



UNIVERSIDAD DE CUENCA
Facultad de Ciencias Químicas
Carrera de Bioquímica y Farmacia

**“Determinación de la frecuencia genotípica y fenotípica de los polimorfismos
2548G>Adel gen *LEP* y Gln223Arg del gen *LEP* en niños con Leucemia Linfoblástica
Aguda de SOLCA Cuenca y Loja.”**

Trabajo de titulación previo a la obtención
del Título de Bioquímica Farmacéutica

Autoras:

Karla Vanessa Loaiza Santín

CI: 1105236861

Karen Lisseth Ochoa Peña

CI: 0706703873

Director:

Dr. Fausto Leonardo Zaruma Torres, PhD.

CI: 1102127980

Cuenca – Ecuador

Abril, 16 del 2019



RESUMEN

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es la neoplasia con mayor porcentaje en la población infantil en Ecuador, y puede verse acompañada de repercusiones como cambios en el estado nutricional, en tal virtud el presente estudio buscó determinar la frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos 2548G>A del gen *LEP* y Gln223Arg del gen *LEPR* en pacientes oncopediátricos puesto a su relación con la ingesta de alimentos.

Esto se desarrolló a través de un estudio descriptivo; en 160 pacientes con LLA atendidos en SOLCA núcleos Loja y Cuenca, quienes participaron de manera voluntaria y dieron su aceptación mediante el consentimiento informado a partir de la aprobación del Comité de Ética para Investigaciones en Seres Humanos de la USFQ.

La recolección de datos se obtuvo mediante la revisión de las historias clínicas, se tomó a cada paciente 5ml de sangre total, se realizó la extracción del material genómico, cuantificación y electroforesis del mismo y finalmente se realizó la detección de los polimorfismos 2548G>A y Gln223Arg mediante la técnica de PCR en tiempo real.

Se determinó que las frecuencias genotípicas para 2548G>A fueron 19% A/A y 81% G/A, con una predominancia del alelo (A) en un 59% y el alelo (G) en un 41%, por otra parte para Gln223Arg las frecuencias genotípicas y alélicas fueron 34% A/A, 66% A/G, (A) 68% y (G) 32% respectivamente.

Se determinó que existe una equivalencia en cuanto a la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas en ambos grupos de pacientes, siendo predominante el grupo heterocigoto para ambos polimorfismos. Finalmente se determinó que no existe asociación de los polimorfismos en estudio con el IMC, cabe recalcar que para el análisis estadístico se trabajó con un intervalo de confianza del 95% y $p < 0.05$.

Palabras clave: Leptina. Receptor de leptina. Polimorfismo. Leucemia. Obesidad. *LEP* 2548G>A. *LEPR* Gln223Arg.



ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the neoplasia with the highest percentage within the infant population in Ecuador, it can come with repercussions in the nutritional state of these kids therefore the present study was looking for to determinate the genotype and allelic frequencies of the polymorphism 2548G>A of the LEP gene and GLN223ARG of the LEPR gene in pediatric oncology patients put to your relationship with food intake..

This work was developed through a descriptive study; in 160 patients with ALL all of whom were being attended in SOLCA Loja and SOLCA Cuenca, the participants collaborated in a voluntary way and gave their acceptance through informed consent, the study has the approbation from the Human Research Ethics Committee of the SFQU.

Data recollection was obtained through medical record revision, 5ml of blood was taken from each patiente, from the samples genomic material was obtained then DNA, quantification tests and electrophoresis thereof, finally the detection of the polymorphisms 2548G>A and Gln223Arg was made trough real time PCR technique.

It was determined that the genotypic frequencies for 2548G> A were 19% A / A and 81% G / A, with a predominance of the allele (A) with 59% and allele (G) 41% on the other hand for GLN223ARG the genotype and allelic frequencies were 34% A/A, 66% A/G, (A) 68% and (G) 32% respectively. In both medical centers was identified an equivalency in the frequency distribution of the patients, heterozygous group was predominant for both polymorphisms.

It was determined that there is an equivalence regarding the distribution of the genotypic and allelic frequencies in both groups of patients, being predominant the heterozygous group for both polymorphism. Finally it was determined that there is no association between the polymorphism in the study with BMI, shown by a confidence interval of 95% was used and $p < 0.05$.

KEY WORDS: Leptin. Leptin receptor. Polymorphism. Leukemia. Obesity. *LEP 2548G>A. LEPR Gln223Arg.*



ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN..... 2

ABSTRACT..... 3

ÍNDICE DE CONTENIDO 4

LISTA DE TABLAS 6

LISTA DE FIGURAS 7

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA 9

DEDICATORIA..... 15

DEDICATORIA..... 16

AGRADECIMIENTO 17

INTRODUCCIÓN 18

CAPITULO 1..... 20

 2. Marco teórico..... 20

 2.1 Leucemia 20

 2.1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)..... 20

 2.1.2 Epidemiología 21

 2.1.3 Etiología 21

 2.2 Leptina 23

 2.2.1 Descripción molecular de la leptina..... 24

 2.2.2 Mecanismo de acción 25

 2.2.3 Señalización intracelular 26

 2.2.4 Resistencia a la leptina 27

 2.2.5 Leptina e inmunidad 28

 2.2.6 Participación de la leptina en la LLA 29

 2.2.7 Polimorfismo *LEP* 2548 G>A..... 30

 2.2 Receptor de Leptina..... 31

 2.3.1 Polimorfismo *LEPR* Gln223Arg 32

CAPÍTULO 2..... 35

3. Materiales y métodos 35

 3.1.1 Tipo de estudio 35

 3.1.2 Universo de estudio 35

4



3.1.3 Área de estudio	35
3.2 Muestreo	36
3.2.2 Criterios de pariamiento.....	36
3.2.3 Criterios de selección	37
3.2.4 Variables	37
Variables independientes.....	37
3.3 Procedimientos	37
3.3.1 Revisión de historias clínicas (HC)	37
3.3.2 Flebotomía	38
3.3.3 Extracción de ADN	38
3.3.5 Cuantificación del ADN.....	44
3.3.6 Amplificación del ADN mediante PCR en tiempo real.....	45
3.3.7 Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real	47
3.3.8 Determinación de los polimorfismos	48
3.3.9 Interpretación de resultados	51
3.3.10 Análisis estadístico	52
CAPÍTULO 3.....	54
4. Resultados.....	54
4.1 Descripción de las características socio-dermográficas, antropométricas, hematológicas y bioquímicas de la población estudiada.....	54
4.2 Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo 2548G>A del gen <i>LEP</i> y <i>GLN223ARG</i> del gen <i>LEPR</i> en la población de estudio.....	57
4.3 Asociación de los polimorfismos 2548G>A del gen <i>LEP</i> y <i>Gln223Arg</i> del gen <i>LEPR</i> con los diferentes parámetros establecidos en el estudio.....	63
4.3 Discusión	64
CAPÍTULO 4.....	71
5. Conclusiones y recomendaciones.....	71
Conclusiones	71
Recomendaciones	72
Bibliografía	73
ANEXOS.....	77



LISTA DE TABLAS

Tabla 1: *Criterios de inclusión y exclusión para los participantes del estudio.*.....37

Tabla 2: *Componentes mini Kit de ADN genómico PureLink® de INVITROGEN*38

Tabla 3: *Materiales y equipos utilizados en la extracción de ADN.*42

Tabla 4: *Materiales y Equipos empleados en la electroforesis de muestras de ADN.*44

Tabla 5: *Materiales y equipos utilizados en la cuantificación de ADN*45

Tabla 6: *Características de las sondas de hidrólisis Taqman® aplicadas en el ensayo.*.....47

Tabla 7: *Condiciones para la reacción de amplificación (cóctel).*48

Tabla 8: *Condiciones para la dilución de las sondas Taqman®.*.....49

Tabla 9: *Materiales y equipos para el desarrollo de qPCR.*50

Tabla 10: *Datos antropométricos, sociodemográficos y hematológicos*54

Tabla 11: *Valores bioquímicos clínicos de la población en estudio n=160.*57

Tabla 12: *Frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos 2548G>A y Gln223Arg.* 58

Tabla 13: *Asociación de riesgo del SNP de LEP con el estado nutricional.*63

Tabla 14: *Asociación de riesgo del SNP de LEPR con el estado nutricional alterado*64



LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Localización del gen LEP y estructura helicoidal **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 2:** Acción de la leptina a nivel del sistema nervioso **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 3:** Activación de la vía JAK/STAT al unirse LEP a LEPRb. **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 4:** Participación de la Leptina a nivel de la Inmunidad en el organismo. **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 5:** Estructura general de las diferentes isoformas del receptor de leptina. **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 6:** Procedimiento de lisis celular para la obtención de ADN genómico.. **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 7:** Procedimiento de lavado/purificación para la obtención de ADN genómico. **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 8:** Procedimiento de elución para la obtención de ADN genómico. **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 9:** Distribución de los pacientes de acuerdo a la provincia de origen.56
- Figura 10:** Clasificación de los pacientes de acuerdo al inmunofenotipo.56
- Figura 11:** Clasificación del IMC según los percentiles con la frecuencia Genotípica del Polimorfismo rs7799039.....59
- Figura 12:** Clasificación del IMC de acuerdo a percentiles con la frecuencia genotípica del polimorfismo rs113710159
- Figura 13:** Clasificación de acuerdo a la procedencia de los pacientes con la frecuencia genotípica del polimorfismo 779903960
- Figura 14:** Clasificación de acuerdo a la procedencia de los pacientes con la frecuencia genotípica del polimorfismo rs 113710160
- Figura 15:** Clasificación de los pacientes de acuerdo al sexo y la frecuencia genotípica del polimorfismo rs 7799039.....61
- Figura 16:** Clasificación de los pacientes de acuerdo al sexo y a la frecuencia genotípica del polimorfismo 113710161



Figura 17: Clasificación de los pacientes de acuerdo a la Etnia y a la frecuencia genotípica del polimorfismo 7799039.....62

Figura 18: Clasificación de los pacientes de acuerdo a la Etnia y a la frecuencia genotípica del polimorfismo 1137101.....62

Figura 19: Comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas de los pacientes tratados en Solca Cuenca y Loja63

Figura 1: Clasificación de los pacientes de acuerdo a la Etnia y a la frecuencia genotípica del polimorfismo 1137101..... 60

Figura 2: Comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas de los pacientes tratados en SOLCA Cuenca y Loja..... 61

Figura 3: Electroforesis realizada en las muestras de ADN genómico..... 83



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

aa:	Aminoácido
ADN:	Ácido desoxiribonucleico
AgRP:	Péptido Agouti-Relacionado
ARC:	Núcleo arcuato
CART:	Transcriptasa Relacionada con la Cocaína-Anfetamina
db/db:	Gen diabético de ratón
EBV:	Epstein-Barr Virus
ERK:	Extracellular signal-regulated kinases
FoxO1:	Caja Forkhead O1
GCT:	Grasa corporal total
HC:	Historia clínica
IMC:	Índice de masa corporal
IRS:	Sustrato Receptor de la Insulina
JaK2:	Janus quinasa tipo 2
JAK/STAT:	Janus quinasa/Transductor de la Señal y Activador de la Transcripción
LEP:	Leptina
LEPR:	Receptor de la leptina
LEPRb:	Receptor de la leptina isoforma larga
LLA:	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLC:	Leucemia Linfoblástica Crónica



LMA:	Leucemia Mieloblástica Aguda
LMC:	Leucemia Mieloblástica Crónica
MCH:	Hormona Concentradora de Melanina
ng/ml:	Nanogramos por mililitro
NPY:	Neuropéptido Y
NO:	Óxido nítrico
NTS:	Núcleo Tracto Solitario
ob/ob:	Gen obeso de ratón
PDK1:	3-Fosfoinositido protein-kinasa dependiente 1
PI3K:	Fosfatidil inositol 3 kinasa
POMC:	Propiomelancortina
PTPN11	Tirosina fosfataza
qPCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real
SNC:	Sistema Nervioso Central
SNPs:	Polimorfismo de un solo nucleótido



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Karla Vanessa Loaiza Santín, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Determinación de la frecuencia genotípica y fenotípica de los polimorfismos $2548G>A$ del gen *LEP* y Gln223Arg del gen *LEPR* en niños con Leucemia Linfoblástica Aguda de SOLCA Cuenca y Loja”, 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.

Cuenca, Abril de 2019.

Karla Vanessa Loaiza Santín

C.I: 110523686-1



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Karen Lisseth Ochoa Peña, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Determinación de la frecuencia genotípica y fenotípica de los polimorfismos $2548G>A$ del gen *LEP* y Gln223Arg del gen *LEPR* en niños con Leucemia Linfoblástica Aguda de SOLCA Cuenca y Loja”, 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.

Cuenca, Abril de 2019.

Karen Lisseth Ochoa Peña

C.I: 070670387-3



Cláusula de Propiedad Intelectual

Karla Vanessa Loaiza Santín, autor/a del trabajo de titulación “Determinación de la frecuencia genotípica y fenotípica de los polimorfismos *2548G>A* del gen *LEP* y *Gln223Arg* del gen *LEPR* en niños con Leucemia Linfoblástica Aguda de SOLCA Cuenca y Loja”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, Abril de 2019.

Karla Vanessa Loaiza Santín

C.I: 110523686-1



Cláusula de Propiedad Intelectual

Karen Lisseth Ochoa Peña, autor/a del trabajo de titulación “Determinación de la frecuencia genotípica y fenotípica de los polimorfismos $2548G>A$ del gen *LEP* y Gln223Arg del gen *LEPR* en niños con Leucemia Linfoblástica Aguda de SOLCA Cuenca y Loja”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, Abril de 2019.

Karen Lisseth Ochoa Peña

C.I: 070670387-3



DEDICATORIA

“El éxito no se trata de grandeza, es sobre consistencia. Ser consistente en trabajar duro conlleva al éxito, la grandeza vendrá sola”

Dwayne Johnson.

A Dios, por permitirme llegar a este momento tan anhelado, por darme la fuerza y ser mi refugio en los momentos de adversidad, por poner en mi camino a personas que me han brindado su apoyo y compañía durante este largo camino.

A mis padres Aníbal Loaiza y Carmen Santín, por ser mi ejemplo de lucha, valentía y amor, por todo el esfuerzo que han realizado para que pueda formarme como profesional, por su amor y amistad incondicional, pero sobre todo por su infinita paciencia conmigo, todo se lo debo a ustedes.

A mis hermanos Carlos, Samantha y Bismarck, por permanecer siempre a mi lado, por todas las alegrías y demás emociones que hemos compartido, por su apoyo en los momentos de lucha y por las fuerzas que me han dado para culminar esta meta.

A mi prima Yajahira que tras una dura lucha contra el cáncer me inspiro a luchar y no tirar la toalla ante los momentos de adversidad, a darle a la vida siempre una sonrisa, sé que desde el cielo me cuidas y al fin he podido



cumplir una de tus peticiones hacia mí antes tu partida, ¡Lo logramos Yari!

Karla Vanessa Loaiza Santín

DEDICATORIA

“Con frecuencia las dificultades preparan a personas ordinarias en extraordinarias”

CS Lewis

A Dios, por bendecirme cada día e iluminar mi camino para cumplir todo aquello que anhelaba y deseaba, darme la mano para hacer frente a las adversidades de la vida y permitirme tener a mi lado a personas de incalculable valor que con su apoyo y amor hicieron de esto un sueño posible.

A mis padres Oscar Ochoa y Guadalupe Peña por su sacrificio para darme la mejor educación, ser mi pilar fundamental en la escuela de la vida , enseñarme que se puede ser mejor cada día, y permitirme alcanzar una de las tantas metas que deseo obtener

A mi esposo Jonnathan por su paciencia, amor y apoyo incondicional en esta larga trayectoria y por tener las palabras exactas para perseverar y seguir adelante.

A mi hijo Matías por llegar a mi vida cuando menos lo esperaba y ser la mayor inspiración y fuerza motora para seguir en pie de lucha y lograr este sueño.

A toda mi familia, que con sus consejos, palabras de aliento y cariño incondicional, contribuyeron para que cada día me llene de fuerza y pueda llegar al final de esta meta.



Karen Lisseth Ochoa Peña

AGRADECIMIENTO

Al concluir nuestra tesis en primer lugar damos gracias a Dios, por ser nuestro guía y compañero a lo largo de nuestros estudios, por ser nuestra fortaleza en los momentos duros de la vida, por habernos ayudado a superar todos aquellos obstáculos que se nos presentaron en el camino, pero sobre todo por habernos permitido llegar a esta meta tan anhelada.

Al concluir un camino arduo y lleno de dificultades expresamos nuestro agradecimiento de manera fraterna al Dr. Fausto Zaruma Torres, PhD., tutor de nuestro trabajo de titulación, por su inmenso apoyo y confianza hacia nosotras, por su dedicación, quien con sus amplios conocimientos, experiencia, paciencia y motivación supo guiarnos para poder dar culminación a esta meta.

De igual manera, nuestro eterno agradecimiento al Dr. Rodrigo Caroca, PhD., Ing. Diego Montero e Ing. María José Carrera quienes siempre estuvieron dispuestos a colaborar, por su orientación y atención a las dudas que se presentaron en el transcurso, por todos los consejos y conocimientos que compartieron con nosotras.

