

**UNIVERSIDAD DE CUENCA**



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“ASOCIACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DEL POLIMORFISMO 2548G>A DEL  
GEN *LEP* CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN PACIENTES AMBULATORIOS DE  
LA FUNDACIÓN DONUM”**

**Trabajo de Titulación previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico**

**Autoras:**

Lorena Alexandra Dután Quizhpi

C.I.: 0105351571

Tatiana Estefanía Guncay Sangurima

C.I.: 0106747637

**Director:**

Dr. Fausto Leonardo Zaruma Torres, PhD.

C.I. 110212798-0

**CUENCA – ECUADOR**

**2017**



## RESUMEN

El presente trabajo es un estudio no experimental de tipo transversal con diseño de casos y controles. El objetivo fue asociar genotípica y fenotípicamente el polimorfismo 2548G>A del gen *LEP* con la presencia de diabetes mellitus tipo 2 en pacientes ambulatorios de la fundación DONUM. Se trabajó con un total de 116 pacientes divididos en dos grupos de igual número (n=58), de acuerdo al diagnóstico previo de DM2; las variables edad, género e índice de masa corporal se aplicaron como criterios de pareamiento. Los antecedentes de enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares, renales, enfermedades de inmunodeficiencias y el estado de gestación fueron criterios de exclusión. La recolección de datos se realizó mediante entrevista directa con aplicación de encuesta; para la toma de muestras de sangre se emplearon tubos con EDTA, posterior se realizó la extracción del ADN, y se amplificó el material genético mediante la técnica de PCR real time.

Para el análisis estadístico se trabajó con un intervalo de confianza del 95% y  $p < 0.05$ . La presencia del alelo A y el genotipo AA se encontró con mayor frecuencia (16%) en el grupo con DM2, comparado con los controles (12%); sin embargo, no se encontró asociación estadísticamente significativa entre la presencia de la variante alélica con el desarrollo de Diabetes Mellitus Tipo 2.

**Palabras clave:** Diabetes mellitus tipo 2, obesidad, leptina, *LEP* 2548G>A



## ABSTRACT

The present research is a non-experimental cross-sectional study with case and control design. The aim of the study was to genotypic and phenotypically association of the SNP 2548G>A of the LEP gene with the presence of type 2 diabetes mellitus in outpatients of the DONUM Foundation. A total of 116 patients were enrolled and divided into two equal groups (n = 58), according to the previous diagnosis of DM2, the groups were paired by age, gender and body mass index. The history of cardiovascular, cerebrovascular, renal diseases, immunodeficiency diseases; and gestation status were exclusion criteria. Data collection was done through the direct interview using a survey; EDTA tubes were used to collect blood samples; later, it was performed the DNA extraction, and the genetic material was amplified using the real time PCR technique.

The Statistical analysis was performed with 95% confidence interval and  $p < 0.05$ . The presence of the A allele and the AA genotype was found with higher frequency (16%) in the DM2 group, compared with the controls (12%); however, no statistically significant association was found between the presence of the allelic variant and the development of Type 2 Diabetes Mellitus.

**Key words:** Type 2 diabetes mellitus, obesity, Leptin, *LEP* 2548G>A.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	2
ABSTRACT .....	3
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	4
LISTA DE TABLAS.....	8
LISTA DE FIGURAS .....	9
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA.....	10
CLÁUSULAS DE DERECHO DE AUTOR .....	12
CLÁUSULAS DE DERECHO DE AUTOR .....	13
CLÁUSULAS DE PROPIEDAD INTELECTUAL .....	14
CLÁUSULAS DE PROPIEDAD INTELECTUAL .....	15
DEDICATORIA.....	16
DEDICATORIA.....	17
AGRADECIMIENTOS .....	18
CAPITULO 1.....	19
1. INTRODUCCIÓN .....	19
1.1 OBJETIVOS DEL ESTUDIO .....	22
Objetivo general .....	22
Objetivos específicos .....	22
CAPITULO 2.....	23
2 Marco Teórico.....	23
2.1 Diabetes Mellitus .....	23



2.1.1 Clasificación .....	23
2.1.2 Epidemiología .....	25
2.1.3 Carga de la mortalidad .....	27
2.1.4 Situación en Latinoamérica y Ecuador.....	28
2.2 Diabetes Mellitus tipo 2 .....	29
2.2.1 Fisiopatología .....	30
2.2.2 Resistencia a la insulina .....	31
2.2.3 Disfunción de la célula $\beta$ -pancreática. ....	32
2.2.4 Criterios de diagnóstico de DM2 .....	34
2.2.5 Categorías de riesgo elevado para el desarrollo de diabetes.....	34
2.2.6 Factores de riesgo.....	35
2.3 Obesidad y DM2.....	35
2.4 Leptina.....	39
2.4.1 Descripción molecular de leptina .....	40
2.4.2 Receptor de leptina .....	41
2.4.3 Mecanismo de acción de la leptina .....	42
2.4.4 Señalización intracelular. ....	43
2.4.5 Resistencia a la leptina .....	45
2.4.6 Participación de la leptina en la resistencia a la insulina y la DM 2.....	46
2.5 Polimorfismo LEP 2548G>A .....	49
CAPITULO 3.....	51
3 Materiales y Métodos .....	51



3.1.1 Tipo de estudio .....	51
3.1.2 Universo de Estudio .....	51
3.1.3 Área de estudio .....	51
3.2 Muestreo .....	51
3.2.1 Fórmula.....	52
3.2.2 Criterios de Paramiento.....	53
3.2.3 Criterios de Selección .....	53
3.2.4 Variables.....	54
3.3 Procedimientos.....	55
3.3.1 Medición de peso y talla .....	55
3.3.2 Flebotomía.....	55
3.3.3 Extracción del ADN. ....	56
3.3.4 Amplificación de ADN mediante la técnica PCR-tiempo real.....	60
3.3.5 Estandarización de la técnica de PCR Real Time .....	61
3.3.6 Determinación del Polimorfismo.....	61
3.3.7 Interpretación de resultados.....	63
3.3.8 Análisis estadístico .....	63
3.3.9 Equilibrio de Hardy-Weinberg .....	63
CAPÍTULO 4.....	64
4 Resultados y Discusión .....	64
4.1.1 Descripción de las características clínicas y antropométricas de la población estudiada.....	64
4.1.2 Análisis estratificado por género .....	65



4.1.3 Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo 2548G>A del gen de <i>leptina</i> en los grupos de estudio.....	66
4.2 Equilibrio de Hardy Weinberg.....	67
4.3 Distribución de la presencia o ausencia del polimorfismo de acuerdo con las variables cualitativas.....	67
4.3.1 Asociación del polimorfismo <i>LEP 2548G&gt;A</i> con la presencia de DM2 .....	68
4.3.2 Asociación del polimorfismo <i>LEP 2548G&gt;A</i> con el IMC .....	69
4.3.3 Asociación del polimorfismo <i>LEP 2548G&gt;A</i> con el género .....	69
4.4 DISCUSIÓN.....	70
CAPÍTULO 5.....	73
5 Conclusiones y Recomendaciones .....	73
Conclusiones .....	73
Recomendaciones.....	74
BIBLIOGRAFÍA.....	75
ANEXOS.....	79

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Diez primeros países/territorios en número de personas con diabetes, 2015 .....	26
<b>Tabla 2:</b> Diez principales causas de mortalidad general en Ecuador, año 2013 .....	29
<b>Tabla 3:</b> Algunos de los genes conocidos, potencialmente marcadores de DM2 .....	31
<b>Tabla 4:</b> Factores de riesgo para adquirir DM tipo 2 .....	35
<b>Tabla 5:</b> Clasificación de la obesidad en adultos según la OMS 2012 .....	36
<b>Tabla 6:</b> Criterios de inclusión y exclusión para los participantes con DM2 .....	53
<b>Tabla 7:</b> Criterios de inclusión y exclusión para participantes que no padecen DM2 .....	54
<b>Tabla 8:</b> Componentes PureLink® Genomic DNA Mini Kit de INVITROGEN .....	56
<b>Tabla 9:</b> Materiales y equipos para la extracción de ADN.....	59
<b>Tabla 10:</b> Condiciones para la reacción de amplificación .....	61
<b>Tabla 11:</b> Condiciones de dilución para las muestra y la sonda Taqman® .....	62
<b>Tabla 12:</b> Materiales y equipos para el desarrollo de qPCR .....	62
<b>Tabla 13:</b> Datos sociodemográficos, clínicos para el grupo control y pacientes con diabetes mellitus tipo 2.....	65
<b>Tabla 14:</b> Características clínicas por género .....	66
<b>Tabla 15:</b> Genotipificación del polimorfismo <i>LEP 2548G&gt;A</i> .....	67
<b>Tabla 16:</b> Equilibrio de Hardy Weinberg .....	67
<b>Tabla 17:</b> Distribución de la presencia o ausencia del polimorfismo <i>LEP 2548G&gt;A</i> de acuerdo con las variables cualitativas.....	68
<b>Tabla 18:</b> Asociación del polimorfismo <i>LEP 2548G&gt;A</i> con la presencia de DM2.....	68
<b>Tabla 19:</b> Asociación del polimorfismo <i>LEP 2548G&gt;A</i> con el IMC.....	69
<b>Tabla 20:</b> Asociación del polimorfismo <i>LEP 2548G&gt;A</i> con el género.....	69



**LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1:** Número estimado de personas con diabetes mellitus en el mundo entre 20 a 79 años y por región en 2015 y 2040. .... 27

**Figura 2:** Evolución natural de la diabetes mellitus tipo 2. .... 33

**Figura 3:** Secreciones de tejido adiposo que influyen sobre el metabolismo. . .... 38

**Figura 4:** Descripción molecular del gen LEP. .... 41

**Figura 5:** Representación esquemática de la estructura general de los diferentes receptores para leptina..... 42

**Figura 6:** Señalización intracelular de la hormona leptina. .... 44

**Figura 7:** Acciones directas de la leptina en los tejidos que contribuyen a la homeostasis de la glucosa. .... 48

**Figura 8:** Proceso de extracción de ADN. .... 57

**Figura 9:** Baño María VORTEMP 56 EVC usado en el proceso de extracción de ADN..... 96

**Figura 10:** Micro centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415R..... 96

**Figura 11:** LightCycler Nano 1.0.7..... 96

**Figura 12:** Análisis Endpoint de LightCycler Nano. 7..... 97



## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**db/db:** gen diabético de ratón.

**DE:** desviación estándar

**DM2:** Diabetes Mellitus 2

**ECNT:** Enfermedades Crónicas no Transmisibles

**EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético

**EHW:** Equilibrio de Hardy-Weinberg

**FAM:** carboxi-fluoresceina

**FRET:** Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente

**GBA:** Glucosa Basal Alterada

**HbA1c:** Hemoglobina glicosilada

**IC:** intervalo de confianza

**IL:** Interleuquina

**IMC:** Índice de Masa Corporal

**IR:** Resistencia a la insulina

**IRS:** Receptor del Sustrato de insulina

**Kb:** Kilo base

**KD:** Kilo Dalton

**LEP:** Leptina

**MFGs:** Macrófagos



**ob/ob:** gen obeso de ratón.

**PCR:** Reacción en Cadena de la polimerasa

**PPAR $\gamma$ :** El receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma

**RI:** Resistencia a la Insulina

**SNP:** Polimorfismo de un solo nucleótido

**STAT 3:** Signal Transducers and Activators of Transcription

**TGA:** Tolerancia a la Glucosa Alterada

**TNF- $\alpha$ :** Factor de Necrosis Tumoral alfa

**VIC:** Fluorocromo verde



## CLÁUSULAS DE DERECHO DE AUTOR

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

Lorena Alexandra Dután Quizhpi en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "ASOCIACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DEL POLIMORFISMO 2548G>A DEL GEN *LEP* CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN PACIENTES AMBULATORIOS DE LA FUNDACIÓN DONUM", 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, noviembre de 2017.

Lorena Alexandra Dután Quizhpi

C.I: 0105351571



## CLÁUSULAS DE DERECHO DE AUTOR

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

Tatiana Estefanía Guncay Sangurima en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "ASOCIACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DEL POLIMORFISMO 2548G>A DEL GEN *LEP* CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN PACIENTES AMBULATORIOS DE LA FUNDACIÓN DONUM", 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, noviembre de 2017.

Tatiana Estefanía Guncay Sangurima

C.I: 0106747637



## CLÁUSULAS DE PROPIEDAD INTELECTUAL

### Cláusula de Propiedad Intelectual

Lorena Alexandra Dután Quizhpi, autora del trabajo de titulación "ASOCIACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DEL POLIMORFISMO 2548G>A DEL GEN *LEP* CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN PACIENTES AMBULATORIOS DE LA FUNDACIÓN DONUM", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, noviembre de 2017.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Lorena Dután Quizhpi".

Lorena Alexandra Dután Quizhpi

C.I: 0105351571



## CLÁUSULAS DE PROPIEDAD INTELECTUAL

### Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Tatiana Estefanía Guncay Sangurima, autora del trabajo de titulación "ASOCIACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DEL POLIMORFISMO 2548G>A DEL GEN *LEP* CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN PACIENTES AMBULATORIOS DE LA FUNDACIÓN DONUM", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, noviembre de 2017.

---

Tatiana Estefanía Guncay Sangurima

C.I: 0106747637



## DEDICATORIA

*“Nunca consideres el estudio como obligación, si no como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”*

A. Einstein.

Agradezco a Dios por haberme dado la existencia a lado de una gran familia, familiares y amigos. A mis padres Celso y Elena por el sacrificio, ejemplo de perseverancia, por enseñarme a ser de mí una mejor persona cada día y por su incondicional apoyo para lograr alcanzar una meta muy importante en mi vida. A mi esposo Freddy por su amor, paciencia y comprensión durante este largo camino. A mis hijos Julio Cesar y Allison por ser mi gran motivación para superarme como persona y brindarles un futuro mejor. A mis hermanos Julio, Guadalupe, Magaly y Graciela por estar a mi lado cuando los necesitaba. A mis compañeros de clase por todos los momentos de alegría y tristezas que hemos compartido, y sobre todo a mis amigas Guadalupe y Tatiana por su inmensa paciencia, consejos y sobre todo por su sincera amistad. De no haber sido por todos ustedes no hubiera tenido la fuerza y voluntad para culminar mi carrera profesional.

Lorena



## DEDICATORIA

*Tengo la fiel certeza, que cada uno elige la dirección de su destino. Así que cuando hagas algo, hazlo bien hecho o mejor no lo hagas.*

Un enorme gracias a Dios y la Virgen del Quinche, mis eternos consejeros y compañeros en esta aventura de vivir.

*¡Nena, lo logramos!* Sin duda todo el esfuerzo y perseverancia que me han llevado a cumplir esta meta tan anhelada, son resultado de todo el cariño, comprensión y correcciones recibidos de mi Madre Leticia, tan bella mujer que, con solo una palabra de aliento, logra inspirar la mejor versión de uno mismo.

A mi padre, Galo por haberme enseñado que uno siempre puede mejorar, cuando se tiene la inspiración correcta.

A mis hermanos, Byron y Ana, por su complicidad y apoyo.

A mi madrecita Lola y mis tíos, por nunca negarme un consejo de aliento.

A Guadalupe, por su amistad y consejos, a Lorena por completar este logro conmigo, y a Mayra por su hermandad.

Una dedicación especial de este logro, para mi segunda mamá, Sra. Carmen, quien es su corto paso por la vida me inculco que *el querer es poder*.

Finalmente, y no menos importante, para Santiago, quien con su paciencia y bondad multiplica las alegrías y divide las tristezas.

Tatiana



## AGRADECIMIENTOS

Sin duda este trabajo es el resultado del esfuerzo en conjunto de muchos, pues a lo largo de este camino hemos tenido la dicha de contar con la colaboración de personas extraordinarias que supieron apoyarnos con gran parte de su valioso tiempo, paciencia y conocimientos, para poder culminar con éxito esta anhelada meta.

Nuestro eterno agradecimiento al Dr. Fausto Zaruma Torres, PhD., tutor de nuestro trabajo de titulación, quien con su dirección y aporte de conocimientos guio este proyecto hasta su culminación. También, un enorme agradecimiento a nuestras familias, quienes con su confianza y amor supieron alentar día a día nuestros esfuerzos y sueños.

En este arduo proceso, hemos tenido la fortuna de contar con el apoyo de personas grandiosas, quienes con su amabilidad y conocimientos llegaron a ser faros de luz ante la duda, 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 la Dra. Diana Astudillo, Mgt, y Dra. Alejandra Neira, PhD., por haber sabido contestar cada una de nuestras dudas en el momento indicado, a la Dra. Johana Ortiz, por apoyarnos con sus amplios conocimientos en estadística, al Dr. Alfredo Campoverde, PhD., por su paciencia e indicaciones.

De igual manera esto no habría sido posible sin la colaboración y apoyo brindado por el personal de la Fundación DONUM, la Universidad de Cuenca y la Universidad Politécnica Salesiana de Cuenca, grandes instituciones que supieron abrirnos las puertas en el transcurso de este proyecto.

*“La gratitud es la memoria del corazón”*



## CAPITULO 1

### 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas no transmisibles como la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), son importantes preocupaciones de salud y economía en todo el mundo. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) la tendencia al incremento acelerado de la prevalencia de estas enfermedades en las últimas décadas ha llevado a que organismos internacionales y regionales de salud las consideren como verdaderas pandemias del siglo XXI (Hernández-Ávila, Gutiérrez, & Reynoso- Noverón, 2013; Moreno, 2012).

Según la Federación Internacional de Diabetes, en el año 2015, 415 millones de personas menores de 80 años padecían de DM a nivel mundial; y en el mismo año se estimó que 5 millones de personas fallecieron a causa de esta enfermedad; cifra que fue significativamente mayor comparada con el número combinado de muertes debidas a enfermedades contagiosas (International Diabetes Federation, 2015). De igual forma, las complicaciones micro y macrovasculares de la diabetes han logrado posicionarse entre las primeras causas de muerte temprana en muchos países (Camejo, García, Rodríguez, Carrizales, & Chique, 2012).

Particularmente en Latinoamérica, figura como la primera causa de ceguera, insuficiencia renal, amputaciones no debidas a traumas y se encuentra entre las diez primeras causas de hospitalización y solicitud de atención médica; y en Ecuador, en el año 2010, la Diabetes y sus complicaciones se posicionaron como la tercera causa de morbilidad y primera de mortalidad de acuerdo a la Encuesta de Salud y Nutrición (ENSANUT). (Cano Fuentes et al., 2013; Freire et al., 2013).

La historia natural de la DM2 conduce desde la resistencia a la insulina a la hiperinsulinemia compensatoria, la disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas, la tolerancia a la glucosa alterada y, finalmente, la DM2 caracterizada por hiperglucemia manifiesta. Su desarrollo suele ser lento y asintomático (ALAD., 2013; Herrera, Soca, Será, Soler, & Guerra, 2012).

La incuestionable vinculación entre DM2 y obesidad, ha dado pie al surgimiento del término "diabesidad", en base a la fuerte influencia y grave impacto de la obesidad sobre la DM2. De acuerdo a la literatura, alrededor del 85% de los pacientes con DM2 son obesos, siendo la obesidad abdominal la que constituye un mayor riesgo para desarrollar esta enfermedad;



y las personas con un IMC mayor de  $35 \text{ kg/m}^2$ , tienen un aumento de 93 veces el riesgo de desarrollar DM2 (Al-Goblan, Al-Alfi, & Khan, 2014; Freire et al., 2013).

Durante estados de obesidad, el páncreas tiene una hiperactividad debido a la concentración alta y constante de glucosa en sangre y se desarrolla un estado de hiperinsulinemia que precede a la resistencia a la insulina; que en individuos con predisposición genética conduce al desarrollo de DM2 (Cervantes-Villagrana & Presno-Bernal, 2013).

