

# UNIVERSIDAD DE CUENCA



**Facultad de Ciencias Químicas  
Carrera de Bioquímica y Farmacia**

**“DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DEL  
POLIMORFISMO 2548G>A DEL GEN DE LA *LEPTINA* EN LA CIUDAD DE  
CUENCA-ECUADOR.”**

Trabajo de titulación previo a la obtención  
del Título de Bioquímico Farmacéutico

**Autoras:**

María Elizabeth Alvarado León

CI: 1104829740

Karla Paola Alvarracín Morocho

CI: 0105769988

**Director:**

Dr. Fausto Leonardo Zaruma Torres, PhD.

CI: 1102127980

Cuenca – Ecuador

2018



## RESUMEN

Debido a la falta de investigaciones de genética que evalúen la distribución poblacional a nivel nacional y conociendo que diversos estudios han indagado la asociación de este polimorfismo con enfermedades crónicas; el objetivo de este estudio fue conocer la distribución alélica y genotípica del polimorfismo 2548G>A del gen *LEP* en personas de la ciudad de Cuenca. Se desarrolló a través de un estudio observacional de tipo transversal descriptivo que contó con la aprobación del Comité de Ética para investigaciones en Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito, en el que participaron 106 individuos que acudieron voluntariamente al Laboratorio de Análisis Biológico y Genética de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, previo consentimiento informado. La recolección de datos se realizó mediante entrevista directa con aplicación de encuesta para definir los datos sociodemográficos y características antropométricas de la población; a cada uno se le tomó 5mL de sangre total, posteriormente se procedió a la extracción de ADN y la detección del polimorfismo 2548G>A mediante la técnica de PCR REAL TIME. A pesar de que esta investigación fue descriptiva se pudo asociar con diferentes covariables, esencialmente, por su trascendencia con el estado nutricional.

Las frecuencias alélicas fueron de 63% para el alelo mutado (A) y 37% para el alelo wild type (G); y las genotípicas de 38% G/G, 51% G/A y 11% A/A. La población de estudio se mantuvo en equilibrio de Hardy Weinberg. Se encontró que existía una asociación estadísticamente significativa ( $p=0.028$ ) entre el SNP y la clasificación del estado nutricional bajo un modelo dominante. Para el análisis estadístico se trabajó con un intervalo de confianza del 95% y  $p<0.05$ .

Se determinó que este estudio tiene una distribución semejante a otras poblaciones, y las personas con el alelo raro se encontraron protegidas de desarrollar sobrepeso y/u obesidad en un 60% frente a los que presentaron el alelo silvestre (OR= 0.40, 0.18 -0.93, IC: 95%).

**Palabras clave:** LEPTINA, POLIMORFISMO, OBESIDAD, *LEP* 2548G>A



## ABSTRACT

Due to the lack of genetic research that evaluates the population distribution at a national level and knowing that several studies have investigated the association of this polymorphism with chronic diseases; the objective of this study was to know the allelic and genotypic distribution of the 2548G> A polymorphism of the LEP gene in people from the city of Cuenca. Findings were a result of a cross-sectional descriptive study – of the observational kind - that was approved by the Ethics Committee for Human Research of the San Francisco University of Quito; in which 106 individuals voluntarily participated and visited the Laboratory of Biological and Genetic Analysis of the Faculty of Chemical Sciences, with prior informed consent. Data collection was carried out through direct interviews with survey applications in order to define the sociodemographic data and anthropometric characteristics of the population; 5mL of total blood was drawn from each participant which was used for the extraction of DNA and the [actual] detection of the 2548G> A polymorphism of the LEP gene was conducted using the real-time polymerase chain reaction (REAL-TIME PCR) technique. Although this investigation was descriptive, associations could be made to different covariates, in essence, due to its transcendence with nutritional state.

Allele frequencies were: 63% for the mutated allele (A) and 37% for the wild type allele (G); and the genotypes of 38% G / G, 51% G / A and 11% A / A. The study population remained in Hardy Weinberg's equilibrium. It was found that there was a statistically significant associations ( $p = 0.028$ ) between the SNP and the classification of nutritional state under a dominant model. For the statistical analysis we worked with a confidence interval of 95% ( $p < 0.05$ ).

It was determined that this study has a similar distribution to other populations, and people with the rare allele were protected from being overweight and / or obese by 60% compared to those who presented the wild allele (OR = 0.40, 0.18 -0.93, IC: 95%).

**Keywords:** LEPTIN (LEP), POLYMORPHISM, OBESITY, *LEP 2548G>A*



---

**ÍNDICE DE CONTENIDOS**

RESUMEN..... 2

ABSTRACT ..... 3

ÍNDICE DE CONTENIDOS ..... 4

LISTA DE TABLA ..... 8

LISTA DE FIGURAS..... 9

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA..... 14

DEDICATORIA ..... 14

DEDICATORIA ..... 16

AGRADECIMIENTOS..... 17

1. INTRODUCCIÓN ..... 18

1.1 OBJETIVOS DEL ESTUDIO ..... 19

    Objetivo general ..... 19

    Objetivos específicos..... 19

**CAPITULO 1** ..... 20

2. Marco Teórico ..... 20

2.1 LEPTINA ..... 20

    2.1.1 Descripción molecular de leptina ..... 22

    2.1.2 Receptor de leptina ..... 23

    2.1.3 Mecanismo de acción de la leptina..... 26

    2.1.4 Mecanismo de señalización de la leptina..... 27

2.2 LEPTINA IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS Y CLÍNICAS ..... 29

    2.2.1 Leptina y páncreas endocrino..... 29

    2.2.2 Función en el control del inicio de la pubertad y la reproducción ..... 29



---

2.2.3	Función como factor de crecimiento y relación con el cáncer .....	30
2.2.4	Leptina y función inmune.....	30
2.2.5	Asociaciones de leptina y enfermedades psiquiátricas .....	30
2.2.6	Leptina, hueso y cartílago.....	31
2.2.7	Leptina y sistema cardiovascular .....	31
2.3	ESTRUCTURA DEL ADN Y POLIMORFISMOS GENÉTICOS .....	32
2.3.1	Organización del ADN .....	32
2.3.2	Definición de los polimorfismos .....	33
2.3.3	Descripción de los polimorfismos .....	34
2.3.4	Tipos de polimorfismos.....	34
	.....	37
2.3.5	Aplicaciones de los polimorfismos de ADN.....	37
2.4	POLIMORFISMO LEP G-2548A.....	38
<b>CAPITULO 2</b>	.....	<b>40</b>
3.	Materiales y Métodos.....	40
3.1.1	Tipo de estudio.....	40
3.1.2	Universo de Estudio .....	40
3.1.3	Área de estudio .....	40
3.2	Muestreo .....	40
3.2.1	Fórmula.....	41
3.2.2	Criterios de selección .....	42
3.2.3	Variables .....	42
	Variable Independiente.....	42
	Variables Intervinientes .....	42
3.3	Procedimientos.....	42
3.3.1	Peso en kilogramos (kg).....	42



---

3.3.2 Estatura en metros (m) .....	43
3.3.3 Flebotomía .....	43
3.3.4 Extracción de ADN .....	43
3.3.5 Amplificación de ADN mediante la técnica PCR-tiempo real.....	48
3.3.6 Estandarización de la técnica de PCR Real Time.....	49
3.3.7 Determinación del Polimorfismo .....	50
3.3.8 Interpretación de resultados .....	52
3.3.9 Análisis estadístico .....	52
3.3.10 Equilibrio de Hardy-Weinberg .....	52
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>53</b>
4. Resultados y Discusión.....	53
4.1 Descripción de las características antropométricas y sociodemográficas de la población estudiada.....	53
4.2 Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo 2548G>A del gen de <i>leptina</i> en los grupos de estudio. ....	54
4.3 Equilibrio de Hardy Weinberg .....	54
4.4 Asociación del polimorfismo <i>LEP</i> 2548G>A con los diferentes parámetros antropométricos.....	55
4.4.1 Asociación del polimorfismo <i>LEP</i> 2548G>A con la clasificación del IMC .....	55
4.4.2 Asociación del polimorfismo <i>LEP</i> 2548G>A con el Estado Nutricional.....	56
4.4.3 Asociación de la obesidad con todas las variables mediante regresión logística. ....	56
4.5 Discusión.....	57
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>62</b>
5. Conclusiones y Recomendaciones .....	62
Conclusiones.....	62



---

Recomendaciones.....	63
BIBLIOGRAFIA.....	64
ANEXOS .....	70



## LISTA DE TABLA

<b>Tabla 1:</b> Criterios de inclusión y exclusión para los participantes. ....	42
<b>Tabla 2:</b> Componentes PureLink® Genomic DNA Mini Kit de INVITROGEN para 50 extracciones. ....	44
<b>Tabla 3:</b> Materiales y equipos para la extracción de ADN.....	47
<b>Tabla 4:</b> Condiciones para la reacción de amplificación .....	49
<b>Tabla 5:</b> Condiciones de dilución para las muestra y la sonda Taqman® .....	50
<b>Tabla 6:</b> Materiales y equipos para el desarrollo de qPCR .....	51
<b>Tabla 7:</b> Datos sociodemográficos de los participantes. ....	53
<b>Tabla 8:</b> Frecuencias Genotípicas y alélicas del polimorfismo LEP 2548G>A. ....	54
<b>Tabla 9:</b> Equilibrio de Hardy Weinberg .....	55
<b>Tabla 10:</b> Asociación del polimorfismo LEP 2548G>A con el IMC. ....	55
<b>Tabla 11:</b> Asociación del polimorfismo LEP 2548G>A con el Estado nutricional. ....	56
<b>Tabla 12:</b> Asociación de la obesidad con todas las variables de estudio. ....	56





**LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1:** Ratón obeso (ob) (derecha) comparado con un ratón normal (izquierda)..... 20

**Figura 2:** Representación esquemática del experimento parabiótico en roedores en el laboratorio de Coleman, en 1973..... 21

**Figura 3:** Descripción molecular del gen LEP, y estructura tridimensional de la proteína leptina..... 23

**Figura 4:** Localización del gen receptor de la Leptina.. ..... 24

**Figura 5:** Las distintas isoformas del receptor de leptina..... 25

**Figura 6:** Mecanismo de acción de la leptina. .... 26

**Figura 7:** Mecanismos de señalización de la leptina ..... 28

**Figura 8:** Organización del genoma humano según su estructura y función..... 33

**Figura 9:** Polimorfismo SNP. Representación del cambio de una base por otra..... 35

**Figura 10:** Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción (RFLP).. ..... 36

**Figura 11:** Repeticiones en tándem de la secuencia..... 37

**Figura 12:** Proceso de extracción de ADN.. ..... 45

**Figura 13:** Procedimiento del lisado de células para la extracción de ADN..... 46

**Figura 14:** Procedimiento para la purificación y lavado de células para la extracción de ADN..... 46

**Figura 15:** Procedimiento de la fase de recuperación de ADN o elución y almacenamiento del ADN ..... 47

**Figura 16:** Discriminación alélica..... 51

**Figura 17:** Baño María VORTEMP 56 EVC usado en el proceso de extracción de ADN. 71

**Figura 18:** Autoclave horizontal digital Tuttnauer® 2540EK..... 71

**Figura 19:** Micro centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415R ..... 71

**Figura 20:** Cabina de Flujo Horizontal Telstar AH-100 ..... 71

**Figura 21:** LightCycler Nano 1.0.7..... 71

**Figura 22:** Análisis Endpoint de LightCycler Nano. .... 71



**Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional**

---

Karla Paola Alvarracín Morocho, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DEL POLIMORFISMO 2548G>A DEL GEN DE LA *LEPTINA* EN LA CIUDAD DE CUENCA-ECUADOR.", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 16 de mayo de 2018.

Karla Paola Alvarracín Morocho

C.I: 0105769988



---

**Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional**

---

María Elizabeth Alvarado León en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DEL POLIMORFISMO 2548G>A DEL GEN DE LA *LEPTINA* EN LA CIUDAD DE CUENCA-ECUADOR.", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 16 de mayo de 2018.

---

María Elizabeth Alvarado León.

C.I: 1104829740



---

Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Karla Paola Alvarracín Morocho, autora del trabajo de titulación, "DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DEL POLIMORFISMO 2548G>A DEL GEN DE LA *LEPTINA* EN LA CIUDAD DE CUENCA-ECUADOR", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 16 de mayo de 2018.

---

Karla Paola Alvarracín Morocho

C.I: 0105769988



---

Cláusula de Propiedad Intelectual

---

María Elizabeth Alvarado León, autora del trabajo de titulación, "DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DEL POLIMORFISMO 2548G>A DEL GEN DE LA *LEPTINA* EN LA CIUDAD DE CUENCA-ECUADOR", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 16 de mayo de 2018.

---

María Elizabeth Alvarado León

C.I: 1104829740



---

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

<b>aa:</b>	Aminoácido
<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>bp:</b>	Pares de bases
<b>C/EBP<math>\alpha</math>:</b>	Proteína unida a incrementadores CCAAT de tipo alfa
<b>CRH:</b>	Hormona liberadora de corticotropina.
<b>db/db:</b>	Gen diabético de ratón.
<b>DMNID</b>	Diabetes mellitus no insulino dependiente
<b>HWE:</b>	Equilibrio de Hardy Weinberg
<b>IMC:</b>	Índice de Masa Corporal.
<b>JaK2:</b>	Janus kinase 2.
<b>JAK-STAT:</b>	Janus quinasa –Transductor de la Señal y Activador de la Transcripción
<b>LEP:</b>	Leptina
<b>LEPR:</b>	Receptor de leptina
<b>ng/ml:</b>	Nanogramos por mililitro
<b>NO:</b>	Óxido nítrico
<b>NPY:</b>	Neuropéptido Y
<b>ob/ob:</b>	Gen obeso de ratón
<b>Pi3K:</b>	Fosfatidilinositol- 3-kinasa
<b>POMC:</b>	Proiomelancortina
<b>PPAR<math>\gamma</math>:</b>	Proliferadores de peroxisomas tipo gamma
<b>qPCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
<b>RFLP:</b>	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
<b>SNPs:</b>	Polimorfismo de un único nucleótido
<b>SOCS-3:</b>	Supresor de la señalización por citosinas- 3
<b>STAT 3:</b>	Transductor de señal y activador de transcripción 3
<b>VNTR y STR:</b>	Polimorfismos en el número de repeticiones en tándem



---

## DEDICATORIA

*Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.*

*Albert Einstein.*

**A Dios y a la Virgen del Cisne**, quienes han sido mi guía, fortaleza y su mano de fidelidad y amor para concluir con éxito esta meta tan anhelada.

**A mis padres** Vinicio Alvarado y Elsa León, por ser el pilar más importante, ya que siempre estuvieron a mi lado brindándome su apoyo incondicional, inculcando en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades porque Dios está conmigo siempre.

**A mi hermana**, por sus palabras de apoyo y compañía que siempre me brindó en el transcurso de mi carrera.

**A toda mi familia** porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a mi **amiga Karla**, por apoyarme cuando más la necesitaba, por extender su mano en momentos difíciles y por el amor brindado cada día.

**María Alvarado León.**



## DEDICATORIA

La intención, por encima de todo...

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica... la voluntad”*

*Albert Einstein.*

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

A mi hija Renata por ser mi gran motivación para seguir adelante y no dejarme vencer por los obstáculos de la vida.

A mi amiga María por su inmensa paciencia y apoyo incondicional, y lucha por cumplir una meta más en mi vida.

A mi abuelita, Guadalupe quien me enseñó el significado de la perseverancia. A ti mi viejita querida que desde el cielo me cuidas.

**Karla Alvarracín Morocho**





## AGRADECIMIENTOS

Al finalizar nuestra tesis primeramente agradecemos a Dios por habernos guiado a lo largo de nuestra carrera, por ser la fortaleza en los momentos de debilidad, y por bendecirnos en cada paso que hemos dado en nuestra vida estudiantil, permitiéndonos vencer cada obstáculo que se nos presentaba.

Nuestro eterno agradecimiento de manera especial y sincera al Dr. Fausto Zaruma Torres, PhD., tutor de nuestro trabajo de titulación, quien con su profesionalismo y don de persona nos supo guiar de la mejor manera hasta la conclusión del trabajo investigativo. De igual manera agradecemos a la Dra. Alejandra Neira, PhD., y a la Lic. Lourdes Viñansaca por su apoyo y confianza en nuestro trabajo y su capacidad para guiar cada paso de nuestra practica para el desarrollo del presente proyecto.

En este arduo trabajo, hemos tenido la oportunidad de contar con el apoyo de personas grandiosas, quienes con su amabilidad y conocimientos llegaron a ser un eje fundamental, por ello nuestra más sincera gratitud hacia la Dra. Inés Malo, PhD., Dra. Mónica Espadero, y el Ing. Pablo Arévalo, PhD., por compartir sin reserva sus conocimientos.

A nuestros familiares, compañeros y amigos que con su apoyo y ánimo impulsaron a la culminación de nuestro Proyecto de Tesis.

De igual forma esto no habría sido posible sin la colaboración y apoyo brindado por el personal de la Universidad de Cuenca y la Universidad Politécnica Salesiana de Cuenca, grandes instituciones que supieron abrirnos las puertas en el transcurso de este proyecto y darnos la oportunidad de obtener un título de tan distinguida institución.



---

## 1. INTRODUCCIÓN

El estudio de los polimorfismos genéticos (SNP's-Single Nucleotide Polymorphisms-Polimorfismo de un solo Nucleótido), tiene muchas aplicaciones en medicina, investigaciones biológicas y procesos jurídicos. Por lo que su análisis permite identificar genes que pueden predisponer al desarrollo de enfermedades, e incluso detectarlas antes que se presenten (Vázquez, 2009).

Las enfermedades de origen genético son el ejemplo más claro que indica que la variación genética afecta a la salud. Se sabe que aproximadamente el 99,9% de la secuencia del ADN de dos individuos diferentes es la misma y que solo una porción significativa del 0,1% constituye las diferencias fenotípicas y/o susceptibilidades a desarrollar enfermedades; a este tipo de variaciones genéticas se les llama polimorfismos genéticos, éstas radican principalmente en los SNPs y en menor grado a inserciones, deleciones, secuencias repetidas y/o rearrreglos cromosómicos. Estudios revelan que existen cerca de 10 millones de SNPs, distribuidos por todos los cromosomas humanos, estimándose que su frecuencia media, aunque con grandes variaciones según cromosomas y regiones dentro de ellos; es de un SNP cada 500-1000 nucleótidos (Vázquez, 2009).

La aparición de SNPs en la región no codificante del gen de la *LEP* puede ocasionar un amplio número de procesos patológicos que incluyen cáncer de diversos tipos, enfermedades psiquiátricas, hipertensión arterial, diabetes mellitus no insulino dependiente, trastornos reproductivos, insuficiencia placentaria, inmunodeficiencias y osteoartritis (Caratachea, 2007).

Dada la escasez de estudios que evalúan la distribución poblacional de frecuencias alélicas y genotípicas en investigaciones de genética a nivel nacional y debido a su importancia, se plantea determinar la distribución de polimorfismos del gen de *Leptina*, especialmente el 2548G>A, mismo que tiene consecuencias clínicas sobre el metabolismo en seres humanos e incluso podría resultar útil como indicador del riesgo de enfermedades crónicas (Vázquez, 2009).