Gracias a este largo camino hacia la culminación de nuestro trabajo de tesis, y durante nuestra vida universitaria hemos tenido la oportunidad de contar con el apoyo de una docente grandiosa, quién con su amabilidad y conocimientos llegaron a ser un eje fundamental en el transcurso de nuestra carrera y finalización de la misma, por ello nuestra más sincera gratitud hacia la Dra. Maritza Ochoa.

A nuestra prestigiosa Universidad de Cuenca, al personal de SOLCA núcleos Cuenca y Loja, de manera especial a la Dra. Soledad Jiménez y al Dr. Emanuel Guerrero, a la Universidad del Azuay y al Centro de Investigación, Innovación y Transferencia de



Tecnología (CIITT), instituciones que muy cordialmente abrieron sus puertas y nos permitieron alcanzar la meta propuesta.

INTRODUCCIÓN

La alta incidencia de enfermedades neoplásicas hace que estas se constituyan actualmente como un real problema de salud de carácter mundial. El número de casos de cáncer ha ido creciendo gradualmente, de manera especial las neoplasias pediátricas, que según la OMS en estos pacientes se ha elevado su incidencia hasta en un 13% en los últimos 20 años, siendo un dato alarmante para la población (OMS, 2017).

En Ecuador, la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es la oncopatología más prevalente en niños menores de 15 años, afectando preferentemente a niños entre 1-4 años de edad; La LLA se caracteriza por la sobreproducción de precursores linfoides o también denominados linfoblastos a nivel de la médula ósea, es decir las células no alcanzan la madurez total como para lograr desempeñar adecuadamente sus funciones. Estas células malignas, por su alta capacidad proliferativa, se acumulan de manera descontrolada, perjudicando así la producción de células maduras y normales. En consecuencia, afecta notablemente la calidad de vida de los pacientes (Leukemia & Lymphoma Society, 2015; SOLCA, 2017).

La leptina (LEP) es una hormona de estructura similar a las citocinas que se sintetiza casi con exclusividad en los adipocitos cuya expresión es dependiente del gen *LEP*; en efecto, ésta al interactuar con su receptor expresado por el gen *LEPR* da lugar a la activación de diversas vías de señalización involucradas principalmente la regulación de la ingesta de alimentos y el gasto energético; no obstante, esta hormona posee también un papel en procesos inmunológicos, de crecimiento, reproducción, desarrollo y proliferación celular, y se la ha asociado a demás con el desarrollo de tumores, inhibición de la apoptosis de líneas celulares leucémicas y la estimulación de formación de colonias de progenitores leucémicos. Por otra parte, por el carácter pleitrópico (fenómeno en el que las alteraciones o mutaciones que se den sobre un solo gen pueden generar una serie de efectos de carácter fenotípico en sistemas que no están relacionados) de la leptina y su receptor, hacen que estos sean muy susceptibles a variaciones genéticas y más aún en niños con LLA, quienes están sujetos a tratamientos agresivos de quimioterapia; dichas variaciones han sido asociadas con en la frecuencia de las recidivas, cambios del estado nutricional, acortando el tiempo de vida de estos pacientes frente a pacientes que no las poseen (Ethier et al., 2012).

Por esta razón y en base a la escasez de investigaciones en nuestro país acerca de la influencia que estos polimorfismos puedan tener sobre esta enfermedad, hemos planteado determinar la frecuencia genotípica y fenotípica de los polimorfismos 2548G>A del gen



LEP y Gln223Arg del gen *LEPR* en este tipo de cáncer hematológico y establecer que influencia tienen estos sobre el mismo.

1. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Objetivo general

Determinar la frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos 2548G>A del *gen LEP* y Gln223Arg del gen *LEPR* en pacientes con LLA en SOLCA Cuenca y Loja.

Objetivos específicos

- Identificar las características antropométricas, hematológicas y bioquímicas de la población de estudio mediante la revisión de historias clínicas.
- Obtener el ADN a partir de sangre total extraída de los pacientes.
- Identificar por PCR en tiempo real (qPCR) los polimorfismo 2548G>A del gen de *LEP* y Gln223Arg del gen *LEPR* en pacientes con LLA de SOLCA Cuenca y Loja.
- Describir la frecuencia del polimorfismo 2548G>A del *gen LEP* y Gln223Arg del gen *LEPR* en los pacientes con LLA de SOLCA Cuenca y Loja de acuerdo a las covariables de interés (edad, sexo, etnia, peso, talla).
- Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas entre los grupos de estudio (Loja y Cuenca).



CAPITULO 1

2. Marco teórico

2.1 Leucemia

La leucemia es un tipo de tumor blando hematológico cuyo desarrollo se encuentra en la médula ósea, tejido responsable de la producción de diversas células que componen el sistema hematopoyético e inmune principalmente, se caracteriza por la producción desmesurada de precursores leucocitarios los cuales son disfuncionales por no poder alcanzar su madurez completa, los procesos apoptóticos en estos precursores leucocitarios también se ven reducidos generando una acumulación de los mismos, con esto se genera un desplazamiento de las células maduras y normales lo que puede conducir también a cuadros de pancitopenia (Lassaleta Atienza, 2016).

Se considera como una neoplasia heterogénea debido a que puede ser linfocítica o mielocítica, esto dependerá del estirpe celular afectado es decir la línea linfocítica o mielocítica (Ortega Sánchez et al, 2007). Se habla de leucemias agudas cuando son de rápida progresión mientras que las de tipo crónico pueden considerarse como leucemias de progresión lenta e incluso intermitente, pudiendo además no encontrarse blastos o estar escasos. Se han definido 4 tipos de leucemia clasificadas de acuerdo a su origen y progresión estos son: leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfoblástica crónica (LLC), leucemia mieloblástica aguda (LMA) y leucemia mieloblástica crónica (LMC) (Ortega Sánchez et al, 2007 ; Leukemia & Lymphoma Society, 2017).

2.1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

La LLA es la neoplasia más frecuente en la infancia afectando de manera especial a niños de entre 0-4 años de edad, se caracteriza por la alta producción de células malignas linfocitarias de tipo B y T en la médula ósea, esta sobreproducción linfocitaria suele



generar un desplazamiento o reemplazo de las otras células sanguíneas como eritrocitos, plaquetas o incluso leucocitos maduros y funcionales, por lo que en esta patología es normal encontrarse con cuadros de pancitopenia, lo que explicaría que estos pacientes sean propensos a otras afecciones como anemias, hemorragias o estar más propensos a infecciones (Lassaleta Atienza, 2016).

La LLA podía ser clasificada según su morfología, inmunobiológica, citogenética entre otros; sin embargo actualmente su clasificación ha quedado relegada únicamente a su distinción de acuerdo al grado de madurez de los blastos, atribuible a muchos factores como los posibles causantes de este cáncer; sin embargo, no hay una causa exacta que nos indique el origen de este padecimiento, aunque destacan factores genéticos, infecciosos y ambientales (Atienza, s. f.; Ortega Sánchez et al., 2007).

2.1.2 Epidemiología

La LLA se presenta hasta en un 80% de los casos en el niño oncológico. Según la OMS este tipo de cáncer se distribuye en estirpe de células B en un 80% y de células T en un 20%. Adicionalmente, la OMS ha determinado que en los últimos 10 años los cuadros neoplásicos se ha elevado en un 13% en el paciente pediátrico (OMS, 2018). Esta neoplasia afecta con una mayor incidencia en los varones entre 0-4 años: Por ventaja, la supervivencia a esta patología se ha incrementado hasta en un 85%; aunque esta tasa de se encuentra ligada a algunos factores como la edad, sexo, estado nutricional, tratamiento y a una detección más temprana de la enfermedad entre otros (Larios-Farak et al., 2016; American Society of Clinical Oncology, 2017).

2.1.3 Etiología

La LLA posee una etiología muy variada, se han mencionado desde factores virales y ambientales hasta factores genéticos en donde se ha relacionado con una inestabilidad genómica que contribuye tanto con el desarrollo como con el acentuamiento del proceso tumoral. Al ser la LLA una de las neoplasias más frecuente en población pediátrica, en donde se encuentra aún en auge el desarrollo del sistema inmune, estos pacientes se vuelven propensos a los efectos de agentes infecciosos como: virus con efectos oncogénicos del tipo de Epstein-Barr virus (EBV); sin embargo, no hay pruebas suficientemente contundentes que corroboren la relación de este agente viral con la



aparición de la enfermedad (Ortega Sánchez et al., 2007) factores ambientales como: la radiación ionizante, la exposición a algunos agentes quimioterapéuticos y químicos con efecto leucemógeno, el tabaco y la acumulación de ciertos fármacos como la fenitoína también se mencionan como elementos de riesgo en cuanto a esta patología (Lassaleta Atienza, 2016).

Las células leucocitarias están sometidas a un constante reordenamiento genético lo que puede conllevar a anomalías genéticas de diversos tipos, es por esta razón que tanto la importancia como el enfoque genético ha ido aumentando considerablemente en los últimos años con respecto a la etiología de esta enfermedad; en lo que refiere a la LLA su genética es compleja, es posible encontrar desde aneuploidias, hiper e hipodiploidias, variaciones genéticas hasta translocaciones cromosómicas; estas últimas son las que se presentan con mayor frecuencia y los genes afectados dependerán del linaje celular, es así que para la estirpe de células B se afectan genes como *E2A-PBX1* t(1;19), *TEL-AML* t(12;21), cromosoma Filadelfia o *BCR-ABL* t(9;22), y *MLL-AF4* t(4;11), estos últimos se ha relacionado como marcadores de pobre pronóstico para LLA (Lassaleta Atienza, 2016.; Guerra-Castillo et al., 2017).

La genómica de la LLA resulta compleja y variada, si bien las translocaciones son las alteraciones genéticas más frecuentes, otras alteraciones que son menos notables como la presencia de variantes genéticas también resultan de importancia en el estudio de la etiología de esta enfermedad. La expresión de algunas de estas variantes se ha involucrado como factores de riesgo de padecer la enfermedad, o influenciar en la evolución y gravedad de esta, la respuesta al tratamiento e incluso podrían cumplir un papel en la probabilidad de recaída y supervivencia de la neoplasia.

El análisis de polimorfismos genéticos (SNPs) resulta costoso y requieren de poblaciones muestrales grandes para poder detectar alelos de efecto pequeño, sin embargo se han destacado algunos SNPs como factores de riesgo relacionados a la LLA, entre estos está el SNPs en *ARID5B* (AT Rich Interactive Domain 5b) gen encargado de la codificación de fracciones proteicas de unión al ADN y que cumplen un papel biológico en la adipogénesis, diferenciación celular, de manera especial de los linfocitos B y el desarrollo hepático, se menciona también como SNP asociados a riesgo de esta enfermedad a algunos presentes en



los genes *IK2F1*, *CEBPE*, *CDKN2A*, *PIP4K2A*, *TP53*, *GATA3*, de este último destacan rs3824662 y rs3781093 los cuales se han relacionado como susceptibles a padecer LLA tanto en población pediátrica como adulta, por otra parte genes que participan en procesos metabólicos como el grupo de los citocromos y otros como *XRCCI* y *GSTP1* se han visto involucrados con la progresión de la enfermedad, recidivas, disminución de tasa de supervivencia e incluso efectos toxicológicos durante las quimioterapias (Jiménez-Morales et al., 2017; Vijaykrishnan et al., 2018).

2.2 Leptina

La LEP es una hormona de descubrimiento relativamente “reciente”, cuyo descubrimiento se ha relacionado en el contexto del papel estratégico que esta posee en el control de la ingesta alimentaria y del gasto energético. Al hablar del descubrimiento de la LEP como tal Douglas Coleman menciona la presencia de dos alteraciones de tipo genético presente en una de las colonias de ratas con las que se investigaba dentro de los Laboratorios Jackson, tras varios estudios parabióticos las mutaciones detectadas se asociaron con dos aspectos, por una parte con la obesidad mórbida y por otra parte con el desarrollo de enfermedades crónicas como la Diabetes Mellitus (Coleman, 2010). Las mutaciones encontradas fueron clasificadas como (ob/ob) en el caso de las cepas obesas, y como (db/db) para las cepas diabéticas, tras una serie de arduas observaciones Coleman dedujo finalmente que para ambas cepas existía el déficit de un factor, que en el caso de la cepa (ob/ob) se estableció como deficiente a un factor sanguíneo, mientras que por otro lado, para la cepa (db/db) existe la deficiencia del receptor del factor faltante en (ob/ob) , años más tarde Jeffrey Friedman y sus colaboradores establecieron el gen *LEP* como responsable de la expresión de la LEP, hormona pleiotrópica cuya función principal ya se mencionó anteriormente.

Por otra parte se denominó como gen *LEPR* al responsable del receptor que interactúa con la leptina expresada por *LEP*, además en este último gen se identificó que las alteraciones genéticas en la cepa (db/db) se encontraban en este gen (Coleman, 2010; J. C. Sánchez, 2005).

La LEP inicialmente fue reconocida como una hormona antiobesidad, hoy en día se la ha denominado más bien como un factor de saciedad circulante debido al papel fisiológico que esta tiene sobre el apetito mediante la regulación de la magnitud de depósitos de grasa en el



cuerpo y el balance energético; es decir, los niveles séricos de la leptina son directamente proporcionales al contenido de energía almacenada en el tejido adiposo; por lo que a mayor cantidad de leptina, el consumo de alimentos disminuiría, no obstante en la obesidad se menciona una posible hiperproducción de esta hormona y fallas en el receptor de está provocando un desequilibrio concluyéndose en un acrecentamiento de contenido de masa grasa corporal a causa de una resistencia a la hormona (Pisabarro et al., 1999; Konopleva et al., 1999; Paz-Filho et al., 2012).

Esta hormona actúa como un regulador neuroendócrino y sus funciones van más allá de regular el estado nutricional, puesto a que se la ha vinculado con otras funciones a nivel inmunológico, la inflamación, hematopoyesis, reproducción, crecimiento, tono vascular es por esto que el déficit o las alteraciones en la producción de este factor circulante se ve asociado con enfermedades cardiometabólicas e incluso interviene en la calidad y tiempo de vida de las personas al relacionarse también como un posible procarcinógeno (Konopleva et al., 1999; Paz-Filho et al., 2012).

2.2.1 Descripción molecular de la leptina

La fracción proteica está conformada por 1466 aminoácidos que se generan a partir de un precursor de 167 aminoácidos en la que los primeros 21 son los responsables del péptido señal, su papel biológico depende principalmente del puente disulfuro presente entre los residuos Cys 96 y Cys 146 de su secuencia de aminoácidos, el gen obeso o *LEP* se localiza a nivel del cromosoma 7q31-3 (**Figura 1**). En humanos este gen posee 650 kilobases, 3 exones y 2 intrones en la que los exones 2 y 3 son los encargados de la codificación proteica. Esta hormona es similar a las citocinas (proteínas que intervienen en la señalización celular) en lo que a estructura refiere consta de un haz de cuatro hélices alfa (A, B, C, D) los cuales se unen mediante bucles(**Figura1**); sin embargo, la estructura cristalina de la leptina posee características que la hacen única como su hélice B, la cual da alrededor de dos vueltas y es más corta que las hélices B característico de las citocina (Botella Carretero et al, 2001; J. C. Sánchez, 2005).

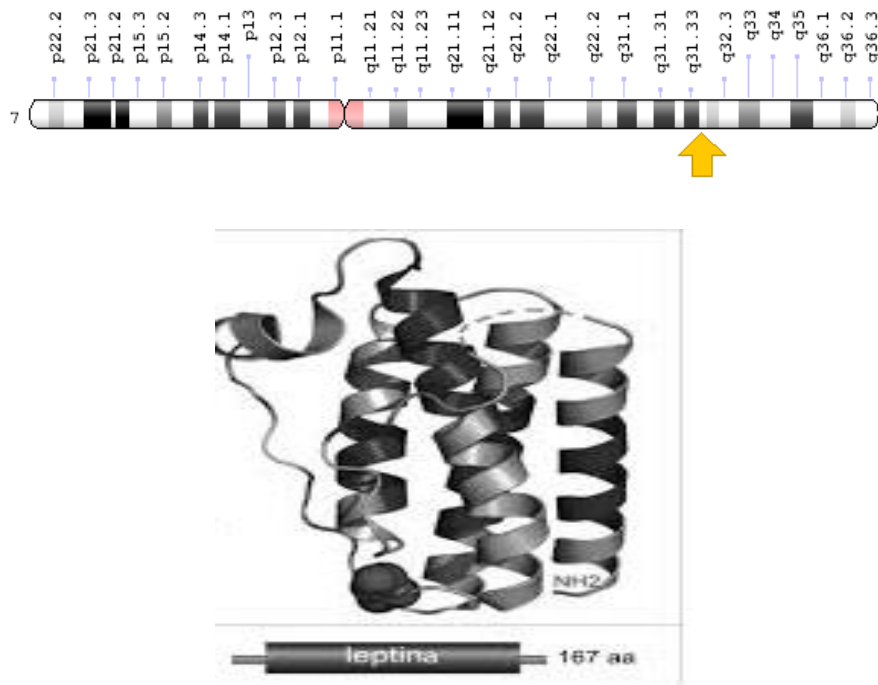


Figura 4: Localización del gen *LEP* y estructura helicoidal de la leptina localización del gen *LEP* y estructura helicoidal de la leptina similar a las citocinas por la presencia de 4 helices (Londoño-Lemos, 2017).