En la actualidad se reconoce que el tejido adiposo, presenta también una función endocrina, con la secreción de adipocinas; sustancias involucradas en la homeostasis de la acción de la insulina, el metabolismo de la glucosa, procesos inflamatorios, entre otros. Dentro de este grupo se encuentra la leptina, hormona peptídica codificada por el gen *LEP* (7q31.3); tiene su acción a nivel del sistema nervioso central, disminuyendo el apetito y regulando las reservas energéticas (Araújo-Vilar, Guillín-Amarelle, Sánchez-Iglesias, Castro, & Casanueva, 2014; Contreras, Lares, Gutiérrez, & Velasco, 2011).

La evidencia acumulada durante la última década ha afirmado que la insuficiencia de leptina adipocitaria en el hipotálamo podría ser un factor etiológico importante en la patogénesis de DM1 y DM2 y morbilidades metabólicas relacionadas. Una de las evidencias más convincentes de la participación de esta adipocina sobre la DM, es que la administración de leptina en ratones experimentales con modelo de deficiencia de insulina como la DM1, puede normalizar los niveles de glucosa en la sangre, regular la ingesta de agua y la producción de orina, e invierte la glucosuria, la hipercetonemia y la hiperfagia (Amitani, Asakawa, Amitani, & Inui, 2013; Denroche et al., 2012; Wang, P, & Pippin, 2014).

A nivel molecular, la síntesis y función de leptina puede verse alterada por la presencia de diferentes polimorfismos de un solo nucleótido (SNP por sus siglas inglesas Single nucleotide polymorphisms) como el SNPs rs7799039 *LEP* (2548G>A), (Yang et al., 2016). Al respecto, en un estudio realizado en mujeres brasileñas, se evidenció que la presencia del polimorfismo 2548G>A en el gen *LEP* actúa como un importante predictor del incremento de leptina en plasma, así también en el aumento del índice de masa corporal, relacionándose con un riesgo elevado para el desarrollo de obesidad y disminución de la sensibilidad a la insulina (Hinuy et al., 2008).

Considerando estos antecedentes y la observación de que en Ecuador no existen estudios que hayan dilucidado la participación de los polimorfismos del gen *LEP* en el desarrollo de



DM2; se investigó la relación genotípica del polimorfismo 2548G>A del gen *LEP* con DM2 en un grupo de adultos diabéticos y no diabéticos.



## 1.1 OBJETIVOS DEL ESTUDIO

### Objetivo general

Asociar genotípica y fenotípicamente el polimorfismo  $2548G>A$  del gen *LEP* con diabetes mellitus tipo 2 en pacientes ambulatorios de la fundación DONUM.

### Objetivos específicos

- Identificar por PCR REAL TIME (qPCR) la frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo  $2548G>A$  del gen *LEP* en pacientes con DM2.
- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo  $2548G>A$  del gen *LEP* en un grupo de pacientes sin DM2.
- Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas entre los grupos de estudio.
- Describir la frecuencia del polimorfismo  $2548G>A$  del gen *LEP* entre los grupos de estudio en relación con género, edad e IMC.

## CAPITULO 2

### 2 Marco Teórico

#### 2.1 Diabetes Mellitus

En la actualidad, la diabetes mellitus (DM) es considerada como uno de los mayores problemas de salud que afecta a gran parte de la población. A nivel mundial, la DM figura como una de las cuatro enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) que causa mayor impacto socio-sanitario y en la economía de la salud, no solo por la elevada frecuencia con la que se presenta, sino también por las graves complicaciones crónicas que acarrea (International Diabetes Federation, 2015; Romero & Barrera, 2017).

El término diabetes mellitus define un desorden endocrino-metabólico que se presenta cuando el organismo no puede producir insulina o no puede utilizar la insulina eficazmente para permitir la asimilación de glucosa por parte de las células; si esto ocurre, los niveles de glucosa en sangre aumentan, y desencadenan una condición patológica conocida como hiperglucemia. Este estado hiperglucémico, conlleva a complicaciones tanto microvasculares como macrovasculares, entre los órganos diana afectados se encuentran la retina, el glomérulo renal y el sistema nervioso periférico para las primeras; mientras que las segundas afectan el sistema cardiovascular.

Al tratarse de una enfermedad multi-etiológica, la DM está asociada tanto a factores ambientales como genéticos; y a pesar de los avances científicos y tecnológicos, cada año más y más personas padecen esta condición. En muchos países la falta de entendimiento acerca de esta enfermedad es una de las grandes barreras, junto con la falta de diagnóstico, falta de presupuesto en salud y tratamientos acertados; para las estrategias de prevención efectivas que puedan ayudar a detener el inexorable aumento de la misma (Herrera et al., 2012; Rey, 2015; Romero & Barrera, 2017).

##### 2.1.1 Clasificación

La clasificación de la DM en base a su etiología y características fisiopatológicas, se divide en cuatro categorías:

1. Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)
  - 1.1 Autoinmune
  - 1.2 Idiopática



- 2 Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)
- 3 Diabetes mellitus gestacional
- 4 Otros tipos de diabetes.

Con frecuencia las personas con diagnóstico de DM2 llegan a requerir insulina en alguna etapa de la enfermedad, por otro lado, algunos casos de DM1 pueden tener periodos largos de remisión sin requerir la terapia insulínica. Por ello se eliminaron los términos no insulino e insulino dependiente (American Diabetes Association, 2016).

La DM1 afecta al 5-10 % de la población diabética, se caracteriza principalmente por un déficit absoluto de insulina, consecuencia de la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas; los primeros signos clínicos suelen manifestarse alrededor de la pubertad, momento en el que la función del páncreas se haya altamente deteriorada. Esta destrucción mayoritariamente se debe a un mecanismo autoinmune; sin embargo, existe un número reducido de casos donde se desconoce la causa etiológica, y se carece de inmunomarcadores indicadores de un proceso autoinmune destructivo de las células  $\beta$  pancreáticas, a este tipo se le conoce como DM1 idiopática, en la que se observa un fuerte componente hereditario (Cervantes-Villagrana & Presno-Bernal, 2013; Rojas, Molina, & Rodríguez, 2012).

La DM2 supone el 85-95 % de los casos de DM, y se caracteriza por grados variables de resistencia a la insulina combinada con un déficit progresivo de producción de ésta. Desde el punto de vista fisiopatológico, la DM2 se puede subdividir en:

- A. Predominantemente insulino resistente con deficiencia relativa de insulina.
- B. Predominantemente con un defecto secretor de la insulina con o sin resistencia a la insulina.

La diabetes mellitus gestacional (DMG) se define como una alteración del metabolismo de los hidratos de carbono de severidad variable que se inicia o se reconoce por primera vez durante el embarazo (Iglesias, Barutell, Artola, & Serrano, 2014; SEMERGEN., 2016).

Por último, el cuarto grupo de clasificación de DM engloba un número considerable de patologías, como:

- Defectos genéticos de la función de la célula beta
- Defectos genéticos en la acción de la insulina



- Enfermedades del páncreas exocrino
- Endocrinopatías
- Inducida por drogas o químicos
- Infecciones
- Formas poco comunes de diabetes mediada inmunológicamente
- Otros síndromes genéticos algunas veces asociados con diabetes (ALAD., 2013).

### 2.1.2 Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la prevalencia de DM, siendo más común la DM2, ha alcanzado grandes proporciones durante los últimos años, y su aumento está relacionado directamente con los cambios en el estilo de vida de las sociedades occidentalizadas, la calidad nutricional, el sedentarismo, etc.

En 2005, un estudio realizado por el Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos reportó una prevalencia de 18.5% de personas mayores de 65 años con diabetes; porcentaje significativamente mayor que aquel reportado para personas menores a 45 años (1.4%). De igual manera, en México, el Estudio Mexicano de Salud y Envejecimiento (SABE) determinó que la prevalencia de diabetes (definida como casos diagnosticados por un médico) pasó de 4% en 1994 a 7% en 2006, y si se incluyen los casos no diagnosticados, la prevalencia aumenta de 6.7 a 14.4% en el mismo periodo; de este porcentaje el 46.8% corresponde a la población entre 60 y 69 años y el 21% a los mayores de 70 años (Mehta, Del Moral, & Aguilar Salinas, 2010).

Los datos reportados por la Federación Internacional de Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés), muestran claramente que las cifras de prevalencia mundial de diabetes en la población adulta prácticamente se han duplicado, pues para el año 2014 las cifras pasaron del 4,7% al 8,5% (International Diabetes Federation, 2015); ello supone también un notable incremento en los factores de riesgo conexos, como el sobrepeso y la obesidad (Ramírez & Corona, 2017). Entre los principales países que presentan mayor prevalencia de la enfermedad destacan China y la India, con 109 y 69 millones de pacientes con DM respectivamente (**Tabla 1**) (International Diabetes Federation, 2015).

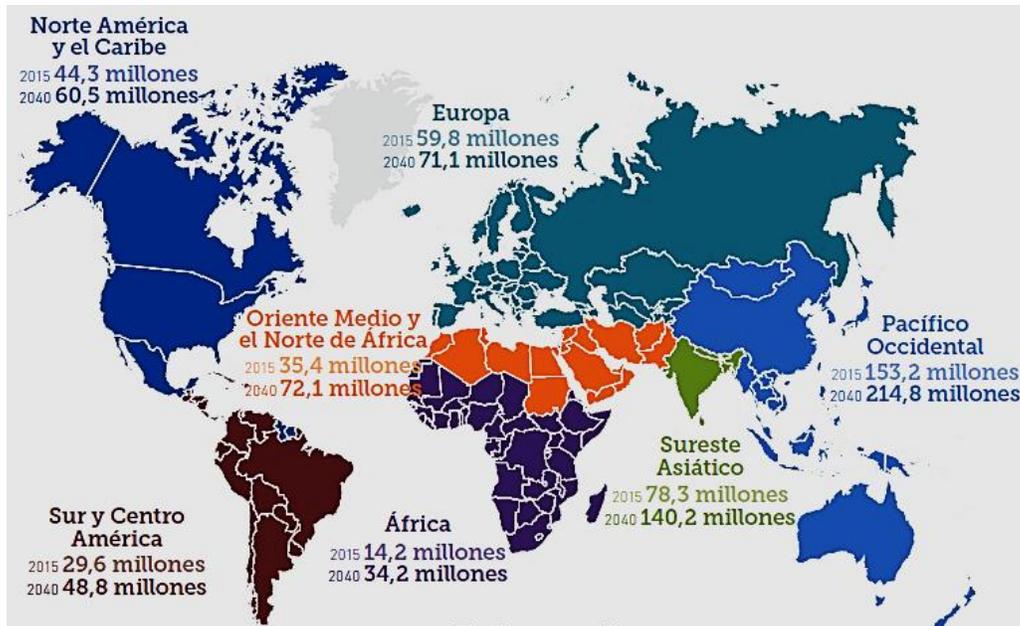


**Tabla 1:** Diez primeros países/territorios en número de personas con diabetes (20-79 años), 2015.



Fuente: Tomada de IDF (International Diabetes Federation, 2015)

Ciertamente, en el año 2015 alrededor del mundo, 415 millones de personas menores de 80 años fueron diagnosticadas con DM y se sospecha que si el crecimiento actual se mantiene, esta cifra se incrementa a 642 millones para el año 2040 (International Diabetes Federation, 2015)



**Figura 1:** Número estimado de personas con diabetes mellitus en el mundo entre 20 a 79 años y por región en 2015 y 2040. Tomada de IDF (International Diabetes Federation, 2015)

### 2.1.3 Carga de la mortalidad.

La DM y sus complicaciones se encuentran entre las primeras causas de muerte temprana en muchos países. Se estimó que en año 2012 esta enfermedad fue la causa directa de 1,5 millones de muertes en el mundo; otros 2,2 millones de muertes eran atribuibles a la hiperglucemia y cerca de la mitad (46,6%) ocurrieron en personas menores de 60 años.

Para el año 2015, los valores aumentaron hasta 5 millones de personas fallecidas entre los 20 y 79 años a causa de la diabetes; y haciendo una comparación, esta cifra fue notablemente mayor frente al número combinado de muertes debidas a enfermedades contagiosas (1,5 millones por VIH/ SIDA, 1,5 millones por tuberculosis, y 0,6 millones por malaria) en el mismo año. Entre los países que destacan con cifras elevadas de decesos por DM se encuentran, Norteamérica con 38%, Centro y Suramérica con un 44% y el continente africano con un 76% (Camejo et al., 2012; International Diabetes Federation, 2015; OMS, 2016; Romero & Barrera, 2017).

Sin embargo, a pesar de los datos presentados, la estimación del número de muertes debido a la DM es aún incierto; pues, más de una tercera parte de países no registran datos claros sobre la mortalidad relacionada con la enfermedad y muchos de los programas



de estadísticas de salud aun subestiman el número de muertes debidas a esta condición; todo esto sugiere que los datos reales puedan ser todavía mayores.

Por otro lado, el costo de la DM y en particular de sus complicaciones afecta tanto al paciente como a los sistemas de salud, debido a que el tratamiento no solo consiste en palear la enfermedad sino también en el control y la prevención de las complicaciones macro y micro vasculares a largo plazo. Por ejemplo, en USA la carga económica de esta enfermedad supera los 130 mil millones de dólares por año; así, el tratamiento de un paciente con DM tiene un gasto médico medio de 1,5 veces más que los de una persona sin esta enfermedad; la presencia de complicaciones microvasculares, duplica los costos, mientras que las complicaciones macrovasculares los triplica y cuando coexisten ambos tipos de patologías, los costos se multiplican hasta cinco veces más (International Diabetes Federation, 2015; Romero & Barrera, 2017).

#### **2.1.4 Situación en Latinoamérica y Ecuador.**

En Latinoamérica, el número creciente de casos y la complejidad de la enfermedad ha determinado un mayor número de muertes e incapacidades debidas a esta patología. Entre las causas más frecuentes de muerte figuran las complicaciones derivadas de DM tales como cardiopatía isquémica y los infartos cerebrales. Además, es la primera causa de ceguera, insuficiencia renal, amputaciones no traumáticas y se encuentra entre las diez primeras causas de hospitalización y solicitud de atención médica. En este sentido, doce de los 21 países latinoamericanos tienen una prevalencia de DM mayor al valor promedio mundial (8.3%); dentro de estos territorios la diabetes es responsable del 12.3% de las muertes totales en los adultos. Pero a pesar de este inminente crecimiento, en estos países el presupuesto asignado para la atención de la enfermedad es uno de los más bajos (20.8 billones de dólares por año), y representa sólo el 4.5% del gasto mundial (ALAD., 2013; Cano Fuentes et al., 2013).

En Ecuador la situación no es diferente, en el año 2010 la DM y sus complicaciones se posicionaron como la tercera causa de morbilidad y primera de mortalidad. De acuerdo a la Encuesta de Salud y Nutrición (ENSANUT) realizada entre el año 2011 y 2013 indica que 414.514 ecuatorianos padecían la enfermedad, de los cuales el 5,4% corresponden a edades entre 40 y 49 años y el 10,3% entre 50 y 59 años de edad (Freire et al., 2013). Para

el año 2013 se registraron 4.695 muertes a causa de DM, convirtiéndose en la principal causa de mortalidad general con un porcentaje de 7,44%, mientras que las enfermedades hipertensivas figuran como la segunda causa de muerte (INEC., 2013), véase la **Tabla 2**

**Tabla 2:** Diez principales causas de mortalidad general en Ecuador, año 2013

Población estimada 2013		15.774.749		
Total de defunciones		63.104		
Tasa de mortalidad general (x 100.000 hab.)		400.03		
Nº Orden	Causas de muerte	Número	%	Tasa
1	Diabetes Mellitus	4.695	7.44	29.76
2	Enfermedades hipertensivas	4.189	6.64	26.56
3	Influenza y neumonía	4.189	5.94	23.77
4	Enfermedades cerebrovasculares	3.749	5.65	22.61
5	Accidentes de transporte terrestre	3.567	4.87	19.47
6	Enfermedades isquémicas del corazón	2.942	4.66	18.65
7	Cirrosis y otras enfermedades del hígado	2.005	3.18	12.71
8	Enfermedades del sistema urinario	1.874	2.97	11.88
9	Insuficiencia cardíaca, complicaciones y enfermedades mal definidas	1.716	2.72	10.88
10	Neoplasia maligna del estómago	1.570	2.49	9.95
Resto	Resto de causas	33.725	-	-

*Fuente:* Modificada de Instituto Nacional de Estadísticas y Censos de Ecuador (INEC., 2013)

## 2.2 Diabetes Mellitus tipo 2

La DM2, anteriormente denominada diabetes no insulino dependiente o DM de la edad madura, es un síndrome metabólico de carácter crónico cuya característica es la deficiencia relativa de insulina que conduce a una condición de hiperglucemia sostenida. Esta deficiencia surge de un estado de resistencia a la acción de la insulina a nivel tisular (hígado, músculo y tejido graso) y una decreciente capacidad secretora de insulina por parte de las células  $\beta$ -pancreáticas. Considerando que en la DM2 ambos fenómenos suelen coexistir en diferentes proporciones y que tanto la secreción de insulina como la sensibilidad a la acción de la hormona son procesos íntimamente relacionados en el complejo control de la homeostasis de la glucosa; es casi imposible dilucidar la contribución de cada uno en



la fisiopatología de la enfermedad (Conget, 2002; González Sarmiento, Hinojosa Mena-Bernal, & Galiana, 2008; Tome, 2006).

Por su etiología heterogénea una gran parte de los casos cursan sin un diagnóstico claro durante mucho tiempo, debido a que la hiperglucemia suele presentarse de manera gradual y no siempre con sintomatología acompañante. Sin embargo, la hiperglucemia crónica es una condición que predispone y se asocia a otra serie de procesos patogénicos como la glucotoxicidad, lipotoxicidad, estrés oxidativo, entre otros; que están involucrados con el daño, disfunción o fallo de varios órganos y sistemas, conduciendo al desarrollo de complicaciones propias de la enfermedad (Conget, 2002; Masharani & German, 2013).

### **2.2.1 Fisiopatología**

Las causas que desencadenan la DM2 se desconocen en el 70-85% de los casos; al parecer, existe asociación de factores genéticos, ambientales, y fisiopatológicos; sin embargo, no existe certeza de la forma en que interactúan para desencadenar el inicio de la enfermedad.

Hay evidencia clínica en base a pruebas científicas que citan una fuerte predisposición genética para el desarrollo de la enfermedad; como por ejemplo, la concordancia para presentarla en gemelos monocigotos (30-90%), el aumento del riesgo en grupos familiares (2-4 veces más frecuente en familiares de primer grado) y las diferencias entre grupos étnicos. Las formas más frecuentes de DM son de naturaleza poligénica, es decir, implican un gran número de genes. Sin embargo, existe un pequeño grupo de naturaleza monogénica, que a diferencia de la primera presenta una herencia de patrón mendeliano, como la DM tipo MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) y la diabetes mitocondrial (Baynes, 2015; Cervantes-Villagrana & Presno-Bernal, 2013).

La identificación de genes asociados con el desarrollo de la DM es difícil; pues los defectos genéticos enmarcados en la DM2 y en la resistencia a la insulina (RI) no son en un solo gen, sino que existe un cierto polimorfismo y muchos genes pueden estar involucrados, tenemos la glucoquinasa, transportador de glucosa 1 (GLUT-1), transportador de glucosa 4 (GLUT-4), hexoquinasa II, fosfofrutoquinasa, glucógeno-sintetasa, calpaína del receptor de insulina, entre otros. Todos estos genes codifican proteínas implicadas en las señales postreceptor y para enzimas clave del metabolismo intermediario de la glucosa (González

Sarmiento et al., 2008). Los genes más conocidos y potencialmente marcadores se exponen en la **Tabla 3**.