## 1.1 OBJETIVOS DEL ESTUDIO

### Objetivo general

Conocer las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo 2548G>A del gen de *Leptina* en la Ciudad de Cuenca-Ecuador.

### Objetivos específicos

- Describir las características sociodemográficas y antropométricas de la población de estudio.
- Identificar y establecer por PCR REAL TIME (qPCR) la frecuencia alélica y genotípica del polimorfismo 2548G>A del gen *LEP* en un grupo de personas de la Ciudad de Cuenca.
- Determinar el equilibrio de Hardy Weinberg como método de probabilidad de distribución genética.
- Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas con las descritas en otras poblaciones.



## CAPITULO 1

### 2. Marco Teórico

#### 2.1 LEPTINA

La historia de la leptina inició en 1950, en el Laboratorio de Jackson, en Bar Harbor, (Maine, EE. UU.), donde obtuvieron de forma casual una colonia de ratones mutantes con hiperfagia, obesidad, letargia e hiperglucemia moderada, con peso tres veces superior al de los ratones normales, por lo que se designó la cepa como ob/ob (**Figura 1**). En 1965, apareció una nueva cepa con hiperfagia y obesidad, pero mostrando una diabetes más acentuada, asociada con hiperlipidemia, que recibió el nombre de db/db. En 1973, en el mismo laboratorio, Douglas Coleman realizó varios experimentos con estas cepas utilizando parabiosis con ratones normales. En el ratón ob/ob desapareció la hiperfagia y la obesidad; sin embargo, en el ratón db/db no encontraron cambios, por lo que se propuso que en los ratones normales circulaba una molécula que regulaba el apetito, y en consecuencia, evitaba la obesidad; así en la mutación ob/ob estaba ausente esa molécula, y en la mutación db/db no existía el receptor cerebral (**Figura 2**) (Valdés et al., 2016), (Manuel, Zárate, & Hernández-Valencia, 2012) (Coleman, 2010).

En diciembre de 1994, el grupo de Jeffrey M. Friedman, del Laboratorio de Genética



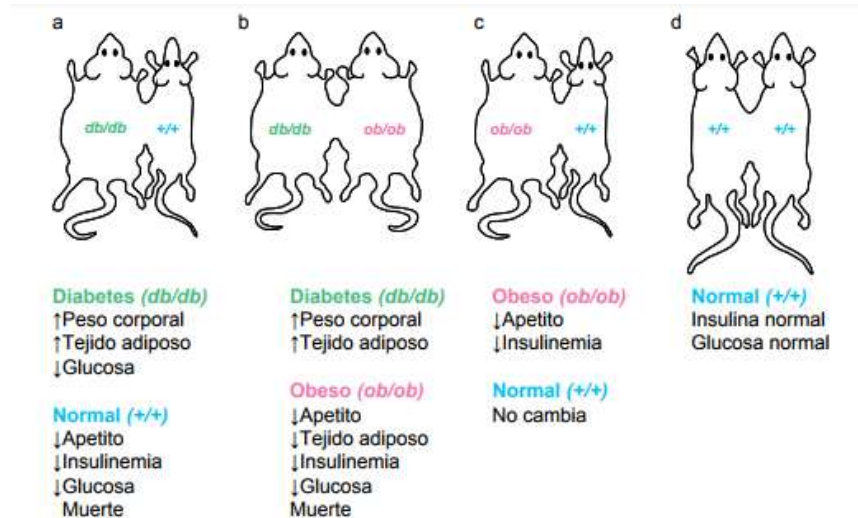
**Figura 1:** Ratón obeso (ob) (derecha) comparado con un ratón normal (izquierda). Tomado de (Manuel et al., 2012)

Molecular de la Universidad Rockefeller de Nueva York, anunció que había conseguido localizar la mutación genética en el brazo largo del cromosoma 6; a continuación pudo clonar el gen denominado ob y, de esta manera, pudieron identificar la leptina del griego “leptos” que significa delgado, por su función en el control del peso corporal. En los meses

posteriores, este mismo grupo demostró que tal hormona era indispensable para mantener la lipostasia y evitar la obesidad, y que los ratones mutantes obesos adelgazaban cuando se les inyectaba la proteína OB (Manuel et al., 2012).



En el siguiente año, otro grupo de científicos informaron el aislamiento del gen del receptor de leptina (*LEPR*) y se confirmó que la mutación en el ratón *db/db* estaba en este gen (Coleman, 2010) (Denver, Bonett, & Boorse, 2011).



**Figura 2:** Representación esquemática del experimento parabiótico en roedores en el laboratorio de Coleman, en 1973. Tomado de (Valdés et al., 2010)

La leptina se produce casi de manera exclusiva en el tejido adiposo y circula acompañada de una proteína que es similar al receptor que se encuentra en el núcleo arcuato del cerebro, que es el sitio en donde suprime el apetito, por otra parte, estimula la termogénesis periférica. Por consiguiente, tanto la ausencia de síntesis de leptina como la de su receptor producen el mismo efecto fenotípico y metabólico en animales y en el humano (Valdés et al., 2016),(Coll, Farooqi, & O’Rahilly, 2007).

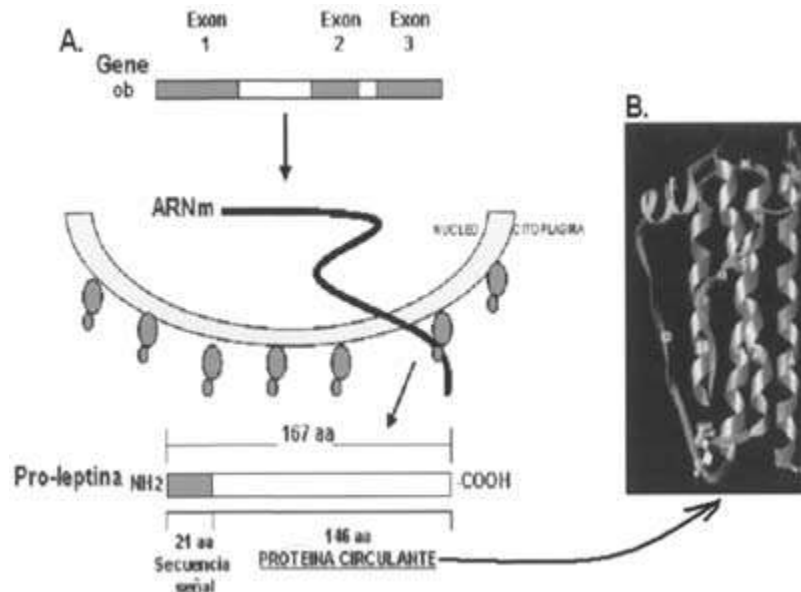
La leptina es una citocina, que además de regular el gasto calórico y la ingesta; también tiene diversas funciones en los sistemas inmunitario y endocrino, que incluyen la reproducción, la homeostasis de la glucosa, la hematopoyesis, la angiogénesis, la osteogénesis, y la inflamación. De tal manera que pacientes con deficiencia o resistencia de leptina son severamente obesos y tienen hiperglucemia, resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia, hipogonadismo hipogonadotrópico e hipotiroidismo central (Paz-Filho et al., 2012),(Almanza-Pérez, Blancas-Flores, García-Macedo, Alarcón-Aguilar, & Cruz, 2008).



Sus niveles son mayores en mujeres que en hombres tras ajustar el IMC; puesto que se correlaciona con la masa grasa, lo que sugiere que los niveles de leptina aumentan de forma exponencial con el aumento de la masa grasa. Así, en circunstancias basales la concentración sérica de leptina se mantiene en un intervalo de 3-15 ng/ml en personas con normopeso, pero los niveles se elevan en el sobrepeso u obesidad y se pueden encontrar valores de 30 ng/ml o incluso superiores (Valdés et al., 2016),(Paz-Filho et al., 2012).

### 2.1.1 Descripción molecular de leptina

La leptina una hormona proteica que tiene su origen en un precursor de 167 aa (aminoácidos) del que se separa un péptido señal de 21 residuos de aminoácidos que se escinde antes de pasar al torrente sanguíneo, de tal forma que al separarse los 21 aa del precursor originan la leptina activa, por lo tanto, la proteína madura procesada corresponde a 146 aa. Su peso molecular es de aproximadamente 16 kDa y su estructura terciaria contiene un haz de cuatro hélices que se asemeja al de la familia de las citocinas de clase I, y un puente disulfuro entre las cisteínas en posición 96 y 146, siendo este último necesario para la actividad biológica de la hormona. La leptina humana tiene una homología de aproximadamente 84% con la de ratón y 83% con la de rata, el gen que codifica a la proteína se denomina *ob* y en los humanos el homólogo del gen *ob* se denomina *LEP*. El gen *LEP* consta de 650 kb y consiste de tres exones separados por dos intrones; la región codificadora de la proteína se localiza en el exón 2 y 3 (**Figura 3**) y se localiza en el cromosoma 7 y el del ratón en el cromosoma 6, ambos en la región 31.3 del brazo q, la longitud de este gen es de 3420 bp. (Hernández et al., 2006),(Almanza-Pérez et al., 2008),(Diez, 2011).



**Figura 3:** Descripción molecular del gen LEP. A) Representación esquemática del gen de leptina, compuesto por tres exones y dos intrones, que da origen a una proteína proleptina integrada por 167 residuos de aminoácidos y una proteína circulante de 146 aminoácidos. B) Estructura tridimensional de la proteína leptina en su forma circulante, compuesta por cinco cadenas principales en forma de hélice Tomado de (Almanza Pérez et al., 2008).

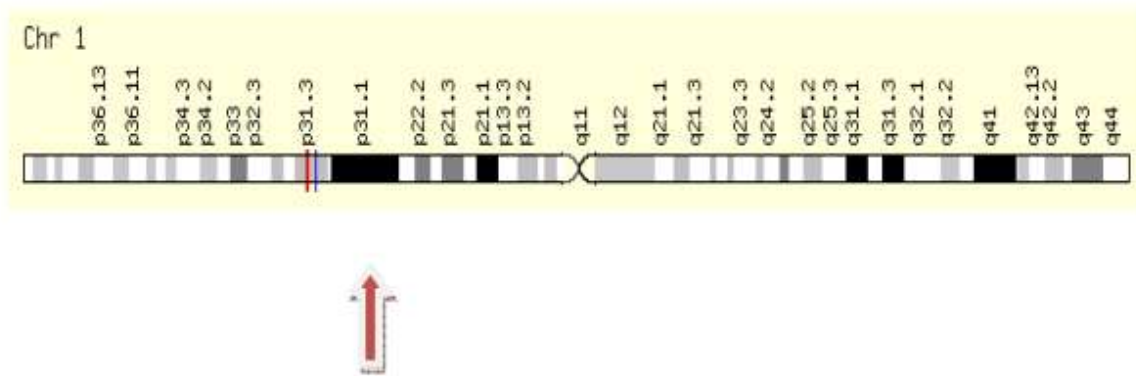
La expresión del gen de la leptina está regulada negativamente por el receptor activado por proliferadores de peroxisomas tipo gamma (PPAR $\gamma$ ) y positivamente por la proteína unida a incrementadores CCAAT de tipo alfa (C/EBP $\alpha$ ), proteína con un rol fundamental en el control de la proliferación y diferenciación celular, el metabolismo, inflamación y numerosas otras respuestas, particularmente en hepatocitos, adipocitos y células hematopoyéticas. La C/EBP $\alpha$  induce la expresión del gen, mientras que PPAR $\gamma$  además de regular la diferenciación del adipocito, también dirige una respuesta sistémica que consiste en un decremento en los niveles de leptina y, a su vez, en el consumo de alimento, que servirá de sustrato para el almacenamiento de grasa en los adipocitos (Almanza Pérez et al., 2008), (Mongil, 2016).

### 2.1.2 Receptor de leptina

En 1994, se identificó el receptor de la leptina también llamado LEPR u OBR y se demostró que su dominio extracelular era estructuralmente parecido al de los receptores



de citocinas de clase I; el gen que codifica para esta proteína en el humano, se encuentra localizado en el cromosoma 1 en la región 1p31. Su estructura genómica está formada por 20 exones; 18 de los cuales son codificantes y otros dos variables que no se traducen. Los exones 19 y 20 codifican el dominio intracelular variable. El gen completo tiene un peso de 70Kb.(Vázquez, 2009)



**Figura 4:** Localización del gen receptor de la Leptina. Tomado de (Vázquez, 2009).

En 1996, se reportó la presencia de las isoformas del LEPR en el ratón producidas por splicing alternativo. En el humano LEPR presenta 6 isoformas: (LEPRa, LEPRb, LEPRc, LEPRd, LEPRE y EPRf), todas ellas tienen distinto número de aminoácidos (señalado entre paréntesis) y comparten los dominios extracelular y transmembrana, la excepción es LEPRE, que carece del dominio transmembrana y se encuentra soluble en la circulación. Actualmente, se sabe que existen tres formas: la forma corta (LEPRa, LEPRc, LEPRd, y EPRf), la forma soluble (LEPRE) y la forma larga (LEPRb) (Vela, 2006),(Goldenberg, Santos, Hodgson, & Cortés, 2014),(Almanza-Pérez et al., 2008),(Vázquez, 2009).

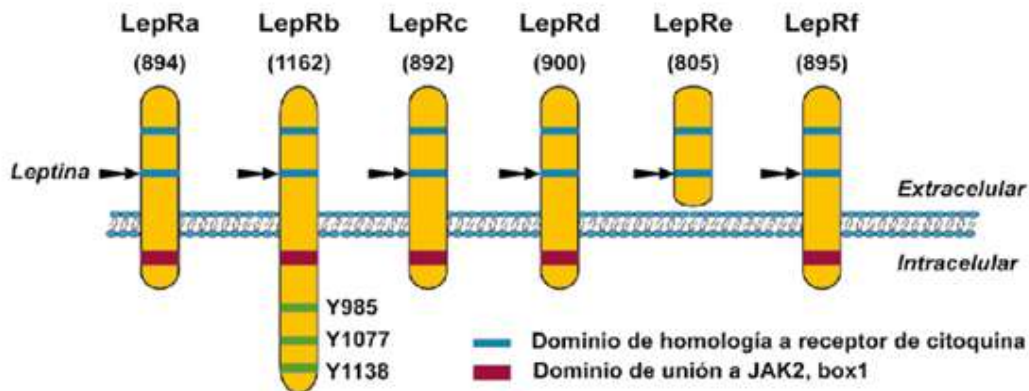
LEPRb u OBRb es la isoforma más larga y es la única que tiene los elementos estructurales necesarios para la activación de cascadas de señalización intracelular, en particular los residuos tirosina (Y) 985, 1077 y 1138, esenciales para la interacción con otras proteínas intracelulares, se ha identificado en múltiples regiones cerebrales y también en tejidos periféricos como el hígado, el páncreas y el músculo estriado. En el cerebro, las regiones fundamentales en las que se ha encontrado están asociadas a la regulación del comportamiento alimentario y de la regulación y equilibrio energético. Sin embargo, en el tejido periférico, parece que el receptor predominante es del tipo corto





(Ra). En órganos como intestino, pulmón y riñón es donde se encuentran estos receptores los cuales se han implicado en el aclaramiento de la leptina o bien en acciones distintas a las de la activación del Jak-Stat. El receptor de la leptina carece de actividad enzimática en su dominio intracelular. En vez de ello, está ligado a miembros de la familia de las quinasas janus (Jak), que pertenecen a una clase de tirosin-quinasas (Goldenberg et al., 2014),(Almanza-Pérez et al., 2008).

De manera general todas las isoformas de LEPR tiene en común: una región extracelular de 818 aminoácidos, una región transmembrana de 23 aminoácidos y una región intracelular donde existen dos tipos de dominios: el no variable de 34 aminoácidos y otro variable, lo que permite las isoformas. En el caso de LEPRb, este dominio tiene 3 secuencias consenso llamadas Box1, 2 y 3 involucradas en la interacción JAK/STAT (Vázquez, 2009), (Sánchez, 2005).

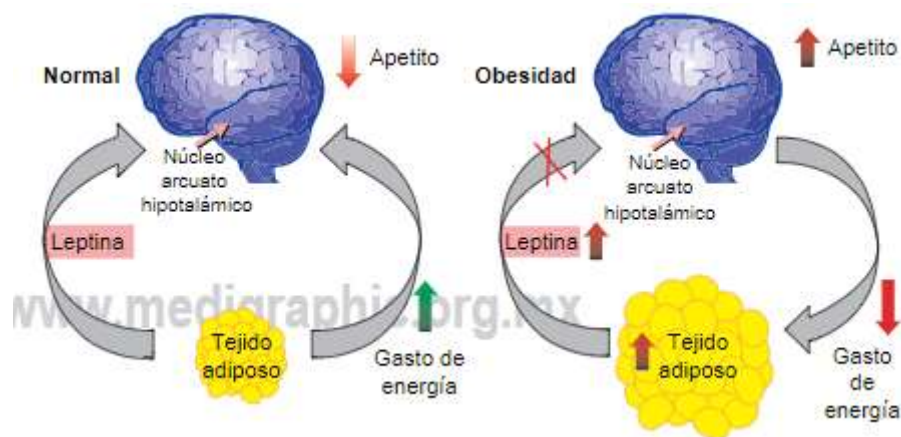


**Figura 5:** Las distintas isoformas del receptor de leptina, todas ellas tienen distinto número de aminoácidos (señalado entre paréntesis) y comparten los dominios extracelular y transmembrana, excepto la LepRe que se encuentra soluble en la circulación. La LepRb es la isoforma más larga y la única que tiene elementos para la activación de cascadas de señalización intracelular. Tomado de (Sánchez, 2005).

### 2.1.3 Mecanismo de acción de la leptina

La leptina es secretada y sintetizada exclusivamente por el adipocito como respuesta a la alimentación para así suprimir el apetito a través de una acción vía hipotalámica. La leptina atraviesa la barrera hematoencefálica para presentar su acción central e interactuar con sus receptores hipotalámicos en neuronas de varios núcleos: arcuato, paraventricular y ventromediano. El principal sitio de acción en el hipotálamo es el núcleo arcuato, el cual comprende dos poblaciones de neuronas: la primera libera el neuropéptido Y y representa la vía orexigénica (inductora del apetito); la segunda sus neuronas secretan proopiomelanocortina (POMC) y representa la vía anorexigénica (inductora de saciedad) (Paz-Filho et al., 2012), (Sánchez, 2005).

A partir de esto la leptina inhibe la vía orexigénica y estimula la anorexigénica por lo que disminuye la ingesta de alimentos y por lo tanto el peso corporal, aumento de oxidación de grasa y el gasto energético favoreciendo así el adelgazamiento (Acosta Hernández, Ramos Morales, Escobar Henríquez, López Muñoz, & Escobar Castillo, 2015).



**Figura 6:** La leptina producida en el adipocito regula el apetito a nivel cerebral y estima el gasto energético. A la derecha se muestra la diferencia cuando existe exceso de tejido adiposo. Tomado de (Acosta Hernández et al., 2015).