2.2.2 Mecanismo de acción

La acción de la leptina en el cuerpo humano se ejerce en el sistema nervioso central (SNC), esta media su acción en la despolarización e hiperpolarización en poblaciones neuronales del núcleo arcuato (ARC) las cuales poseen receptores de la leptina (LEPR), se dice que esta hormona ejerce entonces su acción desde dos modos operandi, así pues para generar una supresión de la ingesta de alimentos, está activa neuronas anorexígenas aumentando la expresión de pro-opiomelancortina (POMC), cocaína y anfetamina (CART) reduciendo el apetito y elevando el gasto energético (**Figura2**) también para que se logre una supresión en la ingesta, la leptina produce una reducción en orexinas y hormona concentradora de melanina (MCH) (Park & Ahima, 2015).

Por otra parte, para que se promueva el consumo de alimentos se activan neuronas de tipo orexígenas, lo que conlleva a un aumento de la expresión de Péptido Agouti-relacionado (AgRP) y neuropéptido Y (NPY), aumentando así el apetito y se reduce el gasto energético

(Figura2). LEPR puede producir también un aumento del apetito modulando otros sistemas como el dopamina-mesolímbico y neuronas presentes en el núcleo del tracto solitario (NTS) (Garfield & Heisler, 2009; Park & Ahima, 2015).

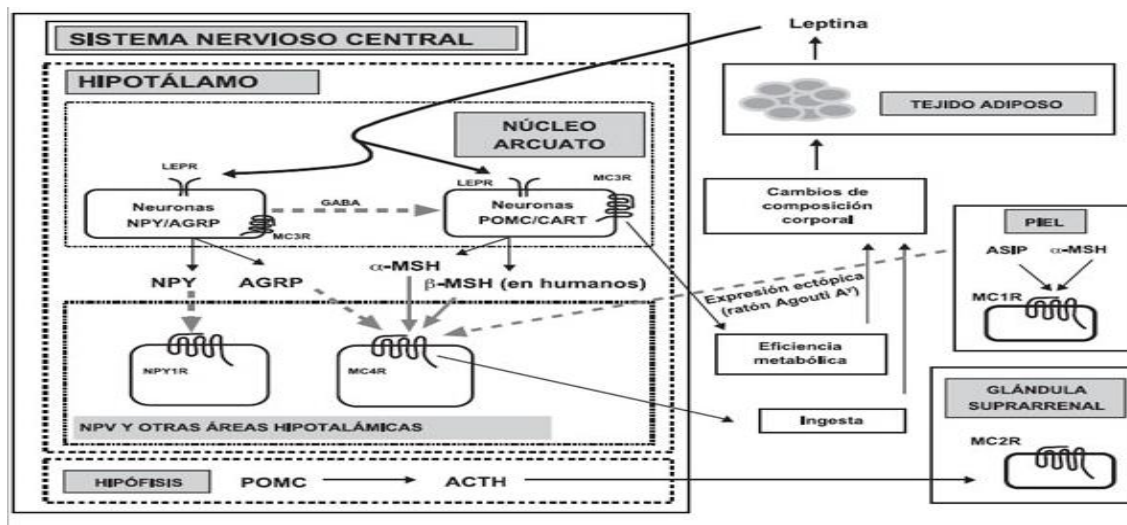


Figura 5: La leptina actúa principalmente nivel del sistema nervioso para controlar la ingesta de alimentos y el gasto calórico (Santos M., 2009).

2.2.3 Señalización intracelular

El LEPR posee una variedad de isoformas, de estas destaca la isoforma larga (LEPRb) que es la forma del receptor que permite a la interacción con la leptina y con esto se consiga cumplir sus funciones mediante la activación de diversas vías de señalización, una de estas es la vía JAK/STAT, en la cual se inicia con una serie de fosforilaciones en los residuos de tirosina de LEPR y demás proteínas asociadas, cuyo objetivo es el reclutamiento de algunas moléculas de señalización como la Tirosina fosfatasa (PTPN11) asociada a la vía de señalización ERK (Extracellular signal-regulated kinases) vía fundamental en la proliferación y división celular mediante ERK/MAPK, transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT), de manera especial de STAT3 ya que de esta depende su transporte y translocación al núcleo desde donde puede mediar la transcripción del gen *LEP* responsable de la expresión de la leptina (Figura 3) (AL-Jumaily & Zgaer, 2014; Flak & Myers, 2016). Por otra parte LEPR controla también la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K), en donde la fosforilación del sustrato receptor de la insulina (IRS) genera una cascada de fosforilaciones y activaciones en 3-fosfoinosítido proteína quinasa dependiente 1 (PDK1) y AKt factores que inhiben la caja de Forkhead O1 (FoxO1) y que junto a la vía

PI3K intervienen como factores de la inflamación, además su acción sobre Rho quinasa-1, parece ejercer un efecto regulador en la apoptosis (Paz-Filho et al., 2012; Wauman & Tavernier, 2011).

En sí, son múltiples las vías de señalización y no están del todo claras, sin embargo su objetivo principal es conseguir una acción anorexígena a nivel hipotalámico equilibrando péptidos orexigénicos y anorexigénicos regulando de manera adecuada el consumo de energía y alimentos, además su acción se implica con otros procesos como la inflamación, apoptosis y proliferación celular, los cuales pueden tener influencia en procesos tumorales, debido a alteraciones en la vía JAK2/STAT3 y una sobreexpresión de FoxO (AL-Jumaily & Zgaer, 2014; Flak & Myers, 2016; Wauman & Tavernier, 2011)

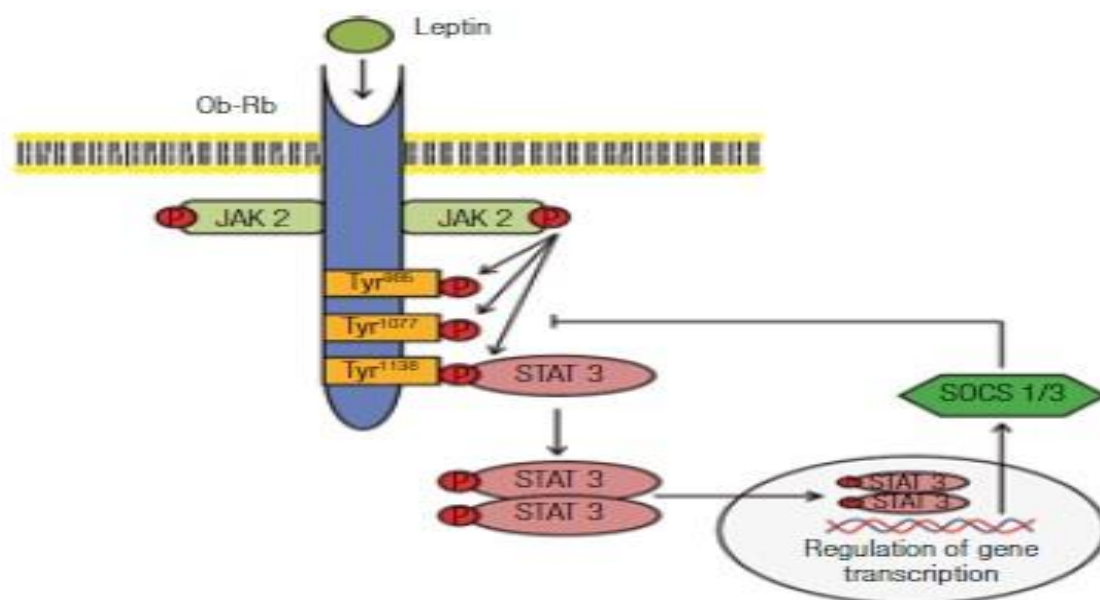


Figura 6: Activación de la vía JAK/STAT al unirse LEP a LEPRb, en esta vía de señalización se genera una serie de fosforilaciones a nivel de los residuos Tyr de LEPRb permitiendo la activación y reclutamiento de STAT 3 esencial para la dimerización y translocación en el interior del núcleo, permitiendo la transcripción del gen LEP (Paz-Filho, y otros, 2012).

2.2.4 Resistencia a la leptina

La LEP está relacionada directamente con regulación del metabolismo energético y la composición corporal, así como con la grasa corporal total (GCT) previendo informaciones



al SNC sobre la cantidad de energía almacenada en el tejido adiposo. La resistencia de esta hormona a su acción en el SNC puede resultar en un aumento de peso u obesidad, a pesar de encontrarse en estos individuos exceso de LEP circulante, es decir esta hormona manda una información que no es registrada por el cerebro produciendo una disminución en la respuesta (Morales Clavijo & Carvajal Garcés, 2010). Su secreción obedece a un ritmo circadiano con pulsos cada 45 minutos; su concentración aumenta durante el día y alcanza un pico alrededor de la medianoche, para descender hasta el inicio de un nuevo ciclo.

Entre las teorías propuestas de resistencia a la leptina tenemos:

- Deficiencia congénita de leptina debido a una mutación en el gen que la produce, o mutación en el receptor de leptina dando como resultado una inhibición en su interacción, produciendo hiperfagia y obesidad.
- Insensibilidad en los receptores hipotalámicos, o defecto en el sistema de transporte hacia el sistema nervioso central.
- Defecto en el transporte de leptina: después de ciertas concentraciones su sistema de transporte hematoencefálico se satura o porque se desarrolla una alteración en sus receptores en el plexo coroideo.
- Reducción en la traducción de la señal por la leptina o del defecto en una serie de respuestas neuronales integradas subsecuentes a la activación del receptor de LEP.

2.2.5 Leptina e inmunidad

La LEP entre sus funciones incluye efectos en la inmunidad adaptativa e innata (**Figura 4**), debido a que el tejido adiposo produce una variedad de factores anti-inflamatorios y pro-inflamatorios como las adiponectinas, resistina, quimiocinas y citocinas como TNF- α e IL6.

La capacidad reguladora de la leptina en la fagocitosis se ha relacionado con la producción de óxido nítrico y de citocinas pro-inflamatorias en macrófagos y monocitos, así mismo la LEP resulta importante en la homeostasis del timo y la maduración del mismo y se ha demostrado que un tratamiento con LEP se genera disminución en la apoptosis de linfocitos B por un efecto protector de la leptina, sugiriendo que la LEP es capaz de prolongar la supervivencia de las células B después de ser activadas. Así mismo en humanos y roedores según estudios que no poseen una producción adecuada de LEP, o expresan LEPR

defectuoso, presentan cierto grado de inmunodeficiencia debido a la reducción de la proliferación de células T in vitro, como respuesta a varios mitógenos, producción inapropiada de IL-4 y una producción inapropiada de anticuerpos después de una inmunización (Falcón Gerónimo et al., 2012).

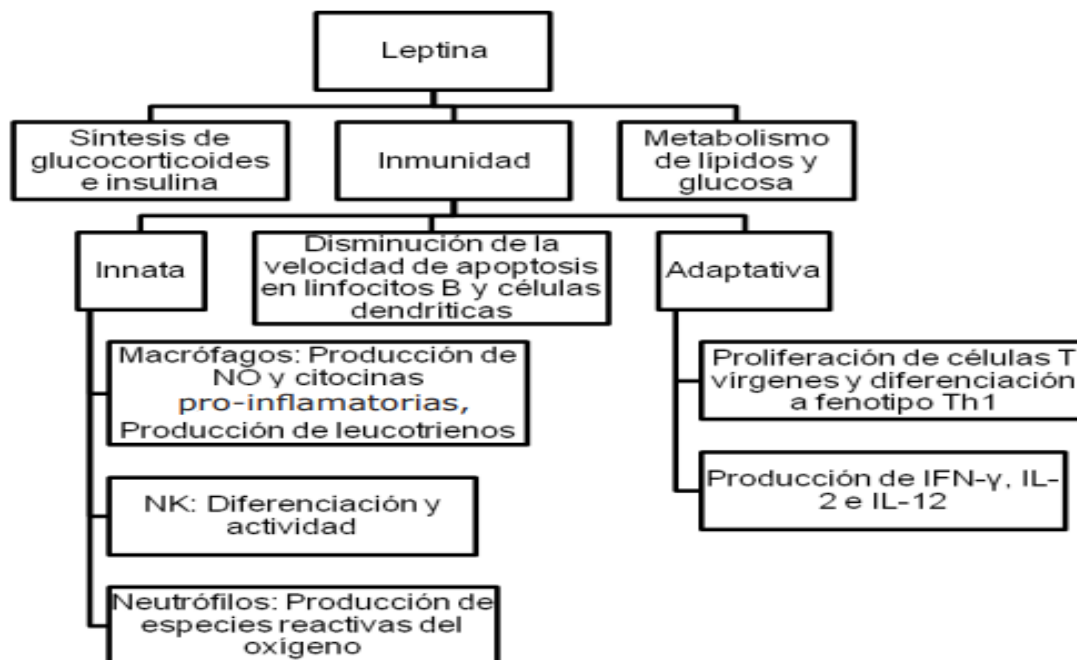


Figura 7: Esquemización de la participación de la Leptina a nivel de la Inmunidad en el organismo (Falcón Gerónimo, Gazga Urioste, González Torres, & Nájera Medina, 2012).

2.2.6 Participación de la leptina en la LLA

La LEP es una fracción proteica cuyas funciones se centran en la regulación del peso corporal mediante el control de la ingesta de alimentos y la regulación del gasto energético, por esta razón se lo relaciona también con acciones sobre el estado nutricional de las personas, esto mediante la activación de vías de señalización de manera especial la vía JAK2/STAT3 principal responsable de la expresión de péptidos orexigénicos como NPY y AgRP, y anorexigénicos como POMC fundamentales en la regulación del consumo energético, es bien conocido que las oncopatologías suelen cursar con alteraciones en el estado nutricional de quienes afecta, la desnutrición resulta un cuadro bastante común en pacientes oncopediátricos, que si bien, las causas que se mencionan asociadas a esta



condición son varias, destaca y es de nuestro interés una elevación en el requerimiento y del gasto energético, donde se vería implicada la actividad de la leptina, no obstante, también se ha evidenciado cuadros de sobrepeso y obesidad de manera especial en los pacientes que se encuentran en remisión de LLA, en ambos casos se ha llegado a considerar una disminución considerable de la supervivencia de los mismos, *Ethier et al*, mencionan en su estudios realizados en el Hospital Pediátrico de Toronto-Canadá, en el cual se expone que los niños con LLA de entre 2-18 años, que a su vez han experimentado cambios en su estado nutricional durante o después del tratamiento, tienen una probabilidad inferior de supervivencia y por ende un aumento en la probabilidad de recaída en la enfermedad (Ethier et al., 2012).

Se menciona a la LEP como una hormona con un papel potencial dentro de diversos tipos de cáncer, cuyo efecto procarcinogénico lo adquiere al ser la responsable de la activación de vías de señalización como STAT3, la cual tras su dimerización y tráfico al núcleo tiene la capacidad de iniciar la transcripción de precursosores genéticos, entre estos aquellos que están implicados en procesos de proliferación celular y el desarrollo tumoral, es por esto se le atribuye a esta hormona influencia sobre la biología tumoral, además de poseer efectos proliferativos, antiapoptóticos y diferenciadores sobre las células neoplásicas hematopoyéticas (Aref, et al., 2013; Mociño-Rodríguez et al., 2017)

2.2.7 Polimorfismo *LEP* 2548 G>A.

Entre los genes asociados con fenotipos caracterizados por el sobrepeso y la obesidad, se encuentran el gen de la proteína leptina (*LEP*), la cual actúa como señal de circulación que reduce la ingestión de alimentos e incrementa el gasto de energía mediante la unión a su receptor, lo que activa la vía de la melanocortina hipotalámica y controla los depósitos de grasa corporal, y cuyo polimorfismo originaría déficit en funciones específicas (Garcés et al., 2016).

El polimorfismo *LEP* 2548G>A representa la presencia del alelo A (raro) en lugar del alelo G (normal), en la secuencia 2548--5'-CGACAGGGTTGC(G/A)CTGATCCT- 3'--2540. Este SNP, localizado en la región promotora del gen *LEP* ubicado en el cromosoma 7q-31,3, influye en la expresión de leptina y por lo tanto, en los niveles de secreción de la hormona en tejido adiposo (Garcés, Gomes, Stekman, & López, 2016).



En un primer estudio *Mammès et al.*, concluyeron que la frecuencia del alelo G, fue significativamente mayor en sujetos con sobrepeso y niveles bajos de leptina, en el año 2000, correlacionaron este polimorfismo con la obesidad (Mammès et al., 2000).

Posteriores estudios sobre el polimorfismos, relacionaron el alelo G con un mayor índice de masa corporal. En el 2008 *Hinuy et al.*, investigaron el incremento de IMC en mujeres, mientras que otros estudios asociaron el alelo G y el IMC en hombres (Hinuy et al., 2008).