**Tabla 3:** *Algunos de los genes conocidos, potencialmente marcadores de DM2*

	<b>Acción de la insulina</b>	<b>Sensibilidad/ RI</b>	<b>obesidad</b>
GLUT-1	IRS 1-4	PPAR- $\gamma$	Leptina
GLUT-4	Fosfatidilinositol	PC-1	Resistina
Hexoquinasa II	3 quinasa ( $\alpha$ , $\beta$ )		Adiponectina
Fosfofructoquinasa	Proteinkinasa $\alpha$ , $\beta$		TNF- $\alpha$
Glucogenosintasa			Neuropéptido Y
			Calpaína 10

*Nota:* RI: resistencia a la insulina, GLUT-1: transportador de glucosa 1; GLUT-4: transportador de glucosa 4; IRS: insulin receptor substrate (receptor de insulina), PPAR- $\gamma$ : peroxisome proliferator-activated receptor (receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma), PC: proprotein convertasa (prohormona convertasa), TNF: tumor necrosis factor (factor de necrosis tumoral). Fuente (González Sarmiento et al., 2008)

Sin embargo, la predisposición genética no es suficiente, pues a pesar de los antecedentes familiares de DM2 para que un individuo desarrolle el padecimiento dependerá mucho de los factores ambientales a los que éste se exponga.

Durante el curso de la enfermedad existen tres alteraciones constantes que caracterizan la patogenia de la DM2:

- Resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos: musculo, grasa y especialmente hígado.
- Secreción alterada de la insulina en respuesta al estímulo de glucosa (hiperinsulinemia compensatoria)
- Producción aumentada de glucosa por el hígado (González Sarmiento et al., 2008; Tome, 2006).

### **2.2.2 Resistencia a la insulina.**

Según el Consenso del Grupo de Trabajo Resistencia a la Insulina de la Sociedad Española de Diabetes se entiende por RI, la disminución de la capacidad de esta hormona endógena y exógena para ejercer sus acciones biológicas en los tejidos diana a concentraciones que son eficaces en los sujetos no diabéticos (Castillo, 2010).

La causa desencadenante de la RI no se ha logrado especificar con claridad, aunque múltiples estudios señalan que las alteraciones a nivel del receptor de insulina generalmente sobre la cascada de fosforilización a nivel post-receptor, explicarían gran parte de la fisiopatología de la enfermedad. Otras hipótesis señalan también que el efecto antagónico que ejercen las adipocitocinas (leptina, adiponectina, resistina, TNF- $\gamma$ ), y los ácidos grasos libres (AGL) y ácidos grasos no esterificados (AGNE) sobre la acción de la insulina, tienen influencia directa sobre el desarrollo de la RI, de igual forma el estrés oxidativo asociado a la disfunción endotelial y alteraciones del metabolismo de la glucosa (González Sarmiento et al., 2008; Sánchez Rodríguez, 2012).

Para vencer la RI, la célula  $\beta$  aumenta la secreción pancreática de insulina (hiperinsulinemia compensadora), mediante este mecanismo se estimula la utilización periférica de glucosa y disminuye la producción de glucosa hepática para mantener la euglucemia. Sin embargo, este proceso conlleva un aumento de la masa celular que inicialmente logra compensar la RI pero con el tiempo, la célula  $\beta$  se deteriora progresivamente por mecanismos aún desconocidos y pierde su función. Una vez que el mecanismo compensatorio fracasa aparece finalmente la hiperglucemia, inicialmente en los estados post-prandiales y luego en ayunas (Castillo, 2010; González Sarmiento et al., 2008).

La RI es fundamental para que se desarrolle la DM2, pero sin el fracaso de la secreción de insulina por las células  $\beta$  no habrá diabetes establecida.

Un hecho interesante es que a medida que la célula  $\beta$  se deteriora, la hiperinsulinemia compensatoria falla, la hiperglucemia se hace notable y para el momento del diagnóstico el páncreas ha perdido hasta un 50% de la función de dichas células (Lopez Alcantar, 2012).

### **2.2.3 Disfunción de la célula $\beta$ -pancreática.**

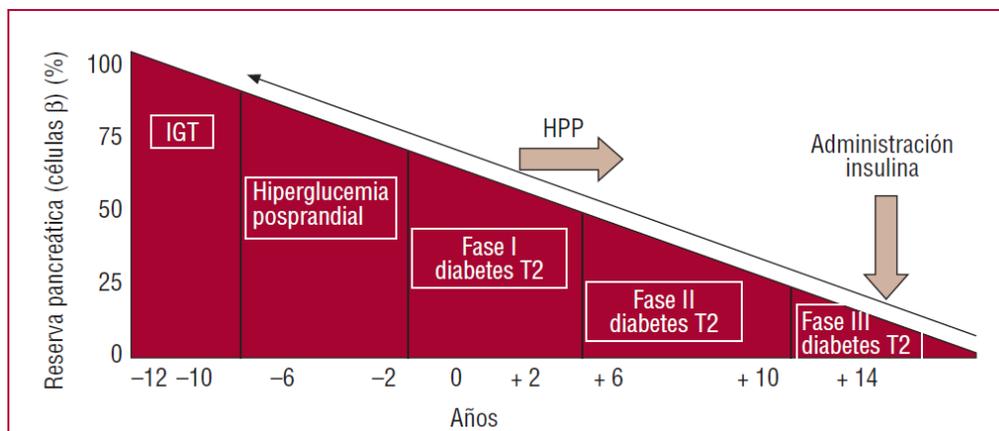
Cualquier anomalía que se presente a nivel de la célula  $\beta$ -pancreática, no solamente influye en el inicio de la DM2, sino que tiene gran relevancia en la evolución de la enfermedad.

Entre las alteraciones que intervienen en el fallo de la célula  $\beta$  durante el curso de la DM2, destacan:

- Depósito de sustancia amiloide.
- Disfunción mitocondrial.

- Estrés del retículo endoplásmico.
- La glucolipototoxicidad y las citoquinas inflamatorias (Contreras Zambrano, 2008; López Alvarenga, 2004).

Como se puede apreciar en la **Figura 2**, la disminución de los islotes de las células  $\beta$ -pancreáticas precede en el tiempo al desarrollo de la diabetes clínicamente manifestada. De hecho, hasta que la masa de las células  $\beta$  no disminuye por debajo del 50%, no se altera la glucemia basal (Calderón Montero, 2007). Simultáneamente, se ha comprobado que la regeneración de las células  $\beta$  no es mayor en los pacientes diabéticos que en los no diabéticos, de modo que se evidencia un desequilibrio entre destrucción y regeneración.



*Figura 2:* Evolución natural de la diabetes mellitus tipo 2. La pérdida de células  $\beta$  secretoras de insulina comienza unos 10 años antes de que la enfermedad sea clínicamente manifiesta. HPP: hiperglucemia postprandial; ITG: intolerancia a la glucosa. Tomada de (Calderón Montero, 2007)

El estudio prospectivo sobre diabetes realizado en el Reino Unido, conocido por las siglas en inglés (UKPDS), reveló que la estimulación crónica de la secreción insulínica para controlar la hiperglucemia contribuye al agotamiento funcional de las células  $\beta$ -pancreáticas y con el tiempo, a pesar de la terapia utilizada para tratar el deterioro metabólico, la progresión desde normoglucemia e intolerancia a la glucosa hacia DM2 se debe mayoritariamente a un fallo inminente en la funcionalidad de dichas células. De acuerdo al estudio, a pesar de la terapéutica utilizada (dieta, insulina, sulfonilúreas o metformina) ningún método pudo revertir o preservar la funcionalidad de las células. Se concluyó entonces que la DM2 es progresiva, y a medida que el páncreas pierde su capacidad de fabricar insulina, se requiere más tratamiento (King, Peacock, & Donnelly, 1999).



Con la introducción de las tiazolidinonas o glitazonas en el tratamiento de la DM2 se espera además de disminuir la resistencia periférica a la insulina, contribuir a preservar la funcionalidad de la célula beta pancreática (Ampudia-Blasco, 2003; Lopez Alcantar, 2012).

#### **2.2.4 Criterios de diagnóstico de DM2**

De acuerdo a la American Diabetes Association la diabetes debe ser diagnosticada en diferentes unidades de medida ( $18 \text{ mg/dl} = 1 \text{ mmol/L}$ ), cuando se cumplen uno o más de los siguientes criterios:

- a) Glucemia casual  $\geq 200 \text{ mg/dl}$  ( $11.1 \text{ mmol/l}$ ) en un paciente con síntomas característicos poliuria, polidipsia y polifagia (se define como casual un análisis practicado en cualquier momento del día independientemente de la hora de la última ingesta);
- b) Glucemia en ayunas  $\geq 126 \text{ mg/dl}$  ( $7 \text{ mmol/l}$ ) confirmada en dos determinaciones (en ayunas se define como la ausencia de ingestión calórica por lo menos durante 8 h);
- c) Valores de glucemia tras 2 h de la sobrecarga oral de glucosa  $\geq 200 \text{ mg/dl}$ ; el test debe realizarse según las directrices de la OMS, usando una bebida estándar que contenga el equivalente a 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua;
- d) Hemoglobina glicosilada (HbA1c)  $\geq 6,5 \%$ . El test debe realizarse en un laboratorio que use un método certificado por el National Glicohemoglobin Standardized Program (NGSP) y estandarizado según el ensayo Diabetes Control and Complication Trial (DCCT).

Los criterios de diagnóstico están basados en cálculos del umbral para las complicaciones de la diabetes. Concentración alta de estos tres marcadores –glucemia en ayunas, glucemia a las 2h y HbA1c- se relacionan con presencia de retinopatía y enfermedades cardiovasculares.

#### **2.2.5 Categorías de riesgo elevado para el desarrollo de diabetes.**

Existen dos grupos de población en los que los niveles de glucemia no son lo suficientemente altos para categorizarlos como DM, pero tampoco pueden ser considerados normales. Se clasifican como: Tolerancia a la Glucosa Alterada (TGA) cuando la glucosa plasmática en ayunas es  $< 126 \text{ mg/dl}$  y la glucosa plasmática tras dos

horas está entre 140 a 200 mg/dl, o glicemia basal alterada (GBA) cuando la glucosa plasmática en ayunas está entre 110 a 125 mg/dl y la glucosa plasmática tras dos horas es < 140 mg/dl. A estas condiciones se conocen comúnmente como “prediabetes”, término mal utilizado (American Diabetes Association, 2016; Iglesias et al., 2014; International Diabetes Federation, 2015).

### 2.2.6 Factores de riesgo

La DM2 es una enfermedad causada por una combinación de factores genéticos, ambientales y conductuales. Es necesario identificar a las personas con alto riesgo para poder ofrecerles intervenciones que han demostrado retrasar o evitar la enfermedad. Los factores pueden clasificarse como modificables o no modificables, se resumen en la **Tabla 4**

**Tabla 4:** Factores de riesgo para adquirir DM tipo 2

Factores de riesgo para presentar DM2	
Modificables	No Modificables
Sobrepeso	Edad y sexo
Sedentarismo	Raza/Etnia
Hipertensión	Susceptibilidad Genética
Colesterol elevado	Antecedente de DM2 en un familiar de primer grado.
Hábito de fumar	Otras enfermedades o tratamientos
Patrones dietéticos	

*Fuente:* Tomada de Candela et al (Candela, 2016)

La correlación de éstos no es absoluta, pero a mayor número de factores de riesgo mayor será la posibilidad de padecer diabetes, y a pesar de que algunos de estos factores pueden ser corregidos, son los factores no modificables como la susceptibilidad genética los que representan mayor importancia y dificultad al momento de prevenir y tratar la enfermedad (Ávila & Solano, 2016).

## 2.3 Obesidad y DM2

La incuestionable vinculación entre DM2 y obesidad ha dado pie al surgimiento del término "**diabesidad**", acuñado por Paul Zimmet *et al* en el 2001, en base a la fuerte influencia y grave impacto de la obesidad sobre la DM2. De acuerdo a la literatura, alrededor del 85%



de los pacientes con DM2 son obesos, siendo la obesidad abdominal la que constituye un mayor riesgo para desarrollar esta enfermedad.

La obesidad no es tan sólo un aspecto estético, sino un proceso fisiopatológico que resulta de la ingesta continua y desregulada de alimento rico en contenido energético, el cual no es aprovechado correctamente como consecuencia de una baja actividad metabólica y/o sedentarismo, por tanto, se almacena y acumula en el tejido adiposo. Todo esto, debido a que el organismo está sesgado más fuertemente hacia la prevención de deficiencia de energía que hacia el almacenamiento excesivo (Kanaya & Vaisse, 2013). Durante esta situación, el páncreas presenta una hiperactividad debido a la concentración alta y constante de glucosa en sangre, generando un estado de hiperinsulinemia que se relaciona con resistencia a la insulina y obesidad, y que en individuos con predisposición genética conduce al desarrollo de DM2 (Cervantes-Villagrana & Presno-Bernal, 2013).

La resistencia a la insulina característica de la obesidad, se desarrolla como resultado de una deposición incrementada de lípidos en tejidos no adiposos lo que conlleva a una a una pérdida en la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, aún no se define con claridad hasta qué punto la sobrecarga ponderal condiciona el desarrollo del síndrome diabético. Pues todos los pacientes obesos desarrollan hiperinsulinemia e insulinoresistencia, pero no todos son intolerantes a la glucosa o diabéticos (Durán García, Durán Sanz, & Durán Sanz, 2013).

Para valorar el grado de obesidad generalmente se aplican medidas antropométricas, y dada su reproducibilidad, facilidad de utilización y capacidad de reflejar la adiposidad en la mayoría de la población, el índice de masa corporal (IMC) es el parámetro más utilizado en la actualidad. Este índice resulta de la relación entre el peso en kilogramos dividido para el cuadrado de la estatura referida en metros cuadrados. Así, la OMS en el año 2012, en base a resultados de estudios longitudinales que relacionan el peso de un individuo con efectos adversos futuros sobre la salud, clasifica a la obesidad en diferentes niveles y categorías, como se indica en la **Tabla 5** (Carrillo Vázquez et al., 2011; Lopez Alcantar, 2012).

**Tabla 5:** *Clasificación de la obesidad en adultos según la OMS 2012*

Clasificación	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Riesgo Asociado a la salud
Normo Peso	18.5 – 24.9	Promedio
Sobrepeso	25 - 29.9	Aumentado
Obesidad Grado I o moderada	30 – 34.9	Aumento moderado
Obesidad Grado II o severa	35 - 39.9	Aumento severo
Obesidad Grado III o mórbida	≥ 40	Aumento muy severo

*Fuente: OMS, 2012.*

Sin embargo, el IMC no define un riesgo metabólico absoluto o relativo similar en todos los grupos poblacionales, pues no toma en cuenta diferencias étnicas y está claro que el tamaño e incluso fisiología del cuerpo varía de manera notoria con la raza y el grupo étnico; es así que, un diagnóstico acertado de obesidad requiere múltiples estudios además del IMC (Kanaya & Vaisse, 2013).

Anteriormente se pensaba que el tejido adiposo funcionaba únicamente como depósito de grasa, sin embargo ahora se sabe que los adipocitos desempeñan funciones mucho más complejas, como regular la captación y la liberación de ácidos grasos, participar en el ciclo de los ácidos grasos libres (AGL) y del glicerol, y segregar numerosas citocinas con acciones hormonales, paracrinas y autocrinas. Dichas citocinas son: factor de necrosis tumoral tipo alfa (TNF $\alpha$ ), adiponectina, resistina, interleucina (IL) 6, IL1B, IL8, IL10, IL15, leptina, angiotensinógeno y el inhibidor del activador del plasminógeno o PAI-1, entre otras. Al aumentar el área de superficie de adipocitos en la obesidad, aumenta la expresión adipocinas pro-inflamatorias como la resistina, la leptina, TNF- $\alpha$ , IL-6 (ver **Figura 3**). Se pierde entonces el equilibrio homeostático en el adipocito generando un estado inflamatorio que se relaciona con múltiples desórdenes metabólicos (Urquidez-Romero, Esparza-Romero, & Valencia, 2015).

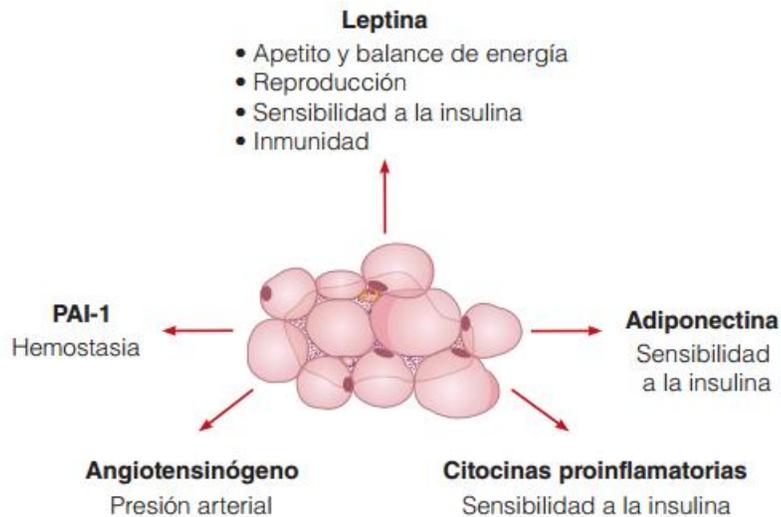


Figura 3: Secreciones de tejido adiposo que influyen sobre el metabolismo. Tomada de (Kanaya & Vaisse, 2013).

El tejido adiposo, además de adipocitos, contiene fibroblastos, pre-adipocitos y macrófagos (MFGs). Los macrófagos son contribuyentes importantes en el proceso inflamatorio sistémico general (Blancas-Flores et al., 2010), constituyen entre 5 y 10% del total de las células presentes en el tejido adiposo, pero la ganancia de peso inducida por la dieta genera una significativa infiltración de MFGs que contribuye con más del 60% de las células halladas en ese tejido durante la obesidad.

Los factores inflamatorios del tejido adiposo son producidos tanto por los adipocitos como por las células inflamatorias asociadas como los MFGs, la interacción entre éstos forman parte de los mecanismos fisiopatológicos que permiten el establecimiento RI y la DM2 (Irecta Najera & Álvarez Gordillo, 2016).

La participación de las adipocinas en el desarrollo de la obesidad y la DM2 ha sido ampliamente explorada, principalmente por la coexistencia de estados de resistencia a la insulina y resistencia a la leptina en individuos obesos. Se sabe que entre la leptina y la insulina existe una perfecta homeostasis ya que se regulan mutuamente. Así, la leptina inhibe la producción de insulina en las células  $\beta$  del páncreas, mientras que la insulina estimula la producción de leptina en el adipocito. Sin embargo, en un estado de resistencia a leptina caracterizado por hiperleptinemia, se pierde la homeostasis entre estas moléculas,



de tal manera que la leptina deja de inhibir la producción de insulina en el páncreas, conduciendo a una fase de hiperinsulinemia y resistencia a esta hormona (Almanza Pérez, Blancas Flores, García Macedo, Alarcón Aguilar, & Cruz, 2008; Serrano Ríos & Cascales Angosto, 2015).

## 2.4 Leptina

En la referencia histórica sobre la leptina publicada por el científico Douglas Coleman (2010), detalla cómo entre los años de 1950 y 1965 un grupo de científicos de Laboratorios Jackson comunicaron la aparición de dos mutaciones asociadas con obesidad mórbida en una de sus colonias de ratas, este defecto genético al parecer se heredaba de forma recesiva y se asociaba con DM. Las dos cepas fueron designadas obesas (*ob/ob*) y diabéticas (*db/db*), y se encontró que se debían a deficiencias de un solo gen (Coleman, 2010). Posterior, el mismo Dr. Coleman demostró que la cepa *ob/ob* era deficiente en un factor sanguíneo, mientras que la cepa *db/db* era deficiente en el receptor para este factor y finalmente el equipo del científico Jeffrey Friedman describió el gen *obeso de ratón* (*ob* o *LEP*) y encontró que codificaba una hormona que llamaron “leptina”, del griego *leptos*, que significa delgado, por su función en el control del peso corporal. 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; Covey et al., 2006; Denver, Bonett, & Boorse, 2011)

Como todas las adipocinas, la leptina funciona como una señal aferente que permite al cerebro detectar la magnitud de las reservas de energía en el organismo por lo que en un principio se le considero como una hormona “antiobesidad”; es sintetizada y secretada casi exclusivamente por el tejido adiposo y la cantidad liberada es directamente proporcional a la masa del mismo; sin embargo, algunas células inmunocompetentes y endoteliales también secretan leptina, aunque en menor proporción (Almanza Pérez et al., 2008; Kanaya & Vaisse, 2013).