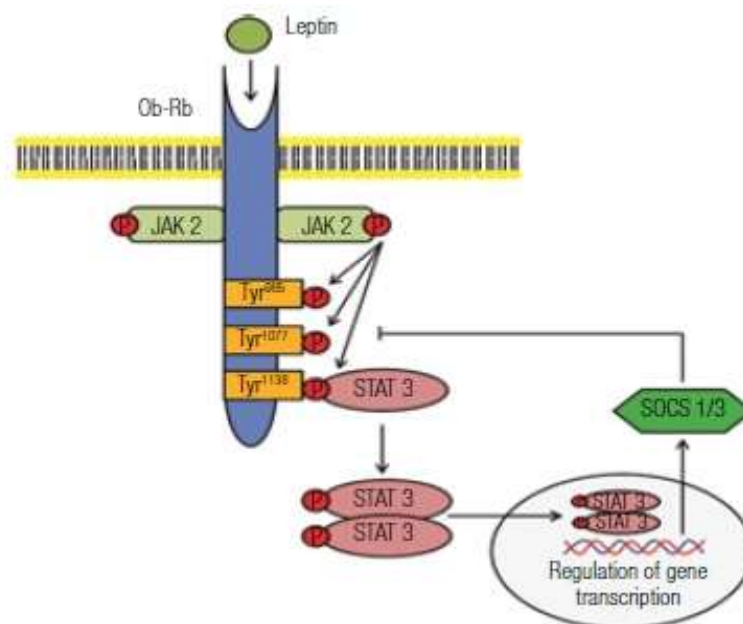
#### 2.1.4 Mecanismo de señalización de la leptina

La señalización intracelular se inicia con la unión de leptina al receptor Ob-Rb que se encuentran localizados en el hipotálamo, estos receptores carecen de actividad enzimática, por lo que se asocia con el sistema JAK-STAT (Janus quinasa –Transductor de la Señal y Activador de la Transcripción). Las JAK son una familia de tirosina quinasas intracelulares que se activan, principalmente, por receptores de tipo citoquina (Almanza-Pérez et al., 2008) (Paz-Filho et al., 2012).

El Ob-Rb, activa preferencialmente a JAK2 e induce la autofosforilación del complejo leptina-ObRb-JAK2. Se inicia, así, una cascada de fosforilaciones en la que intervienen diversos sistemas enzimáticos; entre ellos, JAK2, que como todas las tirosina quinasas, fosforila a las proteínas con dominios SH2. Estas proteínas pertenecen a tres familias diferentes (Almanza-Pérez et al., 2008), (Paz-Filho et al., 2012): a) constituidas por las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), b) comprenden las proteínas STAT3, que una vez fosforiladas se translocan al núcleo, donde funcionan como reguladoras transcripcionales y c) grupo de proteínas asociado al sistema Lep-Rb-JAK2 e incluye las IRS (sustrato receptor de insulina), pertenecientes, a su vez, al grupo de proteínas acopladoras (Almanza-Pérez et al., 2008).

Una vez que la leptina se une a su receptor se produce un cambio conformacional debido a la activación de las JAKs; la activación de las JAKs dependientes de leptina lleva consigo dos consecuencias principales: la primera es la transfosforilación de las cinasas JAKs y la segunda es la posterior fosforilación de ciertos residuos de tirosina en el citoplasma del receptor de leptina, son estas fosforilaciones las que proveen un sitio de anclaje para otras moléculas, entre las que se encuentran el factor de transcripción STAT (transductor de señales y activador de la transcripción). La fosforilación de STAT culmina con la disociación del receptor y la translocación al núcleo para regular la expresión de genes diana, como es el gen *ob*. La señalización de la leptina puede ser bloqueada por el supresor de la señalización por citosinas- 3 (SOCS-3) (Paz-Filho et al., 2012). Esta molécula es miembro de la familia de proteínas con dominio SH2 (dominios que contienen sitios específicos de unión para residuos de tirosina fosforilados). Los SOCS-3 funcionan uniéndose a JAK2 solo si la leptina se encuentra presente, la unión de SOCS-3 con JAK2 inhibe la autofosforilación

de la cinasa y la fosforilación del receptor, por la función que desempeña como inhibidor de la señalización de la leptina, el SOCS-3 es responsable de la resistencia a la leptina como se explica a continuación: cuando los niveles de leptina están permanentemente elevados en la sangre, la hormona induce la expresión genética de SOCS3 a través de STAT3. El producto proteico de SOCS3 es capaz de interaccionar entonces con el residuo fosforilado Y985 de OBRb y con JAK2 bloqueando la señalización activada por leptina (Vela, 2006), (Fuentes Teresa, 2010), (Paz-Filho et al., 2012).



**Figura 7:** La leptina se une al receptor de la leptina (Ob-Rb) y activa la tirosina quinasa 2 de la familia Janus (JAK2) mediante autofosforilación o cruzada. JAK-2 luego fosforila los otros residuos de tirosina, que actúan como sitios para la unión de moléculas de señalización intracelular. Transductor de señal y activador de transcripción 3 (STAT3) es un sustrato de JAK2 y posteriormente se une al fosforilado. STAT-3 experimenta dimerización y se transloca en el núcleo de la célula para funcionar como un promotor para la transcripción génica. Los miembros de la familia SOCS (SOCS1 Y SOCS3) suprimen la acción de la leptina uniéndose a JAK-2 y residuos de tirosina. Tomado de (Paz-Filho et al., 2012).



---

## 2.2 LEPTINA IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS Y CLÍNICAS

### 2.2.1 Leptina y páncreas endocrino

Las interacciones entre la leptina y la insulina han sido estudiadas, debido por una parte a la coexistencia de estados de resistencia a insulina y a leptina en individuos obesos y por otra, a la clara asociación entre obesidad y diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID) (Botella Carretero, Barbancho, Valero González, & Varela Dacosta, 2001).

La DMNID se caracteriza por un estado severo de resistencia a la insulina asociado con hiperglicemia, lo que ha permitido postular a la leptina como la responsable de las relaciones entre obesidad y resistencia a la insulina y entre obesidad y DMNID.

La acción de la leptina sobre la secreción de la insulina se realiza de forma indirecta a través de la estimulación simpática. La insulina al unirse a su receptor, activa la tirosinquinasa (TK) que a su vez favorece la entrada de glucosa en la célula aumentando la expresión de los transportadores de glucosa (GLUT-4). También, aumenta la actividad de la lipoprotein-lipasa (LPL) favoreciendo la lipogénesis (Morales Clavijo, Garcés, & F, 2010).

### 2.2.2 Función en el control del inicio de la pubertad y la reproducción

Desde hace más de 40 años se sabía que la mayoría de los ratones ob/ob son estériles y que recuperan la fertilidad tras el tratamiento con leptina (Sánchez, 2005).

El nivel circulante de leptina es mayor en mujeres que en hombres a lo largo de toda la vida, aunque esta diferencia es más notoria después de la pubertad. Esto se debe a que, en la mujer los depósitos de grasa tienden a ser mayores que en el hombre, aún después de ajustar las concentraciones de leptina a la cantidad de grasa corporal y a la acción de los estrógenos. La testosterona en cambio, tiende a disminuir la leptinemia, afirmación consistente con los hallazgos de Ahmed et al. quienes observaron un aumento en la leptina con el inicio de la pubertad femenina y una disminución en los varones. Por tanto, si no existiera una cantidad suficiente de tejido adiposo para producir una cierta cantidad crítica de leptina, la pubertad no ocurriría, fenómeno frecuente en atletas y en mujeres desnutridas con masa grasa muy escasa o ausente (Sánchez, 2005), (Puigdevall Gallego, Laudo Pardos, & Ferrández Longas, 1998)



---

### **2.2.3 Función como factor de crecimiento y relación con el cáncer**

La leptina actúa como un mitógeno importante durante el proceso de angiogénesis, tanto en tejidos normales como neoplásicos. Diferentes estudios han mostrado el poderoso efecto estimulante de la leptina sobre el crecimiento, la proliferación y la migración de las células endoteliales, así como la acción promotora sobre la expresión de varios genes involucrados en la angiogénesis. Es así como estudios preliminares han correlacionado un nivel elevado de leptina con la aparición de diversos tipos de cáncer. Posiblemente, este es el fundamento molecular de las asociaciones epidemiológicas entre la obesidad y el cáncer, establecidas de forma fehaciente en cáncer de seno y de colon (Frühbeck, Salvador, & Díez, 2000).

### **2.2.4 Leptina y función inmune**

La leptina es un modulador de la respuesta inmune, actúa sobre los receptores de células mononucleares y linfoides estimula la producción de citocinas pro-inflamatorias. Si lo hace sobre los receptores ObRb expresados en las líneas celulares NK92 (natural killer) derivadas de linfocitos, la leptina estimula no sólo su proliferación sino también su actividad citotóxica contra células tumorales. En adición, la leptina puede actuar como factor estimulante de los linfocitos T ayudadores. Debido a sus propiedades inmunoestimulantes, se ha planteado que la hipoleptinemia es la causa de la disfunción inmune asociada con desnutrición y con estados inductores de caquexia. (Botella Carretero et al., 2001), (Sánchez, 2005).

### **2.2.5 Asociaciones de leptina y enfermedades psiquiátricas**

Desde hace varios años, los investigadores han intentado relacionar las enfermedades psiquiátricas con la leptina, motivados quizás por las asociaciones establecidas previamente entre algunas de ellas y la obesidad. Algunos estudios han hallado relación entre la hiperleptinemia y entidades tales como: trastorno de personalidad limítrofe, esquizofrenia e intento de suicidio. Otros, han vinculado la hipoleptinemia con la depresión y con el síndrome de estrés postraumático persistente. Aunque los significados fisiopatológico y clínico de tales relaciones aún no están establecido con claridad, la evidencia plantea interesantes premisas a evaluar en investigaciones futuras (Almanza-Pérez et al., 2008)



### 2.2.6 Leptina, hueso y cartílago

Los osteoblastos y los condrocitos expresan ObRb, indicio de la actividad de la hormona dentro de estas células. En roedores y en seres humanos, la leptina aumenta la masa mineral ósea, mientras que in vitro promueve la proliferación y el crecimiento de osteoblastos y condrocitos. Los efectos osteogénicos mencionados son mediados por acciones periféricas directas sobre los osteoblastos. Por otro lado, los ratones ob/ob tienen una mayor densidad ósea, normalizada por administración de leptina, lo que sugiere que la hormona tiene efectos antiosteogénicos, en apariencia mediados por mecanismos centrales hipotalámicos. Aunque la naturaleza exacta de tales mecanismos aún no ha sido dilucidada, se sabe que estimulan al sistema simpático, el que a su vez, actúa sobre los receptores  $\beta 2$  adrenérgicos de la membrana del osteoblasto, con la finalidad de reducir la formación ósea. Estudios han demostrado aumentos en la producción de leptina y en la expresión de sus receptores, en condrocitos de cartílago osteoartrítico, lo que demostró la participación de la hormona en la fisiopatología de la enfermedad (Gómez Quesada, 2010) (Sánchez, 2005).

### 2.2.7 Leptina y sistema cardiovascular

La leptina produce un aumento significativo de la actividad simpática, gracias a su acción central sobre el hipotálamo, posiblemente debido a que estimula la liberación de melanocortina y de la hormona liberadora de corticotropina (CRH). En roedores, la inyección intraventricular de leptina eleva la presión arterial media y la frecuencia cardíaca y aumenta además la actividad simpática renal en forma significativa (Denroche, Huynh, & Kieffer, 2012),(Sánchez, 2005).

Así pues, la leptina es un posible regulador del tono vascular y por ende de la presión arterial, mediante sus efectos centrales sistémicos y periféricos locales. Aunque dichos efectos en apariencia se contrarrestan, pueden llegar a complementarse dentro del proceso de regulación global. Este hecho tendría relevancia en la patogénesis de la hipertensión arterial, que ha sido usualmente asociada con la hiperleptinemia (Almanza-Pérez et al., 2008).



## 2.3 ESTRUCTURA DEL ADN Y POLIMORFISMOS GENÉTICOS

### 2.3.1 Organización del ADN

El ADN es la molécula que contiene toda la información genética del individuo. El conjunto de esta información presente en las células es el denominado genoma y, según su localización, podemos identificar un genoma complejo nuclear y un genoma mitocondrial simple (Alcoceba Sánchez, 2010).

El ADN de todas las especies de organismos conocidas tiene la misma estructura química, sin embargo, cada organismo es diferente a otro; la diferencia se debe al orden de las bases nitrogenadas en la molécula de ADN. El 30% de las secuencias es altamente repetitivo, la que permite establecer patrones genéticos específicos para identificar individuos, es decir, para establecer una huella genética o huella de ADN (Caratachea, 2007).

El genoma humano haploide está constituido por aproximadamente  $3.3 \times 10^9$  pares de bases (pb). Se pueden distinguir dos tipos de ADN, según la función biológica que desempeñen (Alcoceba Sánchez, 2010).



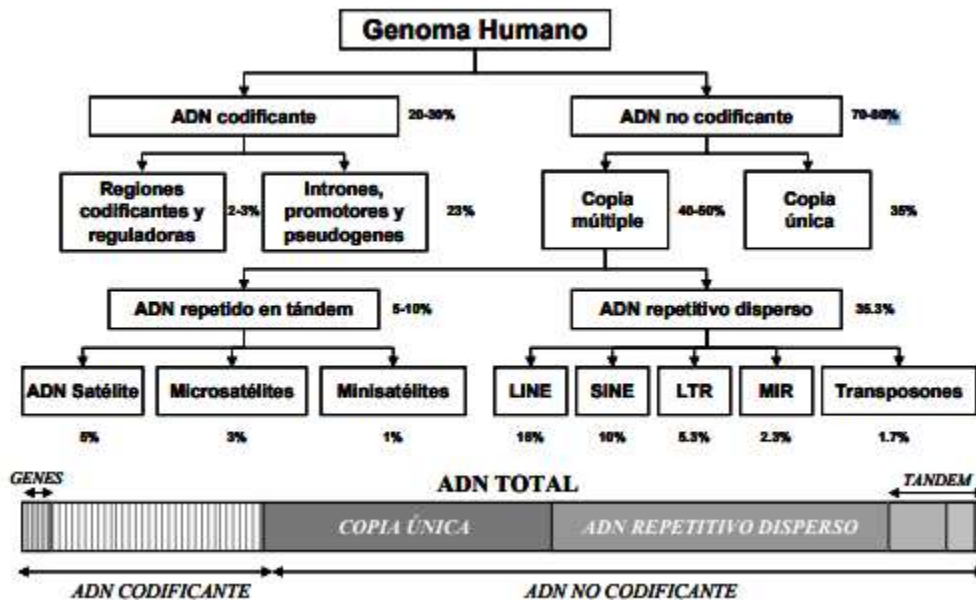


Figura 8: Organización del genoma humano según su estructura y función. Tomado de (Alcoceba Sánchez, 2010).

**El ADN codificante**, existe poca variabilidad individual, exceptuando la región HLA. El margen de variación permitido es muy bajo y los polimorfismos suelen acompañarse de modificaciones fenotípicas. Por ejemplo, si se producen diferentes formas de una proteína, se puede condicionar su función o actividad, bien de forma intrínseca, bien por influencia ambiental (Alcoceba Sánchez, 2010).

**El ADN no codificante**, por el contrario, al no estar sujeto a presión selectiva intensa, puede soportar grandes niveles de variabilidad sin que se produzca una repercusión fenotípica. Esta característica ha convertido a este tipo de ADN en la mayor fuente de investigación de polimorfismos (Alcoceba Sánchez, 2010).

### 2.3.2 Definición de los polimorfismos

Un polimorfismo es una variante genética en la secuencia del ADN entre individuos de la misma especie y que se encuentran en una frecuencia superior al 1% (por debajo de esto, lo llamamos mutación) (Heras Mosquera, 2010), (Alcoceba Sánchez, 2010).

Un polimorfismo puede no tener ningún efecto por localizarse en una región no codificante del ADN, pero si encontramos el polimorfismo en una región codificante o reguladora,



entonces es probable que la presencia del polimorfismo tenga consecuencia en el fenotipo (Alcoceba Sánchez, 2010).

### 2.3.3 Descripción de los polimorfismos

Los alelos son variaciones de la secuencia de ADN presente en un *locus*. Un *locus* se refiere a la posición o localización de un gen en el genoma. Consecuentemente, en una célula diploide cada *locus* está ocupado por dos alelos, uno de origen paterno y otro de origen materno. Por lo tanto, individuos heterocigotos para un *locus* concreto serán aquellos que muestran dos alelos con diferentes secuencias en ese *locus*, e individuos homocigotos serán aquellos que han heredado el mismo alelo (misma secuencia) de cada progenitor.

Dentro de la semejanza entre los individuos de una misma especie, estimada en un 99,9% del genoma humano, existen variaciones individuales en la secuencia del ADN, muchas de ellas neutras, es decir, sin efecto alguno sobre la información genética, debido a que afectan a secuencias no codificantes ni funcionales del ADN. Este 0,1% de variaciones de secuencias de ADN entre individuo; es lo que se conoce como polimorfismos genéticos (Alcoceba Sánchez, 2010), (Heras Mosquera, 2010).

En la práctica, para que un *locus* sea considerado polimórfico el alelo más común de dicho locus debe tener una frecuencia poblacional menor del 99% y, de acuerdo con el principio de Hardy-Weinberg, al menos un 2% de la población debe ser heterocigota para ese locus.

Desde hace casi un siglo se utilizan los polimorfismos genéticos para estudiar las variaciones entre individuos. Son caracteres estables que se transmiten por herencia mendeliana simple y constituyen una expresión de la diversidad genética entre individuos de la misma especie (Heras Mosquera, 2010).

### 2.3.4 Tipos de polimorfismos

Los polimorfismos pueden ir desde la modificación de una sola base hasta cambios en número y/o tamaño en la unidad de repetición:

- Polimorfismos de un solo nucleótido o nucleótido único (SNP).
- Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).



- Polimorfismos en el número de repeticiones en tándem (VNTR y STR).

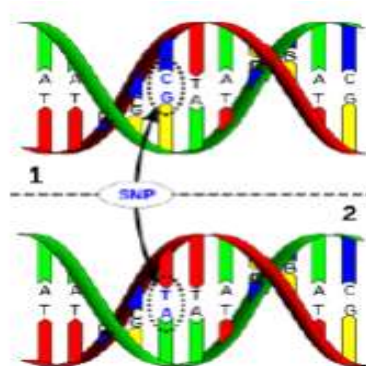
#### 2.3.4.1 Polimorfismos de un solo nucleótido o nucleótido único (SNP).

Los SNP son variaciones en un solo nucleótido o par de bases en una secuencia dada. Pueden estar representados por la delección, inserción o sustitución de una base nitrogenada en la secuencia nucleotídica normal (Ramírez-Bello, Vargas-Alarcón, Tovilla-Zárate, & Fragoso, 2013).

La gran mayoría de los SNPs tienen dos alelos los cuales están representados por una sustitución de base por otra. En las poblaciones, este tipo de alelos se clasifican en alelo principal o “silvestre” y alelo raro o mutante, clasificación basada en la frecuencia observada en las poblaciones. Debido a que los humanos son diploides, un individuo puede tener uno de tres genotipos: homocigoto para el alelo más frecuente, heterocigoto, u homocigoto para el alelo menos frecuente (Caratachea, 2007).