Se observó, en mujeres brasileñas, que el polimorfismo 2548G>A es un importante predictor del incremento de leptina en plasma, así también en el aumento del índice de masa corporal, y un riesgo elevado para el desarrollo de obesidad (Sida Medina, 2010).

2.2 Receptor de Leptina

Fue descrita por primera vez en 1995 por *Tartaglia et al.*, quienes emplearon leptina marcada e identificaron la existencia del receptor en plexos coroides del ratón, y además observaron que una mutación en el receptor causa la aparición precoz de la obesidad. Es una proteína de un solo dominio transmembranal, con una estructura similar al tipo receptores de citoquina I, presenta dominios extracelulares, constituido por repeticiones de cuatro residuos de cisteína y cuatro arreglos estables de estructura secundaria tipo fibronectina III (Tartaglia, 1997) se expresa ampliamente en el hipotálamo, pulmón, hígado, riñón, tejido adiposo, músculo esquelético y células hematopoyéticas. Se identificaron 6 isoformas del receptor: la forma larga (OB1 o LEPRb), cuatro formas cortas (LEPRa; LEPRc; LEPRd; LEPRf), y la forma soluble (**Figura 5**).

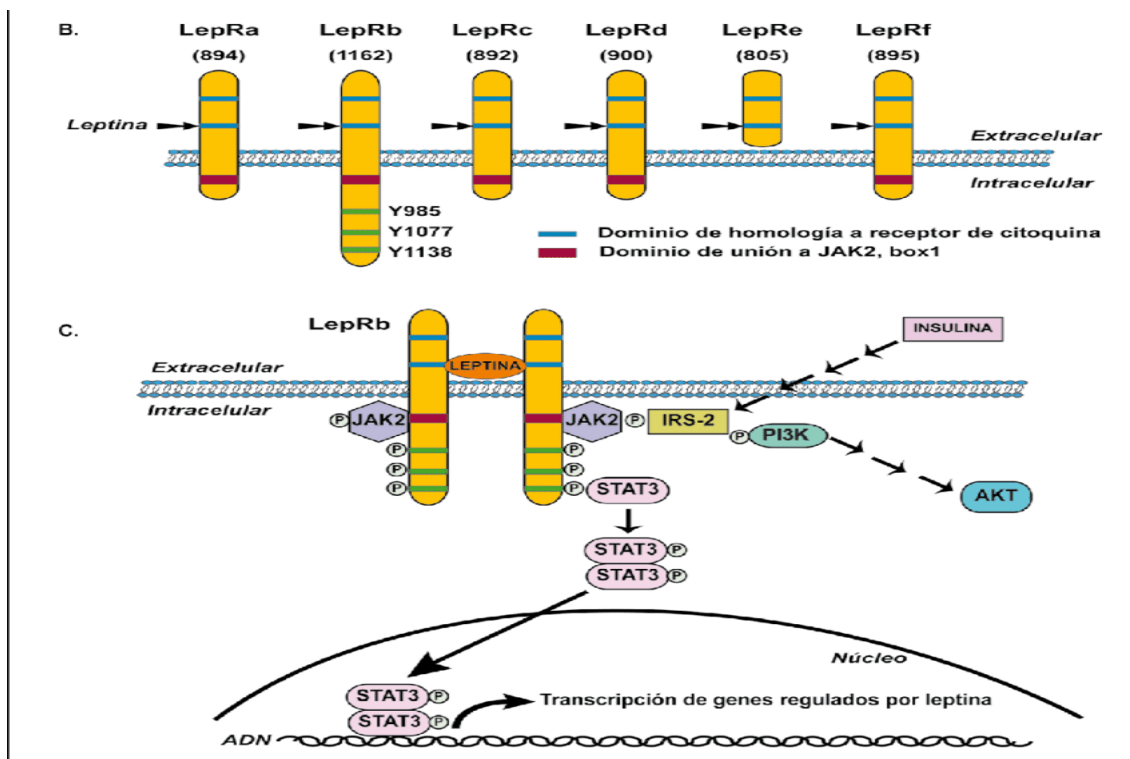


Figura 8: Representación esquemática de la estructura general de las diferentes isoformas del receptor de leptina (Goldenberg, Santos, Hodgson, & Cortés, 2014).

Los receptores se componen de una región externa o receptora compuesta por 816 aminoácidos. La forma larga, con capacidad de transducir señales, se expresa casi exclusivamente en el hipotálamo, en donde se había pensado que tenía su acción como inductor de saciedad. El receptor corto tiene como función primordial es la internalización y degradación de la leptina y la forma soluble del receptor tiene una gran afinidad por la leptina y se piensa que regula las concentraciones plasmáticas de la misma. La leptina se ha visto involucrada en el control del ritmo circadiano (ciclo de aproximadamente 24 horas que regula el proceso del hambre y del sueño), maduración sexual, función renal y cardiovascular, formación de hueso, regulación del sistema inmune, estimulación hematopoyética y actividad fagocítica de macrófagos (Garcés et al., 2016).

2.3.1 Polimorfismo *LEPR* Gln223Arg

LEPR Gln223Arg (rs1137101) se constituye como un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) correspondiente al gen *LEPR*, dicho polimorfismo se da como consecuencia del cambio de una base Adenina por una de Guanina esta variación tiene lugar en el codón de



inicio, en el exón 6 en el nucleótido 668 en el gen *LEPR* a causa de este cambio en la secuencia se genera por ende el remplazo de un aa Glutamina por una Arginina ATCACATCTGGTGGAGTAATTTTCC[A/G]GTCACCTCTAATGTCAGTTCAGCC, en el locus 1p31.3 (GeneCards Suite, 2018). Producto de la transición A/G se obtiene entonces el intercambio de un aminoácido neutro por uno con carga positiva, esto provoca alteraciones de tipo estructural en el receptor afectando notablemente su función y la capacidad de señalización, este SNP puede ser considerado como un posible marcador de desarrollo y pronóstico de algunos cuadros neoplásicos de tipo sólido; en caso de neoplasias hematológicas como la LLA, este SNP como marcador aún no está del todo informado, también en cuanto a relación con el cáncer, se ha mencionado que SNP en este gen estarían relacionados con el favorecimiento de la angiogénesis y desarrollo tumoral debido a fallas en las señalización intracelular en las que interviene este receptor y su hormona (Wasik et al., 2006 ; Diez Ibarbia, 2011).

Como se mencionó anteriormente los estudios en neoplasias hematológicas son escasos y un poco controversiales ya que al parecer no avalan lo mencionado para la LEP en oncopatologías sólidas, esto puede deberse a la diferencia de origen de la neoplasia, sin embargo de entre los pocos estudios que se posee esta por ejemplo *Wasik et al*, evaluaron pacientes pediátricos con LLA en Polonia, de esto se menciona que los niveles séricos y medulares de LEP eran menores en los niños con LLA frente a los niveles de niños sanos, y en cuanto a la frecuencia del SNP Gln223Arg, no se presentó diferencias significativas entre los grupos de casos y controles, por lo que este grupo de investigación dedujo que puede existir una posible relación entre el nivel de LEP y el desarrollo de leucemia en niños, sin embargo el efecto efector de la hormona parece no estar relacionado con el SNP Gln223Arg de su receptor (Wasik et al., 2006).

Por otro lado estudios realizados para este SNP como marcador pronóstico de cáncer oral y orofaríngeo menciona que el genotipo homocigoto Arg223 se asoció con un riesgo 2,5 veces menor de desarrollar cáncer que el homocigoto Gln223 variante, resultados similares se han expresado en otros tipos de cáncer como en el próstata y mama lo que lleva a inferir en que la presencia de este polimorfismo y niveles elevados de leptina si pueden tener un papel comprometedor en lo que a la disminución de la probabilidad de vida y recaída en los



cuadros neoplásicos refiere, esto principalmente relacionado con la actividad procancerígena y antiapoptótica que ha esta hormona se le otorga mediante la activación de diferentes vías de señalización producto de la interacción con su receptor (J. C. Sánchez, 2005; Wasik et al., 2006).



CAPÍTULO 2

3. Materiales y métodos

3.1.1 Tipo de estudio

El desarrollo de este estudio se es de tipo descriptivo.

3.1.2 Universo de estudio

Se constituye como universo de estudio a pacientes pediátricos menores de 18 años, de sexo indistinto que se encuentran en período de tratamiento o remisión de LLA y que fueron atendidos en SOLCA Loja y SOLCA Cuenca durante el lapso Enero-Septiembre del 2018, que tras haber cumplido los criterios de inclusión establecidos inicialmente en el estudio especificados en la **Tabla 1** y que luego de la socialización del mismo con ellos y sus padres y/o representantes legales (tutores) aceptaron formar parte de la investigación mediante la firma del consentimiento informado (**Anexo 1**). El protocolo utilizado estuvo enmarcado bajo los lineamientos bioéticos contemplados en la declaración de Helsinki; y cabe recalcar que este estudio cuenta con el AVAL del Comité de Ética e Investigación en Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito, ya que forma parte del proyecto DIUC ganador de la XV convocatoria con el título “*Translocaciones cromosómicas y polimorfismos genéticos de enzimas de la vía del folato y de transportadores de metotrexato como posibles marcadores predictores de la toxicidad en niños con leucemia linfoblástica aguda.*” (**Anexo 2**). Cuenta también con la aprobación por parte del Instituto del Cáncer SOLCA núcleos Cuenca y Loja, para la colaboración con los participantes (**Anexo 3**).

3.1.3 Área de estudio

El estudio analítico fue desarrollado en la ciudad de Cuenca en la provincia del Azuay. Los participantes del estudio fueron pacientes provenientes de diferentes regiones del país atendidos en el Instituto del Cáncer SOLCA, núcleos Loja y Cuenca. Los procedimientos realizados en la investigación como el mantenimiento de muestras, extracción del ADN y amplificación del mismo se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay.



3.2 Muestreo

Del universo de estudio se desarrolló un muestreo de tipo no probabilístico considerando la frecuencia alélica del SNP menos frecuente tomando como referencia poblaciones semejantes a las de nuestra intervención; con un nivel de significancia de 5% y un poder de 20%. Así por ejemplo la frecuencia del alelo menos común para el MAF (rs7799039) es de 0,4016, lo que resulta un número de 145.8 pacientes, esto puede evidenciarse en la ecuación 1 a continuación:

Ecuación 1. Cálculo de muestra (n)

$$n = \frac{N \times Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2(N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$
$$n = \frac{750.8 \times 1.96_{\alpha}^2 * 0.40 * 0.60}{0.10(750.8 - 1) + 1.96_{\alpha}^2 * 0.40 * 0.60}$$
$$n = 145.8$$

Muestra ajustada a pérdidas, por estar sujetos a la falta de compromiso de los pacientes, pérdida de información, rechazo de muestras o incluso el abandono o cambio de núcleo de SOLCA fuera de Cuenca o Loja por parte de los pacientes se realiza este ajuste donde $n =$ al número de muestra establecida inicialmente y $R =$ proporción esperada de pérdidas, así pues entonces para nuestro estudio la población muestral se ajustó a $n = 162$ pacientes como se puede ver en la ecuación 2.

Ecuación 2. Calculo de la muestra ajustada a pérdidas.

$$MAP = n \frac{1}{1 - R}$$
$$MAP = 145.8 \frac{1}{1 - 0.10}$$
$$MAP = 162$$

3.2.2 Criterios de pariamiento



- Edad
- Sexo
- IMC
- LLA

3.2.3 Criterios de selección

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

Criterio de Inclusión	Criterios de exclusión
Pacientes con LLA atendidos en el Instituto del Cáncer SOLCA y núcleos Cuenca y Loja.	Pacientes trasladados a otra unidad médica o núcleo de SOLCA diferente a núcleos Cuenca y Loja.
Pacientes en edad pediátrica, menores de 18 años.	Pacientes que por criterios clínicos de riesgo no sean autorizados por el médico tratante.
Aceptación y firma del consentimiento y asentimiento informado.	Pacientes con evidencia de inmunodeficiencia primaria o secundaria
	Pacientes que retiren el consentimiento informado o ya no deseen formar parte del estudio.

3.2.4 Variables

Variables independientes

- Polimorfismo 2548G>A del gen *LEP*. Variable cualitativa dicotómica (presencia/ausencia)
- Polimorfismo Gln223Arg del gen *LEPR*. Variable cualitativa dicotómica (presencia/ausencia)

3.3 Procedimientos

3.3.1 Revisión de historias clínicas (HC)

Se requirió realizar una revisión de las HC de los participantes en el estudio, con la finalidad de obtener datos tales como el sexo, edad, peso, etnia, talla, además de los datos



hematológicos y bioquímicos para lo cual se coordinó con el personal médico de SOLCA tanto núcleo Cuenca como Loja, para que se nos permita el acceso a estos documentos, para la determinación del IMC, se lo realizó mediante la aplicación de curvas establecidas por la OMS para la determinación del IMC en percentiles, por tratarse de población pediátrica (OMS, 2018).

3.3.2 Flebotomía

Se extrajo de cada participante de 2-5ml de sangre total, mediante venopunción en el área antecubital del brazo o en el caso de algunos pacientes directamente mediante el catéter venoso central; para esto se cumplió con las normas de asepsia, antisepsia y bioseguridad. La sangre se recolectó en tubos Vacutainer con EDTA como anticoagulante, la cual fue realizada por el personal calificado de SOLCA, debido a que al tratarse de niños que están bajo un estado patológico delicado y por su condición requieren estar internados por largos lapsos de tiempo lo que los lleva a establecer vínculos afectivos y confianza en quienes los atienden diariamente como es el caso de las enfermeras de cabecera. Las muestras fueron transportadas hacia el laboratorio de Atención al Público de la Facultad de Ciencias Químicas en el Campus Central de la Universidad de Cuenca, bajo cadena de frío a una temperatura de entre -20°C y posteriormente al laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la UDA donde se llevó a cabo su procesamiento.

3.3.3 Extracción de ADN

Para la extracción del material genético de las muestras se empleó PureLink® Genomic DNA mini Kit de INVITROGEN para 250 extracciones con número de catálogo K1820-02, este kit permite realizar la extracción de ADN de alto rendimiento y pureza a partir de muestras de sangre total recogidas en tubos lila con anticoagulante EDTA, la tecnología de aislamiento se basa en columnas de giro las que tienen como objetivo reducir al máximo la contaminación. Los componentes incluidos en el mini Kit de ADN genómico PureLink® se detallan en la **Tabla 2**.

Tabla 2: *Componentes mini Kit de ADN genómico PureLink® de INVITROGEN para 250 extracciones.*



Componente	Cantidad
Buffer de Lisis genómica PureLink®	50ml
Buffer de Digestión genómica PureLink®	45ml
Buffer 1 de lavado PureLink®	50ml
Buffer 2 de lavado (10mM Tris HCl, pH 9.0 + 0,1mM EDTA) PureLink®	37.5ml
Buffer de Elución Genómica PureLink®	50ml
ARNasa (20mg/ml) en 50mM Tris HCl, pH 8.0 + 10mM EDTA	5ml
Proteinasa K (20mg/ml)	5ml
Columnas de Giro con tubos de recolección PureLink®	250 unidades
Tubos de recolección (2,0ml) PureLink®	500 unidades

Para la extracción del material genético se requiere además de etanol absoluto, el cual no se incluye en el kit. Finalmente, para el proceso de extracción se siguieron las especificaciones del proveedor (ThermoFisher , 2016).

Fundamento y procedimiento

Para extraer el ADN de las muestras se deben ejecutar tres etapas: Lisis celular, purificación, elución (**Ver figuras 6, 7 y 8**).

La digestión de las células se consigue sometiendo a la acción de la proteinasa-K a 55⁰C, usando una formulación de tampón de digestión la cual favorece la desnaturalización de proteínas y que además incrementa la actividad de la enzima. Por otro lado, la adición de ARNasa permite eliminar el ARN residual de la muestra (esto tiene como objetivo el minimizar el riesgo de contaminación, una vez obtenida el lisado). Luego este se mezcla con etanol absoluto (96⁰) y el reactivo de lisis genómica PureLink® que permite una alta unión del ADN a la columna giratoria de PureLink®. (**Figura 6**)

Una vez extraído el ADN, este une a la membrana a base de sílice de la columna y las impurezas se eliminan mediante la purificación con los buffers de lavado (**Figura 7**)

Finalmente, el ADN resultante se eluye en la solución tampón de elución con bajo contenido de sal (**Figura 8**)(ThermoFisher , 2016). Los materiales y equipamientos necesarios se muestran en la **Tabla 3**.

Todo el proceso de extracción se realizó en el interior de la cabina de flujo laminar horizontal CSB-120 y se trabajó con material esterilizado en la autoclave Tuttnauer 2540.

a. Lisis







-  1. A partir de ST y bajo cámara de flujo laminar
-  2. Tomar 200uL de ST y colocar en un eppendor estéril (T1)
-  3. Colocar en T1 20uL de Proteínasa K + 20 uL de ARNasa.
-  4. Mezclar T1 en vórtex Genie 2(modelo G-560) e incubar a T° ambiente 2 minutos.
-  5. Colocar sobre T1 200uL de reactivo de lisis y mezclar en vórtex.
-  6. Incubar T1 en baño maría a 55°C por 10 minutos.

Figura 9: Procedimiento de lisis celular para la obtención de ADN genómico.