Esta hormona es secretada en respuesta a la alimentación para suprimir el apetito, actuando tanto a nivel del sistema nervioso central como a nivel periférico para regular la conducta alimenticia y el balance de la energía (Almanza Pérez et al., 2008).



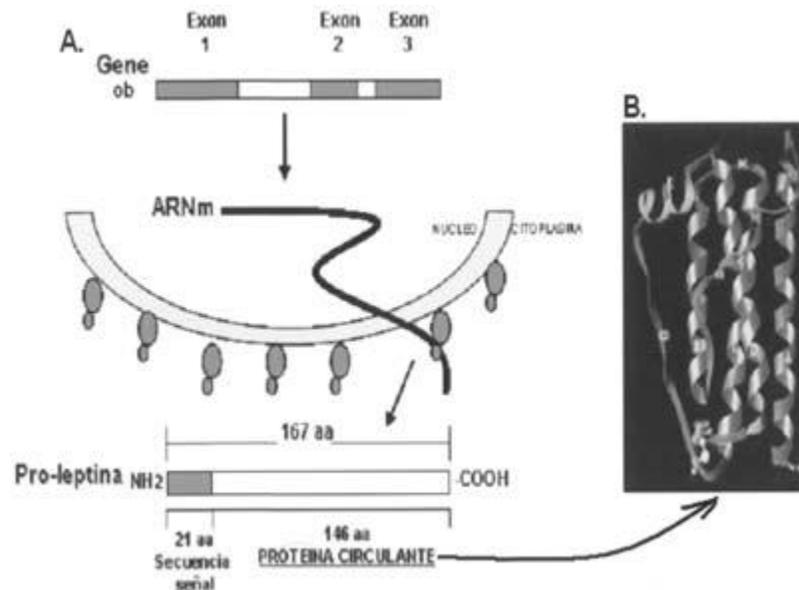
Sus niveles son mayores en mujeres que en hombres tras ajustar el IMC ya que se correlaciona con la masa grasa, dicha relación es curva en vez de completamente lineal, lo que sugiere que los niveles de leptina aumentan de forma exponencial con el aumento de la masa grasa. Así, en circunstancias basales 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 (Paz-Filho et al., 2012).

La concentración decreciente de leptina informa al cerebro de la baja reserva de grasa y nutrientes, desencadenando efectos compensadores sobre el apetito y el gasto energético para reabastecer las reservas y restablecer el balance de energía (Kanaya & Vaisse, 2013). Estudios realizados en ratones, demuestran que además de su función como regulador del gasto calórico y la ingesta, esta hormona también se ve implicada en otras funciones dentro de los sistemas inmunológico y endocrino, incluyendo reproducción, homeostasis de la glucosa, hematopoyesis, angiogénesis, osteogénesis e inflamación; a tal grado que la deficiencia parcial o total de leptina se asocia con obesidad severa, hiperglucemia, resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia, hipogonadismo hipogonadotrópico e hipotiroidismo central (Paz-Filho et al., 2012).

Sin embargo, a pesar de ser una hormona cuyo incremento es señal para cesar la ingesta de alimentos, es curioso que personas con obesidad presenten elevados niveles leptina pero no se desarrolle en ellos el estímulo de saciedad; esto sólo es indicativo de que el organismo al igual que para la insulina, puede generar un estado de resistencia para la leptina en estos pacientes (Carrillo Vázquez et al., 2011; Paz-Filho et al., 2012).

#### **2.4.1 Descripción molecular de leptina**

La proteína comprende una secuencia de 167 aminoácidos con una secuencia señal de 21 aminoácidos; tiene un peso molecular de 16 kD y presenta una estructura terciaria similar a la de las citocinas clásicas de hélice larga; la presencia de puentes disulfuro, es una de las características claves para su funcionamiento. 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 4**) y se localiza en el cromosoma 7 y el del ratón en el cromosoma 6, ambos en la región 31.3 del brazo q (Almanza Pérez et al., 2008; Denroche et al., 2012; Denver et al., 2011).



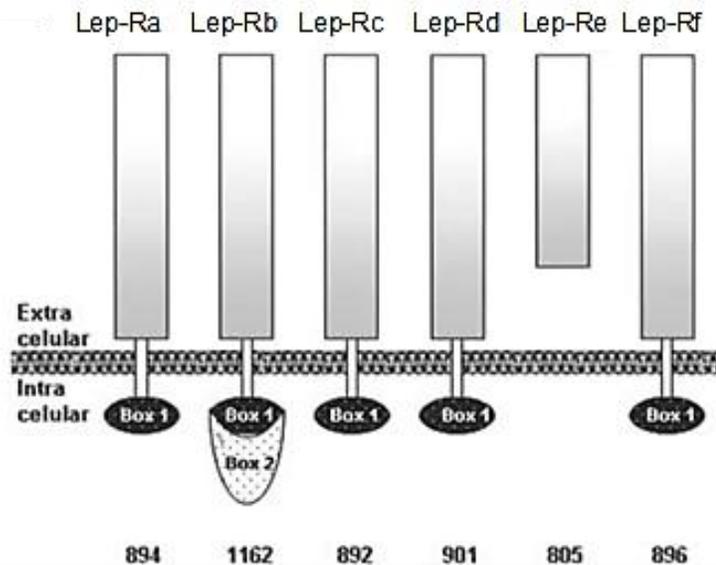
*Figura 4:* Descripción molecular del gen *LEP*. A) Representación esquemática del gen de leptina, compuesto por tres exones y dos intrones, que da origen a una proteína proleptina integrada por 167 residuos de aminoácidos y una proteína circulante de 146 aminoácidos. B) Estructura tridimensional de la proteína leptina en su forma circulante, compuesta por cinco cadenas principales en forma de hélice. Tomada de Almanza Pérez et al (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 ( $C/EBP\alpha$ ), ésta última figura como una importante 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 (Almanza Pérez et al., 2008).

#### 2.4.2 Receptor de leptina

Miembro de la familia de receptores de citocina clase I; se han descrito al menos seis isoformas para el receptor de leptina *Ob-R* o *LEPR*; todas comparten un dominio extracelular idéntico localizado en el extremo aminoterminal, donde se encuentra el sitio de unión con la leptina y difieren en su porción carboxilo-terminal (**Figura 5**). Cinco de las seis

isoformas (LEP-Ra, LEP-Rb, LEP-Rc, LEP-Rd y LEP-Rf) poseen dominios transmembranales, pero solo LEP-Rb contiene el segmento intracelular necesario para la activación de las cinasas, llamada región Box 2. (Almanza Pérez et al., 2008; Wauman & Tavernier, 2011). Por otro lado, la LEP-Ra se considera un transportador de leptina a través de la barrera hematoencefálica; y la forma (LEP-Re) que carece tanto de los dominios intracelular como transmembrana, sirve como una proteína plasmática de unión a la leptina (Paz-Filho et al., 2012).



*Figura 5:* Representación esquemática de la estructura general de los diferentes receptores para leptina. Las regiones de alta homología están representadas por Box 1. En la parte inferior se muestra el número de residuos de aminoácidos para cada receptor. Asimismo, se muestra otra secuencia característica del receptor más conocido LEP-Rb, la región Box 2. Modificado de (Almanza Pérez et al., 2008).

Los receptores para la leptina se expresan ampliamente en el hipotálamo, el páncreas endocrino, el hígado, el músculo esquelético, tejido adiposo, macrófagos, entre otros (Paz-Filho et al., 2012).

### 2.4.3 Mecanismo de acción de la leptina

En particular la leptina actúa como una adipocina anorexigénica en el hipotálamo (Carrillo Vázquez et al., 2011; Lopez Alcantar, 2012).

En el núcleo arcuato, la leptina (LEP) interacciona con el receptor funcional LEP-Rb; la unión LEP-LEP-Rb estimula la prohormona convertasa 1 (PC1) de las neuronas catabólicas para la activación de la proopiomelanocortina (POMC), la producción de melanocortinas



como la hormona  $\alpha$ -melanocito estimulante ( $\alpha$ -MSH) y la activación de los receptores de melanocortina (MC4R) localizados en el núcleo periventricular del hipotálamo para generar una señal de saciedad y así reprimir el apetito (Jung & Kim, 2013; Park & Ahima, 2015). Por otro lado, en el núcleo arcuato se produce el neuropéptido Y (NPY). Este neurotransmisor llega a través de las proyecciones de las neuronas de dicho núcleo hasta el núcleo paraventricular, que es la zona donde se libera, un aumento de NPY activa la sensación de hambre y con ello a la hiperfagia y obesidad. La unión LEP-LEP-Rb en las neuronas anabólicas, inhibe la expresión del NPY y de la proteína relacionada con la proteína agouti (AgRP); impidiendo así la sensación de hambre e indirectamente evitando la obesidad. De manera interesante, una baja cantidad de leptina invierte el mecanismo de control del peso, ya que se facilita la producción de NPY promoviendo la ingesta de alimentos y la adipogénesis; y con este último también se promueve la síntesis de leptina hasta regular nuevamente el sistema (Carrillo Vázquez et al., 2011; Jung & Kim, 2013; Lopez Alcantar, 2012; Park & Ahima, 2015).

En resumen, la leptina funciona como una señal a largo plazo del balance de energía al informar al cerebro de cambios en la cantidad de energía almacenada como grasa. Un decremento de la concentración de leptina promueve el consumo de alimento y minimiza el gasto de energía. Cabe destacar que los niveles de leptina no cambian con una sobrecarga de glucosa ni con comidas mixtas; es tan sólo a partir de 6<sup>ta</sup> hora y más claramente tras 12 horas de ayuno o sobrealimentación cuando se notan los cambios.

#### **2.4.4 Señalización intracelular.**

Una vez que la leptina se une a su receptor se produce un cambio conformacional debido a la activación de las cinasas JAK2 que da inicio a una cascada de fosforilaciones que involucra diversos sistemas enzimáticos; entre ellas está JAK2, que como todas las tirosina cinasas, fosforila a las proteínas con dominios SH2. Estas proteínas pertenecen a tres familias diferentes: la primera está constituida por las proteínas ERK (*extracellular-signal regulated kinase*); la segunda comprende las proteínas STAT3 (*signal transducers and activators of transcription*), que una vez fosforiladas son translocadas al núcleo, donde funcionan como reguladoras transcripcionales del gen *LEP*, gracias a su unión con elementos de respuesta de los promotores de algunos genes como el supresor de la señalización por citocinas-3 (SOCS-3) que bloquea la señalización de la leptina; el tercer grupo está asociado al sistema LEPRb-JAK2 e incluye las IRS (*insulin receptor substrate*),

que aunque no poseen actividad enzimática, pueden ser fosforiladas por varios sistemas de tirosina cinasas y están relacionadas con la activación de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K), enzima importante en la síntesis de fosfatidilinositol trifosfato (PIP3), conocido mediador de la liberación de calcio a partir de los depósitos intracelulares (Denver et al., 2011; Kanaya & Vaisse, 2013; Park & Ahima, 2015).

La vía JAK2/STAT3 es necesaria para el control de la leptina y del balance energético; una vez que STAT3 se transloca al núcleo, también aumenta la expresión de POMC e inhibe la de NPY; otra vía importante es la PI3K y PIP3 que en conjunto con la proteína quinasa B (PKB) impiden que la caja de Forkhead O (FoxO)-1 inhiba la expresión de POMC y estimule la expresión de NPY y AgRP como se muestra en la

Figura 6; promoviendo así los efectos de la leptina (Wauman & Tavernier, 2011). Una mutación en el gen que codifica la PKB- $\beta$  revela la herencia autosómica dominante de resistencia severa a la insulina y diabetes mellitus (Amitani et al., 2013).

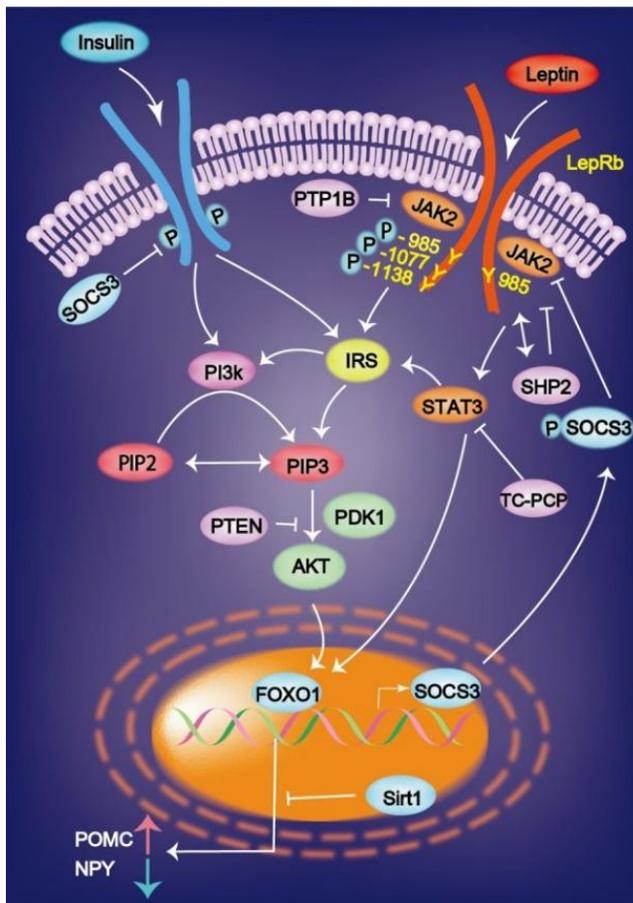


Figura 6: Señalización intracelular de la hormona leptina. La leptina se une al receptor de leptina (LEP-Rb) y activa la quinasa asociada al receptor JAK2 mediante transfosforilación y fosforila tres residuos de tirosina (Y985, Y1077 e Y1138). La expresión de mRNA inducida por leptina de JAK-STAT es inhibida por SOCS3. La insulina y la leptina regulan la expresión de AgRP y POMC a través de Foxo1 y el transductor de señal y activador del factor de transcripción STAT3. Sirt1 suprime la expresión dependiente de Foxo1 del neuropéptido orexigénico AgRP. AgRP, proteína relacionada con agouti; FOXO1, caja de horquilla O1; IRS, sustrato de receptor de insulina; PI3K, fosfatidilinositol 3 quinasa; PIP3, fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato. Tomada de (Amitani et al., 2013)



Una perfecta homeostasis de este sistema provoca que el efecto final de la leptina sea disminución de los niveles de insulina, glucosa y lípidos, aumento de la saciedad, de la termogénesis y de algunas hormonas como las tiroideas y las reproductivas. Los defectos en la señalización de la leptina conducen a la resistencia a la leptina, que es un factor de riesgo primario para la obesidad y resistencia a la insulina (Almanza Pérez et al., 2008; Amitani et al., 2013).

#### **2.4.5 Resistencia a la leptina**

Como se ha mencionado con anterioridad los niveles de leptina aumentan con la ganancia de peso y disminuyen con la pérdida de peso. Sin embargo, el hecho de que el suero de la mayoría de los individuos obesos contenga aproximadamente cuatro veces más leptina que el de sujetos delgados no concuerda con el papel anorexigénico de esta adipocina (Amitani et al., 2013; Lopez Alcantar, 2012).

Entre las teorías más aceptadas propuestas para explicar este fenómeno se encuentran:

- a) Defectos en el transporte de la leptina: En pacientes obesos, el transporte sanguíneo de las altas concentraciones de leptina no es eficiente, posiblemente por la cantidad insuficiente de la isoforma libre de su receptor, lo que sugiere que la leptina es transportada hacia el cerebro por un sistema saturable.
- b) Alteraciones en la vía de señalización que depende de la interacción LEP-LEPR o bien a alteraciones en esta interacción.
- c) Un transporte alterado de leptina en el sistema nervioso central a través de la barrera hematoencefálica.
- d) Defectos post-receptor que conducen a la falta de activación de los mediadores neuroendocrinos mencionados anteriormente, o
- e) Mutaciones en el gen de la leptina y/o de su receptor que provoquen cambios en la secuencia de aminoácidos y/o el plegamiento de las proteínas, dando como resultado una inhibición de su interacción (Araújo-Vilar et al., 2014; Carrillo Vázquez et al., 2011; Harris, 2014; Jung & Kim, 2013).

Actualmente, todas estas posibilidades están siendo valoradas para llegar a un entendimiento completo acerca de vías particulares y/o las interacciones que conllevan al desarrollo de la resistencia a la leptina.



#### 2.4.6 Participación de la leptina en la resistencia a la insulina y la DM 2

Se considera que la leptina y la señalización de la insulina son fundamentales para mantener la homeostasis de los nutrientes en el organismo; por ende, la coexistencia de resistencia a los efectos biológicos de ambas hormonas durante la obesidad está fuertemente ligada al desarrollo DM2 y otras alteraciones del metabolismo (Nazarians-Armavil, Menchella, & Belsham, 2013). Se considera que además de su función como reguladora del peso corporal, la leptina tiene cierta acción sobre el control de la glucosa por mecanismos que son independientes de la ingesta de alimentos; debido a que las redes de señalización de estas dos hormonas se superponen en varios niveles, y además de que la leptina presenta múltiples acciones directas e indirectas sobre los tejidos sensibles a la insulina y las hormonas del páncreas endocrino (Denroche et al., 2012; Wang et al., 2014).

Los estudios con administración aguda de leptina intracerebroventricular (ICV) destacan el papel de las acciones centrales de la leptina en el hipotálamo en la manipulación del metabolismo de la glucosa independientemente de la ingesta de alimentos y del balance energético, por ejemplo:

- En los roedores deficientes en la señalización de leptina, la hiperinsulinemia, y por lo tanto la interrupción de la homeostasis normal de la glucosa, precede a los cambios en la masa corporal.
- En segundo lugar, la administración de leptina a ratones *ob/ob* es capaz de reducir los niveles de glucosa en plasma en horas, antes de cambios en el peso.
- En tercer lugar, incluso cuando se administran durante varios días dosis bajas de leptina pueden curar virtualmente la diabetes en ratones *ob/ob* sin alterar el peso corporal.
- Finalmente, la alimentación controlada en los ratones *ob/ob* no puede corregir los niveles de glucosa en plasma en la misma medida que con la terapia con leptina.

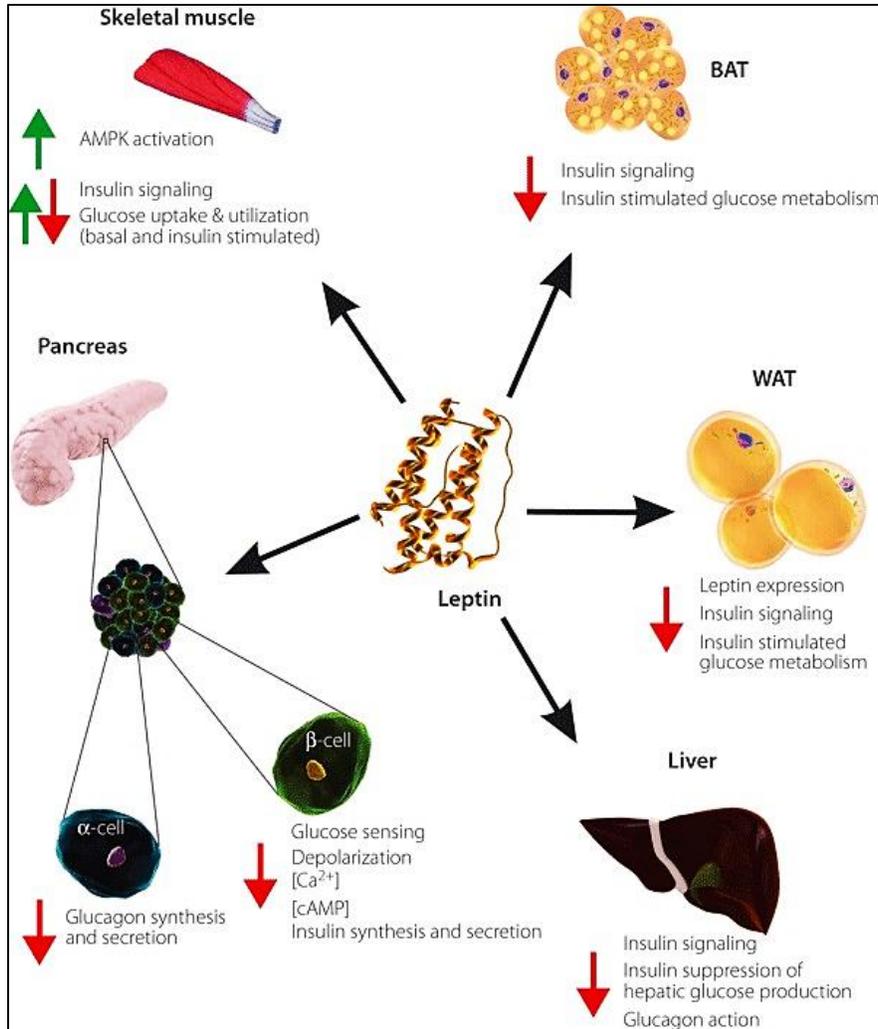
Por tanto, la leptina parece tener acciones potentes sobre la homeostasis de la glucosa que son independientes de sus efectos sobre la ingesta de alimentos y el peso corporal. Basándose en esta hipótesis se podría deducir un mecanismo potencial por el cual la resistencia a la leptina podría conducir a la diabetes independientemente del desarrollo de la obesidad (Coimbra, Brandão Proença, Santos-Silva, & Neuparth, 2014; Denroche et al., 2012; Moon et al., 2013).