Este tipo de polimorfismo es muy frecuente y es posible que esté presente de manera más cercana en el ADN. Los SNP pueden aparecer tanto fuera de los genes (que no afecten la producción o función de alguna proteína) como en un gen específico, donde pueden ubicarse en regiones codificantes (relacionados con cambios en la cantidad de proteína producidas) o no codificantes (que afectan solo la secuencia de aminoácidos) (Ramírez-Bello et al., 2013).

Las ventajas de un SNP como biomarcadores son básicamente su amplia distribución a través de todo el genoma humano, su frecuencia y su estabilidad; además, debido a su alta frecuencia, muchas enfermedades genéticas están causadas por un SNP o se relacionan con la identificación de un SNP específico (Alcoceba Sánchez, 2010), (Jiménez Sousa, 2011).



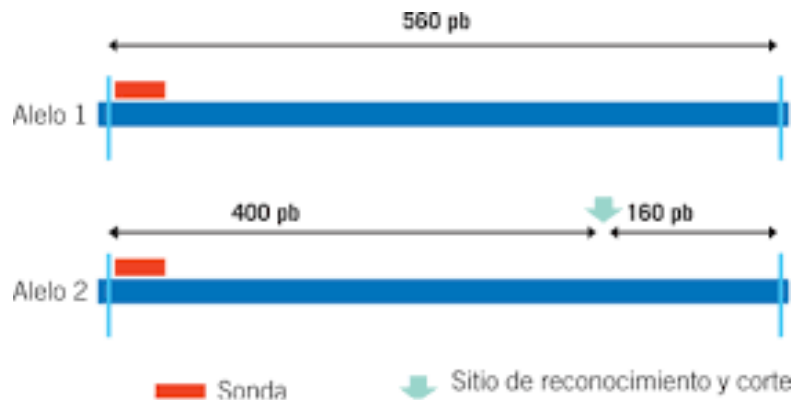
**Figura 9:** Polimorfismo SNP. Representación del cambio de una base por otra. Tomado de (Heras Mosquera, 2010)

### 2.3.4.2 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Los RFLPs expresan las diferencias entre individuos en sitios concretos del ADN mediante el uso de enzimas de restricción. Estas enzimas cortan en secuencias específicas del ADN (denominadas dianas de restricción), dando lugar a fragmentos de tamaños diferentes que pueden hibridar con sondas específicas para poder reconocerlos y ser analizados mediante electroforesis en geles de agarosa (Franco, 2016).

El hecho de que un individuo sea heterocigoto, significa que tiene alelos diferentes en un determinado locus, por lo que al identificar su secuencia en un gel se observará más de una banda. Una para el fragmento sin corte de restricción y otra en el corte (Cheriyedath Susha, 2016).

Este tipo de polimorfismo suele ser difícil de encontrar y sólo permite determinar si se presenta o no un sitio polimórfico en una secuencia específica.



**Figura 10:** Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción (RFLP). Tomado de (Cheriyedath Susha, 2016).

### 2.3.4.3 Polimorfismos en el número de repeticiones en tándem (VNTR y STR)

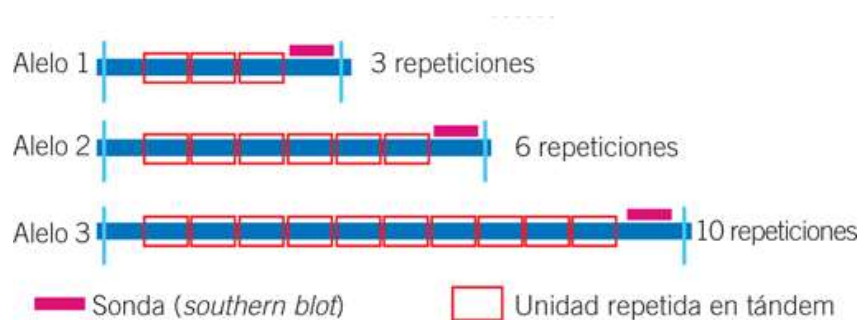
Los VNTR y STR se consideran microsatélites o minisatélites, es decir, *locus* que corresponden a secuencias cortas de ADN (un par o trío de bases), repetidas en bloque o en tándem un número específico de veces (Carracedo, 2010)

Estos polimorfismos, se localizan con frecuencia en regiones intrónicas o no codificantes, su longitud es variable, entre 20 y 100 pb repetidas y su variabilidad es alta dentro de las

poblaciones, lo que permite su uso confiable en la identificación de individuos (Alcoceba Sánchez, 2010).

Una ventaja principal en este polimorfismo es que no está en todo el genoma, o que limita su uso (Franco, 2016), (Alcoceba Sánchez, 2010).

La longitud de estas secuencias puede ser de pocas bases hasta algunas decenas de nucleótidos, y la cantidad de repeticiones determinará la variabilidad de alelos distintos en un mismo locus. Así, en un mismo cromosoma pueden existir regiones con diferente número de repeticiones en la población (Caratachea, 2007)



**Figura 11:** Repeticiones en tándem de la secuencia Tomado de (Wolfgang, 2011).

### 2.3.5 Aplicaciones de los polimorfismos de ADN.

1. Los polimorfismos del ADN que no tienen efecto fenotípico se utilizan para la comprobación de la identidad (huella genética).
2. Los polimorfismos que tienen una contribución mínima o leve a la susceptibilidad frente a ciertos procesos patológicos poseen interés médico especialmente en la prevención de enfermedades complejas.
3. Y los polimorfismos que desempeñan un papel directo en la aparición de una patología son de interés para establecer un diagnóstico o un seguimiento de la enfermedad del paciente, así como para el estudio de los mecanismos moleculares de la enfermedad (Torrades, 2002), (Caratachea, 2007).



## 2.4 POLIMORFISMO LEP G-2548A

*LEP 2548G>A* (rs7799039) es un polimorfismo del gen de *Leptina* de un solo nucleótido (SNP) que consiste en un cambio del alelo guanina (G) por el alelo adenina (A) en el nucleótido -2548 en la secuencia --2560 5' -CGACAGGGTTGC(**G/A**)CTGATCCT- 3'--2540, en el locus 7q31.3 Este polimorfismo, localizado en la región promotora del gen *LEP* influye en la expresión de leptina y por lo tanto, en los niveles de secreción de la hormona en el tejido adiposo (Yang et al., 2016), relacionándose así fuertemente con la hiperleptinemia y predisposición a la resistencia a la leptina en diferentes poblaciones (He et al., 2013),(Sida Medina Raquel, 2010).

El -2548G>A polimorfismo fue descrito por primera vez por Mammès y colaboradores en 1998, quienes analizaron la región promotora del gen de *leptina* en un grupo de franceses caucásicos obesos, concluyendo que la presencia del alelo A en la posición -2548 se asoció con altos niveles de leptina en sangre independientemente del peso corporal. Posteriormente, los mismos autores encontraron que el alelo G estaba asociado a la obesidad ( $p < 0.001$ ) y a niveles más bajos de leptina ( $p = 0.05$ ) (Diez, 2011).

Un estudio realizado en mujeres brasileñas, que el polimorfismo 2548G>A es un importante predictor del incremento de leptina en plasma, así como también del aumento del índice de masa corporal, relacionándose con un riesgo elevado para el desarrollo de obesidad. Mientras que otro estudio no encontró diferencia significativa entre los sujetos obesos y delgados con respecto a la frecuencia genotípica del polimorfismo LEP 2548G>A; realizado en hombres y mujeres brasileñas. En adición a lo anterior, un grupo de investigadores de Chongqing, China, encontraron que la distribución de LEP 2548G>A en la comunidad China, difiere de la mostrada en el área occidental y que la frecuencia del alelo A en pacientes diabéticos, es más elevado que en el grupo control (Carrillo Vazquez et al., 2011), (Sida Medina Raquel, 2010).

Diversos estudios apuntan a una posible asociación entre el polimorfismo -2548 G>A y la obesidad en distintas poblaciones, sin embargo, otros trabajos llevan a una conclusión opuesta; como es el caso en el análisis de las características genéticas, clínicas y de



estilo de vida, de 303 individuos españoles obesos y su grupo control no evidenció ninguna asociación entre este polimorfismo y la obesidad (Carrillo Vazquez et al., 2011).

Los cambios genéticos identificados en el promotor del gen de la leptina; muestra que asociar un polimorfismo al desarrollo de una patología de origen multifactorial, no es algo que pueda definirse fácilmente, debido al fondo genético de cada población y a los factores ambientales. Por lo que, es muy difícil poder considerar estos genes como marcadores moleculares universales de una patología (Carrillo Vazquez et al., 2011).



---

## CAPITULO 2

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1.1 Tipo de estudio

Estudio observacional de tipo transversal descriptivo.

#### 3.1.2 Universo de Estudio

El universo de estudio estuvo constituido por personas mayores de edad, hombres y mujeres de la ciudad de Cuenca que estuvieron interesados en participar en el estudio, que acudieron voluntariamente al Laboratorio de Análisis Biológico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca y firmaron el consentimiento informado, en el horario de 8am a 12am, durante los meses de diciembre y enero. El protocolo utilizado estuvo enmarcado bajo los lineamientos bioéticos contemplados en la Declaración de Helsinki; y fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito, Quito-Ecuador (**ANEXO 4**).

#### 3.1.3 Área de estudio

El desarrollo del estudio se llevó acabo en la ciudad de Cuenca-Provincia del Azuay. Los participantes fueron personas voluntarias de la ciudad de Cuenca. El mantenimiento de las muestras, extracción del ADN y la determinación del genotipo del polimorfismo mediante la técnica de PCR en tiempo real se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular en la Facultad de Medicina de la Universidad de Cuenca.

### 3.2 Muestreo

El muestreo del universo fue probabilístico de tipo aleatorio simple, es decir todos los elementos que forman el universo y que, por lo tanto, están descritos en el marco muestral, tienen idéntica probabilidad de ser seleccionados para la muestra.

El tamaño de muestra fue calculada mediante la fórmula de población finita, de acuerdo al último censo en el año 2010 realizado por el INEC en la Cuidad de Cuenca, que indica que la población es de 505.585 habitantes (INEC 2010) y además, considerando que no





existen estudios en nuestro país de la distribución de este SNP o SNPs similares, se adoptó una prevalencia del 50% para maximizar el tamaño de la muestra, un nivel de significancia de  $\alpha=0,05$ , error  $\beta=0.10$ . Se ajustó el tamaño de muestra considerando posibles pérdidas de un 10% ( $n= 95$  personas).

### 3.2.1 Fórmula

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2(N-1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

$$n = \frac{505.585 * (1,96)^2 * 0,5 * 0,5}{0,10^2(505.585 - 1) + 1,96^2 * 0,5 * 0,5}$$
$$n = 80.84 = 81$$

Muestra Ajustada a Pérdidas

$$MAP = n \left( \frac{1}{1 - R} \right)$$

$$MAP = 81 \left( \frac{1}{1 - 0,15} \right)$$

$$MAP = 95$$

A cada persona se le informó sobre el estudio en mención, quienes mostraron interés y cumplieron con los criterios de inclusión fueron incluidos en el estudio, inicialmente se procedió a la lectura y firma del consentimiento informado (**ANEXO 2**), además, se realizó una entrevista precisa y detallada (**ANEXO 3**) con las personas con el fin de recoger y registrar datos sociodemográficos y antropométricos. Posteriormente, se tomó las medidas de peso y talla en una báscula digital SECA mod 318300, y con una cinta métrica.

Las medidas antropométricas y características sociodemográficas fueron rotuladas, se les asignó un código alfanumérico distintivo, siendo también registrado electrónicamente en una base de datos de Microsoft Excel, con el mismo que se usó para las muestras.



### 3.2.2 Criterios de selección

Tabla 1: *Criterios de inclusión y exclusión para los participantes.*

Criterios de Inclusión	Criterios de exclusión
Personas mayores de edad de 18 años en adelante, que tengan las mismas probabilidades de ser escogido y que les interese participar en el estudio y firmen el consentimiento informado.	Todas aquellas personas que por alguna razón una vez que estuvieron el estudio, ya no quisieron seguir colaborando

### 3.2.3 Variables

#### Variable Independiente

- Polimorfismo 2548G>A del gen *LEP*. Variable cualitativa dicotómica (presencia/ausencia).

#### Variables Intervinientes

- Edad: variable continua medida en años.
- Peso corporal: variable continua medida en kilogramos.
- Género: variable nominal dicotómica (hombre/mujer).
- Etnia: variable nominal (Blanco, Afro descendiente, Mestizo, Montubio, Indígena, Otros).
- Talla: variable continua medida en metros.
- Procedencia: variable nominal (Costa, Sierra, Amazonía, Región Insular).
- Co-morbilidades: variable nominal (presente/ausente).

### 3.3 Procedimientos

#### 3.3.1 Peso en kilogramos (kg)

Para este procedimiento se empleó una Báscula Digital Model 874. Inicialmente, se verificó la calibración de la báscula, la misma que se ubicó en una superficie plana, horizontal y firme antes de empezar el procedimiento, Se encero y se le pidió a cada participante que se retire por un momento su calzado y las prendas que se consideren



peso adicional como: chaquetas, cinturones, billeteras, llaves, sombreros, en lo posible se realizó con la menor ropa posible. Cada participante se subió a la báscula colocando los pies paralelos en el centro, de forma erguida, con la vista hacia el frente (mirando al examinador), sin moverse y con los brazos caídos naturalmente a los lados. Una vez en posición correcta, se observó el peso marcado en kg.

### 3.3.2 Estatura en metros (m)

Para medir la talla, se fijó una cinta métrica en la pared, procurando que esté perfectamente perpendicular al piso y que el extremo correspondiente al cero coincida con el nivel del suelo. Se pidió a cada participante que mire al frente, que mantenga los pies juntos, los talones contra la cinta y las rodillas rectas. Se colocó una escuadra sobre el punto medio de la cabeza de la persona de tal manera que uno de los lados de dicha escuadra quede apoyada a la pared marcando la estatura en la cinta en metros (m).

### 3.3.3 Flebotomía

A cada participante se le extrajo de 2 a 5ml de sangre total mediante una punción venosa en el área antecubital del brazo, siguiendo estrictas normas de asepsia y antisepsia; se empleó tubos al vacío con EDTA como anticoagulante. Cada muestra, se mantuvo bajo cadena de frío entre 4 y 8°C, y fue transportada hacia el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cuenca; en donde se procedió a la extracción del material genético, y almacenamiento de las muestras bajo refrigeración.

### 3.3.4 Extracción de ADN

Para la extracción del material genético se empleó PureLink® Genomic DNA Mini Kit de INVITROGEN para 50 extracciones con número de catálogo K1820-01, el cual permitió una extracción de ADN de alto rendimiento y pureza a partir de muestras de sangre total recogidas en tubos con EDTA, la tecnología de aislamiento se basa en columnas de giro que minimizan la contaminación. Los componentes incluidos en los Mini Kits PureLink® Genomic DNA se enumeran en la **Tabla 2**.



**Tabla 2:** Componentes PureLink® Genomic DNA Mini Kit de INVITROGEN para 50 extracciones.

Componente	K1820-01
	50 preps
PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer	10 ml
PureLink® Genomic Digestion Buffer	9 ml
PureLink® Genomic Wash Buffer 1	10 ml
PureLink® Genomic Wash Buffer 2	7,5 ml
PureLink® Genomic Elution Buffer (10mM Tris-HCl, pH 9.0 + 0,1mM EDTA)	10 ml
RNase A (20mg/ml) in 50mM tris-HCL pH 8.0 10mM EDTA)	1 ml
Proteinase K (20mg/ml) in storage buffer (Proptietary)	1 ml
PureLink® Spin Columns with Collection Tubes	50 each
PureLink® Collection Tubes (2.0 ml)	100

*Fuente:* Autoras (2018)

El proceso requiere además de etanol absoluto (96 – 100%) el cual no se incluye en el kit mencionado.

Para el proceso de extracción se siguieron las especificaciones del proveedor (Thermo Fisher, 2016).

### ***Fundamento y procedimiento***

El proceso de extracción de ADN constó de cuatro etapas: Lisis celular, purificación, lavado y elución, como se muestra en la **Figura 12**.

Las células se digirieron gracias a la acción de la proteinasa K a 55 °C, usando una formulación de tampón de digestión la cual a más de ayudar en la desnaturalización de proteínas, aumenta la actividad de esta enzima. Por otro lado gracias a la acción de la ARNasa se eliminó cualquier ARN residual en la muestra, minimizando así la contaminación, el lisado se mezcló con etanol absoluto (96 – 100%) y PureLink ® Genomic Lysis Binding que permite una alta unión del DNA a la Columna de giratoria PureLink®.

Una vez extraído el ADN, este se une a la membrana a base de sílice en la columna y las impurezas se eliminan mediante lavado con soluciones de Wash Buffers. Finalmente el

ADN purificado se eluye en la solución tampón de elución con bajo contenido de sal (Thermo Fisher, 2016).

Todo el proceso de extracción se llevó a cabo en el interior de la Cabina de Flujo Horizontal Telstar AH-100 y además se trabajó con material esterilizado en el Autoclave horizontal digital Tuttnauer® 2540EK.