Leyenda: ST=Sangre total; T1= Tubo 1.

b. Lavado/Purificación.








-  7. Añadir a T1 200uL de Etanol absoluto y mezclar en vórtex 5 segundos.
-  8. Trasvasar el contenido de T1 a una columna rotatoria(CR) provista de tubo recolector (TR)
-  9. Centrifugar la CR con TR a 10000rpm por 1 minuto.
-  10. Pasar la CR a un nuevo TR y añadir 500uL de buffer de lavado 1
-  11. Centrifugar a 10000rpm por 1 minuto.
-  12. Desechar el TR y pasar la CR a un nuevo TR añadir 500uL de Buffer de lavado 2
-  13. Centrifugar a 13000rpm por 3 minutos

Figura 10: Procedimiento de lavado/purificación para la obtención de ADN genómico **Leyenda:** CR= Columna rotatoria; TR= Tubo recolector.

c. Elución






-  14. Descartar el TR y colocar la CR en un tubo eppendorf estéril.
-  15. Añadir 75uL de reactivo de Elución e incubar por 2 minutos.
-  16. Centrifugar a 10000rpm por 2 minutos.
-  17. Recoger el ADN genómico purificado.
-  18. Almacenar a -20°C hasta su procesamiento en refrigerador vertical True T-23

Figura 11: Procedimiento de elución para la obtención de ADN genómico.

Leyenda: CR= Columna rotatoria; TR= Tubo recolector.

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

Materiales	Equipos
Pipeta automática 10-100ul Thermo Scientific (FINNPIPETTE® F2)	Cabina de flujo laminar horizontal CSB-120
Pipeta automática 100-1000ul Thermo Scientific (FINNPIPETTE® F2)	Vortex Genie 2 (G-560)
Pipeta automática 100-100ul LABMATE Soft	Centrifuga Eppendorf 5804
Tubos eppendorf de 1.5ml libres de DNasa (AXYGEN™)	Refrigerador Kelvinator KRO-1700DF
Gradillas plásticas Pop-Up™	Refrigerador vertical True T-23
Gradillas plásticas para microtubos	Autoclave Tuttnauer 2540

Fuente: (Autoras, 2019)

3.3.4 Electroforesis de muestras de ADN

El principio de la electroforesis consiste en la migración de las moléculas a través de un gel o una matriz porosa, según su peso molecular o tamaño; todo esto a partir de un campo eléctrico. La electroforesis en gel de agarosa es la forma más efectiva de separar fragmentos de ADN de diferentes tamaños (100 pb hasta 25 kb) y carga. Para separar el ADN mediante electroforesis en gel de agarosa, el ADN se carga en los pocillos prefabricados en el gel y se aplica una corriente eléctrica para estimular la migración. El esqueleto de fosfato de la molécula de ADN (y ARN) está cargado negativamente, por lo tanto, cuando se coloca en un campo eléctrico, los fragmentos de ADN migrarán al ánodo cargado positivamente. La velocidad de migración de una molécula de ADN a través de un gel está determinada por lo siguiente: 1) tamaño de la molécula de ADN; 2) concentración de agarosa; 3) conformación de ADN; 4) voltaje aplicado, 5) presencia de bromuro de etidio, 6) tipo de agarosa y 7) tampón de electroforesis. Después de la separación, las moléculas de ADN se pueden visualizar bajo luz ultravioleta después de teñirlas con un tinte apropiado (EDVOTEK®, 2019).



Procedimiento

Preparación de gel de agarosa:

- Se vierten en un matraz 80 ml del tampón de electroforesis TAE (Tris, acetato y EDTA) y 0,8 g de agarosa.
- Se funde la solución de agarosa en un microondas o placa calefactora.
- Se deja enfriar la suspensión hasta que alcance unos 50°C aproximadamente.
- Se sella con cinta adhesiva el soporte o molde donde se va a verter el gel de agarosa y se coloca el peine que servirá para formar los pocillos del gel.
- Una vez que la solución de agarosa ha alcanzado los 50°C, se le añaden 8 µL de SYBR Safe DNA gel stain (10,000 X) y se mezcla bien.
- Se vierte la solución de agarosa con SYBR Safe en el soporte, previamente sellado. Se deja polimerizar durante unos 30 minutos.

Preparación de las muestras

- Se toman 8 µl del DNA aislado y se le añaden 2 µl de tampón de carga (DNA Gel Loading Dye), se mezcla correctamente para proceder a colocar en cada pocillo del gel.

Electroforesis

- Se quita la cinta adhesiva con la que se ha sellado el soporte del gel y se coloca en la cubeta de electroforesis. Los pocillos deben de estar cerca del cátodo (polo negativo, color negro).
- Se añade tampón de electroforesis TAE, de forma que cubra bien el gel de agarosa.
- Se aplican 10 µl de cada muestra preparada, en cada uno de los pocillos.
- Se aplican 10 µl de marcadores de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder en dos de los pocillos (primero y último pocillo).
- Se tapa la cubeta de electroforesis y se conectan los electrodos a la fuente de alimentación. Se comprueba que esté bien conectada.



- Se programa la fuente a unos 75 voltios y se ejecuta la electroforesis por un periodo de 30-45 minutos.
- Finalmente se visualizan los fragmentos de DNA mediante luz UV con la ayuda de un transluminador y se realiza una fotografía de la imagen en el fotodocumentador (**Anexo 4**). Los materiales y equipos con sus características constan en la Tabla 4.

Tabla 4: *Materiales y Equipos empleados en la electroforesis de muestras de ADN.*

Materiales	Equipos
Pipeta de 1-10ul Thermo Scientific (FINNPIPETTE® F2)	Horno Microondas Panasonic nn-g55
Matraz 150ml	Transluminador EPI/Blue/UV y Fotodocumentador (ENDURO™ GDS TOUCH)
Vaso de precipitación	Fuente de poder BIO-RAD 200
Matraz de 1000ml	Cámara de electroforesis horizontal BIO-RAD (Mini-Sub®)
Probeta de 100ml	Balanza analítica OHAUS (Adventurer® Pro)

Fuente: (Autoras, 2019)

3.3.5 Cuantificación del ADN

Para poder efectuar los ensayos de PCR y análisis de identificación de los SNPs de una manera adecuada, se requiere determinar si se cuenta o no con una cantidad suficiente ADN en las muestras de material genómico extraídas, para lo cual se utiliza la técnica de espectrofotometría UV/Visible, la misma que alrededor de los 260nm de absorbancia es ideal para captar la máxima absorción por parte de los nucleótidos. A su vez la espectrofotometría permite conocer la pureza del ADN extraído de la muestra, esto mediante la relación entre la densidad óptica (DO) a 260nm y 280nm (DO260nm/DO280nm respectivamente), en la que una relación mayor a 1,6 se considera como una muestra de pureza óptima o adecuada para estos ensayos.



Para la cuantificación se utilizó el espectrofotómetro para microplacas EPOCH™, para lo que se debe sanitizar primeramente con ayuda de alcohol antiséptico cada uno de los pocillos de la microplaca, posterior a esto se colocó con ayuda de una pipeta automática 2ul de muestra en cada pocillo, esto se realizó por duplicado tanto para las muestras como para el blanco, finalmente se calibro el equipo a una longitud de onda de 260 y 280nm y se realiza la lectura directa de las muestras en estas absorbancias(Farina, Ripoll, & Gasparri, 2010).

Para la lectura de resultados, el equipo EPOCH™ cuenta con un sistema de conexión directa a un ordenador en el cual se registran en una hoja de cálculo en Excel los resultados obtenidos para cada una de las muestras. El material y los equipos utilizados se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5: *Materiales y equipos utilizados en la cuantificación de ADN*

Materiales	Equipos
Pipeta automática de 1-10ul Thermo Scientific (FINNPIPETTE® F2)	Espectrofotómetro para microplacas (EPOCH™)
Puntas estériles de 10ul	
Alcohol etílico antiséptico 96 grados	
Paños Leans Cleaning Tissue (Nikon Instruments Inc.)	

Fuente: (Autoras, 2019)

3.3.6 Amplificación del ADN mediante PCR en tiempo real

Fundamento y procedimiento

Para la determinación de los polimorfismos 2548G>A y Gln223Arg de los genes *LEP* y *LEPR* respectivamente, se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR), la cual es una de las más sensibles y se constituye como una técnica enzimática que permite la detección y amplificación de millones de copias de una secuencia específica la cual se realiza por medio de gradientes de temperatura. La referencia de



“tiempo real” se define como la capacidad de detectar en cada ciclo de esta reacción a los segmentos amplificados. Para la aplicación de esta técnica se requiere entonces de agua libre de nucleasas y un complejo de sustancias contenidas en un reactivo comercial “Master mix” el cual está conformado por: la ADN polimerasa, enzima capaz de sintetizar ADN; un cebador o “primer” que es una serie de oligonucleótidos que se hibridan al ADN de cada una de las muestras y definen el segmento a amplificar; los desoxirribonucleotidos trifosfatados (dNTPs); el ión magnesio (Mg^{+}), un buffer, y un fluorocromo que es el responsable de emitir fluorescencia tras la acción de un láser, cuya fluorescencia es directamente proporcional al producto amplificado. Esta técnica se constituye por tres ciclos principales que son la desnaturalización de la cadena de ADN, hibridación y extensión del segmento específico de ADN (Aguilera, et al, s.f.; Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013)

Desnaturalización: Este ciclo se basa en someter al ADN a altas temperaturas que van de entre $94-97^{\circ}C$ lo que consigue generar una ruptura en los puentes de hidrógeno que unen las hebras de ADN, el tiempo que requiere este paso dependerá de la cantidad de uniones G-C y A-T, a mayor cantidad de uniones G-C se requiere mayor tiempo debido a que este apareamiento poseen 3 enlaces, es decir un enlace más que A-T mismos que es más fáciles de romper (Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013 ; Chirinos-Arias, 2015).

Hibridación: En esta etapa se da un descenso de la temperatura considerada como una etapa crucial en la que el cebador o primer se ancla al ADN molde por complementaridad en su extremo 3' y se inicia la amplificación del segmento específico de ADN, los rangos de temperatura en este ciclo van de entre $35-60^{\circ}C$, tanto de la temperatura como del anclaje del primer dependerá la estabilidad y especificidad del producto amplificado (Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).

Extensión: Tiene como objetivo dar lugar a la elongación de la cadena del nuevo ADN que se sintetiza a partir del “primer” anclado a la cadena ADN molde, esta extensión se da en dirección 5'-3' y para que se dé la extensión como tal, actúa de manera fundamental sobre el complejo primer-ADN molde una polimerasa la que tiene la capacidad de sintetizar ADN a partir de la incorporación de desoxinucleósidos trifosfatos (dNTP's) que se complementan y dan como resultado final la elongación de la cadena este ciclo se genera a



una temperatura óptima de 72°C y se obtiene como producto final amplicones cuyo tamaño dependerá de cada investigador (Tamayo de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).

Para este estudio se emplearon sondas de hidrólisis Taqman® rs7799039 correspondiente a *LEP* y rs1137101 a *LEPR*, ambas poseen dos fluoróforos, denominados VIC y FAM, cuya función es permitir detectar cambios o variaciones en las secuencias de ADN, como lo es la presencia del alelo A y la ausencia del alelo G (ver **Tabla. 6**), en ambos casos el primer fluoróforo (VIC) se encuentra diseñado para la detección de la secuencia complementaria correspondiente al alelo (A), mientras que el fluoróforo FAM viene diseñado para la secuencia complementaria del alelo (G), el estudio se llevó a cabo en el equipo 4 Channel Real Time PCR TL-988 de Tianlong®, y mediante el análisis de las curvas generadas para cada una de las muestras se determinó si se trataba de un Homocigoto A/A, homocigoto G/G o un heterocigoto.

Tabla 6: Características de las sondas de hidrólisis Taqman® aplicadas en el ensayo.

SNP	Identificado	Número de ensayo	Fluoróforo	Secuencia: Cambio de A por G
2548G>A	rs7799039	C_13280 79_10	VIC/HEX: (A)	TTGTTTTGTTTTGCGACAGGGTT GC[G/A]CTGATCCTCCCGCCTCA GTCTCCCT
c.668A>G <i>Gln223Arg</i>	rs1137101	C_87225 81_10	FAM: (G)	ATCACATCTGGTGGAGTAATTT TCC[A/G]GTCACCTCTAATGTCA GTTCAGCCC

Leyenda: (A)= Alelo A; (G)= Alelo G

Fuente: (Autoras, 2019)

3.3.7 Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real

La técnica fue estandarizada realizando 3 ensayos a diferentes volúmenes de reacción (10, 15 y 20uL) y se experimentó con 3 muestras de ADN seleccionadas de manera aleatoria y se las llevó a una concentración de 15 y 30ng/uL. Se procedió a determinar la concentración de cada una de las muestras de ADN, mediante cuantificación en equipo de EPOCH



Determinada la concentración del ADN se realizaron dos diluciones con agua destilada ultra pura y libre de DNase/Rnase hasta llevar a cada muestra a una concentración de 15 y 30ng/uL.

Se prepararon diluciones aplicando la fórmula $C1 \times V1 = C2 \times V2$, que nos permite conocer la cantidad de ADN y diluyente que se requieren para obtener un volumen final de 20uL para cada una de las concentraciones requeridas.

Seguido de esto se procedió a calcular los volúmenes de los reactivos que conforman un súper cóctel para llevar acabo la reacción a volúmenes finales de 10, 15 y 20uL. El mejor resultado del coctel de reacción se muestra en la **Tabla 7**.

Se configuró los ciclos correspondientes para el desarrollo de la qPCR y finalmente se determinó que a un volumen final de reacción de 15uL y 20uL se observaron mejores resultados, seleccionando el ensayo de 15uL como el ideal para realizar el resto de reacciones por optimización de materiales y reactivos.

Tabla 7: *Condiciones para la reacción de amplificación (cóctel).*

Componente	Blanco (uL)	Volumen en reacción (uL)
Taqman® Genotyping Master Mix 2X	7.5	7.5
Sonda Taqman® diluida con Buffer TE-1X	0.75	0.75
Agua grado biología molecular	6.75	2.75
Muestra de ADN diluida	--	4
<i>Volumen total</i>	15	15

Fuente: (Autoras, 2019)

3.3.8 Determinación de los polimorfismos

Preparación de las muestras.



Se procedió a separar en alícuotas de cada uno de los reactivos implicados en la qPCR con el objetivo de minimizar el riesgo de contaminación, cada una de las muestras de ADN fueron diluidas hasta alcanzar una concentración de 15ng/uL siguiendo la siguiente fórmula.

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

$$V1 = \frac{C2 * V2}{C1}$$

Donde:

V1 = Volumen de ADN concentrado	V2 = Volumen del diluyente para llegar (20ml)
C1 = Concentración del ADN concentrado	C2 = Concentración a la que se quiere llegar (15ng/uL)

Por ejemplo, para una muestra cuya concentración inicial es 45.23ng/uL aplicando la fórmula tenemos:

$$V1 = \frac{15ng/uL * 20}{45.32ng/uL}$$

$$V1 = 6.62uL$$

Es decir que para llegar a una muestra final de 20uL de ADN diluido con una concentración de 15ng/uL a partir de esta muestra se requiere de 6.62uL del ADN concentrado de esta y 13.38uL de diluyente que es el agua destilada ultra pura y libre de DNase/Rnase, este método fue aplicada para cada una de las muestras cuya concentración era mayor a 15ng/uL.

Se requiere también de una dilución de las sondas Taqman®, las cuales inicialmente se encuentran en una concentración de 40x, y la concentración requerida para la reacción es de 20x, por lo que se procedió a diluirla como se indica en la **Tabla 8**.

Tabla 8: *Condiciones para la dilución de las sondas Taqman®.*



Dilución de la sonda	Volumen
Sonda Taqman®	20ul
Buffer tris-EDTA	20ul
Volumen total	40ul

Fuente: (Autoras, 2019)

Las condiciones de la reacción de amplificación para la determinación del polimorfismo son las mismas que se indicaron en la **Tabla 7**.

Las muestras fueron colocadas de manera ordenada en cada pocillo de la microplacas para PCR de 96 reacciones en total, se colocó el blanco en el último pocillo y en el resto de los pocillos las correspondientes muestras, a pesar de poseer microplacas para 96 reacciones se prefirió utilizar en cada ensayo solo la mitad de estas en, es decir 48 reacciones (incluido el blanco), aquellas muestras que presentaron un resultado dudoso o no lo presentaron fueron procesadas nuevamente en el equipo 4 Channel Real Time PCR TL-988. Para una validación del resultado se corrieron dichas muestras también en el equipo ABI StepOne Plus Real-Time PCR 96 well System en el Centro de Investigación Innovación y Transferencia de Tecnología (CIITT) de la Universidad Católica de Cuenca; en total se llevaron a cabo 15 corridas, incluyendo los ensayos de prueba. Cabe recalcar que en cada una se colocó un blanco.