Los mecanismos a través de los cuales la leptina modula el metabolismo de la glucosa no se han elucidado completamente. Sin embargo, los resultados del estudio de Denroche y col., demostraron que la leptina in vitro puede reducir la fosforilación del transportador de glucosa 2 (GLUT2), el transporte de glucosa y los niveles intracelulares de adenosina trifosfato (ATP) (Denroche et al., 2012). También sugirieron que inhibe la secreción de insulina por la activación dependiente de PI3K de la fosfodiesterasa 3B (PDE3B) y por la disminución de los niveles de cAMP, inhibiendo así la ruta de la proteína quinasa A (PKA), que regula los canales de  $Ca^{2+}$  y la exocitosis (Denroche et al., 2012; Marroquí et al., 2012).

De igual forma, se conoce que la leptina regula negativamente la expresión de mRNA de proinsulina a través de un mecanismo transcripcional que puede implicar el sistema STAT disminuyendo la síntesis de insulina (Harris, 2014); también debido a la presencia de LEPR en las células  $\beta$ -pancreáticas la leptina puede afectar la masa de las células  $\beta$  a través de cambios en la proliferación, apoptosis y crecimiento celular (Marroquí et al., 2012); de esta forma, la hiperinsulinemia en ratones *ob/ob* podría ser causada por el deterioro de la señalización de la leptina en las células  $\beta$  pancreáticas contribuyendo a la obesidad y la resistencia a la insulina (Levi et al., 2011).

La acción de la leptina sobre la insulina es predominantemente por acción central, mediante la vía de la melanocortina, pero esto no significa, que la leptina no influya sobre la señalización de la insulina por medios periféricos directos e indirectos (Muzumdar et al., 2003) como se muestra en la **Figura 7**. Por ejemplo, la acción de la leptina en el cerebro suprime potentemente la producción de glucosa hepática, mientras aumenta la captación de glucosa en los tejidos a pesar de la persistente y grave deficiencia de insulina (German et al., 2011). Los ratones tratados con el antagonista de la leptina de ratón polietilenglicolilado (PEG-MLA) exhiben un incremento en los niveles de insulina plasmática, una disminución de la sensibilidad a la insulina en todo el cuerpo, una producción elevada de glucosa hepática y una inhibición de la producción de glucosa hepática mediada por insulina (Levi et al., 2011).



*Figura 7: Acciones directas de la leptina en los tejidos que contribuyen a la homeostasis de la glucosa. La leptina actúa sobre los tejidos que expresan LEPR-b, incluyendo el páncreas endocrino y los tejidos sensibles a la insulina. La acción directa de la leptina sobre el páncreas endocrino inhibe la secreción de insulina de las células  $\beta$  y la secreción de glucagón de las células  $\alpha$ . La leptina actúa sobre los adipocitos para suprimir la señalización y la acción de la insulina, y los estudios in vivo indican que la leptina antagoniza directamente la sensibilidad a la insulina hepática. La acción directa de la leptina sobre el músculo esquelético puede aumentar o disminuir la captación de glucosa y el metabolismo de la glucosa estimulado por insulina, y el efecto general sigue siendo controvertido (combinado hacia arriba y hacia abajo). AMPK, quinasa activada por monofosfato de adenosina; BAT, tejido adiposo marrón; CAMP, adenosina monofosfato cíclico; WAT, tejido adiposo blanco. Tomada de Denroche et al. (Denroche, Huynh, & Kieffer, 2012)*

Una de las evidencias más convincentes del efecto que genera la leptina sobre la homeostasis de la glucosa es que la administración de leptina en ratones experimentales



con modelo de deficiencia de insulina como la DM1, puede normalizar los niveles de glucosa en la sangre, regular la ingesta de agua y la producción de orina, e invierte la glucosuria, la hipercetonemia y la hiperfagia. Sin embargo, al intentar una terapia con leptina exógena en seres humanos los resultados no han sido homogéneos, lo que sugiere que existen otros factores que controlar. Para el caso de la DM2 no se encuentran todavía resultados consistentes al tratamiento con leptina, pues al vincularse en un 80% con presencia de obesidad, parece que esta última es una condición limitante ya que se asocia típicamente con niveles elevados de leptina y resistencia a leptina, lo que afecta directamente la actividad de esta hormona (Amitani et al., 2013; Denroche et al., 2012; Wang et al., 2014).

En base a todo lo expuesto, es fácil concluir que la leptina y la insulina son dos hormonas que se regulan mutuamente; por un lado, la leptina puede inhibir la biosíntesis y la secreción de insulina en las células  $\beta$ , y por otro lado, la insulina estimula la secreción de leptina en el tejido adiposo, así que, cualquier alteración a nivel de la síntesis de leptina provocaría la disfunción de este lazo regulador hormonal adipo-insular, jugando un papel importante en el desarrollo de hiperinsulinemia, obesidad y DM2 (Amitani et al., 2013).

Debido a la relevancia de la interacción LEP-LEPR en la activación de la vía hipotalámica de señales leptina-melanocortina para la regulación de la homeostasis energética, numerosas investigaciones se han enfocado a evaluar la presencia de mutaciones en los genes que codifican para la leptina y su receptor para dilucidar la susceptibilidad genética a la obesidad y DM2.

## 2.5 Polimorfismo LEP 2548G>A

Los defectos en la producción de leptina causan una grave obesidad hereditaria en roedores y humanos además de vincularse con otras alteraciones metabólicas como la DM2. Particularmente el polimorfismo 2548G>A en el gen de leptina se ha asociado con el aumento de la producción y secreción de leptina en plasma (Yang et al., 2016)

*LEP* 2548G>A (rs7799039) es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) del gen *LEP* que consiste en la sustitución del alelo G por el alelo A en el nucleótido -2548 en la secuencia --2560 5' -CGACAGGGTTGC(**G/A**)CTGATCCT- 3'--2540, en locus 7q31.3 (Boumaiza et al., 2012). Este polimorfismo en la región promotora del gen de la leptina tiene una influencia sobre la expresión génica y las tasas de secreción de la leptina en tejido



adiposo; pues se encontró que ciertos factores nucleares derivados del adipocito se unen con mayor afinidad al alelo -2548A. Esto indica que el polimorfismo puede de hecho modificar la velocidad de transcripción del gen de la leptina y la secreción; relacionándose fuertemente con la hiperleptinemia y predisposición a la resistencia a la leptina en diferentes poblaciones (Hassanzadeh, Maleki, Saidijam, & Paoli, 2013; Hoffstedt, Eriksson, Mottagui-Tabar, & Arner, 2002).

El primer reporte sobre este tema fue publicado en el 1998 por Mammès y colaboradores, quienes analizaron la región promotora de leptina en un grupo de franceses caucásicos obesos. Estos análisis permitieron la identificación de ocho polimorfismos, sin embargo, sólo la presencia del alelo A en la posición -2548 (polimorfismo 2548G>A) se asoció con altos niveles de leptina en sangre independientemente del peso corporal y una mala respuesta a la dieta en mujeres obesas. Posteriormente, los mismos autores encontraron que el alelo G estaba asociado a la obesidad ( $p < 0.001$ ) y a niveles más bajos de leptina ( $p = 0.05$ ) (Carrillo Vázquez et al., 2011; Fujiwara, Edna de Melo, & Corrêa Mancini, 2015). Otro estudio mostró que las mujeres brasileñas portadoras del alelo G tenían cuatro veces más posibilidad de ser obesas que aquellas que tenían el alelo A. En esta población, el alelo G se asoció con un aumento de los niveles de leptina en plasma ( $p = 0.024$ ) y un mayor índice de masa corporal ( $p = 0.027$ ) (Hinuy et al., 2008).

Por otro lado, el genotipo AA fue asociado a niveles significativamente más altos de leptina en suero, un aumento de la secreción de leptina y los niveles de ARNm en el tejido adiposo, en mujeres suecas con peso normal (Hoffstedt et al., 2002). Finalmente, un estudio interesante realizado en un grupo de pacientes con DM2 de la ciudad de Durango-México concluyó que los genotipos heterocigoto (G/A) y homocigoto mutado (A/A), comparados con el homocigoto silvestre (G/G) del polimorfismo 2548G>A del gen de leptina tienen tendencia de asociación con la presencia de DM2 y obesidad mórbida, y que el alelo mutado (A) está presente con mayor frecuencia en los pacientes con DM2 que en el grupo control (Sida Medina, 2010).

Finalmente, con estos antecedentes se investigó el rol del polimorfismo -2548G>A del gen *LEP* en el desarrollo de DM2.



## CAPITULO 3

### 3 Materiales y Métodos

#### 3.1.1 Tipo de estudio

Estudio analítico de tipo transversal con diseño de casos y controles.

#### 3.1.2 Universo de Estudio

El universo de estudio estuvo constituido por personas mayores de edad, hombres y mujeres no embarazadas con y sin DM2 que acudieron a consulta externa en la Fundación DONUM durante los meses de julio y agosto en horarios de 7am a 11am y que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión **Tabla 6** y **Tabla 7**. 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 a cabo en la ciudad de Cuenca-Provincia del Azuay. Los participantes fueron seleccionados en el departamento de enfermería (lugar obligatorio de toma de signos vitales previa consulta con el médico) de la Fundación DONUM. El mantenimiento de las muestras y la extracción del ADN se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular en la Facultad de Medicina de la Universidad de Cuenca; mientras que la determinación del genotipo del polimorfismo mediante la técnica de PCR en tiempo real se desarrolló en la Facultad de Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana de la Ciudad de Cuenca.

### 3.2 Muestreo

El muestreo del universo fue de tipo no probabilístico por cuotas, para separar a los posibles participantes en dos grupos de estudio en base al diagnóstico de DM2. El primer grupo estuvo constituido por personas con DM2 previamente diagnosticada, y que acudieron a chequeos de rutina con el diabetólogo de la institución; y el segundo grupo estuvo constituido por individuos que no padecían de DM2 y que acudieron a la institución a consulta externa en cualquiera de los departamentos de salud; para ambos grupos se aplicaron criterios de inclusión y exclusión (**Tabla 6** y **Tabla 7**) respectivamente.

El tamaño de muestra fue calculada mediante la fórmula para estudios de casos y controles; considerando que no existen estudios en nuestro país sobre este polimorfismo o polimorfismos similares; se aplicaron los datos de un estudio similar realizado en México (Sida Medina, 2010) con una probabilidad de que el polimorfismo se encuentre presente entre los individuos con DM2 ( $p_1=57\%$ ) y una probabilidad de que el polimorfismo se presente entre los individuos sin DM2 ( $p_2=30\%$ ), aplicando un nivel de significancia de  $\alpha=0,05$ , error  $\beta=0.20$ .

### 3.2.1 Fórmula

$$n = \frac{[Z_{1-\alpha/2}\sqrt{2p(1-p)} + z_{1-\beta}\sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

Donde (p) es igual al promedio entre  $p_1$  y  $p_2$

$$n = \frac{[1,96\sqrt{2(0,435)(1-0,435)} + 0,84\sqrt{0,57(1-0,57) + 0,30(1-0,30)}]^2}{(0,57 - 0,30)^2}$$

Se realizó un ajuste del tamaño de muestra considerando posibles pérdidas de un 10% ( $n=58$  personas con DM2 y  $n=58$  personas sin DM2).

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

$$MAP = 52 \left( \frac{1}{1-0,10} \right)$$

$$MAP = 57,7 = 58$$

A cada paciente se le informó sobre el estudio en mención, a los pacientes que mostraron interés y cumplían con los criterios de inclusión y exclusión, se procedió a la lectura y firma del consentimiento informado (**ANEXO 2**), además se realizó una entrevista precisa y detallada (**ANEXO 3**) con los pacientes con el fin de recoger y registrar las características clínicas de la enfermedad, datos sociodemográficos y sus hábitos. Los pacientes cuyas declaraciones eran confusas, poco claras e inconsistentes fueron excluidos del estudio. Posterior, se procedió a la toma de medidas de peso y talla en balanza mecánica con tallímetro marca ADE mod 318300.

Las medidas antropométricas y características sociodemográficas fueron rotuladas de acuerdo al grupo de pertenencia asignándoles un código alfanumérico distintivo, siendo



también registrado electrónicamente en una base de datos de Microsoft Excel y con el mismo que se usaría para las muestras.

### 3.2.2 Criterios de Paramiento

Los participantes de ambos grupos fueron pareados por:

- Edad
- Género
- IMC

### 3.2.3 Criterios de Selección

**Tabla 6:** *Criterios de inclusión y exclusión para los participantes con DM2*

Criterio de Inclusión	Criterios de exclusión
Personas mayores de edad hombres y mujeres no embarazadas, que previamente hayan sido diagnosticados con DM2, y que acudan a la Fundación DONUM para consulta externa, que les interese participar en el estudio y firmen el consentimiento informado.	Pacientes con DM2 que además presenten enfermedades cardiovasculares (Cardiopatía isquémica, Insuficiencia Cardíaca)
	Personas con DM2 que además padezcan de enfermedad cerebral
	Personas con DM2 que además padezcan de insuficiencia renal
	Personas con DM2 que además padezcan de desnutrición.
	Personas con DM2 y que presenten infecciones agudas o crónicas,
	Personas con DM2 y que además presenten evidencia de inmunodeficiencia primaria o secundaria
	Mujeres con DM2 embarazadas
	Personas con DM2 y que presenten algún tipo de cáncer.



**Tabla 7:** Criterios de inclusión y exclusión para participantes que no padecen DM2

Criterio de inclusión	Criterios de exclusión
Personas mayores de edad hombres y mujeres no embarazadas, que no padezcan de DM2, y que acudan a la Fundación DONUM para consulta externa, que les interese participar en el estudio y firmen el consentimiento informado.	Personas con enfermedades cardiovasculares (Cardiopatía isquémica, Insuficiencia Cardiaca) Personas con enfermedad cerebral Personas con insuficiencia renal Personas con desnutrición. Personas con infecciones agudas o crónicas, Personas con evidencia de inmunodeficiencia primaria o secundaria Mujeres embarazadas Personas que presenten algún tipo de cáncer.

### 3.2.4 Variables

#### Variable Independiente

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

#### Variable Dependiente

Diabetes Mellitus Tipo 2. Variable nominal dicotómica

#### Variable Confusora

Obesidad: Variable nominal dicotómica

#### Variables Intervinientes

- Edad: variable continua medida en años
- Peso corporal : variable continua medida en kilogramos
- Género: variable dicotómica (hombre/mujer)
- Índice de Masa Corporal: Variable continua en kg/m<sup>2</sup> de acuerdo a la fórmula de Quetelet: Normo peso IMC entre 18,5-24,9 Sobrepeso: 25-29,9 Obesidad ≥30.



- Antecedentes familiares: variable cualitativa dicotómica

### 3.3 Procedimientos

#### 3.3.1 Medición de peso y talla.

Para este procedimiento se empleó una Báscula Pesa Persona Mecánica de clase III con tallímetro telescópico ADE M318300, proporcionada por el departamento de enfermería de la Fundación. El tallímetro permitió la medición de 60-210 cm, con una escala de 1 mm y la balanza tenía una capacidad de peso hasta 200 kg con graduaciones de 100 g.

Se verificó que la balanza se encontrara ubicada en una superficie plana horizontal y firme y que el tallímetro se encontraba correctamente ensamblado con la balanza, además se verificó que la balanza se encuentre calibrada antes de empezar el procedimiento.

##### ***Peso en kilogramos (kg).***

Se colocó el balancín de la escala de kg y de g en la posición de cero, para la medición se le pidió a cada participante que se desprenda por un momento de su calzado y de 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 la balanza, de forma erguida, con la vista hacia el frente (mirando al examinador), sin moverse y con los brazos que caigan naturalmente a los lados. Una vez en posición correcta, se desplazaron los balancines de las escalas correspondientes hasta llegar al peso del participante, el cual vino dado cuando la aguja central de las escalas se colocó en la mitad de los dos márgenes sin moverse. El peso fue registrado kg.

##### ***Estatura en metros (m).***

Sin bajarse de la balanza se pidió a cada participante que continúe mirando al frente, que mantenga los pies juntos, los talones contra el tallímetro, las rodillas rectas. Se pidió al participante que aspire y que se mantenga lo más recto posible, se desplazó la corredera del tallímetro hasta la cabeza del participante y enseguida el mismo procedió a alejarse del tallímetro y en ese punto exacto se registró la medida en cm y posteriormente se la convirtió en metros.

#### 3.3.2 Flebotomía

A cada participante se le extrajo de 2 a 5ml de sangre total mediante una punción venosa en el área antecubital del brazo y en ocasiones de la cara dorsal de la mano, siguiendo estrictas normas de higiene; se empleó tubos vacuette lila 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 muestras bajo refrigeración con una temperatura entre 4-8°C.

### 3.3.3 Extracción del 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 permite 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 8**.

**Tabla 8:** 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 (Proptetary)	1 ml
PureLink® Spin Columns with Collection Tubes	50
PureLink® Collection Tubes (2.0 ml)	100

*Fuente:* Autoras (2017)

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 (ThermoFisher, 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 8**.