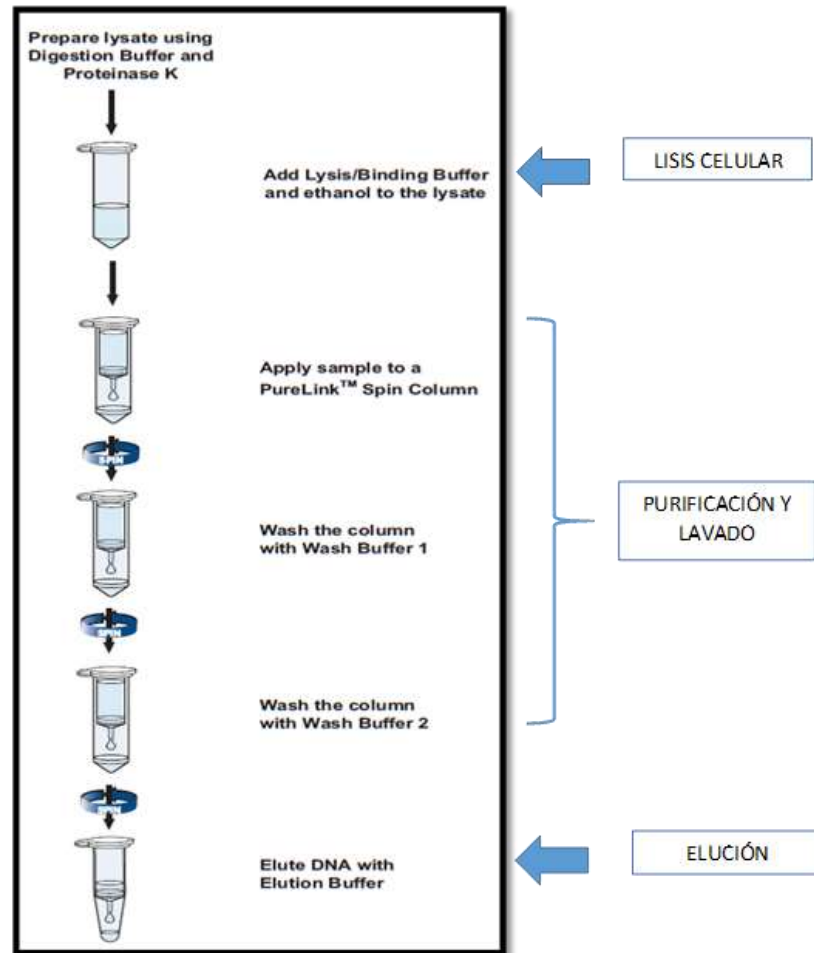
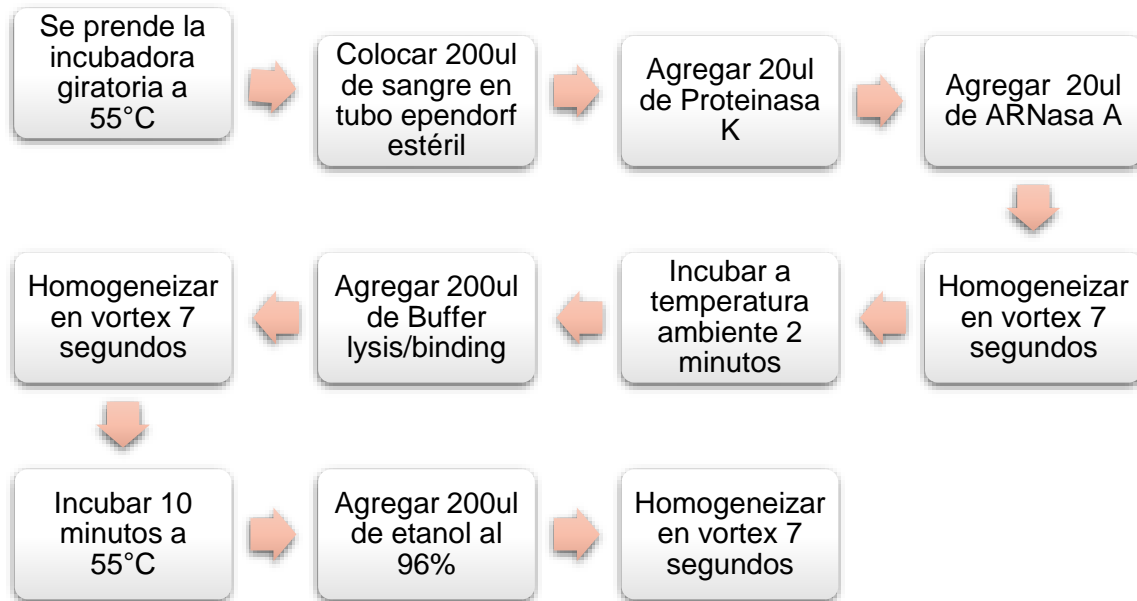


Figura 12: Proceso de extracción de ADN. Tomada de (ThermoFisher, 2016).



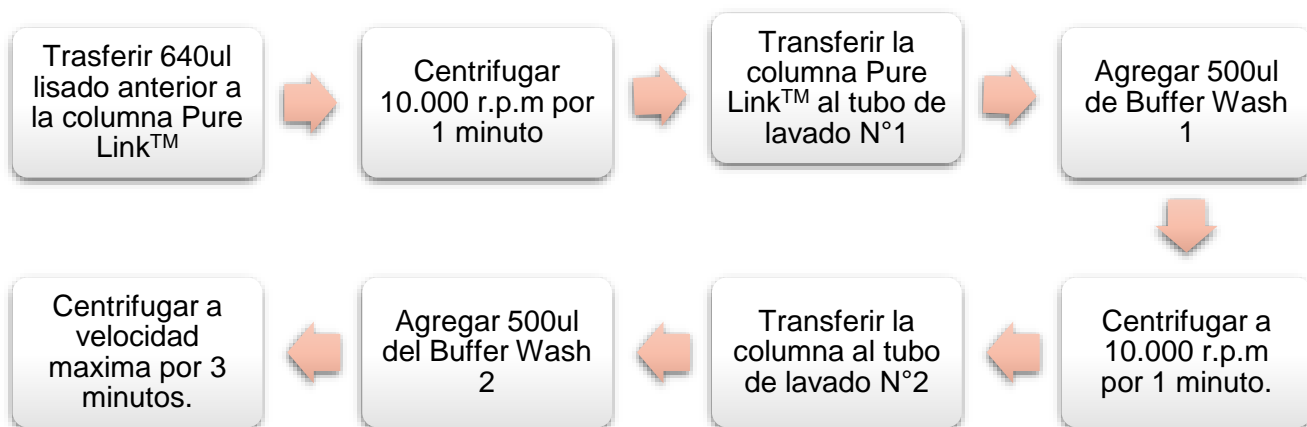
**Preparación del Lisado**



**Figura 13:** Procedimiento del lisado de células para la extracción de ADN.

**Purificación y lavado del ADN**

Para esta etapa se preparó los buffers de lavado 1 y 2, añadiendo 15 ml y 17,5ml de etanol al 96% respectivamente.

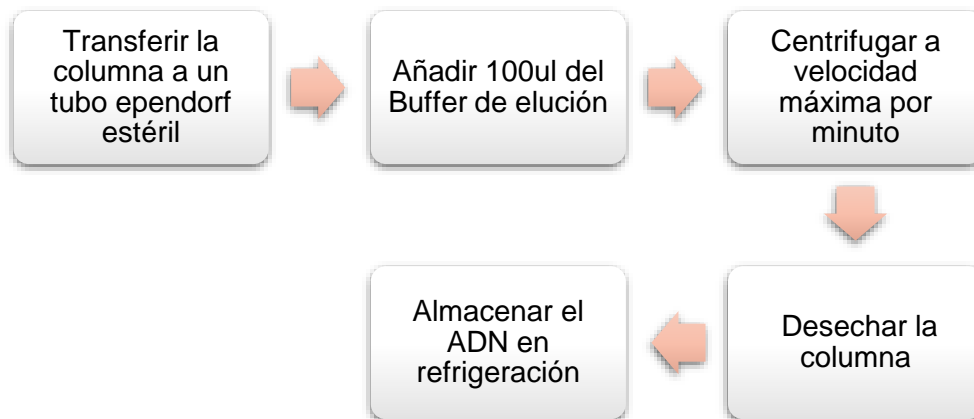


**Figura 14:** Procedimiento para la purificación y lavado de células para la extracción de ADN.



**Elución y almacenamiento del ADN**

Cada tubo eppendorf con ADN purificado se lo cubrió con papel parafilm para evitar cualquier tipo de contaminación y se mantuvieron en refrigeración hasta que se completó el total de las muestras extraídas.



**Figura 15:** Procedimiento de la fase de recuperación de ADN o elución y almacenamiento del ADN

**Tabla 3:** Materiales y equipos para la extracción de ADN.

Materiales	Equipos
Pipetas automáticas Labnet Biopette 20ul	Agitador vortex IKA® Basic
Pipetas automáticas Labnet Biopette 200ul	Micro centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415R)
Pipetas automáticas Labnet Biopette 1000ul	Incubadora agitadora (Vortemp® 56 EVC)
Puntas con filtro estériles AXYGEN™ de 1000ul	Cabina de Flujo Horizontal Telstar AH-100
Puntas con filtro estériles AXYGEN™ de 200ul	Refrigerador Indurama®
Gradilla de plástico para 80 microtubos (1,5 a 2,0 ml) HEATHROW	Autoclave horizontal digital Tuttnauer® 2540EK
Tubos eppendorf de 1,5 ml estériles libres de DNasa	
Guante de nitrilo sin polvo. Color azul.	
Rollo papel parafilm, Senna	

Fuente (Autoras, 2018)



### 3.3.5 Amplificación de ADN mediante la técnica PCR-tiempo real

#### ***Fundamento y procedimiento***

Para llevar a cabo la amplificación del ADN y determinar la presencia o ausencia del polimorfismo 2548G>A del gen *LEP*, se utilizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR), la cual es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la dicha secuencia es fielmente copiada de la original. La técnica de qPCR consta de varios ciclos divididos en tres etapas: desnaturalización del ADN, hibridación y extensión de la secuencia específica (Costa, 2005).

**La primera etapa es la desnaturalización:** En ella las hebras de ADN se separan, esto se debe a que se rompen los puentes de hidrógeno que las unen, ya que la reacción es sometida a altas temperatura (93- 97 °C) (Costa, 2005), (Chirinos-Arias, 2015).

**La segunda etapa es la hibridación- Alineación:** la temperatura baja de modo que los extremos 3' de las hebras ahora separadas se puedan aparear con oligodesoxinucleótidos perfectamente complementarios (cebadores o primers), cuya longitud sea suficiente (20-30 nucleótidos) para formar híbridos estables con la molécula que sirve de plantilla. Esta es la etapa crucial, debido a que, si el primer no se ancla, no se producirá la amplificación, pudiéndonos dar resultados falsos negativos (Chirinos-Arias, 2015).

**La tercera etapa es la elongación o extensión:** en ella la polimerasa sintetizará nueva hebra de ADN a partir del primer anclado. Está fase, usualmente se produce a una temperatura de 72 °C (Chirinos-Arias, 2015).

Una polimerasa resistente a la desnaturalización por calor, es la polimerasa Taq — llamada así por la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, de la que se había aislado—, extiende los extremos 3' de ambos oligonucleótidos utilizando las hebras del ADN bicatenario como plantilla, proceso que se conoce como «extensión del cebador» (primera extensión) (Aguilera, Ruiz-Tachiquín, Rocha, Pineda, & Chanez-Cardenas, 2014).

Para el desarrollo de este estudio, se usaron sondas de hidrólisis Taqman, la cual consiste en un oligonucleótido marcado en su extremo 5' con un fluoróforo de alta energía también llamado reportero y en su extremo 3' con otro fluoróforo de baja energía llamado "Quencher" (Aceptor). Ambos, se encuentran enganchados hasta que la sonda detecte e hibride la secuencia diana en la muestra de ADN. Una vez que la sonda ha hibridado dicha secuencia; se da un cambio conformacional en el Quencher y el reportero, y esto a su vez, permite que la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa, rompa la unión





logrando así que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada y capturada por el equipo (Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C., 2013).

Para llevar a cabo la técnica, se empleó el equipo el LightCycler nano de Roche el cual es compatible con la sonda Taqman® del polimorfismo **rs7799039** cuyo número de ensayo es C\_\_1328079\_10; ésta nos permitió identificar en el ADN el siguiente cambio: presencia del alelo A y ausencia del alelo G, en la secuencia: (GAGGGGAGGCGGCTGCCACCCCTTC [**G / A**] ACACTATTACCCATCGGTCA CTTGT). La sonda viene marcada con los fluorocromos “reporter” el VIC y el FAM; el primero, diseñado con la secuencia complementaria del alelo mutado (A), mientras que el segundo viene diseñado con la secuencia complementaria del alelo silvestre (G)(Roche, 1999), (Microbial, 2012).

### 3.3.6 Estandarización de la técnica de PCR Real Time

La técnica fue estandarizada realizando diferentes ensayos, donde se tomaron de manera aleatoria tres muestras de ADN.

1. En primera instancia, se procedió a determinar la concentración del ADN total obtenido, (lo óptimo es entre 1 – 10ng/uL), y se obtuvo un ~25ug/uL. Basados en el protocolo de trabajo propuesto por el fabricante.
2. Conocida dicha concentración se procedió a realizar 5 diluciones de cada una de las muestras de ADN total con agua destilada ultra pura libre de DNase/RNase en las siguientes concentraciones de 1/5, 1/10, 1/15, 1/20, 1/25, acompañadas de un blanco.
3. Cada una la diluciones fueron preparados con las indicaciones de la **Tabla 4**.
4. Enseguida se prosiguió al desarrollo del qPCR.

**Tabla 4:** *Condiciones para la reacción de amplificación*

Componente	Blanco (uL)	Volumen de reacción (uL)
TaqMan® Genotyping Master Mix 2X	5	5
Sonda Taqman® diluida con buffer tris-EDTA 1X	0.5	0.5
Agua grado biología molecular	4.5	2.5
Muestra de ADN diluida	--	2
<b>Volumen Total</b>	10	10

*Fuente:* Autoras (2018)



Programación para la corrida del qPCR: un Hold de 600 segundos a 95°C, y 40 ciclos a 92°C por 15 segundos y 60°C por 60 segundos.

### 3.3.7 Determinación del Polimorfismo

#### *Preparación de las muestras*

Se realizaron alícuotas de 1ml de agua tipo biología molecular para evitar contaminación, de la misma manera se realizaron alícuotas de 20ul de sonda Taqman® y 200ul de master mix. Las muestras de ADN y la sonda Taqman® fueron diluidas como se indica en la **Tabla 5**.

**Tabla 5:** *Condiciones de dilución para las muestra y la sonda Taqman®*

Dilución de la muestra	Volumen	Dilución de la sonda	Volumen
Muestra de ADN	1 µl	Sonda Taqman®	20 µl
Agua para PCR	9 µl	Buffer tris-EDTA	20 µl
<b>Total de volumen</b>	10 µl	Volumen total	40 µl

*Fuente: Autoras (2018)*

Las condiciones de la reacción de amplificación para la determinación del polimorfismo son las mismas que se indicaron en la **Tabla 4**.

Las muestras fueron colocadas de manera ordenada en cada pocillo de una tira de tubos para PCR de ocho reacciones en total, correspondiendo la primera posición al blanco, en cada corrida se amplificaron 31 muestras, en total se llevaron a cabo 4 corridas y en cada una se colocó un blanco.

Todo el procedimiento se realizó con material estéril y en el interior de una cabina de flujo horizontal Telstar AH-100, a la cual se le aplicó luz UV por 30 minutos antes y después de su uso.

Tabla 6: Materiales y equipos para el desarrollo de qPCR.

Materiales	Equipos
Pipetas automáticas Labnet Biopette 10 uL	Micro centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415R)
Pipetas automáticas Labnet Biopette 200ul	LightCycler Nano Roche versión 1.0.7
Pipetas automáticas Labnet Biopette 1000ul	Cabina de Flujo Horizontal Telstar AH-100
Puntas con filtro estériles AXYGEN™ de 10ul	Refrigeradora Indurama
Puntas con filtro estériles AXYGEN™ de 200ul	
Gradilla de plástico para 80 microtubos (1,5 a 2,0 ml) HEATHROW	
Tira de 8 tubos de 0,1ml para PCR con tapa estériles	
Tubos eppendorf de 1,5 ml estériles libres de DNasa	
Guante de nitrilo sin polvo. Color azul.	
Rollo papel parafilm, Senna	

Fuente (Autoras, 2018).

Una vez identificado cada genotipo, se le indica al equipo cada uno de ellos, arrojando así una gráfica de discriminación alélica, en donde se agrupa a cada genotipo según la presencia o ausencia de los alelos (**Figura 16**) (Guitierrez Orozco, 2012).

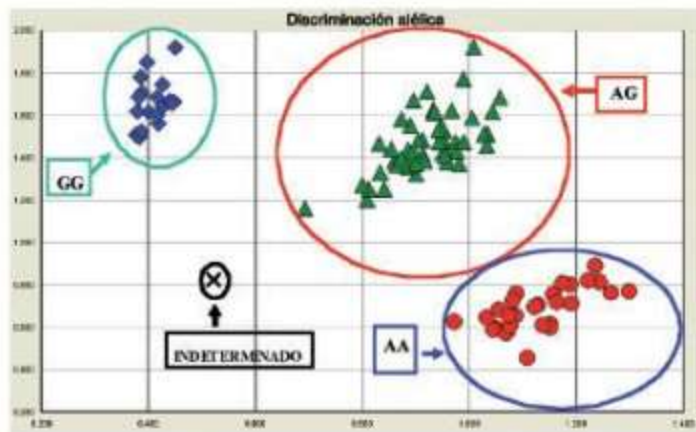


Figura 16: Discriminación alélica. Tomado de: (Guitierrez Orozco, 2012)



### 3.3.8 Interpretación de resultados

El equipo LightCycler Nano de Roche, es un dispositivo de PCR en tiempo real de 32 muestras para la expresión génica y análisis de variación genética que reconoce las diferentes fluorescencias emitidas y las reporta a través de una tabla de platos; la misma que discrimina los resultados por colores en función del alelo encontrado. Por ejemplo, aquellas muestras que marquen como homocigotos silvestres (G/G) se muestran de color verde, los homocigotos mutados (A/A) como color rojo, las muestras heterocigotos (G/A) exhiben un color amarillo. Adicionalmente, si la muestra no fue analizada o carece de material ADN se muestran platos de color negro o grises respectivamente (**ANEXO 6**)

### 3.3.9 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, se llevó a cabo utilizando el paquete de software SPSS, versión 22, se empleó el test de Kolmogorov-Smirnov para verificar la distribución de los datos. En el estudio descriptivo los resultados se expresaron como la mediana ( $\bar{x}$ ) más el límite mínimo (min) y máximo (máx.). En tanto que, para la asociación entre variables se determinó con un intervalo de confianza (IC) del 95% y un valor  $p < 0,05$ . Así, las variables numéricas y cualitativas fueron analizadas mediante la prueba de *Chi* cuadrado por su naturaleza no paramétrica.

### 3.3.10 Equilibrio de Hardy-Weinberg

La frecuencia alélica y genotípica del polimorfismo en estudio, así como la determinación del Equilibrio Hardy Weinberg (EHW), fueron obtenidos empleando el programa Bioinformático SNPStats desarrollado por el Instituto de Oncología de la Universidad de Cataluña, disponible online en: [http://bioinfo.iconcologia.net/SNPStats\\_web](http://bioinfo.iconcologia.net/SNPStats_web). Con uso de esta herramienta informática, se determinó también la posible asociación entre la presencia del polimorfismo y las medidas antropométricas; así como, la asociación con la obesidad; específicamente para medir la fuerza de asociación se empleó el análisis Odds Ratio y también se realizó regresión logística.



## CAPÍTULO 3

### 4. Resultados y Discusión

El presente estudio empleó un diseño observacional de tipo transversal descriptivo, cuyo desarrollo estuvo enmarcado bajo los lineamientos bioéticos contemplados en la Declaración de Helsinki y contó con la aprobación del Comité de Ética para investigaciones en Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito (**ANEXO 4**).

#### 4.1 Descripción de las características antropométricas y sociodemográficas de la población estudiada

La **Tabla 7**, detalla los datos correspondientes a edad, sexo, peso y morbilidades, de los 106 voluntarios (mestizos) participantes del estudio. Los individuos tuvieron edades entre 19 y 78 años con una mediana de 29.03 años, El 53% (56 muestras) pertenecía a mujeres y el 47% (50) a hombres. De acuerdo a la clasificación del estado nutricional conforme al IMC, el 56,6% fueron normopeso, el 35,8% presentaron sobrepeso y el 7,5% estuvieron en obesidad. Por otro lado, el 18% de las personas presentaron morbilidades tales como Diabetes mellitus tipo II, hipertensión arterial, hipotiroidismo, artritis. Además, fueron 103 personas de la sierra y 3 de la costa y oriente.