Todo el procedimiento fue llevado a cabo con material estéril y en el interior de una cámara de flujo, a la cual se le aplicó luz UV por 30 minutos antes y después del uso, la placa para PCR utilizada cuenta con 96 pocillos y para cubrir los pocillos se utilizó tiras de 8 tapas ópticas, que permiten el paso de la luz a través de las muestras y a la vez que reducen el riesgo de contaminación entre estas. Las condiciones con las cuales se realizó esta prueba de contraste se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9: *Materiales y equipos para el desarrollo de qPCR.*

Materiales	Equipos
Pipeta automática 10-100ul Thermo	Cabina de flujo laminar horizontal CSB-120



Scientific (FINNPIPETTE® F2)	
Pipeta automática 100-100ul Thermo Scientific (FINNPIPETTE® F2)	4 Channel Real Time PCR TL-988 (Tialong®)
Tubos eppendorf de 200uL libres de DNasa (AXYGEN™)	Refrigeradora Kelvinator KRO-1700DF
Tubos eppendorf de 1.5ml libres de DNasa (AXYGEN™)	Autoclave Tuttnauer 2540
Gradillas plásticas Pop-Up™	
Gradillas plásticas para microtubos Thermo Scientific	

Fuente: (Autoras, 2019)

3.3.9 Interpretación de resultados

Para la interpretación de resultados en el equipo 4 Channel Real Time PCR TL-988, se procedió a identificar cada una de las curvas generadas para cada muestra, en base a la emisión de la intensidad para cada fluoróforo sobre los umbrales establecidos para cada uno de ellos, como ya se mencionó anteriormente se trabajó con 2 fluoróforos, VIC/HEX que genera una fluorescencia y curva de color azul correspondiente al alelo G y el fluoróforo FAM que permite la detección del alelo A que genera como respuesta una curva de color verde. Por ejemplo, en caso de que la muestra sobrepase los umbrales de VIC/HEX y FAM y se genere únicamente una curva de color verde, dicha muestra es determinada como homocigoto A/A (**Figura 9**), por otro lado y bajo las mismas condiciones anteriores pero con la generación de una curva azul significa que la muestra es homocigota para el alelo menos frecuente G/G y finalmente, en caso de que se generen dos curvas (verde y azul), se trataría de una muestra heterocigota A/G (**Figura 10**), en el caso de que las muestras no hayan sido analizadas o no contengan material genómico suficiente, el equipo no genera ninguna curva o estas no sobrepasan los umbrales establecidos para los fluoróforos.

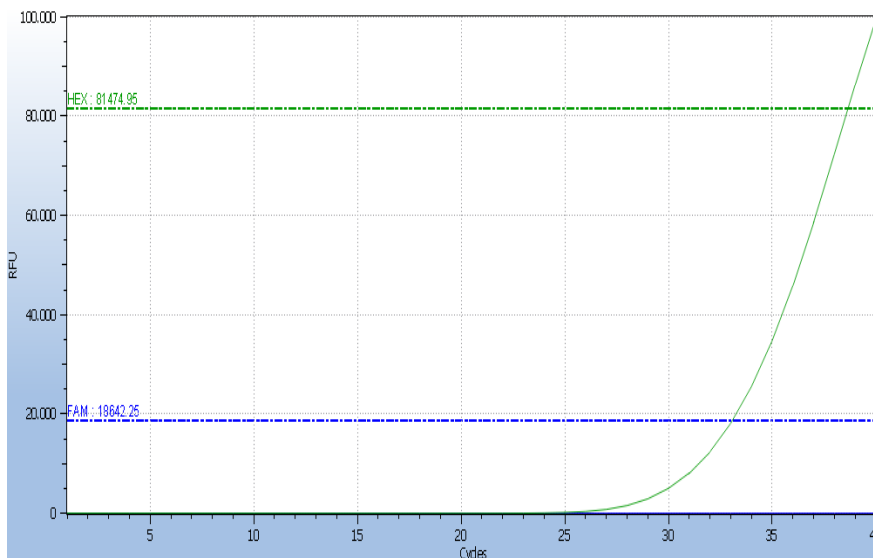


Figura 12: Generación de curva verde (VIC/HEX) que indican la detección de un SNP A/A.

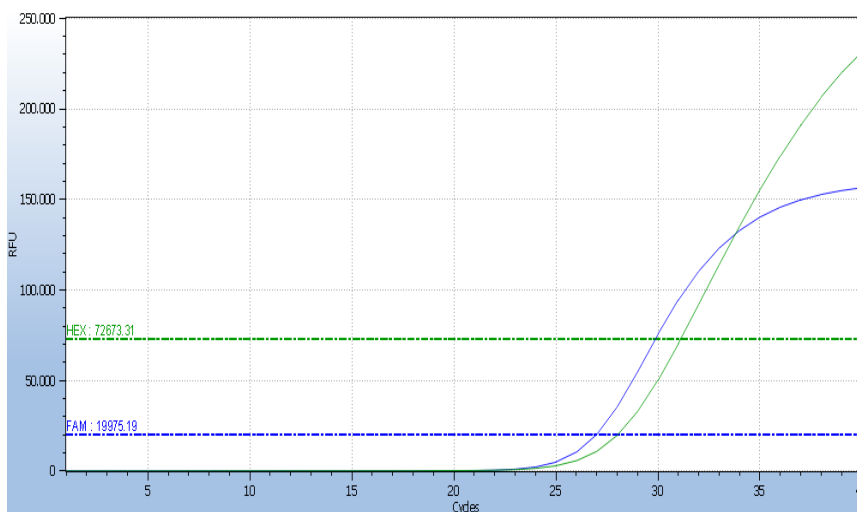


Figura 13: Generación de curva verde (VIC/HEX) y azul (FAM) que indican la detección de un SNP heterocigoto.

3.3.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico constó de diferentes fases, en el que se utilizó el programa estadístico informático SPSS versión 22. Inicialmente se realizaron los tests de normalidad de los datos mediante la prueba estadística Kolmogorov-Smirnov, para determinar su posterior análisis paramétrico o no paramétrico según corresponda. El ajuste permite determinar que variables cuentan con datos distribuidos normalmente para los cuales sus resultados se expresaron como la Media (\bar{x}) \pm la desviación estándar (DS); mientras que para aquellas



variables cuyos datos no cumplan con una distribución normal, se los expresó como la Mediana (intervalo de confianza 95%).

Por otra parte, para el análisis de las frecuencias alélicas y fenotípicas de rs7799039 y rs1137101 se aplicó el programa bioinformático SNPStats, desarrollado por el Instituto de Oncología de la Universidad de Cataluña y que se encuentra disponible vía online en: <https://www.snpstats.net/start.htm> (Solé, Guinó, Valls, Iniesta, & Moreno, 2006) a su vez esta plataforma nos permite determinar si existe o no una posible asociación entre estas frecuencias y las variables establecidas en el estudio, de manera especial con el IMC.

Finalmente, a pesar que no constaba dentro de los objetivos de esta investigación un análisis de asociación entre el IMC, este se obtuvo mediante una regresión logística binaria con las demás covariables establecidas en el estudio mediante SPSS v22.



CAPÍTULO 3

4. Resultados

4.1 Descripción de las características socio-dermográficas, antropométricas, hematológicas y bioquímicas de la población estudiada

El estudio realizado es de tipo descriptivo, el mismo que se enrolaron 160 pacientes oncopediátricos con LLA atendidos en la Sociedad de Lucha Contra el Cáncer Núcleos Cuenca y Loja. De acuerdo a la **Tabla 10** se observa que 93 pacientes corresponden al sexo masculino (57.8%), mientras que las 68 pacientes han sido mujeres (42.2%).

En la misma tabla se muestran dos grupos de niños menores de 10 años y entre 10 a 18 años; esto permite revisar la distribución y el comportamiento entre infantes y escolares vs a los prepúberes, púberes y jóvenes; así pues, de 70 niños que estuvieron en el grupo de menor edad la media estuvo en 6.95 años y para el otro grupo 13,81 años.

En el caso de las características antropométricas, al tratarse de población pediátrica se clasificó el IMC en percentiles como establece la OMS (OMS, 2018), por lo que se agrupó como Hipotrófico ó bajo peso (Percentiles 0-5), normotróficos o de peso saludable (entre los percentiles 5-85), Hipertrófico ó de sobrepeso (entre 85-95) y obesidad (>95); llama la atención que el grupo de niños con excesos de peso representa entre ambos un 30% de la población estudiada.

La mayor parte de estos (84.4%) declaró su etnia como mestiza, únicamente un 3.1% de la población se declaró indígena, mientras que el restante (12.5%) no declaró su etnia, o no se encontraba registrado en las historias clínicas.

Tabla 10: Datos antropométricos, sociodemográficos y hematológicos de la población en estudio.



Variable	N (%)	Promedio \pm DS	Normalidad (Valor de <i>p</i>)
Sexo			
Masculino/	93 (57.8)	-	
Femenino	67 (42.3)	-	
Edad			
<10 años	70 (43.7)	6.95 \pm 4.61	0.40
(10-18 años)	90 (56.3)	13.81 \pm 3.31	0.32
Peso (Kg)			
		38.03 \pm 12.92	0.33
Talla (m)			
		1.35 \pm 0.22	0.05
IMC* (Kg/m²)			
Hipotr3fico (0-5)	5(8.0)	-	
Normotr3fico (5-85)	104 (65.0)	-	
Hipertr3fico (85-95)	29(18.1)	-	
Obeso \geq 95.1	19(11.9)	-	
Etnia			
Mestizo	135 (84.4)	-	
No declara	21 (12.5)	-	
Ind3gena	5 (3.1)	-	
Procedencia			
Azuay	62 (38.8)	-	
Cañar	21 (13.1)	-	
Loja	26 (13.6)	-	
El Oro	24 (15.0)	-	
Morona Santiago	8 (5.0)	-	
Zamora Chinchipe	7 (4.4)	-	
Otras	12 (10.1)	-	

Leyenda: *IMC: Índice de Masa Corporal clasificada según percentiles

La Tabla anterior y la **Figura 9** indican la distribución de acuerdo a la procedencia o a la provincia de origen de los pacientes atendidos en los dos centros hospitalarios. Tal como se observa, existen 4 provincias que abarcan el mayor número de niños con LLA.

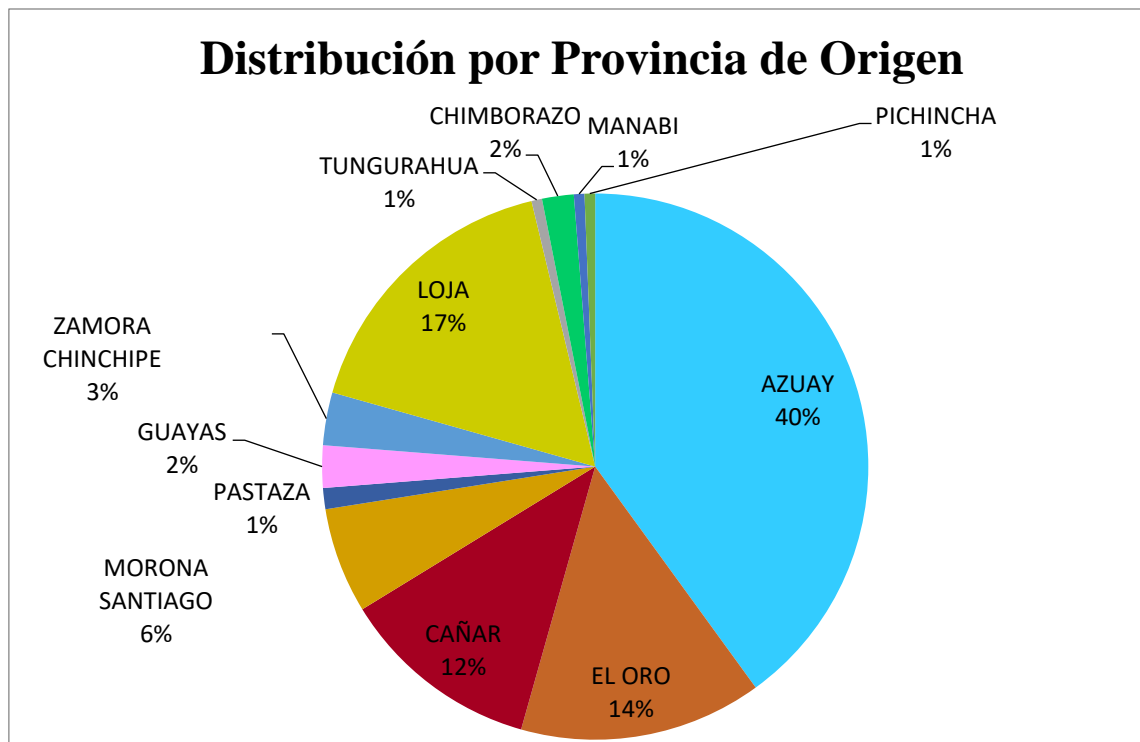


Figura 14. Distribución de los pacientes de acuerdo a la provincia de origen.

En la figura 10 se puede observar 93.1% de los pacientes presentan una leucemia de linaje o estirpe celular B donde se abarca (pre-B temprana, común y madura), para el estirpe celular T tan solo un 5.7% presentó este inmunofenotipo, por otro lado se halló que 2 pacientes de la población involucrada poseían un inmunofenotipo ambiguo.

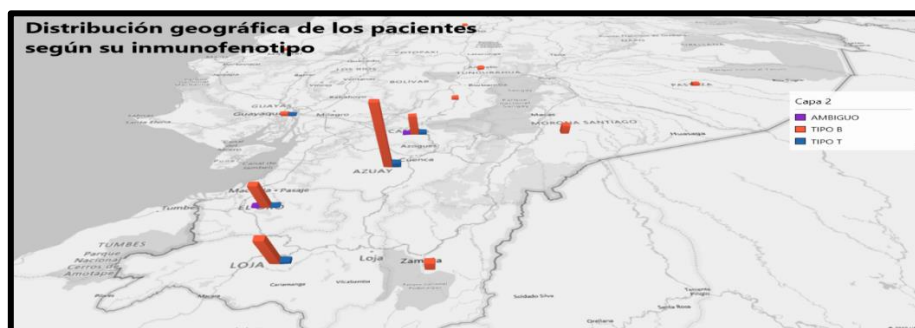


Figura 15. Clasificación de los pacientes de acuerdo al inmunofenotipo.



En cuanto a los datos hematológicos obtenidos en las historias clínicas, se determinó que tan solo un 10% de los pacientes poseen anemia teniendo valores inferiores a 11mg/dL y 35% para la hemoglobina (Hb) y hematocrito (Hto) respectivamente, no se evidenció daño renal, esto con relación a los valores de urea y creatinina; sin embargo, un grupo de niños correspondientes a 9.9% de la población de estudio presentaron algunas alteraciones dentro de los valores de ALT lo que sugiere una posible afección hepática, todo esto se muestra en la **Tabla 11**.

Tabla 11: Valores bioquímicos clínicos de la población en estudio $n=160$.

Variable	N(%)	Promedio \pm DS	Normalidad (Valor de p)
Inmunofenotipo			
Tipo B	149 (93.1)	-	
Tipo T	9 (5.6)	-	
Ambiguo	2 (1.2)	-	
Hemoglobina (g/dL)		13.14 \pm 2.50	0.22
Hematocrito (%)		38.90 \pm 5.67	0.40
Urea (mg/dL)		19.86 \pm (6.89)	0.32
Creatinina (mg/dL)		0.39 \pm (0.15)	0.26
ALT UI/L		31.05(36.72-56.47)	<0.005*
AST UI/L		25.50(26.81-37.80)	<0.005*

Leyenda: *Prueba de Kolmogorov- Smirnov con significancia estadística por lo que los valores indicados corresponden a la mediana e intervalo de confianza al 95%

4.2 Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo 2548G>A del gen *LEP* y *GLN223ARG* del gen *LEP* en la población de estudio.

Luego de haber realizado la qPCR en un total de 160 muestras, se obtuvo como resultados para ambos polimorfismos la presencia de únicamente dos de tres grupos genotípicos posibles, es decir que dentro de la población en estudio solo se encontró con la presencia del homocigoto (A/A) y del heterocigoto (G/A), mientras que el homocigoto (G/G) no se encontró presente en este estudio en ninguno de los dos polimorfismos en cuestión.



Para la determinación de las frecuencias se realizó un análisis de estas mediante el programa bioinformático SNPStats, en donde se logró determinar que para el SNP2548G>A el grupo heterocigoto (G/A) se encuentra en mayor cantidad dentro de la población de estudio estando presente en 130 pacientes con una proporción de (0.81), mientras que los 30 pacientes se encuentran en el grupo homocigoto A/A correspondiendo a un 0.19. Por otra parte, para el caso del SNP Gln223Arg, al igual que en el caso anterior el heterocigoto (A/G) estuvo en una mayor proporción 106(0.66) y el grupo homocigoto (A/A) está en una proporción de 54(0.34). Finalmente cabe recalcar que en ninguno de los dos polimorfismos estudiados se obtuvo genotipo homocigoto mutado (ver **Tabla 12**). En cuanto a las frecuencias alélicas, para el polimorfismo 2548G>A el alelo raro fue el más frecuente (A) con una cantidad de 59%, mientras que el alelo normal tuvo una menor frecuencia (G) con un valor de 41%. Para el polimorfismo Gln223Arg el alelo normal tuvo mayor frecuencia (A) con un valor de 68% respectivamente; mientras que para el alelo raro (G) se presentó con menos frecuencia con un valor de 32%. (**Tabla 12**).