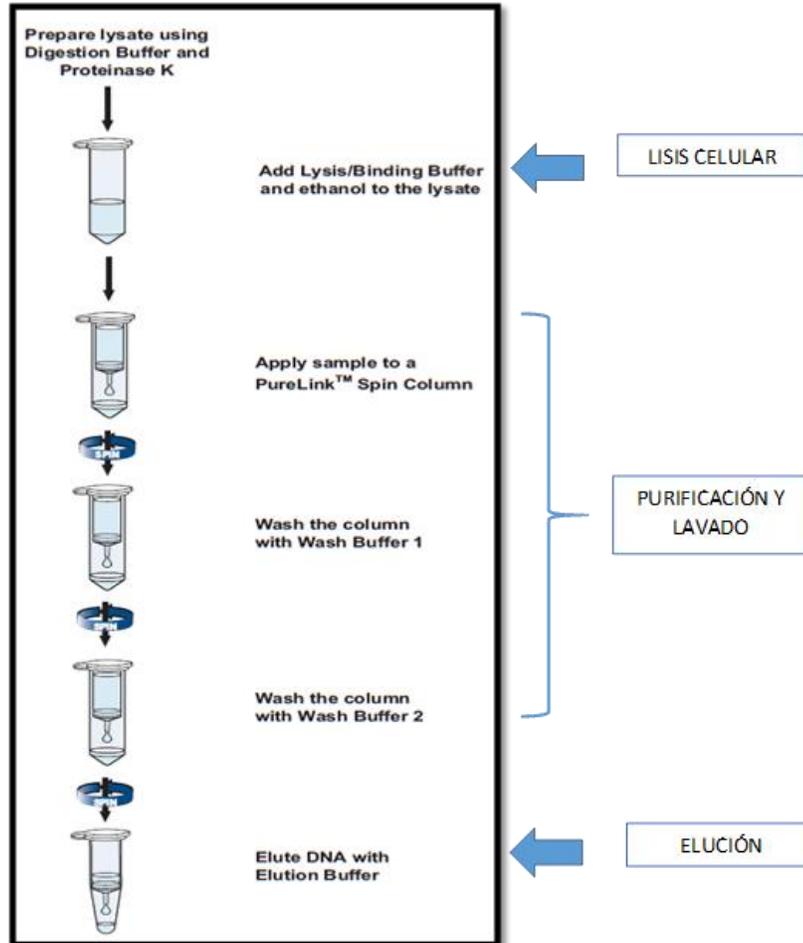


Figura 8: Proceso de extracción de ADN. Tomada de (ThermoFisher, 2016)

Las células se digirieren 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 elimina cualquier ARN residual en la muestra, minimizando así la contaminación, el lisado se mezcla 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 (ThermoFisher, 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 la Autoclave horizontal digital Tuttnauer® 2540EK

***Preparación del Lisado.***

1. Con 10 minutos de anticipación se alista la incubadora giratoria Vortemp® 56 EVC a una temperatura de 55°C.
2. Posteriormente en un tubo eppendorf estéril se añadió 200ul de sangre total fresca. Trabajar bajo cámara de flujo.
3. Enseguida se colocó 20ul de proteinasa K a la muestra y 20ul de ARNasa, se mezcló bien mediante vortex IKA® Basic brevemente y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos.
4. Una vez transcurrido el tiempo se añadió 200ul de Lisis Genomic PureLink®/ Binding Buffer y se mezcló bien por vortex hasta que se obtuvo una solución homogénea, de inmediato se llevó a la incubadora giratoria Vortemp® 56 EVC a 55°C durante 10 minutos para promover la digestión de las proteínas.
5. Una vez transcurrido el tiempo de digestión, se retiró el tubo eppendorf de la incubadora y se colocó 200ul de etanol absoluto (96%) al lisado y se mezcló bien por vortex durante 5 segundos de tal manera que se obtuvo una solución homogénea, de ~640ul, e inmediatamente se procedió a la purificación del ADN.

***Purificación del ADN.***

1. Los 640ul del lisado preparado se trasvasó a una columna de giro PureLink® Genomic (la cual viene unida con un tubo de recogida),
2. Se llevó a centrifugación en la centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415R, durante 1 minuto a 10000 rpm a temperatura ambiente,
3. Se descartó el tubo de recogida y la columna de giro fue colocada en un nuevo tubo de recogida PureLink®, de aquí se procedió al lavado de ADN.

***Lavado*** .

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

2. Una vez preparados los reactivos se procedió a añadir 500ul de buffer de lavado 1 de PureLink® Genomic a la columna de giro, y se llevó a centrifugación a temperatura ambiente a 10000 rpm durante 1 minuto;
3. Se desechó el tubo de recogida y se colocó la columna de giro en un nuevo tubo de recogida PureLink®, enseguida se colocó 500ul de buffer de lavado 2 PureLink® en la misma columna de giro y nuevamente se procedió a centrifugar a velocidad máxima (13000 rpm) durante 1.5 minutos a temperatura ambiente,
4. El tubo de recogida fue desechado, y por último se llevó a cabo la elución del ADN.

### ***Elución.***

1. Para este último paso de la extracción de ADN se colocó la columna de giro en un tubo eppendorf estéril de 1,5 ml, y se le colocó 100ul de buffer de elución de PureLink® Genomic a la columna.
2. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto, y se centrifugó a velocidad máxima durante 1 minuto a temperatura ambiente.
3. Finalmente se desechó la columna de giro, y en el tubo eppendorf se recogió el ADN genómico purificado.

### ***Almacenamiento de ADN.***

Cada tubo eppendorf con ADN purificado se lo cubrió con papel parafilm para evitar cualquier tipo de contaminación y se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta que se completó el total de las muestras extraídas, que comprendió un periodo de 20 días.

**Tabla 9:** *Materiales y equipos para la extracción de ADN.*

<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>
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, 2017)*

### 3.3.4 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 una secuencia específica de ADN millones de veces durante varios ciclos repetidos en los que la dicha secuencia es fielmente copiada. La técnica de qPCR consta de tres etapas: desnaturalización del ADN, hibridación y extensión de la secuencia específica.

El método empleado para el desarrollo de este estudio fueron 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: (TTGTTTTGTTTTGCGACAGGGTTGC[**AG**]CTGATCCTCCCGCCTCAGTCTCCCT). 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) (Microbial, 2012).

### 3.3.5 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 10**.
4. Enseguida se prosiguió al desarrollo del qPCR.

**Tabla 10:** *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
Volumen Total	10	10

*Fuente: Autoras (2017)*

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.

### 3.3.6 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 11**.

**Tabla 11:** *Condiciones de dilución para las muestra y la sonda Taqman®*

Dilución de la muestra	Volumen	Dilución de la sonda	Volumen
Muestra de ADN	0.1 µl	Sonda Taqman®	20 µl
Agua para PCR	0.9 µl	Buffer tris-EDTA	20 µl
Total de volumen	0.10 µl	Volumen total	40 µl

*Fuente: Autoras (2017)*

Las condiciones de la reacción de amplificación para la determinación del polimorfismo son las mismas que se indicaron en la **Tabla 10**

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 12:** *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	Refrigerador 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, 2017).*



### 3.3.7 Interpretación de resultados

En este punto el equipo LightCycler Nano de Roche, 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 silvestre (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**)

### 3.3.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, se verificó la distribución normal de los datos mediante test de Kolmogorov-Smirnov y la igualdad de varianzas mediante prueba de Levene. En el estudio descriptivo los resultados se expresaron como la media ( $\bar{x}$ ) más o menos una desviación estándar ( $\pm DE$ ). En tanto que, para el de asociación entre variables se lo determinó con un intervalo de confianza (IC) del 95% y un valor  $p < 0,05$ . Así, las variables numéricas fueron analizadas mediante el test “*t de Student*” por su naturaleza paramétrica; mientras que las variables cualitativas fueron analizadas con la prueba de *Chi* cuadrado; para los respectivos análisis se utilizó el paquete estadístico SPSS, versión 21 para Windows.

### 3.3.9 Equilibrio de Hardy-Weinberg

La frecuencia alélica y frecuencia 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 la presencia de la DM2; de igual manera se determinó la posible asociación entre el polimorfismo y el grado de obesidad; específicamente para medir la fuerza de asociación se empleó el análisis Odds Ratio.

## CAPÍTULO 4

### 4 Resultados y Discusión

El presente estudio empleó un diseño de casos y controles, cuyo desarrollo estuvo enmarcada 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**).

#### 4.1.1 Descripción de las características clínicas y antropométricas de la población estudiada.

Para formar los grupos de estudio se aplicaron como criterios de pareamiento la edad, IMC y el género, seleccionando así un participante sin diagnóstico de DM2 (control) por cada participante con la enfermedad (caso), es decir una relación 1:1. Como resultado de obtuvo dos grupos con igual número de participantes (n= 58).

Los datos sociodemográficos y clínicos del grupo control y grupo casos se presentan en la **Tabla 13**. El total de los participantes procedían de la región Sierra del país y se identificaron con la etnia mestiza. Por otro lado, el grupo etario que predominó en el grupo control fue el adulto (52%), mientras que para el grupo casos destacó la tercera edad (52%), a su vez, el tiempo medio de padecimiento de la enfermedad entre los participantes con DM2 fue de  $11,52 \pm 8,92$  años y el tratamiento farmacológico predominante empleado para el control de la enfermedad, fueron las biguanidas con un 32,8%, un 24,1% pertenece a la asociación de biguanidas con sulfonilureas, otro 10% al grupo de las sulfonilureas, un 13,8% al tratamiento con insulina, y un 6,9% corresponde a una combinación de biguanidas con insulina; finalmente un 5,2% manifestaron mantener únicamente un tratamiento no farmacológico (dieta y ejercicio). De acuerdo al análisis estadístico, no existió diferencia significativa por género, edad e IMC entre los grupos, ya que estos fueron criterios de pareamiento.

**Tabla 13:** Datos sociodemográficos, clínicos para el grupo control y pacientes con diabetes mellitus tipo 2

	Controles (n=58)	Casos (n=58)	Valor de <i>p</i>
<b>Edad (años)</b>	63±12	62±14	0,750**
<b>Género F/M</b>	42/16	40/18	0,683*
<b>Peso (kg)</b>	67,58±10,61	66,94±11,88	0,760**
<b>Talla (m)</b>	1,53±0,82	1,50±0,96	0,196**
<b>IMC (kg/m2)</b>	29,44 ±3,39	29,02±3,79	0,526**
<b>Tiempo de padecimiento de la enfermedad (años)</b>	-	11.52 ±8,92	-
<b>Antecedentes Familiares de Diabetes</b>	22 (37,93%)	26 (44,83%)	0,451*
<b>IMC - categoría</b>			
<b>Normopeso</b>	7 (12%)	9 (16%)	-
<b>Sobrepeso</b>	24 (41%)	23 (40%)	-
<b>Obesidad</b>	27 (47%)	26 (45%)	-
<b>Tratamiento farmacológico (%)</b>	-	Biguanidas (32,8%) Biguanidas + Sulfanilureas (24,1%) Sulfanilureas (17,2%) Insulina (13,8%) Biguanidas + Insulina (6,9%) Solo tratamiento no farmacológico (5,2%)	-

\*prueba de Chi cuadrado

\*\*test "t de Student"

Nota: F: femenino, M: masculino. Recuento (porcentaje). IMC: Índice de Masa Corporal, Media ± Desviación Estándar.

#### 4.1.2 Análisis estratificado por género

Para detallar de mejor forma los grupos de estudio se aplicó un análisis estratificado por género; el grupo de control masculino ( $n = 16$ ), que incluyó sujetos con edad de  $60 \pm 15$

años e IMC de  $28,95 \pm 2,17$  kg / m<sup>2</sup>, fue comparado con hombres con DM2 ( $n = 18$ ), de  $61 \pm 14$  años ( $p = 0,833$ ) y con un IMC de  $29,2 \pm 1,97$  kg / m<sup>2</sup> ( $p = 0,726$ ). El grupo de control femenino ( $n = 42$ ) con  $63 \pm 13$  años con un IMC de  $29,03 \pm 4,27$  kg / m<sup>2</sup>, se comparó con pacientes con DM2 femeninos ( $n = 40$ ) que incluyeron pacientes de  $64 \pm 11$  años ( $p = 0,783$ ) con un IMC de  $29,54 \pm 4$  kg / m<sup>2</sup> ( $p = 0,576$ ). Como se puede evidenciar no existieron diferencias estadísticas significativas. Véase la **Tabla 14**.

**Tabla 14:** Características clínicas por género

	Femenino		Valor de p	Masculino		Valor de p
	CASOS 40 (69%)	CONTROLES 42 (72%)		CASOS 18 (31%)	CONTROLES 16 (28%)	
<b>Edad (años)</b>	64±11	63±13	0,783	61±14	60±15	0,833**
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	29,54±4	29,03±4,27	0,576	29,2±1,97	28,95±2,17	0,726**
<b>Antecedentes</b>						
<b>Familiares</b>	de 17(65%)	18(82%)	0,134	9(35%)	4(18%)	0,974*
<b>Diabetes</b>						
<b>Tiempo de padecimiento de la enfermedad (años)</b>	12,67 ±9	-	-	10,13 ±8	-	-

\*prueba de Chi cuadrado

\*\*test "t de Student"

Nota: IMC: Índice de Masa Corporal. Recuento (porcentaje)

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

Mediante técnica de PCR en tiempo real, se pudo evidenciar dentro de los grupos de estudio solamente la presencia de dos (G/G, A/A), de los tres genotipos posibles (G/G, G/A y A/A). Empleando el programa Bioinformático SNPStats, se observó que el homocigoto silvestre (G/G) presenta mayor frecuencia, frente al homocigoto mutado para ambos grupos. De este modo, el alelo silvestre (G) presentó una mayor frecuencia con 84% y 88%, en comparación con el alelo mutado A (16%) y (12%), en los casos y controles respectivamente. Sin embargo, la frecuencia genética del homocigoto mutado fue mayor en el grupo casos. Véase la **Tabla 15**.

**Tabla 15:** Genotipificación del polimorfismo *LEP 2548G>A*

Grupo	Frecuencias genotípica del SNP (n=116)			Frecuencia alélica del SNP (n=116)	
	G/G	G/A	A/A	G	A
<b>Casos</b>	49 (84%)	0 (0%)	9 (16%)	98 (84%)	18 (16%)
<b>Controles</b>	51 (88%)	0 (0%)	7 (12%)	102 (88%)	14 (12%)

*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. La frecuencia está expresada en porcentaje

#### 4.2 Equilibrio de Hardy Weinberg

En el contexto de un estudio de casos y controles, el equilibrio de Hardy Weinberg se evaluó en la población control; determinando que la distribución genotípica del SNP no se encontró en equilibrio de Hardy Weinberg, pues se obtuvo un valor de  $p < 0,05$ . Como se muestra en la **Tabla 16**.

**Tabla 16:** Equilibrio de Hardy Weinberg

	Equilibrio de Hardy-Weinberg (n=58)			
	Homocigoto GG	Heterocigoto GA	Homocigoto AA	p-valor
<b>Controles</b>	51(0,88)	0(0,00)	7(0,12)	<0.0001

#### 4.3 Distribución de la presencia o ausencia del polimorfismo de acuerdo con las variables cualitativas

De los nueve resultados con presencia de polimorfismo *LEP 2548G>A* encontrados en el grupo casos; el 66,7% (n=6) está presente en los pacientes de tercera edad, de estos (n=4) son del género femenino y (n=2) del género masculino; y el otro 33.3% (n=3) está presente en el grupo adultos, de estos (n=2) son de género masculino y (n=1) son del género femenino. De los siete resultados con presencia de polimorfismo *LEP 2548G>A* encontrados en el grupo control; el 57,1% (n=4) está presente en los pacientes de tercera edad, de estos (n=2) son del género femenino y (n=2) del género masculino; y el otro 42.9% (n=3) está presente en el grupo adultos y pertenece al género femenino. Remítase a la

**Tabla 17**

**Tabla 17:** Distribución de la presencia o ausencia del polimorfismo *LEP 2548G>A* de acuerdo con las variables cualitativas

		PRESENCIA DEL SNP	
CASOS	EDAD	Si	No
	Adulto	3 (33,3%)	27 (46,9)
	Tercera edad	6 (66,7%)	22 (44,9%)
	GÉNERO		
	Femenino	5 (55,6%)	35 (71,4%)
	Masculino	4 (44,4%)	14 (28,6%)
CONTROLES	EDAD		
	Adulto	3 (42,9%)	25 (49%)
	Tercera edad	4 (57,1%)	26 (51%)
	GÉNERO		
	Femenino	5 (71,4%)	37 (72,5%)
	Masculino	2 (28,6%)	14 (27,5%)

*Nota:* IMC: índice de masa corporal. Recuento (porcentaje dentro de la presencia del polimorfismo).

#### 4.3.1 Asociación del polimorfismo *LEP 2548G>A* con la presencia de DM2

El homocigoto mutado (A/A) estuvo presente en un 15,5% de los participantes, mientras que en los controles en un 12,1%; sin embargo, a pesar de estos resultados no se evidenció una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,59$ ) entre los grupos; de igual forma, la asociación entre el SNP y la presencia de la enfermedad se realizó a través del análisis estadístico de Odds Ratios (OR) con IC 95% y  $p<0.05$ , sin obtener una asociación estadísticamente significativa. Véase la **Tabla 18**.

**Tabla 18:** Asociación del polimorfismo *LEP 2548G>A* con la presencia de DM2

Genotipo	Casos	Controles	OR (95% IC)	valor de <i>p</i>
<b>G/G</b>	49 (84.5%)	51 (87.9%)	1.00	0.59
<b>A/A</b>	9 (15.5%)	7 (12.1%)		

### 4.3.2 Asociación del polimorfismo *LEP 2548G>A* con el IMC

De acuerdo a los resultados obtenidos por el programa estadístico SPSS v21, no se pudo encontrar una asociación estadísticamente significativa ( $p=0,727$ ) entre el SNP en cuestión y el IMC, a pesar de que como se observa en la **Tabla 19**, existe mayor presencia del polimorfismo en personas con sobrepeso y obesidad.

**Tabla 19:** Asociación del polimorfismo *LEP 2548G>A* con el IMC

		PRESENCIA DEL POLIMORFISMO		Total	Valor de $p$
		SI	NO		
GRADO DE OBESIDAD	NORMOPESO	3 (18,8%)	13	16	0,727
	SOBREPESO	7 (43,8%)	40	47	
	OBESIDAD	6 (37,5%)	47	53	
Total		16 (100%)	100	116	

Fuente: Autoras, 2017

### 4.3.3 Asociación del polimorfismo *LEP 2548G>A* con el género

Remitiéndonos a la **Tabla 17**, observamos que existe mayor frecuencia del polimorfismo en el género femenino; sin embargo, después del análisis de asociación entre estas variables (SNP vs género) no se encontró una asociación estadísticamente significativa ( $p=0,45$ ), entre el género y ser portador del SNP. Véase la **Tabla 20**

**Tabla 20:** Asociación del polimorfismo *LEP 2548G>A* con el género

Genotipo	GÉNERO		OR (95% IC)	valor de $p$
	Femenino	Masculino		
<b>G/G</b>	72 (87.8%)	28 (82.3%)	1.00	0.45
<b>A/A</b>	10 (12.2%)	6 (17.6%)		

Fuente: Autoras, 2017



#### 4.4 DISCUSIÓN

Como se mencionó con anterioridad, diversos estudios manifiestan que el polimorfismo 2548G>A en la región promotora del gen de leptina, podría acarrear problemas en la síntesis de la leptina o en el desarrollo de la misma, dichos conflictos a su vez podrían alterar la cascada de señalización de esta proteína generando un estado conocido como resistencia a la leptina, que suele asociarse con obesidad, resistencia a la insulina, y DM2 (Denroche et al., 2012; Levi et al., 2011) en diversas poblaciones, no así en otras.

El presente estudio se realizó en una población de 58 pacientes con diagnóstico de DM2 y 58 controles, donde el total de los participantes provenían de la región Sierra del Ecuador, mayoritariamente de la provincia del Azuay y Cañar, se obtuvo que los individuos con diagnóstico de DM2, presentaron con mayor frecuencia la presencia del homocigoto mutado (A/A) (15,5%), frente al grupo control, pero a pesar de estos datos, no se llegó a identificar una asociación estadísticamente significativa entre el alelo mutado (A) y la presencia de DM2.

Con respecto al polimorfismo 2548G>A del gen *LEP*, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas y alélicas entre el grupo control y los individuos con diagnóstico de DM2 ( $p>0.05$ ); también se observó que el alelo mutado (A) no parece conferir riesgo para el desarrollo de DM2 ( $OR=1$ ) en el grupo estudiado. Estos resultados no concuerdan con un estudio similar llevado a cabo en una población de personas diabéticas de la ciudad de Durango-México, el cual concluyó que el polimorfismo 2548G>A del gen de leptina, tiene tendencia de asociación con la presencia de DM2 y obesidad extrema (Sida Medina, 2010); pero por otro lado, los resultados de nuestra investigación si concuerdan con los obtenidos en el estudio de casos y controles realizado por (Hassanzadeh et al., 2013) sobre una población de 200 individuos con síndrome metabólico y 200 controles; y cuyas conclusiones mencionan que no existe una relación estadísticamente significativa entre el polimorfismo en mención y el desarrollo de síndrome metabólico, contando dentro de este último la resistencia a la insulina y obesidad; de igual forma, otros estudios han llegado a la conclusión de que los niveles de leptina son iguales en individuos con diabetes tipo 2 que en controles, lo cual daría un indicio de que este polimorfismo por sí solo no representa gran influencia en el desbalance de los niveles de esta proteína y a su vez en el desarrollo de DM2 (McGregor et al., 1996).