**Tabla 7:** Datos antropométricos y sociodemográficos de los participantes.

CARACTERÍSTICA	TOTAL DE MUESTRAS n=106		VALOR DE p PARA NORMALIDAD
<b>EDAD (AÑOS)</b>	29.03* (19-78)	Mediana	<0.0001
<b>SEXO M/H</b>	56(53%) / 50(47%)	Frecuencia	
<b>PESO (KG)</b>	62.0* (45-100)	Mediana	0.005
<b>TALLA (M)</b>	1.62 ±0.082 **	Media	0.082
<b>MORBILIDADES P/A</b>	18(17%) / 88(83%)	P/A	-
<b>IMC – CATEGORÍA</b>			
☐ <b>NORMOPESO</b>	60 (56.6%)	Frecuencia	-
<b>SOBREPESO</b>	38 (35.8%)	Frecuencia	-
<b>OBESIDAD</b>	8 (7.5%)	Frecuencia	-

*Nota:* M: Mujeres, H: Hombres. Recuento (porcentaje). IMC: Índice de Masa Corporal. P: Presencia, A: Ausencia. \*Mediana. \*\*Media.



#### 4.2 Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo 2548G>A del gen de leptina en los grupos de estudio.

Mediante la técnica de PCR en tiempo real, se pudo identificar los grupos genotípicos definidos en tres posibles categorías: wild type (G/G), heterocigoto (G/A) y homocigoto mutado (A/A). Después del análisis de frecuencias, empleando el programa Bioinformático SNPStats, se observó que el grupo heterocigoto (G/A) presenta mayor proporción 54(0,51), frente al homocigoto mutado 12(0,11) y silvestre 40(0,38). De este modo, el alelo mutado (A) presentó una mayor frecuencia con 134(0,63), en comparación con el alelo silvestre 78(0,37). Véase la **Tabla 8**.

**Tabla 8:** Frecuencias Genotípicas y alélicas del polimorfismo LEP 2548G>A.

FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS DEL SPN (n= 106)			
GENOTIPO	TOTAL DE MUESTRAS	ALELO	TOTAL DE MUESTRAS
G/G	40(0.38)	A	134(0.63)
G/A	54(0.51)	G	78(0.37)
A/A	12(0.11)		

*Nota:* Los valores mostrados fuera de paréntesis representan el número de veces que se repite el alelo o el número de individuos portadores del genotipo para el sitio polimórfico estudiado, entre paréntesis se muestra la frecuencia relativa.

#### 4.3 Equilibrio de Hardy Weinberg

Con los resultados obtenidos de las frecuencias génicas se evaluó el equilibrio de Hardy Weinberg del total de muestras de la población estudiada; determinando que la distribución genotípica del SNP se encontró en equilibrio, pues se obtuvo un valor de  $p=0.32$ , lo que confirma que los alelos se han distribuido de manera uniforme, tal como se observa en la **Tabla 9**.



Tabla 9: Equilibrio de Hardy Weinberg

Equilibrio de Hardy-Weinberg (n=106)				
	Homocigoto GG	Heterocigoto GA	Homocigoto AA	p-valor
Muestras observadas	40(0.38)	54(0.51)	12 (0.11)	<b>0.32</b>
Muestras esperadas	42.3	49.3	14.3	

#### 4.4 Asociación del polimorfismo *LEP 2548G>A* con los diferentes parámetros antropométricos.

Realizado el análisis de asociación entre el genotipo y los diferentes rasgos antropométricos (edad, genero, peso y talla independientemente) de la población total no se observó ninguna asociación estadísticamente significativa ( $p>0.05$ ).

A pesar que no es parte de nuestros objetivos se realizó una correlación entre los genotipos y el estado nutricional, además se comprobó si existía una asociación significativa con la obesidad mediante regresión logística.

##### 4.4.1 Asociación del polimorfismo *LEP 2548G>A* con la clasificación del IMC

De acuerdo a los resultados obtenidos por el programa estadístico SPSS v22, se encontró que existía una correlación estadísticamente significativa ( $p=0.006$ ) entre la distribución genotípica y el estado nutricional conforme al IMC, por lo que a continuación se analizó cuál de los genotipos es el que produce esta asociación. Observarse en la **Tabla 10**.

Tabla 10: Asociación del polimorfismo *LEP 2548G>A* con el IMC.

GENOTÍPO	CLASIFICACIÓN DEL IMC			Valor de $p$	Tau-b de kendall
	NORMOPESO	SOBREPESO	OBESIDAD		
G/G	28 (45.2%)	9 (25.0%)	3 (37.5%)	0.006	0.165
G/A	25 (41.7%)	27 (71.1%)	2 (25.0%)		
A/A	7 (11.7%)	2 (5.63%)	3 (37.5%)		
<b>TOTAL</b>	60 (100%)	38 (100%)	8 (100%)		

Nota: IMC: Índice de Masa Corporal



#### 4.4.2 Asociación del polimorfismo *LEP 2548G>A* con el Estado Nutricional

Los resultados determinaron asociación significativa entre el SNP y el estado nutricional de acuerdo al modelo dominante de agrupamiento, entre el conjunto de los individuos con sobrepeso y obesidad frente a los normopeso ( $p=0.028$ ), por lo tanto las personas con el alelo raro A se encontraban protegidas de desarrollar sobrepeso y/u obesidad en un 60% frente a los silvestres (OR= 0.40, 0.18 -0.93, IC: 95%) **Tabla 11.**

**Tabla 11:** Asociación del polimorfismo *LEP 2548G>A* con el Estado nutricional.

GENOTIPO	NORMOPESO	SOBREPESO/OBESIDAD	OR (IC 95%)	valor de p
<b>G/G</b>	28 (46.7%)	12 (26.1%)		
<b>G/A – A/A</b>	32 (53.3%)	34 (73.9%)	0.40(0.18-0.93)	<b>0.028</b>

Nota: OR: odds ratio

#### 4.4.3 Asociación de la obesidad con todas las variables mediante regresión logística.

Como se muestra en la **Tabla 12**, al realizar el análisis de asociación multivariado es decir de todas las variables con la obesidad mediante regresión logística se evidenció una asociación entre la edad de los participantes y la presencia de sobrepeso/obesidad en conjunto, encontrándose una significancia en el grupo del adulto joven. Con el polimorfismo SNP no hubo significancia sin embargo, al hacer la asociación bivariada entre el SNP con el estado nutricional si se encontró como se observa en la **Tabla 11.**

**Tabla 12:** Asociación multivariado de la obesidad con todas las variables de estudio.

VARIABLES	EXP (B) (IC 95%)	VALOR DE p
<b>EDAD</b>		
Adulto mayor	22.763	1.000
Adulto	17427	1.000
Adulto joven	7.571 ( 1.82-31.479)	0.005
<b>SEXO</b>	0.512	0.150
<b>MORBILIDADES</b>	3.267	0.142
<b>GENOTIPO</b>	0.433	0.092

Nota: EXP (B): Riesgo multivariado determinado por regresión logística.





#### 4.5 Discusión

En este estudio, el polimorfismo 2548G>A del gen de *leptina* se encontró distribuido de la siguiente manera: 63% para el alelo mutado (A) y 37% para el alelo wild type (G); y las genotípicas se presentaron en un porcentaje de 38% para el homocigoto normal G/G, 51% para el heterocigoto G/A y 11% para el homocigoto mutado A/A. El alelo A se presentó como un factor de protección frente al sobrepeso y obesidad.

A partir de los hallazgos encontrados de los 106 voluntarios (mestizos) participantes del estudio, el grupo etario que predominó fue el adulto joven (78,3%), el 53% (56 muestras) pertenecía a mujeres y el 47% (50) a hombres. De acuerdo a la clasificación del estado nutricional calculado a través del IMC, el 56,6% fueron normopeso, el 35,8% presentaron sobrepeso y el 7,5% estuvieron en obesidad. Este resultado se contrastó con los resultados obtenidos por Dután y Guncay, quienes trabajaron en una población similar de la misma zona geográfica, sin embargo, en este grupo de contraste se encontró en su grupo control un porcentaje de 41% de individuos en sobrepeso y 47% en obesidad. A diferencia de nuestro estudio, la mayor parte de la población se encontró en obesidad, a pesar de ser una población semejante, esto puede ser posiblemente a que el grupo etario que prevaleció en este estudio fue la tercera edad, lo que respeta los patrones considerados en el sobrepeso que conforme aumenta la edad aumenta el número de personas con sobrepeso, probablemente debido a los hábitos alimenticios, la falta de ejercicio y factores genéticos (Dután Quizhpi & Guncay Sangurima, 2017).

Con respecto a las frecuencias genotípicas para el polimorfismo 2548G>A del gen de *LEP* se encontraron 38% para el homocigoto normal G/G, 51% para el heterocigoto G/A y 11% para el homocigoto mutado A/A, esta distribución de los genotipos fue muy similar a un estudio realizado en 290 niños y adolescentes pre-púberes en población venezolana donde obtuvieron una frecuencia de 33%, 51% y 16% respectivamente (Garcés et al., 2016). El gen *LEP* ha sido estudiado en varias poblaciones teniendo diferentes distribuciones así Trakovická et al, en 236 personas eslovacas determinaron que las frecuencias genotípicas fueron de 24%G/G ,44% G/A y 32% A/A, cuya distribución no fue muy semejante a la nuestra, ya que la frecuencia del genotipo A/A fue mayor en



comparación con nuestra población, pero coincidió con nuestra investigación, ya que la mayoría de las personas presentaron el genotipo heterocigoto G/A (Trakovická, Moravčíková, Candráková, & Kasarda, 2016). A nivel de Ecuador no existen suficientes reportes de la distribución sobre este polimorfismo en población abierta sana; sin embargo, en un estudio previo de Dután y Guncay (Dután Quizhpi & Guncay Sangurima, 2017) , quienes estudiaron en pacientes DM2 de la ciudad de Cuenca reportaron que la frecuencia del homocigoto mutado A/A fue mayor y no se encontró la presencia de heterocigotos A/G, siendo muy diferente a nuestros resultados lo cual posiblemente pudiera haber sido a que esta investigación se llevó como un diseño de casos y controles en pacientes con evidencia de síndrome metabólico.

Las frecuencias alélicas en nuestra población de estudio fueron de 63% para el alelo mutado(A) y 37% para el alelo wild type (G), cuya distribución muestra que hay mayor presencia del alelo raro, nuestros resultados se muestran semejantes a lo que concluyeron Trakovická et al, en 236 personas eslovacas, donde se demostró que existían mayor prevalencia del alelo A de 54% (Trakovická et al., 2016), Por otro lado, a diferencia de nuestros hallazgos, Yiannakouris et al, reportaron que en 118 jóvenes griegos, el alelo predominante fue el G (53%) y que además estaba asociada con niveles altos de leptina libre de plasma (Yiannakouris, Melistas, Yannakoulia, Mungal, & Mantzoros, 2003). La distribución del alelo raro del polimorfismo 2548G>A evaluado ha tenido diferentes comportamientos de distribución de acuerdo al grupo étnico, tal como lo refieren Fan & Say, quienes lo investigaron al SNP en una población suburbana multiétnica de Malasia y encontraron que el alelo variante A (mutado) era más alto en los asiáticos, especialmente entre los malayos / bumiputras peninsulares, chinos e indios. (Fan & Say, 2014). En contraste, otro estudio realizado por Duarte et al, en 150 sujetos delgados sanos en el sureste de Brasil quienes pertenecían a diferentes etnias (europeos-caucásicos, mulatos (personas de ascendencia mixta (africana y caucásica)) y amerindios autóctonos) determinaron que la frecuencia del alelo G (70%) fue la predominante en este grupo de personas y no se encontraba asociada a la obesidad (Duarte, Francischetti, Genelhu, Cabello, & Pimentel, 2007).

El modelo del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), siendo una proposición teórica, es muy valioso para evaluar los factores evolutivos que están operando en las poblaciones.



Además, tiene una gran importancia en la interpretación de estudios de variación genómica (SNPs) y de asociación con enfermedades de tipo genético. En nuestro estudio, a partir de las frecuencias genotípicas se evaluó el HWE y se obtuvo un Chi cuadrado de 0.96 que corresponde a valor  $p$  de 0.32, por lo que el polimorfismo se encontró en equilibrio para la población de estudio, lo que confirma que los alelos se han distribuido de manera uniforme; asumiendo por tanto que los alelos se transmiten de forma independiente entre generaciones y siempre que no haya selección sobre ellos (López Alcaraz, 2015). Fan & Say, determinaron un similar comportamiento de la estimación del HWE en su estudio con personas malayas (Fan & Say, 2014). Al contrario de nuestros resultados, en el estudio de Dután y Guncay, que fue de casos y controles en pacientes con DM2, ellas concluyeron que el polimorfismo rs7799039 del grupo control (Dután Quizhpi & Guncay Sangurima, 2017) se presentaba en desequilibrio de HW, asumiendo que posiblemente obedezca a que los controles fueron escogidos de acuerdo a variables de emparejamiento con los casos (Llorca, Prieto Salceda, Combarros, Dierssen-Sotos, & Berciano, 2005).

Por otro lado, se evidenció una asociación entre la edad de los participantes y la presencia de sobrepeso/obesidad en conjunto, encontrándose una significancia en el grupo del adulto joven. Posiblemente, existe una sobrerrepresentación en el grupo, dado que se agrupó a todos los individuos con alteraciones en el peso en una categoría, sin embargo, es interesante notar que los hábitos alimenticios y las condiciones de vida sedentarias hacen que a más temprana edad se empiece a presentar aumento de peso lo que posteriormente deriva en una obesidad.

La genotificación del polimorfismo del gen de la leptina 2548G>A, así como, la frecuencia de los alelos, es útil en la medicina clínica; ya que, la distribución es diferente en las distintas poblaciones, puesto que, estas pueden estar sujetas a mutación, selección o migración. Esta última debida a que da lugar a la introducción de nuevas variedades génicas en una población siendo un hecho cada día más común (Carrillo Vazquez et al., 2013).

Varios estudios han evidenciado la relevancia del polimorfismo *LEP* 2548G>A en la región promotora del gen de la leptina asociada a la obesidad por tal motivo a pesar de no



ser parte de nuestros objetivos realizamos un estudio comparativo y de asociación, al observar gran presencia de personas con sobrepeso y obesidad, cuyos resultados muestran una correlación con el IMC. Por lo tanto, los individuos con el alelo 2548A presentaron un factor de protección frente al sobrepeso y obesidad, resultando entonces que las personas con el alelo 2548G tienen la predisposición a presentar la enfermedad, lo que concuerda con varios estudios realizados en diferentes países, tal es así que, en una investigación realizada en mujeres brasileñas donde la frecuencia del alelo G (64%) fue mayor y estuvo asociado con la regulación del peso corporal (Duarte et al., 2007). De igual forma, varios grupos de investigadores de EE. UU y Europa se enfocaron en determinar la asociación del alelo G con el sobrepeso en mujeres, y todos llegaron a la misma conclusión de riesgo cuyos resultados demostraron que las mujeres portadoras del alelo G tienen al menos cuatro veces más riesgo de obesidad que las no portadoras, lo que sugiere que el polimorfismo *LEP* 2548G>A es un fuerte predictor de obesidad (Li et al., 1999; Wang et al., 2012; Hinuy et al., 2008). En niñas españolas de 12-16 años también se evidenció el vínculo entre el alelo G y la presencia de sobrepeso (Riestra et al., 2010). Según Mammès y col. encontraron una asociación de polimorfismo *LEP* 2548G>A con el IMC aumentado en europeos con sobrepeso (Mammès et al., 2000) y en una muestra de aborígenes taiwaneses, Wang et al, mostraron que el genotipo homocigoto GG está asociado con obesidad extrema (Wang et al., 2012). Aunque, si varios estudios apuntan a una posible asociación entre el alelo G y la obesidad en distintas poblaciones, otros trabajos llevan a una conclusión opuesta; por ejemplo, el análisis de las características genéticas, clínicas y de estilo de vida, de 303 individuos españoles obesos y su grupo control no evidenció ninguna asociación entre este polimorfismo y la obesidad (Portolés et al., 2006), por lo que estaría posiblemente en dependencia de una influencia epigenética. Igualmente en contraste a nuestro estudio, Delgadillo et al., realizaron un estudio en indígenas tepehuanos y mestizos de México, donde la frecuencia del alelo A fue mayor en los dos grupos en mestizos (45%) y en la población tepehuana (40%), lo cual sugiere que la obesidad está determinada por el decremento de la expresión del polimorfismo GG del gen de *LEP* (Delgadillo-Guzmán, Cuéllar-Cruz, Reyes-Romero Miguel, & Quintanar-Escorza, 2010).

Esto indica por lo tanto que las distribuciones alélicas son muy variables dependiendo de diferencias ambientales, culturales y genéticas; asociándose a este polimorfismo con



enfermedades como diabetes, hipertensión, cardiopatías en algunos estudios, mientras que en otros no se encuentra dicha asociación a pesar de que el tamaño en la muestra estudiada sea similar.

En nuestro estudio, los resultados obtenidos demuestran una asociación significativa entre el SNP y el estado nutricional; de acuerdo al modelo dominante de agrupamiento entre el conjunto de los individuos con sobrepeso y obesidad frente a los normopeso, encontrándose que el alelo A del polimorfismo G>A del gen de *LEP*, en nuestra población es considerado como un marcador de protección (tanto en estado homocigoto A/A como heterocigoto G/A) y que las personas que presenten el alelo G predisponen la obesidad. Sin embargo, no todo está dicho, pues tanto el sobrepeso como la obesidad son enfermedades multifactoriales y poligénicas; y se requiere de estudios mucho más amplios y rigurosos que ayuden a dilucidar cuales son los otros genes y/o factores que interaccionen con la leptina y conlleven al desarrollo de esta enfermedad que es considerada como una de las principales causas de muerte a nivel mundial.



## CAPÍTULO 4

### 5. Conclusiones y Recomendaciones

#### Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente estudio, evidenciaron la existencia del polimorfismo genético del gen de *LEP* 2548G>A en la población de voluntarios cuencanos, existiendo una frecuencia genotípica de 38% para el homocigoto normal G/G, 51% para el heterocigoto G/A y 11% para el homocigoto mutado A/A.

La distribución de la frecuencia de los alelos en la población fue de 63 % con el alelo A mutado y 37% para el alelo wild type (G); encontrándose con mayor frecuencia en el adulto joven y de sexo masculino.

Se demostró que la población se encuentra en equilibrio de Hardy – Weinberg ( $p=0.32$ ), confirmando así que los alelos del polimorfismo mantienen sus frecuencias en la población a través de las generaciones.

En el análisis estadístico no se encontró una asociación con las variables (edad, sexo, peso y talla independientemente) que represente riesgo; sin embargo, al asociar el SNP con el IMC, se determinó una relación de protección (OR= 0.40, 0.18 -0.93, IC: 95%) para el alelo A mutado de acuerdo al modelo dominante de distribución, por lo tanto las personas con el alelo G silvestre predisponen a sobrepeso.



### Recomendaciones

Es importante, la aplicación de la investigación genética en las diferentes poblaciones, para tener un punto de partida para futuras indagaciones, debido a que, los estudios de asociación con genes candidatos son muy relevantes en diversas áreas de la biología y medicina (clínica, farmacología, epidemiología, farmacogenómica, etc.).