Tabla 12: Frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos 2548G>A y Gln223Arg.

SNP	Frecuencia genotípica, n (%)	Frecuencia alélica, n (%)
2548G>A	A/A: 30 (0.19)	A: 190(0.59)
	G/A: 130 (0.81)	G: 130(0.41)
	G/G: 0 (0.0)	
Gln223Arg	Arg/Arg: 54 (0.34)	A: 217(0.68)
	Gln/Arg: 106(0.66)	G: 103(0.32)
	Gln/Gln: 0 (0.0)	

Se puede evidenciar en la **Figura 13 y 14**, de acuerdo a la clasificación de los pacientes por el IMC (saludable, bajo peso, sobrepeso y obesidad), que para ambos SNP las frecuencias genotípicas A/G, G/A y A/A presentan un mayor recuento de pacientes con peso saludable.

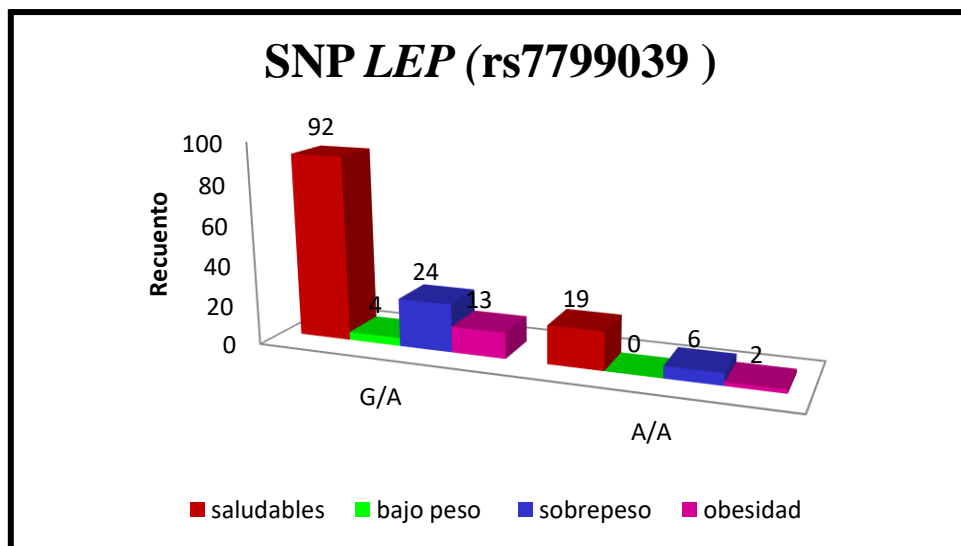


Figura 16: Clasificación del IMC según los percentiles con la frecuencia genotípica del Polimorfismo rs7799039.

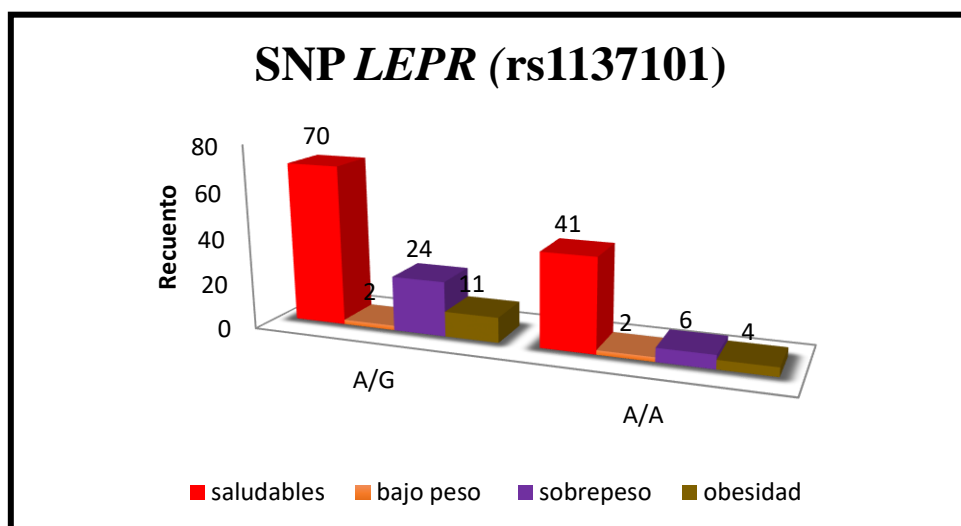


Figura 17: Clasificación del IMC de acuerdo a percentiles con la frecuencia genotípica del polimorfismo rs1137101.

De acuerdo con la **Figura 15** se observa que para la clasificación según las provincias de origen de los pacientes de nuestro estudio, la mayor parte presenta la frecuencia genotípica G/A en el caso de *LEP* y que las provincias con el mayor número de casos son Azuay, El Oro, Cañar y Loja, mientras que existe una menor proporción para la frecuencia A/A. Para el caso del *LEPR* observando la **Figura 16**, podemos describir que así mismo la mayor parte corresponde para la frecuencia genotípica A/G cuyos pacientes proceden de las



provincias más representativas ya antes mencionadas incluyendo a Morona Santiago, y menos proporción tenemos a la frecuencia genotípica A/A.

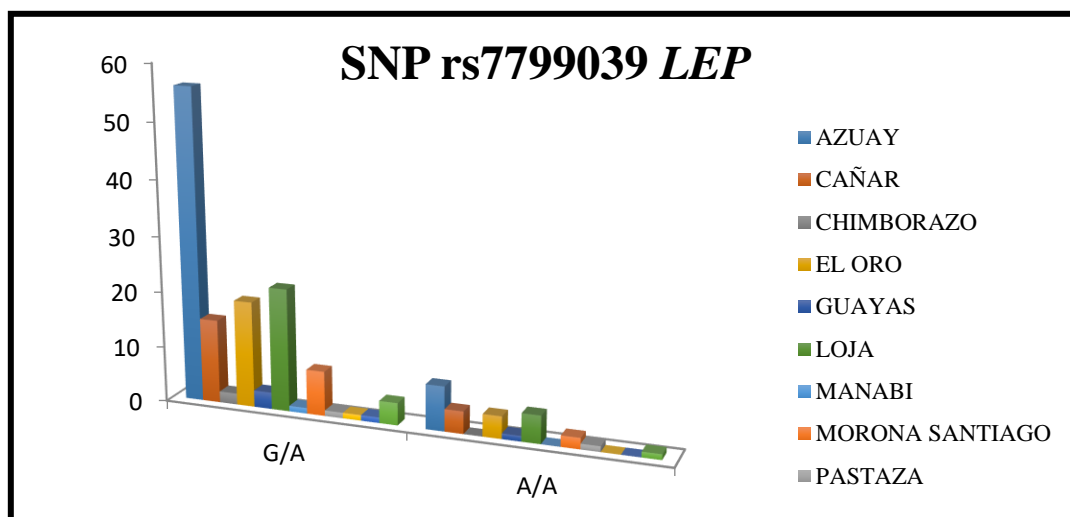


Figura 18: Clasificación de acuerdo a la procedencia de los pacientes con la frecuencia genotípica del polimorfismo rs7799039

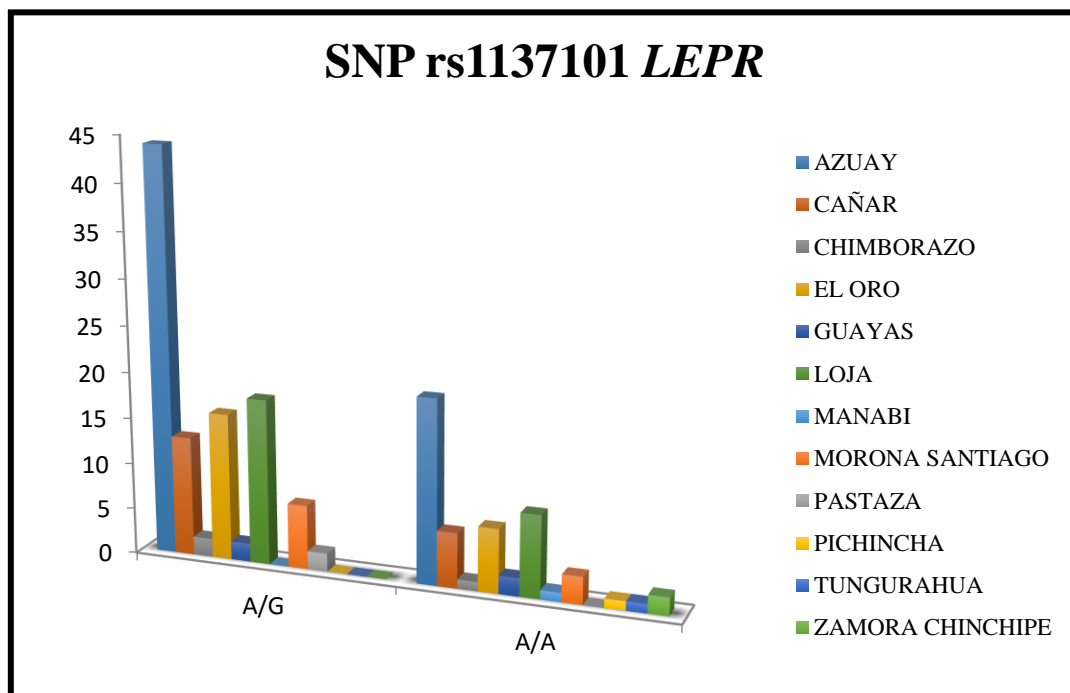


Figura 19: Clasificación de acuerdo a la procedencia de los pacientes con la frecuencia genotípica del polimorfismo rs1137101.

En la Figura 17 y 18 se puede observar que tanto para el SNP del gen LEP como para LEPR ya sean en hombres como mujeres la frecuencia genotípica que se encuentra en mayor porcentaje es la del grupo heterocigoto G/A (LEP) y A/G (LEPR) respectivamente.

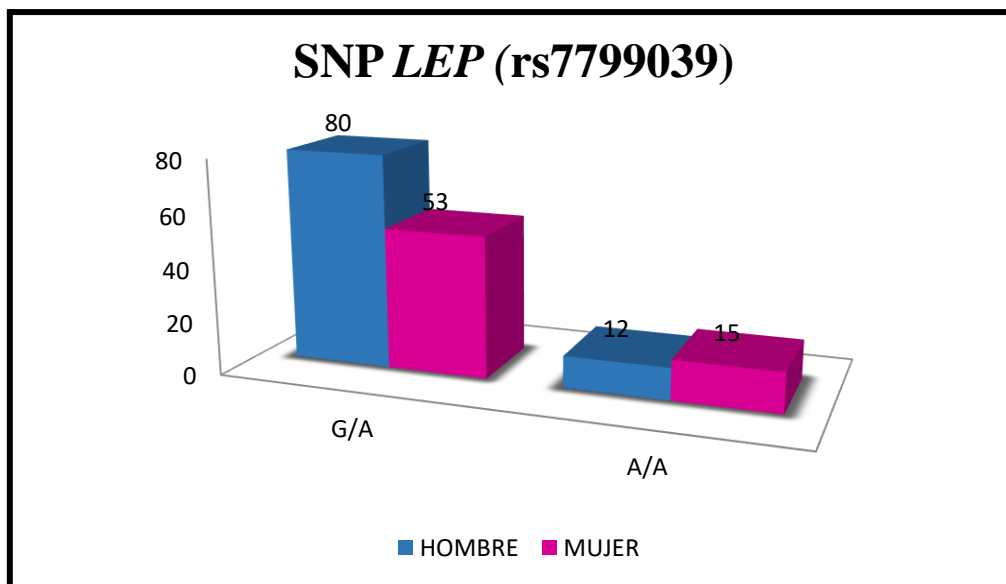


Figura 20: Clasificación de los pacientes de acuerdo al sexo y la frecuencia genotípica del polimorfismo rs7799039.

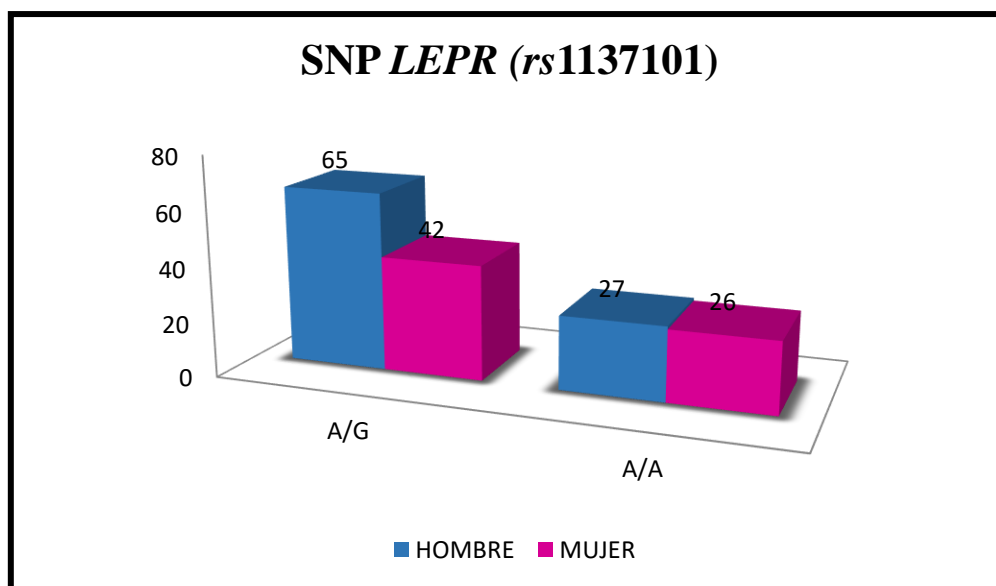


Figura 21: Clasificación de los pacientes de acuerdo al sexo y a la frecuencia genotípica del polimorfismo 1137101.

Para las **Figuras 19 y 20** tanto para el SNP2548G>A de la leptina como el de su receptor, se encuentra una mayor frecuencia genotípica del grupo heterocigoto G/A y A/G para los pacientes que se declararon como mestizos, pero cabe recalcar que también hay una pequeña mayoría en cuanto al grupo mestizo con la frecuencia genotípica heterocigoto A/A del receptor de Leptina.

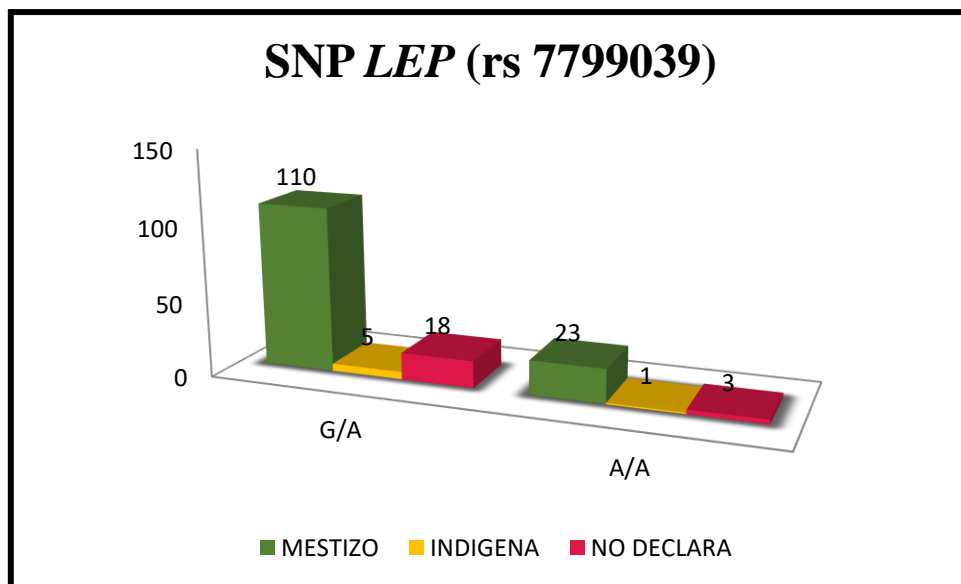


Figura 22: Clasificación de los pacientes de acuerdo a la Etnia y a la frecuencia genotípica del polimorfismo 7799039.