A pesar que la revisión bibliográfica destaca que puede existir una asociación entre el SNP en estudio y el desarrollo DM2; recordemos que la diabetes es una patología de origen multifactorial y la asociación entre un SNP y esta enfermedad no es algo que pueda definirse fácilmente, pues aun si fuera clara la participación de la leptina en la regulación de la homeostasis de la glucosa, el fondo genético de cada población, así como los factores ambientales pueden modular la importancia de un polimorfismo, de tal manera que es muy difícil poder encontrar un patrón homogéneo de este SNP entre regiones distintas como para poder considerar este gen como un marcador molecular universal para la DM2 (Carrillo Vázquez et al., 2011). Además, debido a la relevancia de la interacción LEP-LEPR en la activación de la vía hipotalámica de señales leptina-melanocortina, se debe evaluar en conjunto la presencia de mutaciones en los genes que codifican para la leptina y su receptor para dilucidar con mayor claridad la influencia genética de estos componente para el desarrollo de DM2 (González Sarmiento et al., 2008; Tome, 2006) , lo cual en el presente trabajo no fue posible evidenciarlo por falta de recursos.

Por otro lado, la asociación entre la obesidad y el polimorfismo  $2548G>A$ , ha llegado a demostrarse en diferentes estudios realizados con diversas poblaciones, como regiones brasileñas, francesas y japonesas (Wang et al., 2014; Wauters, Considine, & Van Gaal, 2000); sin embargo y a pesar de que éstos y otros estudios apuntan a una posible asociación entre el polimorfismo  $2548G>A$  y la obesidad, otros trabajos llegan a la conclusión opuesta. Así lo demuestra un estudio genético con 303 individuos españoles obesos y su respectivo grupo control, donde no se pudo encontrar ninguna asociación entre este polimorfismo y la obesidad (Portolés et al., 2006). De igual forma, el estudio realizado por (Constantin et al., 2010) sobre sujetos brasileños llegaron a la misma conclusión. Ahora, remitiéndonos a los resultados obtenidos en este estudio, observamos que tampoco se logró evidenciar una asociación estadísticamente significativa ( $p=0,727$ ) entre el polimorfismo y el grado de obesidad de los participantes; concordando estos resultados con los obtenidos por Portolés et al. (2006) y Constantin et al. (2010). Pero, a pesar de que los resultados de este estudio no evidenciaron una asociación estadísticamente significativa entre el IMC y el alelo mutado; se pudo observar que los portadores del genotipo silvestre presentan obesidad, lo que concuerda con algunos estudios realizados en Brasil y Taiwán donde se sugirió que existe una asociación entre el alelo silvestre (G/G) y el desarrollo de obesidad (Carrillo Vázquez et al., 2011; Fujiwara et al., 2015; Marin, 2015).



Analizando estos resultados contradictorios, podríamos decir que son un indicativo de que las distribuciones alélicas varían de región a región, presentando asociación a la enfermedad en unos estudios, mientras que en otros no; posiblemente, porque la variación en *LEP-2548* requiera de interacción adicional con múltiples genes y factores ambientales propios de cada región, para así conducir a un trastorno en la regulación y homeostasis de la glucosa (Sida Medina, 2010).

El equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) es una pieza clave cuando se estudian asociaciones entre mutaciones genéticas y enfermedades. En el contexto de un estudio de casos y controles, debemos tener en cuenta que HWE sólo debe ser evaluado en la población control, que es donde debería cumplirse este principio, mientras que el desequilibrio de HW en los casos sugiere una asociación entre la mutación y la enfermedad. Sin embargo, que se presente un desequilibrio de HW, como es el caso de nuestro estudio, no necesariamente invalida los resultados; así lo menciona Xu y colaboradores, en uno de sus estudios, donde manifiesta que una alta proporción de los estudios de casos y controles publicados sobre factores genéticos son inconsistentes con el EHW en los controles; además, que es más frecuente informar de valores de  $p < 0,05$  cuando los controles están en desequilibrio (Xu, Turner, Little, Bleecker, & Meyers, 2002). De igual forma, un estudio de casos y controles donde los controles han sido escogidos de acuerdo a variables de emparejamiento con los casos, tiende a no cumplir con el equilibrio de HW (Llorca, Prieto-Salceda, Combarros, Dierssen-Sotos, & Berciano, 2005).

Pese a que los resultados obtenidos en nuestro estudio no presentan una asociación significativa entre el SNP y la enfermedad en cuestión, esto no significa, que todo este dicho, pues como se ha mencionado una enfermedad multifactorial y poligénica como la diabetes, requiere de estudios mucho más amplios y rigurosos que ayuden a dilucidar cuales son los otros genes y/o factores que en interacción con la leptina conlleven al desarrollo de una enfermedad que es considerada como una de las principales causas de muerte a nivel mundial.



## CAPÍTULO 5

### 5 Conclusiones y Recomendaciones

#### Conclusiones

- En el análisis estadístico no se evidenció una asociación estadísticamente significativa entre la presencia del polimorfismo y la presencia de la DM2 ( $p > 0,05$ ), lo que sugiere que la presencia del polimorfismo, no tiene influencia directa sobre el desarrollo de la enfermedad.
- El homocigoto mutado (A/A) estuvo presente en un 15,5% de los individuos con diagnóstico de DM2, mientras que en los controles estuvo presente en un 12,1%. Durante la etapa de genotipificación no se evidenció la presencia de estados heterocigotos (G/A).
- De acuerdo al estudio estadístico, existió mayor frecuencia del polimorfismo 2548G>A, en el género femenino, pertenecientes al grupo de la tercera edad y obesidad. Sin embargo, no se existió una asociación estadísticamente significativa entre el SNP y estas variables.
- El estudio de asociación entre el SNP y la enfermedad no demuestra estar en EHW, resultado que se puede atribuir a que se trató de un diseño de casos y controles, donde los controles fueron seleccionados de acuerdo a variable de pareamiento con los casos. Y al hecho de que en el estudio tampoco se evidenció la presencia de estados heterocigotos.



### Recomendaciones

- La importancia del efecto de la leptina sobre la secreción de insulina en la evolución de la diabetes tipo 2, especialmente en personas obesas con niveles muy elevados de leptina, necesita mayor investigación, sobre todo por el hecho de que al parecer el SNP no presenta una distribución homogénea entre regiones distintas.
- Al no existir estudios previos similares a nuestra investigación, se requieren de más estudios para corroborar nuestros hallazgos.
- Sería importante evaluar varios polimorfismos en un mismo gen, o considerar un estudio en conjunto con el receptor de leptina, ya que estos pudieran influir potencialmente en la función de proteínas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Al-Goblan, A. S., Al-Alfi, M. A., & Khan, M. Z. (2014). Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 7, 587-591.
- ALAD. (2013). *Revista e la Asociacion Latinoamericana de Diabetes*.
- 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. *Gaceta Médica de México*, 144, 535 - 542.
- American Diabetes Association, A. (2016). original: Standards of Medical Care in Diabetes-2016. *Clinical Diabetes*, 34(1), 3-5.
- Amitani, M., Asakawa, A., Amitani, H., & Inui, A. (2013). The role of leptin in the control of insulin-glucose axis. *Frontiers in Neuroscience*, 7, 51. doi:10.3389/fnins.2013.00051
- Ampudia-Blasco, F. (2003). Fallo celular beta y progresión de la diabetes mellitus tipo 2. *Endocrinología y Nutrición*, 50(7), 274-279.
- Araújo-Vilar, D., Guillín-Amarelle, C., Sánchez-Iglesias, S., Castro, A., & Casanueva, F. F. (2014, abril). Uso terapéutico de la leptina recombinante humana. *Revista Española Endocrinología Pediátrica*, 5, 27-42.
- Baynes, H. (2015). Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *J Diabetes Metab*, 6(541), 2.
- Blancas-Flores, G., Almanza-Pérez, J. C., López-Roa, R. I., Alarcón-Aguilar, F. J., García-Macedo, R., & Cruz, M. (2010). La obesidad como un proceso inflamatorio. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 67, 88-97.
- Boumaiza, I., Omezzine, A., Rejeb, J., Rebhi, L., Ouedrani, A., Ben Rejeb, N., . . . Bouslama, A. (2012). Relationship Between Leptin G2548A and Leptin Receptor Q223R Gene Polymorphisms and Obesity and Metabolic Syndrome Risk in Tunisian Volunteers. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 16(7), 726-733. doi:10.1089/gtmb.2011.0324
- Calderón Montero, A. (2007). Epidemiología, genética y mecanismos patogénicos de la diabetes mellitus. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 7(8), 3H-11H.
- Camejo, M., García, A., Rodríguez, E., Carrizales, M. E., & Chique, J. (2012). El mundo, diabetes mellitus en visión epidemiológica de la diabetes mellitus. Situación en venezuela. Registro epidemiológico y propuesta de registro. Programas de detección precoz. *Guía Clínica Práctica de Diabetes Mellitus*, 10(Spl 2), 7.
- Candela, J. M. (2016). ¿ Cuáles son los factores de riesgo para desarrollar diabetes mellitus tipo 2? *Guía de actualización en diabetes mellitus tipo2*, 15-18.
- Cano Fuentes, G., Dastis Bendala, C., Morales Barroso, I., Manzanares Torné, M. L., Fernández Gregorio, A., & Martín Romana, L. (2013). Ensayo clínico aleatorio para evaluar la eficiencia de una intervención educativa desarrollada en atención primaria sobre asmáticos adultos. *Atención Primaria*, 46(3), 117-139. doi:10.1016/j.aprim.2013.04.005
- Carrillo Vázquez, J. P., López, J., Alcantar, C. G., Benítez Cardoza, A., Zamorano, C., López Camarillo, C. A., . . . Marchat, M. (2011). Relevancia de polimorfismos en el gen de la leptina y su receptor para el desarrollo de la obesidad. In U. J. A. d. Tabasco (Ed.), *obesidad: problema multifactorial* (primera ed., pp. 17-34). Estados Unidos Mexicanos.
- Castillo, J. (2010). Fisiopatología de la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM 2). In (pp. 18-22): Colombia: Asociación Colombiana De Endocrinología.
- Cervantes-Villagrana, R. D., & Presno-Bernal, J. M. (2013). Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células  $\beta$  pancreáticas. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 21(3), 98-106.
- Coimbra, S., Brandão Proença, J., Santos-Silva, A., & Neuparth, M. J. (2014). Adiponectin, Leptin, and Chemerin in Elderly Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Close Linkage with Obesity and Length of the Disease. *BioMed Research International*, 2014, 701915. doi:10.1155/2014/701915
- Coleman, D. L. (2010). A historical perspective on leptin. *Nat Med*, 16(10), 1097-1099.
- Conget, I. (2002). Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus. *Revista Española de cardiología*, 55(5), 528-535.



- Constantin, A., Costache, G., Sima, A. V., Glavce, C. S., Vladica, M., & Popov, D. L. (2010). Leptin G-2548A and leptin receptor Q223R gene polymorphisms are not associated with obesity in Romanian subjects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391(1), 282-286. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.050>
- Contreras, F., Lares, M., Gutiérrez, R., & Velasco, M. (2011). Leptina e Hipertensión. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*, 6(3), 52-59.
- Contreras Zambrano, M. A. (2008). Disfunción beta pancreática. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*, 6, 1-5.
- Covey, S. D., Wideman, R. D., McDonald, C., Unniappan, S., Huynh, F., Asadi, A., . . . Kieffer, T. J. (2006). The pancreatic B-cell is a key site for mediating the effects of leptin on glucose homeostasis. *Cell Metabolism*, 4(4), 291-302. doi:10.1016/j.cmet.2006.09.005
- 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. doi: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.
- Durán García, S., Durán Sanz, S., & Durán Sanz, A. (2013). Diabetes mellitus tipo 2 y obesidad: ¿tratar la obesidad o la diabetes? *Medicina Clínica*, 141(Supl 2), 14-19. doi:DOI: 10.1016/S0025-7753(13)70058-7
- Freire, W. B., Ramírez, M., Belmont, P., Mendieta, M., Silva, M., Romero, N., . . . Monge, R. (2013). RESUMEN EJECUTIVO. TOMO I. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del Ecuador. *ENSANUT-ECU 2011-2013*, 85-94.
- Fujiwara, C. T. H., Edna de Melo, M., & Corrêa Mancini, M. (2015). Association of Leptin Gene -2548 G/A Polymorphism with Obesity: A Meta-Analysis. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 66(2-3), 109-109.
- German, J. P., Thaler, J. P., Wisse, B. E., Oh-I, S., Sarruf, D. A., Matsen, M. E., . . . Morton, G. J. (2011). Leptin Activates a Novel CNS Mechanism for Insulin-Independent Normalization of Severe Diabetic Hyperglycemia. *Endocrinology*, 152(2), 394-404. doi:10.1210/en.2010-0890
- González Sarmiento, E., Hinojosa Mena-Bernal, M., & Galiana, L. I. (2008). Diabetes mellitus tipo 1 y 2: etiopatogenia, formas de comienzo, manifestaciones clínicas, historia natural. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 10(17), 1091-1101.
- Harris, R. B. S. (2014). Direct and Indirect Effects of Leptin on Adipocyte Metabolism. *Biochimica et biophysica acta*, 1842(3), 414-423. doi:10.1016/j.bbadis.2013.05.009
- Hassanzadeh, T., Maleki, M., Saidijam, M., & Paoli, M. (2013). Association between leptin gene G-2548A polymorphism with metabolic syndrome. *Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 18(8), 668-673.
- Hernández-Ávila, M., Gutiérrez, J. P., & Reynoso-Noverón, N. (2013). Diabetes mellitus en México: El estado de la epidemia. *Salud Pública de México*, 55, s129-s136.
- Herrera, A. A., Soca, P. E. M., Será, C. R., Soler, A. L. M., & Guerra, R. C. O. (2012). Actualización sobre diabetes mellitus. *Correo Científico Médico*, 16(2).
- Hinuy, H. M., Hirata, M. H., Forti, N., Diamant, 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, 611-616.
- Hoffstedt, J., Eriksson, P., Mottagui-Tabar, S., & Arner, P. (2002). A Polymorphism in the Leptin Promoter Region (-2548 G/A) Influences Gene Expression and Adipose Tissue Secretion of Leptin. *Horm Metab Res*, 34(07), 355-359. doi:10.1055/s-2002-33466
- Iglesias, R., Barutell, L., Artola, S., & Serrano, R. (2014). Resumen de las recomendaciones de la American Diabetes Association (ADA) 2014 para la práctica clínica en el manejo de la diabetes mellitus. *Diabetes Práctica*, 5(2), 1-24.
- INEC. (2013). *Anuario de estadísticas vitales nacimientos y defunciones 2013*. Retrieved from Ecuador:
- International Diabetes Federation, I. (2015). *Diabetes una emergencia mundial* (septima ed.): International Diabetes Federation.



- Irecta Najera, A. C., & Álvarez Gordillo, G. d. C. (2016). Mecanismos moleculares de la obesidad y el rol de las adipocinas en las enfermedades metabólicas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35(2), 174-183.
- Jung, C. H., & Kim, M.-S. (2013). Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity. *Archives of Pharmacal Research*, 36(2), 201-207. doi:10.1007/s12272-013-0020-y
- Kanaya, A. M., & Vaisse, C. (2013). Obesidad. In D. G. Gardner & D. Shoback (Eds.), *Endocrinología Básica e Clínica de Greenspan (Lange) - 9ED* (9na ed., pp. 699-706): AMGH.
- King, P., Peacock, I., & Donnelly, R. (1999). The UK Prospective Diabetes Study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 48(5), 643-648. doi:10.1046/j.1365-2125.1999.00092.x
- Levi, J., Gray, S. L., Speck, M., Huynh, F. K., Babich, S. L., Gibson, W. T., & Kieffer, T. J. (2011). Acute Disruption of Leptin Signaling in Vivo Leads to Increased Insulin Levels and Insulin Resistance. *Endocrinology*, 152(9), 3385-3395. doi:10.1210/en.2011-0185
- Llorca, J., Prieto-Salceda, D., Combarros, O., Dierssen-Sotos, T., & Berciano, J. (2005). Riesgos competitivos de muerte y equilibrio de Hardy-Weinberg en estudios de casos y controles sobre asociación entre genes y enfermedades. *Gaceta Sanitaria*, 19, 321-324.
- Lopez Alcantar, J. (2012). *Asociación de la leptina con la obesidad en la población mexicana*. (Maestría Tesis Doctoral), Instituto Politécnico Nacional, México.
- López Alvarenga, J. C. (2004). Genética en la obesidad. *Revista de endocrinología y nutrición*, 12(4 Supl 3), S96-S101.
- Marin, D. (2015). *Associação dos polimorfismos G2548A e GLN223ARG com parâmetros antropométricos em mulheres saudáveis*.
- Marroquí, L., Gonzalez, A., Neco, P., Caballero-Garrido, E., Vieira, E., Ripoll, C., . . . Quesada, I. (2012). Role of leptin in the pancreatic  $\beta$ -cell: effects and signaling pathways. *Journal of Molecular Endocrinology*, 49(1), R9-R17. doi:10.1530/jme-12-0025
- Masharani, U., & German, M. S. (2013). Hormonas pancreáticas y diabetes mellitus. In D. G. Gardner & D. Shoback (Eds.), *Endocrinología Básica e Clínica de Greenspan (Lange) - 9ED* (pp. 573-644): AMGH.
- McGregor, G. P., Desaga, J. F., Ehlenz, K., Fischer, A., Heese, F., Hegele, A., . . . Lang, R. (1996). Radiomunological measurement of leptin in plasma of obese and diabetic human subjects. *Endocrinology*, 137(4), 1501-1504.
- Mehta, R., Del Moral, M. E., & Aguilar Salinas, C. A. (2010). Epidemiología de la diabetes en el anciano. *Revista de Investigación Clínica*, 62(4), 305-311.
- Microbial. (2012). SISTEMAS DE DETECCIÓN DE PATÓGENOS POR PCR A TIEMPO REAL. In: <http://www.microbial-systems.com>.
- Moon, H.-S., Dalamaga, M., Kim, S.-Y., Polyzos, S. A., Hamnvik, O.-P., Magkos, F., . . . Mantzoros, C. S. (2013). Leptin's Role in Lipodystrophic and Nonlipodystrophic Insulin-Resistant and Diabetic Individuals. *Endocrine Reviews*, 34(3), 377-412. doi:10.1210/er.2012-1053
- Moreno, M. G. (2012). Definición y clasificación de la obesidad. *Revista Médica Clínica las Condes*, 23(2), 124-128. doi:10.1016/S0716-8640(12)70288-2
- Muzumdar, R., Ma, X., Yang, X., Atzmon, G., Bernstein, J., Karkanias, G., & Barzilai, N. (2003). Physiologic effect of leptin on insulin secretion is mediated mainly through central mechanisms. *The FASEB Journal*. doi:10.1096/fj.02-0991fje
- Nazarians-Armavil, A., Menchella, J. A., & Belsham, D. D. (2013). Cellular Insulin Resistance Disrupts Leptin-Mediated Control of Neuronal Signaling and Transcription. *Molecular Endocrinology*, 27(6), 990-1003. doi:10.1210/me.2012-1338
- OMS, O. M. d. I. S. (2016). Diabetes, nota descriptiva. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>
- Park, H.-K., & Ahima, R. S. (2015). Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism: clinical and experimental*, 64(1), 24-34. doi:10.1016/j.metabol.2014.08.004
- 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, 597-607.