Los polimorfismos del gen *LEP*, como el 2548G>A, han demostrado tener una participación importante en la obesidad y diabetes mellitus, sin embargo, algunos resultados son contradictorios; por lo que fuera muy importante realizar mayor número de investigaciones similares, para corroborar nuestros hallazgos.

Sería importante, conocer la distribución del receptor de leptina, para poder ver la relevancia que tiene con el desarrollo de la obesidad y determinar cuál puede ser la causa de cierta enfermedad. También, se puede realizar una investigación del SNP en diferentes etnias del Ecuador y comprobar si existe alguna asociación con estas.



## BIBLIOGRAFIA

- Acosta Hernández, M. E., Ramos Morales, F. R., Escobar Henríquez, J. B. H., López Muñoz, J. de J. D., & Escobar Castillo, P. (2015). Mecanismos bioquímicos de la leptina implicados en el desarrollo de la obesidad, (15), 11.
- Aguilera, P., Ruiz-Tachiquín, M.-E., Rocha, M., Pineda, B., & Chanez-Cardenas, M. (2014). PCR en tiempo real (pp. 175-201).
- Alcoceba Sánchez, M. (2010). Estudio de polimorfismos genéticos en la evolución clínica de pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, 220.
- Almanza-Pérez, J. C., Blancas-Flores, G., García-Macedo, R., Alarcón-Aguilar, F. J., & Cruz, M. (2008). Leptina y su relación con la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. *Gac Méd Méx*, 144(6), 535–542.
- Botella Carretero, J. I., Barbancho, L., Valero González, M., & Varela Dacosta, C. (2001). Leptina: implicaciones fisiológicas y clínicas. En *Anales de Medicina Interna* (Vol. 18, pp. 48–56). SciELO Espana.
- Caratachea, M. A. C. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 20(3), 213–221.
- Carracedo, Á. (2010). La variabilidad genética de los micro y minisatélites y su aplicación en medicina legal, 12.
- Carrillo Vazquez, J., Jeronimo, L.-A., Brenda, C.-V., Claudia, B.-C., Zamorano, A., Reyes-López, C.,... Marchat, L. (2013). G-2548A leptin promoter and Q223R leptin receptor polymorphisms in obese Mexican subjects. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 8, 34. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2013.34.43>
- Carrillo Vazquez, J., Marchat, L., López Alcantar, J., G. Benítez Cardoza, C., Zamorano, A., Lopez-Camarillo, C., & Augusto Sandino Reyes, C. (2011). Relevancia de polimorfismos en el gen de la leptina y su receptor para el desarrollo de la obesidad (pp. 17-38).
- Chirinos-Arias, M. (2015). Guía de PCR en tiempo real. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.1417599>





- Coleman, D. L. (2010). A historical perspective on leptin. *Nature Medicine*, 16(10), 1097-1099. <https://doi.org/10.1038/nm1010-1097>
- Coll, A. P., Farooqi, I. S., & O'Rahilly, S. (2007). The Hormonal Control of Food Intake. *Cell*, 129(2), 251-262. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.001>
- Costa, J. (2005). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real, 7.
- Delgadillo-Guzmán, D., Cuéllar-Cruz, M., Reyes-Romero Miguel, A., & Quintanar-Escorza, A. M. (2010). Oxidative stress is related with obesity and the polymorphisms g-2548a of the leptin gene (lep) and q223r of the leptin receptor gene (lepr) in tepehuano and mestizo populations of Mexico, 11.
- Denroche, H. C., Huynh, F. K., & Kieffer, T. J. (2012). The role of leptin in glucose homeostasis. *Journal of Diabetes Investigation*, 3(2), 115-129. <https://doi.org/10.1111/j.2040-1124.2012.00203.x>
- Denver, R. J., Bonett, R. M., & Boorse, G. C. (2011). Evolution of leptin structure and function. *Neuroendocrinology*, 94(1), 21-38. <https://doi.org/10.1159/000328435>
- Diez, A. (2011, diciembre 12). *Influencia del Polimorfismo GLN223ARG del Receptor de Leptina en el sobrepeso*. Universidad de Cantabria, Santander. Recuperado a partir de <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/510/Diez+Ibarbia+A.pdf?sequence=1>
- Duarte, S. F., Francischetti, E. A., Genelhu, V. A., Cabello, P. H., & Pimentel, M. M. (2007). LEPR p.Q223R, beta3-AR p.W64R and LEP c.-2548G>A gene variants in obese Brazilian subjects. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 6(4), 1035-1043.
- Dután Quizhpi, L. A., & Guncay Sangurima, T. E. (2017). *Asociación genotípica y fenotípica del polimorfismo 2548G> A del gen LEP con diabetes Mellitus tipo 2 en pacientes ambulatorios de la Fundación Donum* (B.S. thesis).
- Fan, S.-H., & Say, Y.-H. (2014). Leptin and leptin receptor gene polymorphisms and their association with plasma leptin levels and obesity in a multi-ethnic Malaysian suburban population. *Journal of Physiological Anthropology*, 33(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1880-6805-33-15>
- Franco, K. (2016, marzo 7). Polimorfismos de ADN y huella genética. Recuperado 22 de febrero de 2018, a partir de <https://prezi.com/l1cd6p17n6cf/polimorfismos-de-adn-y-huella-genetica/>



- Frühbeck, G., Salvador, J., & Díez, J. (2000). Implicaciones de la leptina en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 93-105.
- Fuentes Teresa. (2010). Señalización intracelular activada por leptina y su modulación por el ejercicio físico (I).
- Garcés, M. F., Gomes, B., Stekman, H., Hernández, C., López, A., & Soto de Sanabria, I. (2016). Polimorfismos G2548A del gen de leptina y GLN223ARG del gen del receptor de leptina en pre-puberes con riesgo cardiometabólico. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*, 79(2).
- Goldenberg, D., Santos, J. L., Hodgson, M., & Cortés, V. (2014). *Novel physiological and therapeutic implications of leptin* (Vol. 142).
- Gómez Quesada, M., J. (2010). Mecanismo regulador del osteoblasto por la leptina; Las piezas del rompecabezas que relacionan peso y densidad mineral ósea comienzan a encajar\*. *REEMO*, 131-132.
- Gutiérrez Orozco, G. (2012). *Detección de snps en genes asociados a obesidad y cáncer de mama en pacientes del noreste de México*. Universidad autónoma de nuevo león facultad de medicina, Mexico.
- He, J., Xi, B., Rüter, R., Shi, T.-Y., Zhu, M.-L., Wang, M.-Y.,... Wei, Q.-Y. (2013). Association of LEP G2548A and LEPR Q223R Polymorphisms with Cancer Susceptibility: Evidence from a Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 8(10), e75135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075135>
- Heras Mosquera, G. N. (2010). "IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS EN UN SOLO NUCLEÓTIDO EN EL GEN CYP2D6 DEL CITOCROMO P450, EN POBLACIÓN SANA DEL ECUADOR", 122.
- Hernández, Á., del Campo, F., A Mazon, M., Alonso, N., Calvo, B., Martin-Gil, F. J.,... L Arranz, M. (2006). Structure, functions and clinical importance of leptin. *QUIMICA CLINICA*, 25, 5.
- Hinuy, H. M., Hirata, M. H., Forti, N., Diament, J., Sampaio, M. F., Armaganijan, D.,... Hirata, R. D. C. (2008). Leptin G-2548A promoter polymorphism is associated with increased plasma leptin and BMI in Brazilian women. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 52(4), 611-616. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302008000400006>



- Jiménez Sousa, M. A. (2011, julio 5). Genómica: implicación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en la hepatitis C. Recuperado 3 de abril de 2018, a partir de <http://epidemiologiamolecular.com/genomica-polimorfismos-snps-hepatitis-vhc/>
- Li, W. D., Reed, D. R., Lee, J. H., Xu, W., Kilker, R. L., Sodam, B. R., & Price, R. A. (1999). Sequence variants in the 5' flanking region of the leptin gene are associated with obesity in women. *Annals of Human Genetics*, 63, 227-234. <https://doi.org/10.1046/j.1469-1809.1999.6330227.x>
- López Alcaraz, R. (2015). Desarrollo y aplicación de técnicas de Meta-análisis en estudios de asociación genética, 84.
- Mammes, O., Betoulle, D., Aubert, R., Herbeth, B., Siest, G., & Fumeron, F. (2000). Association of the G-2548A polymorphism in the 5' region of the LEP gene with overweight. *Annals of Human Genetics*, 64, 391-394. <https://doi.org/10.1017/S0003480000008277>
- Manuel, L., Zárate, A., & Hernández-Valencia, M. (2012). La leptina, hormona del adipocito, regula el apetito y el consumo de energía. Papel en la obesidad y dismetabolismo. *Acta Médica Grupo Ángeles*, 10(3), 154-7.
- Mongil, D. (2016, junio). *Adaptacion fisiológicas a la pérdida de peso y factores que favorecen nuevamente la ganancia de peso*. Universidad de Cantabria, Santander. Recuperado a partir de <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/8754/MongilRuizD.pdf?sequence=1>
- Morales Clavijo, M., Garcés, C., & F, C. (2010). OBESIDAD Y RESISTENCIA A LA LEPTINA. *Gaceta Médica Boliviana*, 33(1), 63-68.
- Paz-Filho, G., Mastronardi, C., Franco, C. B., Wang, K. B., Wong, M.-L., & Licinio, J. (2012). Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 56(9), 597-607.
- Portoles, O., Sorli, J. V., Frances, F., Coltell, O., Gonzalez, J. I., Saiz, C., & Corella, D. (2006). Effect of genetic variation in the leptin gene promoter and the leptin receptor gene on obesity risk in a population-based case-control study in Spain. *European Journal of Epidemiology*, 21(8), 605-612. <https://doi.org/10.1007/s10654-006-9045-6>



- Puigdevall Gallego, V., Laudo Pardos, C., & Ferrández Longas, A. (1998). Leptina y pubertad, *49*, 561-567.
- Ramírez-Bello, J., Vargas-Alarcón, G., Tovilla-Zárate, C., & Fragoso, J. M. (2013). Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta Médica de México.*, 9.
- Riestra, P., Garcia-Anguita, A., Viturro, E., Schoppen, S., De Oya, M., & Garcés, C. (2010). Influence of the leptin G-2548A polymorphism on leptin levels and anthropometric measurements in healthy Spanish adolescents: Leptin G-2548A polymorphism in children. *Annals of Human Genetics*, 74(4), 335-339. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2010.00586.x>
- Roche. (1999). LightCycler® Nano System Performance Data. Recuperado 19 de abril de 2018, a partir de [https://lifescience.roche.com/global\\_en/articles/lightcycler-nano-system-performance-data.html](https://lifescience.roche.com/global_en/articles/lightcycler-nano-system-performance-data.html)
- Sánchez, J. C. (2005). Perfil fisiológico de la leptina. *Colombia médica*, 36(1). Recuperado a partir de <http://www.scielo.org.co/pdf/cm/v36n1/v36n1a8.pdf>
- Sida Medina Raquel. (2010, Enero). *Asociación de los Polimorfismos G-2548A Y A223G en el Gen Leptina y su Receptor con Diabetes Tipo 2 en la Ciudad de Durango*. Instituto Politécnico Nacional, Durango. Recuperado a partir de <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8599/237.pdf?sequence=1>
- Thermo Fisher. (2016). PureLink Genomic DNA Mini Kit - Thermo Fisher Scientific. Recuperado 17 de abril de 2018, a partir de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K182001>
- Torrades, S. (2002). Diversidad del genoma humano: los polimorfismos, *VOL 21*. Recuperado a partir de [http://apps.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet?\\_f=10&pidet\\_articulo=13031745&pidet\\_usuario=0&pidet\\_revista=4&fichero=4v21n05a13031745pdf001.pdf&ty=6&accion=L&origen=doymafarma&web=www.doymafarma.com&lan=es](http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pidet_articulo=13031745&pidet_usuario=0&pidet_revista=4&fichero=4v21n05a13031745pdf001.pdf&ty=6&accion=L&origen=doymafarma&web=www.doymafarma.com&lan=es)
- Trakovická, A., Moravčíková, N., Candráková, K., & Kasarda, R. (2016). *Associations between LEP G2548A polymorphisms and lipids metabolism* (Vol. 19). <https://doi.org/10.15414/afz.2016.19.si.75-79>
- Valdés, B., María, J., Valdés Alonso, M. del C., Pérez Martínez, M., Díaz, J., de los Ángeles, M., & Linares Valdés, H. (2016). Papel de la leptina como señal aferente



- en la regulación de la homeostasis energética. *Revista Cubana de Pediatría*, 88(1), 0–0.
- Vázquez, J. P. C. (2009, noviembre 23). *Efecto de la sustitución Q223R en el receptor de la leptina y su asociación con la obesidad*. Instituto Politécnico Nacional. Recuperado a partir de <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/6460/EFECTOSUSTIT.pdf?sequence=1>
- Vela, M. E. F. V. (2006). Señalización de la Leptina. *Revista de Educación Bioquímica*, 25(2), 50–54.
- Wang, T., Huang, M., Chang, W., Albert, M., Tsai, E., Liu Chih-Shan, ... Ko Ying-Chin. (2012). G-2548A Polymorphism of the Leptin Gene Is Correlated with Extreme Obesity in Taiwanese Aborigines. *Obesity*, 14(2), 183-187. <https://doi.org/10.1038/oby.2006.23>
- Yang, M., Peng, S., Li, W., Wan, Z., Fan, L., & Du, Y. (2016). Relationships between plasma leptin levels, *leptin* G2548A, *leptin receptor* Gln223Arg polymorphisms and gestational diabetes mellitus in Chinese population. *Scientific Reports*, 6, 23948. <https://doi.org/10.1038/srep23948>
- Yiannakouris, N., Melistas, L., Yannakoulia, M., Mungal, K., & Mantzoros, C. (2003). The-2548G/A polymorphism in the human leptin gene promoter region is associated with plasma free leptin levels; interaction with adiposity and gender in healthy subjects. *HORMONES*, 2(4), 229-236. <https://doi.org/10.14310/horm.2002.11104>



## ANEXOS

## ANEXO 1: Variables de la Investigación

VARIABLE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	TIPO	CATEGORÍA
<b>Polimorfismos 2548G&gt;A en el gen LEP</b>	Presencia del alelo A o ausencia del alelo G	Presencia	Cualitativa nominal	Presente Ausente
<b>Edad</b>	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el momento de la entrevista, indicado en su cédula de identidad	Años	Cuantitativa (continua) Cualitativa (Nominal)	Adulto joven: 18-35 años Adulto: 35-64 años Tercer edad: 65 años en adelante
<b>Sexo</b>	Identificación sexual	Género	Cualitativa (nominal)	Masculino Femenino
<b>Etnia</b>	Etnia con la cual el individuo se identifica.	Etnia	Cualitativa (nominal)	Blanco Afro descendiente Mestizo Montubio Indígena Otros
<b>Talla (estatura)</b>	Es la altura que tiene un individuo en posición vertical desde el punto más alto de la cabeza hasta los talones en posición de "firmes".	Metros (m)	Cuantitativa (Continua)	Metros
<b>Procedencia</b>	Región desde donde acude el individuo para ser atendido	Región del País	Cualitativa (Nominal)	Costa Sierra Amazonía Región Insular
<b>Peso Corporal</b>	Masa del cuerpo expresada en kilogramos, medida en balanza mecánica	Kilogramos (kg)	Cuantitativa (Continua)	Kilogramos
<b>Morbilidades</b>	Presencia de una o más enfermedades	Presencia	Cualitativa nominal	Presente Ausente



**ANEXO 2: Consentimiento informado**



**Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos**  
**Universidad San Francisco de Quito**  
El Comité de Revisión Institucional de la USFQ  
The Institutional Review Board of the USFQ

**Formulario Consentimiento Informado**

**Título de la investigación:** “DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DEL POLIMORFISMO 2548G>A DEL GEN DE LA *LEPTINA* EN LA CIUDAD DE CUENCA-ECUADOR”.

**Organización del investigador:** Universidad de Cuenca

**Nombre del investigador principal:** María Elizabeth Alvarado León.  
Karla Paola Alvarracín Morocho.

**Datos de localización del investigador principal:** María Elizabeth Alvarado León.  
Tlf: 0993858965  
e-mail: [maria.alvaradol@ucuenca.ec](mailto:maria.alvaradol@ucuenca.ec)

Karla Paola Alvarracín Morocho.  
Tlf: 0984800365  
e-mail: [karla.alvarracinm@ucuenca.ec](mailto:karla.alvarracinm@ucuenca.ec)

**Co-investigadores:** Dr. Fausto Leonardo Zaruma Torres, PhD.  
Dra. Alejandra Neira, PhD.

**DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO**

**Introducción**

Este formulario de consentimiento puede contener palabras que usted no comprenda. Por favor, no dude en pedir a las investigadoras principales del estudio que le expliquen cualquier palabra o información que usted no entienda claramente.

En este formulario se indica el propósito de esta investigación. Usted está en libertad de hacer todas las preguntas que considere necesarias para despejar sus dudas y entender claramente el objetivo de este estudio con el fin de decidir aceptar o rechazar su participación en el mismo. Antes de indicar su decisión usted puede tomarse el tiempo que considere necesario para consultar con su familia y/o amigos si desea participar o no.

***Antecedentes del estudio:***



Todos los seres vivos están formados por una o varias células y esta es la unidad funcional de los seres vivos. Los seres humanos estamos formados por múltiples células, estas contienen una variedad de sustancias como azúcares, grasas, proteínas y material genético.

El material genético está formado principalmente por ADN [ácido desoxirribonucleico] y por ARN [ácido ribonucleico]; en sí, es como un "libro de instrucciones" donde se encuentran todas las indicaciones que permiten a las células del cuerpo crecer, duplicarse y producir diversas sustancias para poder formar estructuras más complejas como el corazón, los pulmones, los riñones, páncreas, etc.

Este material genético se organiza en pequeñas secciones denominadas genes. Estos genes son responsables de determinar todas las características de un individuo, como el color de ojos, color de cabello, tono de piel, estatura, peso, etc. Así, cuando existe alguna variación en el orden de un gen, también surgen alteraciones a nivel del funcionamiento normal del cuerpo que podrían generar una enfermedad.

Nosotras María Alvarado y Karla Alvarracín, egresadas de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca tenemos interés en identificar una variación en un gen conocido como gen de *Leptina*, esta variación a su vez se conoce científicamente como "polimorfismo 2548G>A" por lo que usted ha sido invitado para participar de esta investigación porque se necesita personas mayores de edad de 18 años en adelante.

El gen de *Leptina*, contiene información necesaria para que las células del tejido graso del cuerpo humano produzcan una hormona llamada Leptina; la cual es una sustancia química que participa en procesos tales como regulación del peso corporal, de la alimentación y del gasto energético, reproducción, crecimiento, función inmune y tono vascular, se ha asociado con un amplio número de patologías ya que la Leptina participa en la regulación hormonal de muchos procesos biológicos y como tal interviene en la fisiopatología de un amplio número de enfermedades.

### Propósito del estudio

Nuestra investigación pretende:

A partir de muestras de sangre, extraer el material genético (ADN) para determinar en éste la presencia o no del polimorfismo del gen de *Leptina* explicado con anterioridad. El propósito es determinar la frecuencia de dicho polimorfismo en población abierta y de esta forma aportar al campo de la ciencia con información acerca de una de los posibles factores causante de diversas enfermedades crónicas.

Consideramos importante su participación porque para este estudio se requiere personas mayores de edad de 18 años en adelante que les interese participar en el estudio y firmen el consentimiento informado.

### Descripción de los procedimientos

Una vez si usted acepta formar parte del estudio, su participación consistirá en: Acudir al Laboratorio de Análisis Biológico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de





Cuenca, donde mediante una entrevista directa y confidencial con las investigadoras principales, llenaran una hoja de recolección de datos, posterior las investigadoras le tomarán medidas de peso, talla y una muestra de sangre venosa (aprox. 5ml), sea del brazo derecho o izquierdo, La muestra de sangre tomada a su persona servirá además para la determinación del mencionado polimorfismo para lo cual utilizaremos las técnicas de laboratorio correspondientes

Entre la información que se le pedirá de manera confidencial durante la entrevista esta:

- Edad
- Sexo
- Etnia
- Procedencia
- Comorbilidades.

Para la toma de muestra de sangre se seguirán los siguientes pasos:

1. La investigadora principal preparara los elementos necesarios, asegurándose que sea material nuevo y estéril.
2. Luego se lavará las manos con abundante agua y jabón y se colocara guantes estériles.
3. Luego, identificará al paciente y explicará el procedimiento que se va a realizar. Pidiéndole que siente o se recueste.
4. Se etiquetará los tubos con la identificación del paciente (código alfanumérico asignado).
5. Después, la investigadora principal: Ubicara el torniquete alrededor del brazo del paciente de 5-10 cm por encima del codo y hará ligera presión; luego, localizara la vena a punzar, una vez localizada, desinfectara el área que va a punzar con algodón empapado de alcohol antiséptico y punzara la vena en dirección contraria al flujo sanguíneo. En un tubo tapa lila (tubo con EDTA) se recogerá aproximadamente 2-5 ml de sangre, finalmente se retirara el torniquete del brazo y se sacara la aguja; luego se aplicara presión suave con un algodón seco hasta que deje salir sangre y se colocara un apósito (curita) en el sitio que fue punzado.
6. Finalmente, la muestra de sangre será guardada en un refrigeración y se desechara correctamente todo el material usado incluyendo los guantes usados.
7. Las investigadoras registraran el procedimiento en los formatos designados y verificando que no exista ninguna novedad con el sitio que fue punzado.

*Nota:* en caso de tener dificultad de realizar la punción en los brazos, se podrá escoger otro sitio de punción, en este caso el dorso de la mano, y se continuará desde el paso n°5 colocando el torniquete alrededor de la muñeca.

Luego; en la tarde del mismo día, se extraerá el material genético, ADN, y se almacenara en



refrigeración hasta completar el número de muestras total.

Una vez recolectadas y extraído el ADN de todas las muestras necesarias, se procederá a identificar la presencia o no del polimorfismo en mención, mediante una técnica científica conocida como PCR Real Time.

**Duración de la investigación:** Esta investigación se llevará a cabo en un lapso de 6 meses, el día de hoy se consolidará su colaboración a través del presente documento y se procederá a la entrevista, medidas de peso, talla y la toma de muestra de sangre por parte de las investigadoras principales.

### Riesgos y beneficios

Riesgos:

- **Físicos:** con la toma de muestra de sangre de su brazo podrá experimentar cierto dolor, moretones, mareos y, en raras ocasiones, infección o desmayo. Las investigadoras tomarán las precauciones necesarias para evitar estas dificultades.
- En cuanto a la acción de subirse a la balanza para tomar medidas de peso y talla, no representan ningún tipo de riesgo físico o químico para usted.
- **Psicológicos:** Usted podría experimentar cierto grado de estrés al conocer el resultado de la presencia o ausencia del polimorfismo; sin embargo, debe mantenerse tranquilo pues dicho resultado no tiene influencias negativas sobre su salud.

### Precauciones a tomar durante la extracción de sangre venosa:

*Para evitar posibles infecciones en la zona de punción:*

- Durante la toma de muestra se aplicaran las más estrictas normas de higiene como: material nuevo y estéril, lavado de manos, uso de guantes estériles, desinfección con alcohol antiséptico.
- No tocar nuevamente la zona de punción después de haberla desinfectado.
- Limpiar correctamente la zona punzada luego de la extracción.
- El material descartable a usar se abrirá sólo al momento de su utilización y, una vez manipulado, no podrá guardarse nuevamente aun cuando se le considere nuevo.

*Para evitar la formación de hematomas (moretones):*

- Evitar movimientos en busca aleatoria de la vena.
- La misma persona no tratara de extraer la muestra de sangre más de dos veces. De ser posible, otra persona capacitada debe completar la acción.
- No aplicar presión excesiva en la zona punzada.



*Para evitar desmayos:*

- Si la persona sintiese mareo o sensación de que se desmayara, las investigadoras inmediatamente retiraran la aguja del lugar de la punción, aplicaran rápidamente la asepsia correspondiente y ayudaran al paciente a colocar la cabeza entre las rodillas o le pedirán que se recueste y respire profundamente.
- En caso de ser necesario se colocará una toalla fría en la cabeza o parte posterior del cuello. En caso que permanezca inconsciente, se notifica de inmediato a un médico.

**Beneficios:**

- Usted podrá conocer de manera gratuita si poseen o no el polimorfismo 2548G>A del GEN *LEP* que puede estar influyendo en el control de los niveles de azúcar en su sangre.
- Pese a que usted no recibirá ningún beneficio directo con el desarrollo de este proyecto, un posible beneficio indirecto es que su participación pudiera contribuir para conocer la frecuencia con que se presenta el polimorfismo 2548G>A del GEN *LEP* en la ciudad de Cuenca.

**Confidencialidad de los datos**

Para nosotros es muy importante mantener su privacidad, por lo cual bajo ningún concepto se revelará la identidad de los participantes. Toda la información que se obtenga de la investigación y de los participantes se mantendrá bajo confidencialidad, aplicaremos las medidas necesarias para que nadie conozca su identidad ni tenga acceso a sus datos personales:

1. La información que nos proporcione se registrará con un código alfa-numérico que reemplazará su nombre y se guardará en un lugar seguro donde solo el investigador tendrá acceso.
2. La muestra de sangre tomada de su persona será utilizada solo para esta investigación y destruidas tan pronto termine el estudio.
3. Su nombre no será mencionado en los reportes o publicaciones.
4. El Comité de Bioética de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ) podrá tener acceso a sus datos en caso de que surgieran problemas en cuanto a la seguridad y confidencialidad de la información o de la ética en el estudio.

**Derechos y opciones del participante**

Usted está en la libertad de decidir en participar o no de esta investigación, de igual manera, si en el desarrollo de la misma decide retirarse puede hacerlo con total libertad, únicamente su decisión deberá ser comunicada a los investigadores.

Si Usted decide participar no recibirá ningún pago ni tendrá que pagar absolutamente nada.

**Información de contacto**

Si usted tiene alguna pregunta sobre el estudio por favor comunicarse con:

Dr. Fausto Leonardo Zaruma Torres, PhD.

Tlf: 0983051850



e-mail: [fazato@hotmail.com](mailto:fazato@hotmail.com)

María Elizabeth Alvarado León.

Tlf: 0993858965

e-mail: [maria.alvaradol@ucuenca.ec](mailto:maria.alvaradol@ucuenca.ec)

Karla Paola Alvarracín Morocho

Tlf: 0984800365

e-mail: [karla.alvarracinm@ucuenca.ec](mailto:karla.alvarracinm@ucuenca.ec)

Si usted tiene preguntas sobre este formulario puede contactar al Dr. William F. Waters, Presidente del Comité de Bioética de la USFQ, al siguiente correo electrónico: [comitebioetica@usfq.edu.ec](mailto:comitebioetica@usfq.edu.ec)

### Consentimiento informado

He leído y comprendido toda la información contenida en este documento, el lenguaje utilizado ha sido claro y oportuno y todas mis dudas han sido contestadas, me han dado a conocer los riesgos y beneficios de participar en este estudio. He tenido el tiempo suficiente para decidir mi participación y manifiesto que acepto voluntariamente participar en esta investigación.

Firma del participante

Fecha

Firma del testigo (si aplica)

Fecha

Nombre del investigador que obtiene el consentimiento informado

Firma del investigador

Fecha



ANEXO 3: Hoja de recolección de datos

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Universidad de Cuenca  
Facultad de Ciencias Químicas  
Carrera de Bioquímica y Farmacia

**Trabajo de Titulación:** “DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DEL POLIMORFISMO 2548G>A DEL GEN DE LA *LEPTINA* EN LA CIUDAD DE CUENCA-ECUADOR.”

**Investigadoras Principales:** María Elizabeth Alvarado León.  
Karla Paola Alvarracín Morocho.

**Director de Tesis:** Dr. Fausto Zaruma, PhD.

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

**Código del Paciente:** En mayúsculas, primera letra del primer nombre, primera letra del segundo nombre, primera letra del primer apellido, primera letra del segundo apellido, seguido de un guion medio, número que se le asignó al paciente a su llegada al Laboratorio de Biología Molecular. *Ejemplo:* MEAL-1

**Responda cada pregunta lo mejor que pueda. Si no está seguro de alguna respuesta, proporcione una aproximación o cálculo.**

**Marque una X en la caja al lado de su respuesta.**

**VARIABLES**

1. **Edad:** Marcar con un X

Adulto joven: 18-35 años ( )      Adulto: 35-64 años ( )      Tercera edad: 65 años en adelante ( )

**Edad exacta:** ( ) años



2. **Sexo:** Marcar con un X

Masculino ( ) Femenino ( )

3. **Etnia:** Marcar con un X

Blanco ( ) Afro descendiente ( ) Mestizo ( ) Montubio ( ) Indígena ( )

Otros:.....

4. **Procedencia:** Marcar con un X

Costa ( ) Sierra ( ) Oriente ( ) Región Insular ( ) Otros:.....

5. **Peso:** \_\_\_\_\_ en kilogramos.

6. **Talla:** \_\_\_\_\_ en metros.

7. **Morbilidades**

- **Manifiesta alguna de las siguientes enfermedades:** Marcar con un X

**Si ( ) No ( ) ¿Cuál?**

( ) Enfermedad Cardíaca

( ) Enfermedad Cerebral

( ) Insuficiencia Renal

( ) Desnutrición

( ) Infecciones agudas o crónicas

( ) Evidencia de inmunodeficiencias primaria o secundaria

( ) Presenta algún tipo de cáncer.



**ANEXO 4: Carta de Aprobación del estudio emitido por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos Universidad San Francisco de Quito**

2017-170E



**Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos  
Universidad San Francisco de Quito**

**El Comité de Revisión Institucional de la USFQ  
The Institutional Review Board of the USFQ**

Aprobación MSP, Oficio No. MSP-VGV5-2016-0244-Q, 26 de Abril de 2016

Quito, 21 de marzo de 2018

Señoritas

Karla Paola Alvarracín Morocho  
María Elizabeth Alvarado León,  
Investigadoras Principales  
UNIVERSIDAD DE CUENCA  
Ciudad

De mi mejor consideración:

Por medio de la presente, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito se complace en informarle que su solicitud de revisión y aprobación del estudio de investigación "DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DEL POLIMORFISMO 2548G>A DEL GEN DE LA LEPTINA EN LA CIUDAD DE CUENCA-ECUADOR.", ha sido aprobada el día de hoy como un estudio expedito, debido a que la investigación va a tomar datos personales pero el investigador asegura que serán codificados para el análisis y presentación de los resultados y una vez concluido el estudio cualquier dato que pudiese identificar al participante será borrado.

El CEISH - USFQ aprueba el estudio ya que cumple con los siguientes parámetros:

- El proyecto de investigación muestra metas y/o objetivos de significancia científica con una justificación y referencias.
- El protocolo de investigación cuenta con los procedimientos para minimizar sus riesgos de sus participantes y/o los riesgos son razonables en relación a los beneficios anticipados del estudio.
- Los participantes del estudio tienen el derecho a retirarse del estudio y su participación su conseguida a través de un proceso de consentimiento informado
- El protocolo cuenta con provisiones para proteger la privacidad y confidencialidad de los participantes del estudio en sus procesos de recolección, manejo y almacenamiento de datos
- El protocolo detalla las responsabilidades del investigador

Además el investigador principal de este estudio ha dado contestación a todas las dudas y realizado todas las modificaciones que este Comité ha solicitado en varias revisiones. Los documentos que se aprueban y que sustentan este estudio es la versión # 1 de febrero 27, 2018 que incluyen:

- Solicitud de revisión y aprobación de estudio de investigación, 16 páginas;
- Solicitud de aplicación al consentimiento informado por escrito, 6 páginas;
- Hoja de vida de la investigadora principal Karla Alvarracín, 13 páginas;
- Hoja de vida de la investigadora principal María Alvarado, 17 páginas.

Casilla Postal 17-12-845, Quito, Ecuador  
[comiteetico@usfq.edu.ec](mailto:comiteetico@usfq.edu.ec)  
PBX (593-2) 297-1700 ext 1149



2017-170E

Esta aprobación tiene una duración de un año (365 días) transcurrido el cual se deberá solicitar una extensión si fuere necesario. En toda correspondencia con el Comité de Bioética favor referirse al siguiente código de aprobación: 2017-170E. El Comité estará dispuesto a lo largo de la implementación del estudio a responder cualquier inquietud que pudiese surgir tanto de los participantes como de los investigadores.

Favor tomar nota de los siguientes puntos relacionados con las responsabilidades del investigador para este Comité:

1. El Comité no se responsabiliza por los efectos de eventos adversos que pudieran ser consecuencia de su estudio, los cuales son de entera responsabilidad del investigador principal. Sin embargo, es requisito informar a este Comité sobre cualquier novedad, especialmente eventos adversos, dentro de las siguientes 24 horas, explicando las medidas que tomaron para enfrentar y/o manejar el mencionado evento adverso.
2. El Comité no se responsabiliza por los datos que hayan sido recolectados antes de la fecha de esta carta; los datos recolectados antes de la fecha de esta carta no podrán ser publicados o incluidos en los resultados.
3. El Comité ha otorgado la presente aprobación en base a la información entregada por los solicitantes, quienes al presentarla asumen la veracidad, corrección y autoría de los documentos entregados.
4. De igual forma, los solicitantes de la aprobación son los responsables por la ejecución correcta y ética de la investigación, respetando los documentos y condiciones aprobadas por el Comité, así como la legislación vigente aplicable y los estándares nacionales e internacionales en la materia.

Deseándole los mejores éxitos en su investigación, se solicita a los investigadores que notifiquen al Comité la fecha de terminación del estudio.

Atentamente,

William F. Waters, PhD

Presidente Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos USFQ

cc. Archivo general, Archivo protocolo



Castilla Postal 17-12-841, Quito, Ecuador  
[comitebioetica@upfn.edu.ec](mailto:comitebioetica@upfn.edu.ec)  
PBX (593-2) 297-1700 ext 1149





---

**ANEXO 5: Equipos usados para la extracción de ADN y qPCR**



**Figura 17:** Baño María VORTEMP 56 EVC usado en el proceso de extracción de ADN.

*Fuente: Autoras*



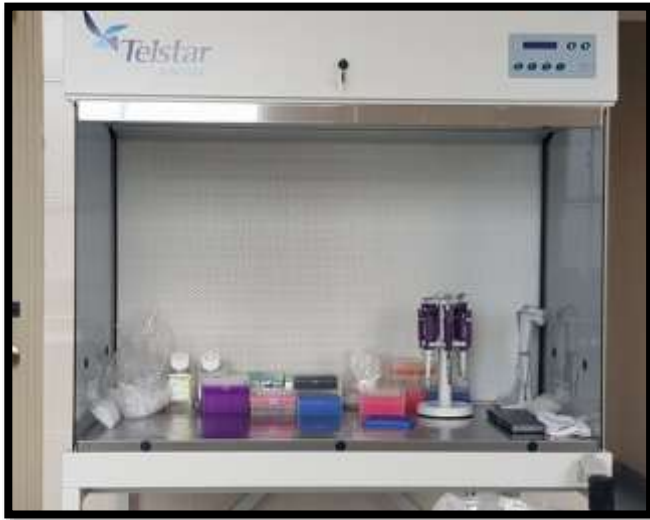
**Figura 18:** Autoclave horizontal digital Tuttnauer® 2540EK.

*Fuente: Autoras.*



**Figura 19:** Micro centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415R

*Fuente: Autoras*



**Figura 20:** Cabina de Flujo Horizontal Telstar AH-100

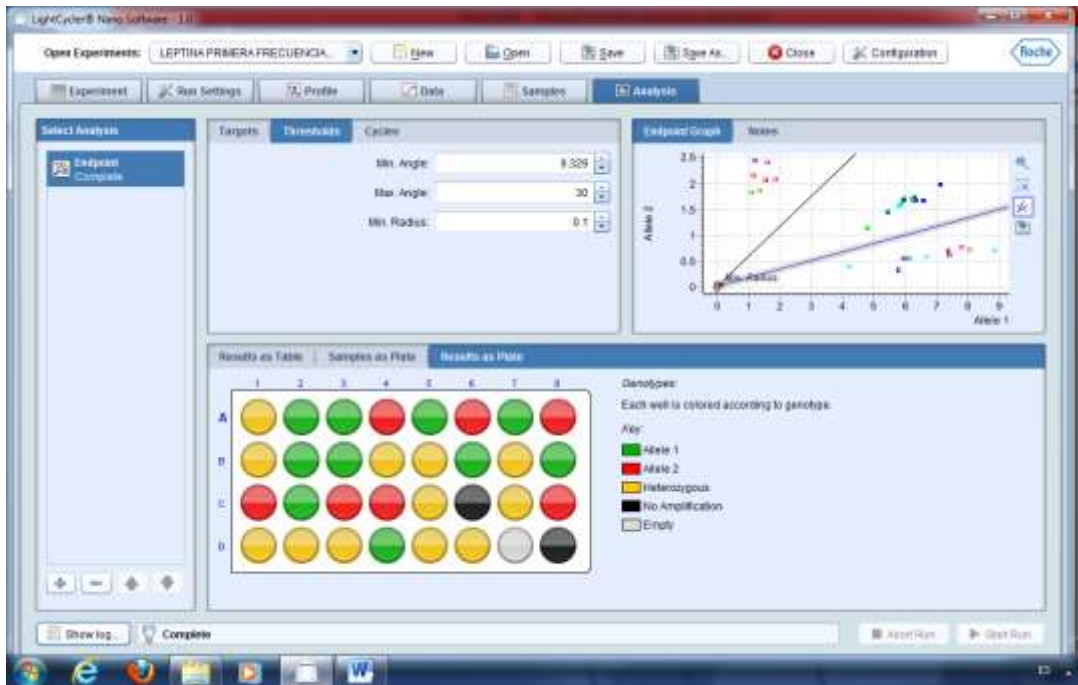
*Fuente:* Autoras.



**Figura 21:** LightCycler Nano 1.0.7.

*Fuente:* Autoras

**ANEXO 6: Interpretación de los resultados obtenidos en la técnica de qPCR**



**Figura 22:** Análisis Endpoint de LightCycler Nano.

Fuente: Autoras.