- Portolés, O., Sorlí, J. V., Francés, F., Coltell, O., González, J. I., Sáiz, 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. doi:10.1007/s10654-006-9045-6
- Ramírez, M. Á. V., & Corona, M. B. E. F. (2017). Estrategia educativa y capacidad de autocuidado de la persona con diabetes mellitus. *Jóvenes en la ciencia*, 2(1), 155-158.
- Rey, M. L. (2015). *Epidemiología de la Diabetes Mellitus: El impacto social de la enfermedad*. Universidad de Extremadura,
- Rojas, E., Molina, R., & Rodríguez, C. (2012). Definición, clasificación y diagnóstico de la diabetes mellitus. *Guía Práctica de Diabetes Mellitus*, 10, 12.
- Romero, G. A., & Barrera, F. (2017). Determinación de factores que afectan la adherencia al tratamiento en pacientes con Diabetes Mellitus 2, que acuden a un club de diabéticos. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Quito)*, 39(1), 69-78.
- SEMERGEN. (2016). Diabetes: clasificación, detección precoz y diagnóstico. *Guías clínicas: diabetes mellitus*, 2-5.
- Serrano Ríos, M., & Cascales Angosto, M. (2015). Resistencia a la insulina, inflamación y obesidad. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
- Sida Medina, R. (2010). *Asociación de los Polimorfismos G-2548A y A223G en el Gen Leptina y su Receptor con Diabetes Tipo 2 en la Ciudad de Durango*. (Maestría en Ciencias en Biomedicina), Instituto Politécnico Nacional, Durango.
- Sánchez Rodríguez, Á. (2012). La diabetes como enfermedad sistémica. Papel del internista en la diabetes mellitus tipo 2. In S. E. d. M. Interna (Ed.), *Protocolos Diabetes Mellitus Tipo 2* (pp. 1-7). España: Elsevier España.
- ThermoFisher. (2016). PureLink Genomic DNA Mini Kit. In ThermoFisher (Ed.).
- Tome, M. A. (2006). Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2. In V. M. Arce, P. F. Catalina, & F. Mallo (Eds.), *Endocrinología* (pp. 274-278): Universidad de Santiago de Compostela.
- Urquidez-Romero, R., Esparza-Romero, J., & Valencia, M. E. (2015). Interacción entre genética y estilo de vida en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2: el estudio en los indios pima/genetic-life style interactions in type 2 diabetes mellitus development: the pima indians study. *BIOtecnica*, 17(1), 40-46.
- Wang, B., P. C. C., & Pippin, J. J. (2014). Leptin- and Leptin Receptor-Deficient Rodent Models: Relevance for Human Type 2 Diabetes. *Current Diabetes Reviews*, 10(2), 131-145. doi:10.2174/1573399810666140508121012
- Wauters, M., Considine, R. V., & Van Gaal, L. F. (2000). Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *European journal of endocrinology*, 143(3), 293-311.
- Xu, J., Turner, A., Little, J., Bleecker, E. R., & Meyers, D. A. (2002). Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? *Human genetics*, 111(6), 573-574.
- 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. doi:10.1038/srep23948
- Ávila, L. R. N., & Solano, M. C. (2016). Factores de riesgo y complicaciones en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Sucre. 2012. Risk factors and complications in patients with type 2 diabetes mellitus. Sucre 2012.*

**ANEXOS**

**ANEXO 1: Variables de la investigación**

VARIABLE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	TIPO	CATEGORÍA
Polimorfismos 2548G>A en el gen <i>LEP</i>	Presencia del alelo A o ausencia del alelo G	Presencia	Cualitativa nominal	Presente Ausente
Peso Corporal	Masa del cuerpo expresada en kilogramos, medida en balanza mecánica provista en el centro de enfermería de la fundación DONUM	Kilogramos (kg)	Cuantitativa (Continua)	Kilogramos
Talla (estatura)	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", se mide en centímetros (cm) para posterior transformarla en metros.	Metros (m)	Cuantitativa (Continua)	Metros
Índice de masa corporal	Relación entre el peso (Kg) y talla (m <sup>2</sup> ) que se utiliza para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos.	Kg/m <sup>2</sup>	Cuantitativa (continua)	De acuerdo a la fórmula de Quetelet: Normopeso IMC entre 18,5-24,9 Sobrepeso : 25-29,9 Obesidad ≥30
Edad	Años vividos de la persona desde la fecha de nacimiento indicada en la cedula de identidad hasta el momento de la entrevista	Años	Cuantitativa (continua) Cualitativa (Nominal)	Adulto joven: 18-35 años Adulto: 35-64 años Tercer edad: 65 años en adelante
Sexo	Identificación sexual registrada en la cédula de identidad de la persona	Género	Cualitativa (nominal)	Masculino Femenino
Procedencia	Región desde donde acude el individuo para ser atendido	Región del País	Cualitativa (Nominal)	Costa Sierra Amazonía Región Insular



Raza	Etnia con la cual el individuo se identifica.	Etnia	Cualitativa (nominal)	Blanco Afrodescendiente Mestizo Montubio Indígena Otros
Tiempo de aparición de la enfermedad	Tiempo transcurrido desde el día de diagnóstico de la enfermedad hasta el día de la entrevista	Tiempo	Cuantitativa (continua)	Meses Años
Tratamiento con antidiabéticos	Terapia farmacológica antidiabética que ha sido prescrita por un médico para el control de la glucemia del paciente.	Fármacos antidiabéticos	Cualitativa (nominal)	Metformina Sulfonilureas Insulina Ninguno
Dieta específica.	Recomendación que da un médico tratante para ingerir o restringir una cantidad y alimento específico en un horario definido como parte de un tratamiento.	Realiza No Realiza	Cualitativa (Nominal)	Si No
Ejercicio físico	Variedad de actividad física planificada, estructurada, repetitiva y realizada con un objetivo relacionado con la mejora o el mantenimiento de la salud o aspecto físico.	Realiza No realiza	Cualitativa (Nominal)	Si No
Duración del ejercicio físico	Tiempo en horas o minutos empleados para la realización de Ejercicio físico	Horas o minutos	Cuantitativa (Continua)	< o igual a 30 minutos 31-60 minutos >o igual a 60 minutos
Frecuencia con la que realiza ejercicio físico	Es el número de veces que se realiza ejercicio físico a la semana	Número de veces por semanas	Cuantitativa (Discreta)	< 3 veces por semana 3-5 veces por semana >5 veces por semana

**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:** “ASOCIACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DEL POLIMORFISMO 2548G>A DEL GEN *LEP* CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN PACIENTES AMBULATORIOS DE LA FUNDACIÓN DONUM”.

**Organización del investigador:** Universidad de Cuenca

**Nombre del investigador principal:** Lorena Alexandra Dután Quizhpi  
Tatiana Estefanía Guncay Sangurima

**Datos de localización del investigador principal:** Lorena Alexandra Dután Quizhpi

Tlf: 0985811197

e-mail: [alexandra.dutan09@ucuenca.ec](mailto:alexandra.dutan09@ucuenca.ec)

Tatiana Estefanía Guncay Sangurima

Tlf: 0996401243

e-mail: [estefania.guncay93@ucuenca.ec](mailto:estefania.guncay93@ucuenca.ec)

**Co-investigadores:** Dr. Fausto Leonardo Zaruma Torres, 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 de la Fundación DONUM:

DONUM es una Organización No Gubernamental (ONG) creada en octubre de 1992 por iniciativa de un grupo de sacerdotes y ciudadanos cuencanos. La Fundación cuenta con áreas de desarrollo por ejemplo Microcrédito y un Centro Médico que brinda servicio médico especializado, ágil, oportuno y a precios accesibles para personas de escasos recursos económicos. A tiende a sectores urbanos y rurales del Austro y el País.

**MISIÓN:** Promover la salud integral, la organización, la generación de ingresos, la autogestión y brindar servicios de calidad con calidez a la población del país a bajos costos.

**VISIÓN:** Ser una ONG innovadora, de referente positivo respetada y prestigiosa, económicamente solvente con presencia y credibilidad a nivel local y nacional, participando activamente en el quehacer político y social del país.

### VALORES CORPORATIVOS

- Solidaridad
- Profesionalismo
- Vocación de servicio
- Auto sostenibilidad.
- Empoderamiento
- Transparencia
- Desarrollo

Consulta Externa, Se define como el conjunto de actividades realizadas por médicos, enfermeras y otro personal calificado de la institución, apoyados casi siempre por medio de diagnóstico, como son: los exámenes de laboratorio, ecografías, rayos X con el objetivo de prevenir, controlar y tratar las diferentes enfermedades.

Pacientes ambulatorios: Se define como los pacientes que diariamente acuden a la institución con necesidades por ser atendidas y se benefician, o reciben el servicio que ofrece la institución.

Antecedentes del estudio:



Las células en el cuerpo humano contienen una amplia variedad de sustancias entre estas tenemos químicos, azúcares, proteínas, grasas y material genético.

El material genético, (ADN [ácido desoxirribonucleico], 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 Lorena Dután y Tatiana Guncay, 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".

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 influye directamente en la ingesta de alimentos, es decir, esta sustancia indica al cuerpo cuando se ha consumido la cantidad suficiente de alimentos y genera la sensación de "estar lleno"; para que el individuo deje de ingerir alimentos en ese momento. Además, la leptina también está muy relacionada con la insulina, otra hormona importante que se produce en el páncreas y sirve para asimilar el azúcar de los alimentos.

Si existiese una variación a nivel del gen de leptina, el cuerpo no podrá generar normalmente el sentimiento de saciedad, por ende, el individuo va a consumir grandes cantidades de alimento en intervalos muy cortos de tiempo, desarrollando así sobrepeso u obesidad; también habrá un exceso de azúcar en la sangre y posiblemente un daño en las células del páncreas. Todas estas acciones favorecen la resistencia a la insulina y el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

### **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 encontrar si existe asociación entre la presencia de dicho polimorfismo



con la presencia de la DM2; y de esta forma aportar al campo de la ciencia con información acerca de una de las posibles causas de esta enfermedad.

Para esto, en el estudio se formaran dos grupos: el primero, integrado por personas que padezcan DM2 y el segundo integrado por personas que no padezcan de DM2. Usted será ubicado en uno de estos dos grupos según corresponda.

Consideramos importante su participación porque usted es una persona mayor de edad que cumple con los siguientes criterios:

- No padece de Enfermedad Cardiovascular
- No padece de Enfermedad Cerebral
- No padece de Insuficiencia Renal
- No padece de desnutrición
- No padece de Infecciones agudas o crónicas
- No evidencia inmunodeficiencias primaria o secundaria
- No se encuentra en estado de Gestación.
- No padece de ningún tipo de cáncer.

### Descripción de los procedimientos

Si usted acepta formar parte del estudio, su participación consistirá en: Acudir al departamento de enfermería de la unidad de salud “Fundación DONUM”, donde mediante una entrevista directa y confidencial con las investigadoras principales, proporcionará información relevante para completar una hoja de recolección de datos, posterior las investigadoras le tomarán medidas de peso y talla con una balanza mecánica con tallímetro proporcionada por centro de enfermería y una muestra de sangre venosa (aprox. 5ml), sea del brazo derecho o izquierdo.

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

- Edad
- Sexo
- Etnia
- Procedencia
- Tiempo de aparición de la enfermedad
- Ejercicio físico.
- Dieta específica. (sugerida como parte del tratamiento).
- Antecedentes familiares de DM2.
- Tratamiento farmacológico actual (para personas con DM2)
- Medidas de peso y talla (tomadas en ese momento)
- Índice de masa corporal (será calculado)

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, identificara al paciente y explicara el procedimiento que se va a realizar. Pidiéndole que siente o se recueste.
4. Se etiquetara 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, le redirigirán a usted hacia el consultorio correspondiente para que usted continúe con su consulta médica.

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, las muestras de sangre obtenidas serán transportadas bajo cadena de frío (refrigeración) hacia los laboratorios de la Universidad de Cuenca, donde: 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 8 meses, el día de hoy se consolidará su colaboración a través del presente documento y se procederá a la entrevista, medidas de peso y talla y la toma de muestra de sangre por parte de las investigadoras principales. Una vez concluida la investigación los resultados relacionados con su muestra serán entregados al personal de salud de la fundación



DONUM y será un médico quien le proporcione la información completa acerca de la interpretación de los resultados, cuando usted así lo requiera.

**Destrucción de las Muestras:** las investigadoras conservarán los registros relacionando su identidad con su muestra de sangre por el periodo de tiempo que dure el estudio. Pero si usted desea, hasta que esos registros se eliminen, usted puede pedir a las investigadoras que su muestra de sangre y el material obtenido sean destruidos.

Al término de la investigación (8-9meses) las muestras de sangre y el material obtenido, serán destruidas bajo las más estrictas normas de bioseguridad.

### Riesgos y beneficios

Riesgos:

- Los riesgos asociados con la toma de muestra de sangre de su brazo incluyen 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.

### 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 colocara una toalla fría en la cabeza o parte posterior del cuello. En caso que permanezca inconsciente, se notifica de inmediato a un médico.

**Beneficios:**

- 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 al conocimiento de una de las posibles causas de la DM2.

**Confidencialidad de los datos**

En el presente estudio 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.

Quienes realizamos este estudio nos comprometemos a mantener absoluta confidencialidad con su información, por lo cual aplicaremos las medidas necesarias para que nadie conozca su identidad ni tenga acceso a sus datos personales:

1. La información obtenida de su persona se registrará a través de un código alfanumérico al que únicamente tendrán acceso los investigadores y el personal de la Fundación DONUM.
2. Su nombre no será mencionado en los reportes o publicaciones.
3. 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

Los resultados serán entregados al personal de la Fundación en el departamento de enfermería, en este lugar el personal de salud serán los encargados de transmitir los resultados a los participantes de manera personal y confidencial. Los resultados que necesiten ser expuestos para obtener la titulación, se expondrán resguardando la identidad e integridad de todos los participantes.

**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.

Su participación o no participación, dentro de esta investigación no afectará en ningún aspecto el servicio y la atención que reciba usted dentro de la Fundación DONUM.

#### **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)

Lorena Alexandra Dután Quizhpi

Tlf: 0985811197

e-mail: [alexandra.dután09@ucuenca.ec](mailto:alexandra.dután09@ucuenca.ec)

Tatiana Estefanía Guncay Sangurima

Tlf: 0996401243

e-mail: [estefania.guncay93@ucuenca.ec](mailto:estefania.guncay93@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)



<b>Consentimiento informado</b>	
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 ( <i>si aplica</i> )	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:** “ASOCIACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DEL POLIMORFISMO 2548G>A DEL GEN *LEP* CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN PACIENTES AMBULATORIOS DE LA FUNDACIÓN DONUM”

**Investigadoras Principales:** Lorena Alexandra Dután Quizhpi  
Tatiana Estefanía Guncay Sangurima

**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 Clínico de la Fundación DONUM.

*Ejemplo:* NBAR-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.**

Parte I – 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. **Género:** 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. Tiempo de aparición de la enfermedad:** años ( ), meses ( )
- 6. Ejercicio físico:** realiza ejercicio físico: si ( ) no ( )

**¿Con que frecuencia realiza ejercicio a la semana?**

- No hago ejercicio ( )  
 Una vez a la semana ( )  
 De 2 a 3 veces a la semana ( )  
 De 4 a 5 veces a la semana ( )  
 diario ( )

**¿Qué tiempo emplea para hacer ejercicio?**

Menos de 30 minutos ( ) entre 30 minutos a 1 hora ( ) más de 1 hora ( )  
 Especifique: \_\_\_\_\_

Deporte o actividad física específica: \_\_\_\_\_

**7. Dieta:**

¿Cuántas comidas realiza por día?: \_\_\_\_\_

¿Usted consume algún tipo de comida especial por su salud o por razones personales?, anote de qué clase y cuánto consume: \_\_\_\_\_

¿Sigue alguna restricción en la dieta o comidas especiales? No ( ) Sí ( )

Con bajo contenido de hidratos de carbono ( )

Con bajo contenido graso / colesterol ( )

Otro: \_\_\_\_\_

¿Cómo evaluarías tus hábitos alimenticios?

Excelentes ( ) Buenos ( ) Regulares ( ) Malos ( ) Pésimos ( )

**8. ¿Hay antecedentes familiares de diabetes?**

No ( ) Sí ( ) (¿de quién?): \_\_\_\_\_



9. **Tipo de tratamiento farmacológico:** Si usted es una persona que padece de Diabetes Mellitus tipo 2: Marcar con un X (admite más de una opción)

Biguanidas ( ) Sulfonilureas ( ) Insulina ( )

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

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

12. **Índice de Masa Corporal:** Marcar con un X

Normo peso IMC: 18,5-24,9 kg/m<sup>2</sup> ( ) Sobrepeso : 25-29,9 kg/m<sup>2</sup> ( )

Obesidad  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> ( )

Valor exacto de ICM: ( ) kg/m<sup>2</sup>

## PARTE II - CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

1. **El paciente es mayor de edad:** Marcar con un X

Si ( ) No ( )

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

Si ( ) No ( )

( ) Enfermedad Cardíaca

( ) Enfermedad Cerebral

( ) Insuficiencia Renal

( ) Desnutrición

( ) Infecciones agudas o crónicas

( ) Evidencia de inmunodeficiencias primaria o secundaria

( ) Presenta algún tipo de cáncer.

3. **Si usted es mujer ¿Se encuentra usted en estado de gestación?**

Si ( ) No ( )



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



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, 22 de julio de 2017

Señoritas

Lorena Alexandra Dután Quizhpi  
Tatiana Estefanía Guncay Sangurima  
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 "ASOCIACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DEL POLIMORFISMO 2548G>A DEL GEN LEP CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN PACIENTES AMBULATORIOS DE LA FUNDACIÓN DONUM", 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 # 3 de julio 22, 2017 que incluyen:

- Solicitud de revisión y aprobación de estudio de investigación, 27 páginas;
- Solicitud de aplicación al consentimiento informado por escrito, 8 páginas;

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

- Hoja de vida de Tatiana Estefanía Guncay Sangurima, 12 páginas;
- Hoja de vida de Lorena Alexandra Dután Quizhpi, 12 páginas;
- Protocolo de tesis, 6 páginas.

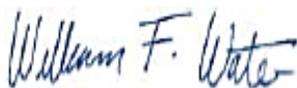
Esta aprobación tiene una duración de un año (365 días) transcurrido el cual se deberá solicitar una extensión si fuere necesario. En toda correspondencia con el Comité de Bioética favor referirse al siguiente código de aprobación: **2017-067T**. El Comité estará dispuesto a lo largo de la implementación 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 se 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



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



*Figura 9:* Baño María VORTEMP 56 EVC usado en el proceso de extracción de ADN. Fuente: Autoras

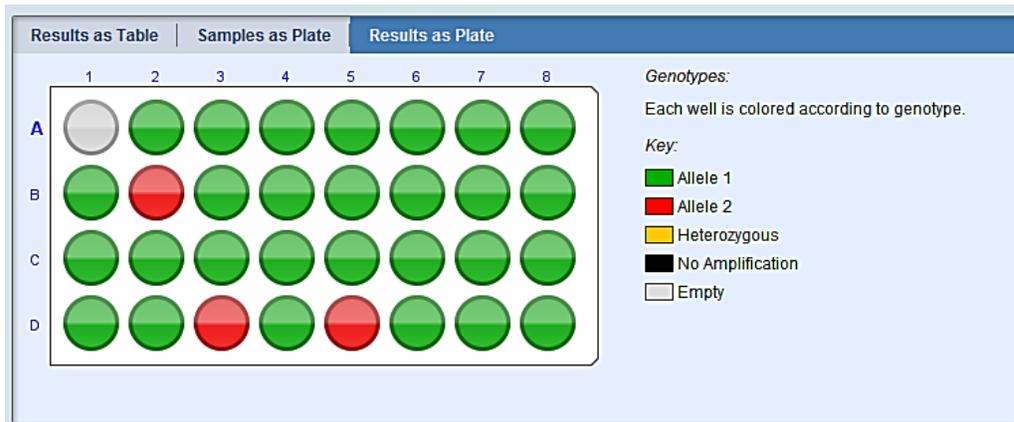


*Figura 10:* Micro centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415R Fuente: Autoras



*Figura 11:* LightCycler Nano 1.0.7. Fuente: Autoras

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



*Figura 12: Análisis Endpoint de LightCycler Nano. Fuente: Autoras, 2017*