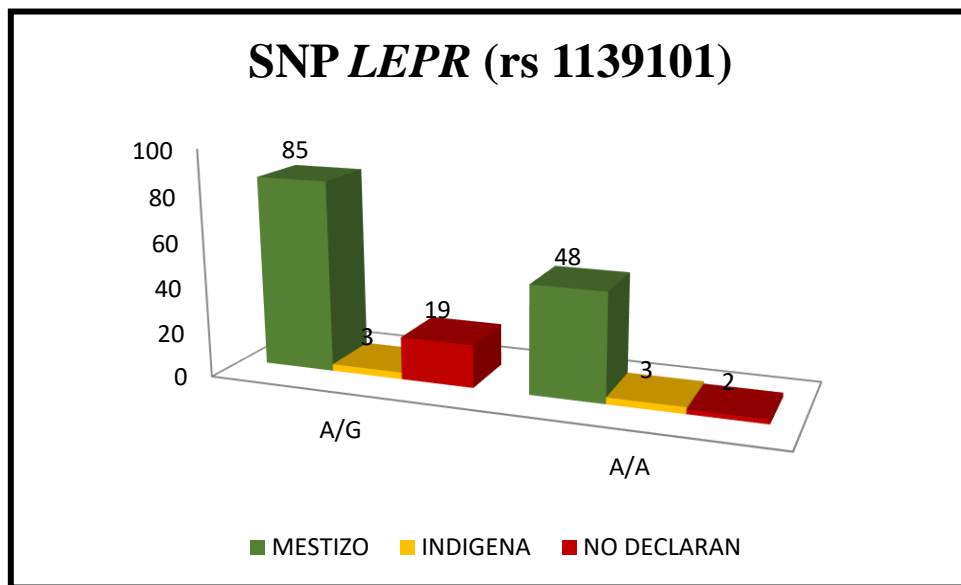


Figura 23: Clasificación de los pacientes de acuerdo a la Etnia y a la frecuencia genotípica del polimorfismo 1137101.

En la **Figura 21** se observa que para ambos núcleos de SOLCA (Cuenca y Loja) no hay una diferencia significativa en cuanto a la distribución genotípica y alélica, puesto que la de mayor frecuencia para los pacientes en ambos centros médicos fue del grupo heterocigoto G/A(2548G>A) y A/G(Gln223Arg).

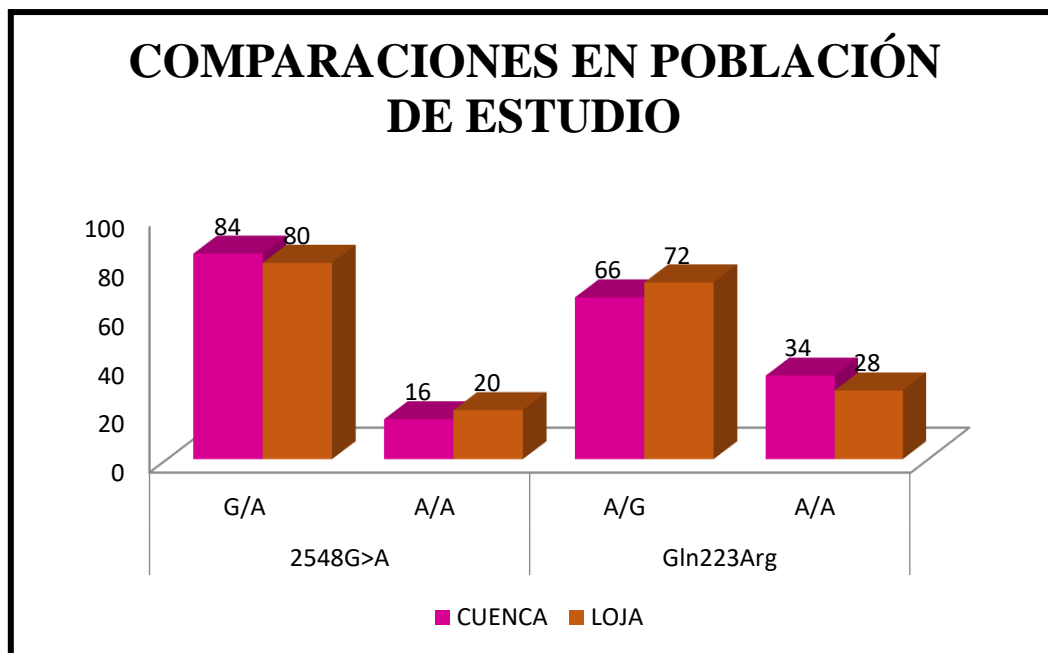


Figura 24: Comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas de los pacientes tratados en SOLCA Cuenca y Loja.

4.3 Asociación de los polimorfismos 2548G>A del gen *LEP* y *Gln223Arg* del gen *LEPR* con los diferentes parámetros establecidos en el estudio.

Mediante el programa bioinformático SPSSv22 se analizaron varios modelos de asociación entre las frecuencias genotípicas y las diferentes covariables. Se buscó con mayor énfasis observar las respuestas de análisis de riesgo con la razón de ventajas u Odds ratio OR, con un intervalo de confianza de 95% (IC95), en la que se relacionó la presencia del genotipo con la alteración del peso (grupos con IMC diferentes al ideal) donde no se apreció una asociación estadísticamente significativa. Este comportamiento se muestra en la **Tabla 13 y 14**.

Tabla 13: Asociación de riesgo del SNP de la leptina con el estado nutricional.



		Estado nutricional		Total	
		Saludable	Alterado		
SNP rs7799039 Leptina	G/A	Recuento	87	46	133
		% dentro de Estado nutricional	84,5%	80,7%	83,1%
	A/A	Recuento	16	11	27
		% dentro de Estado nutricional	15,5%	19,3%	16,9%
Total		Recuento	103	57	160
		% dentro de Estado nutricional	100,0%	100,0%	100,0%

OR: 1.30(0.558-3.032), p=0.546

Tabla 14: Asociación de riesgo del SNP del receptor de la leptina con el estado nutricional alterado

		Estado nutricional		Total	
		Saludable	Alterado		
SNP rs1137101 Receptor leptina	A/G	Recuento	66	41	107
		% dentro de Estado nutricional	64,1%	71,9%	66,9%
	A/A	Recuento	37	16	53
		% dentro de Estado nutricional	35,9%	28,1%	33,1%
Total		Recuento	103	57	160
		% dentro de Estado nutricional	100,0%	100,0%	100,0%

OR: 0.696(0.344-1.408), p=0.315

4.3 Discusión

La LLA es el cáncer hematológico que con mayor frecuencia se presenta en la población pediátrica a nivel mundial, su origen es multifactorial y dentro de estos se encuentra el



factor genético, por lo que la elaboración de estudios en base con este factor resultan de bastante interés, el estudio presentado analizo dos genes, el de la leptina y su receptor y determino la frecuencia de los mismos en la población oncopediatrica con la neoplasia antes mencionada en SOLCA núcleos Cuenca y Loja, para esto se contó con la participación de 160 niños de género indistinto, contando con un 57.8% del género Masculino y 42.3% del género Femenino con una media de edad ($\bar{x} \pm DS$) de 10.81 ± 4.61 . Para la clasificación del IMC, dentro del estudio se determinó que el 3.1% se encontraba con bajo peso, 63.8% peso saludable, 20.6% y 12.5% se encontraban dentro de los rangos de sobrepeso y obesidad respectivamente, estos resultados fueron comparados con los resultados de Hidalgo Avilés y Pólit García, quienes analizaron el estado nutricional de niños con leucemia en Guayaquil, en donde determinaron que 60.46% de la población de su estudio cuenta con un peso saludable, 16.27% está dentro de los rangos de sobrepeso y para los pacientes con riesgo de sobrepeso, delgadez y delgadez severa obtuvieron un 4.65% para cada uno de estos, finalmente un 2.32% de la población está dentro del grupo de clasificados como obesos (Hidalgo Avilés & Pólit García, 2017). Con estos resultados se puede mencionar entonces, que existe similitud, al menos en que la población con mayor porcentaje es la que se encuentra con un peso saludable, en cuanto a los porcentajes de los pesos alterados (Bajo peso, sobrepeso y obesidad) difieren de los nuestros sin embargo esto puede deberse a las diferencias en los hábitos alimenticios, a la enfermedad misma e incluso al tratamiento quimioterapéutico que puede alterar de varias formas el estado nutricional.

La LLA como todas las neoplasias, viene relacionada a una serie de complicaciones que pueden ser secundarias a la enfermedad o derivadas de la toxicidad de la quimioterapia, una de las principales complicaciones que presentan es la anemia que puede ir de leve a grave, de acuerdo a nuestro estudio se pudo determinar que un 10% de la población presenta anemia al tener valores bajos de Hb y Hcto, los mismos que fueron descritos en la Tablas 10 de resultados, tanto la anemia como la presencia de una trombocitopenia, resultan de interés en este tipo de pacientes ya que si bien no son factores pronósticos, se los ha implicado con aumentar el riesgo de morbilidad.



Las células leucémicas tienden a invadir con gran rapidez la circulación sanguínea lo que implica la proliferación de estas a otros órganos, a su vez se suma la quimiotoxicidad lo que desemboca en daño a algunos órganos, entre estos el hígado y los riñones, en cuanto a los marcadores de daño o alteración hepática tenemos a la ALT, enzima que en nuestra población de estudio se encontró sobre los valores normales en un 9.9% lo que nos sugiere que existen complicaciones hepáticas las cuales como se menciona en la bibliografía están principalmente relacionadas con la toxicidad de la quimioterapia, de manera especial por la administración de Metotrexato y Mercaptopurina, como se menciona por Periañez-Párraga *et al.*, (Periañez-Párraga, et al., 2009).

Para el caso de las frecuencias genotípicas, en nuestro estudio el SNP 2548G>A del gen *LEP* se encontró que se presentó en mayor frecuencia con un 81% para el heterocigoto G/A, y un 19% para el homocigoto A/A, no se evidencio la presencia del grupo homocigoto G/G, al contrastar estos resultados con el estudio propuesto por *Maistry et al*, en donde se evaluó la posible asociación del síndrome metabólico con diferentes aspectos bioquímicos y genéticos en 999 Indios asiáticos de Durban, Sudáfrica (Maistry et al., 2018) el SNP 2548G>A presento resultados dentro de las frecuencias genotípicas semejantes a los nuestros puesto que no se evidencio la presencia del grupo homocigoto G/G, además de que las frecuencias de los demás grupos fenotípicos (A/A y G/A) son ciertamente similares a los nuestros puesto a que el grupo heterocigoto se encuentra en mayor porcentaje (99.2%), mientras que el homocigoto A/A esta en un porcentaje mínimo del 0.8%.

Por otra parte para este SNP (2548G>A) los estudios en cáncer de tipo hematológico son prácticamente escasos y aún más en población pediátrica, sin embargo este polimorfismo ha sido ampliamente estudiado e incluso propuesto como un marcador genético de riesgo en algunos tipos de cáncer sólido, como menciona *Mohammadzadeh et al*, donde las frecuencias genotípicas en este estudio fueron para los grupos (A/A, G/A y G/G) 36, 55 y 9% respectivamente para el grupo de casos, mientras que para el grupo control se obtuvo 45% A/A, 52% G/A y 3% G/G, en contraste con nuestro estudio se puede evidenciar que existe una mayor distribución para el genotipo G/A, seguido del genotipo A/A sin embargo se difiere ya que en este estudio el genotipo G/G pese a estar en una porción mínima, si se encuentra presente mientras que en nuestro caso no lo estuvo (Mohammadzadeh,



Mohammad-Ali, [...], & Ahmadi , The Relationship between -2548 G/A Leptin Gene Polymorphism and Risk of Breast Cancer and Serum Leptin Levels in Ahvazian Women, 2015). Adicionalmente existen múltiples estudios contradictorios a nuestros resultados, puesto a que en aquellos, a diferencia de nuestro estudio el genotipo G/G se presenta en mayor frecuencia que los otros dos grupos genotípicos tanto en 2548G>A como en Gln223Arg (Yiannakouris et al., 2003; Zhang et al.,2018). Con lo antes mencionado se puede entonces corroborar que ambos SNPs se distribuyen y comportan de manera diferente por la gran variabilidad étnica, esto se evidencia en estudios sobre población caucásica y británica (Gotoda et al., 1997; Chagnon et al., 2000).

La bibliografía menciona una evidente asociación entre la leptina y diversos aspectos relacionados con los cuadros leucémicos, tales como la proliferación celular, la promoción de la hematopoyesis normal, incluso se ha mencionado un efecto apoptótico, sin embargo la relación entre esta hormona y la neoplasia ya antes mencionada, no está del todo dilucidado (Wasik et al., 2006) además del fundamental papel de la leptina y su receptor sobre la ingesta de alimentos y su posible participación dentro de la fisiopatología de la obesidad, razón por la cual y pese a no formar parte de nuestros objetivos hemos analizado si existe una posible asociación entre los SNPs en estudio con el IMC de los pacientes, haciendo énfasis en aquellos que presentan alteraciones en su peso, al aplicar un estudio de regresión logística binaria entre los SNPs y el IMC, en este último se abarco dos parámetros (Peso saludable y alterado), estando dentro del peso alterado todos aquellos pacientes que poseen un bajo peso, sobrepeso u obesidad, finalmente los resultados arrojados por nuestro estudio indican que no existe una asociación entre los SNPs en estudio con esta variable, con un OR: 1.30 (0.558-3.032 ; p=0.546) para 2548G>A y para Gln223Arg OR: 0.696(0.344-1.408; p=0.315) dichos resultados se contrastan con el estudio de Wasik et al, donde de manera similar, se analizó el SNP del gen *LEPR* en población pediátrica con leucemia, y a su vez se determinó los niveles séricos y medulares de leptina en donde se concluyó que no existe asociación entre el SNP con la neoplasia misma, y mucho menos con el desarrollo de obesidad (Wasik et al., 2006). De igual manera, pero en población adulta Turca se analizó tanto rs7799039 como rs1137101, en donde se concluyó que el SNP 2548G>A no presentan una asociación de riesgo con la obesidad, y por lo tanto no se lo puede considerar como un marcador genético de riesgo para esta patología, mientras que para Gln223Arg, se



evidenciaron ciertas diferencias en las frecuencias genotípicas entre las poblaciones en estudio (casos y controles), sin embargo no mostraron una diferencia estadísticamente significativa por lo que de igual manera no presento una asociación con la obesidad (Sahin et al, 2013).

Si bien no existen estudios que involucren al gen *LEP* como un marcador de obesidad dentro de población leucémica, *Mohammadzahed et al*, afirma una asociación de riesgo de cáncer mamario en las pacientes con 2548G y que se encuentren en estado postmenopaúsico, pero dicha asociación no se ve influenciada por el IMC (Mohammadzadeh, Mohammad-Ali, [...], & Ahmadi, 2015) también es importante mencionar que resultados que contradicen los obtenidos por el nuestro en cuanto a la existencia de asociación entre los SNPs y la obesidad se citan en (Hinuy, y otros, 2008 ; Zayani, y otros, 2017) de manera especial en el estudio propuesto por Shahid et al, donde se analizó el SNP 2548G>A en torno a la obesidad y haciendo énfasis a la edad y género donde se determino una evidente asociación entre el SNP con la obesidad en población infantil ≤ 18 años, teniendo la población femenina un mayor riesgo con respecto a la masculina (Shahid et al., 2015).

Los estudios realizados en base con la leptina, su receptor y la asociación con la obesidad son varios, y los resultados arrojados por los mismos son de igual manera muy variantes e incluso contradictorios entre ellos, sin embargo se debe tomar en cuenta la compleja fisiopatología de la obesidad, donde se habla de un origen multifactorial influenciado por factores genéticos, ambientales e incluso se puede abarcar a factores evolutivos y de desarrollo, sumado a esto el hecho de estar presente en cuadros neoplásicos como la leucemia que basa parte de origen en alteraciones genéticas hace que sea aún más difícil establecer si existe o no una asociación entre los SNPs y el IMC, de manera especial con la obesidad (Carrillo Vázquez et al., 2011 ; Shahab & Mohammad, 2016)

De igual manera al centrarnos en el aspecto genómico existe controversia en cuanto a las frecuencias genotípicas y alélicas para los dos genes en contexto, pero esto puede deberse a factores como el fondo genético poblacional, variaciones étnicas, geográficas, e incluso puede influir sobre esto los modelos utilizados para realizar el análisis genético, influye también que los cohortes analizados en los diferentes estudios puestos en contraste con nuestros resultados no presentan ciertamente similitudes a nivel poblacional, ni patológico,



debido a que los análisis de estos SNPs en población infantil y en base con neoplasias de tipo hematológico son realmente escasos, es por estas razones y resultados tan variantes que resulta entonces muy difícil establecer si existe en realidad o no una asociación como tal imposibilitando por el momento definirlos como marcadores genéticos de riesgo con la obesidad y esto pues, en el caso de nuestro estudio donde se habla en contexto del estado nutricional y de manera especial la obesidad en cuadros leucémicos, se torna incluso más complejo establecer a 2548G>A y Gln223Arg como marcadores de obesidad puesto a que al origen multifactorial de la obesidad se le suman alteraciones endócrinas que pueden estar presentes en los oncopacientes en relación con el metabolismo de lípidos, retención de líquidos e incluso efectos secundarios relacionados con el tratamiento con esteroides lo que vuelve más complejo establecer si existe en realidad una asociación o no (Carrillo Vázquez, y otros, 2011; López Facundo et al, 2015).

Es importante mencionar que si bien es cierto en nuestro estudio no se cuantificó sericamente esta hormona puesto a que no fue propósito del mismo, resultaría de bastante interés que se lo realice ya que niveles altos de leptina se han asociado como un factor de riesgo en diferentes tipos de cáncer incluidos los de tipo hematológico(Shahab & Mohammad, 2016), incluso Aref et al, proponen a la adiponectina y leptina como posibles marcadores pronóstico de leucemia al determinar valores significativamente más altos de leptina sérica en pacientes con LLA y por el contrario en pacientes con LMA los valores séricos eran más bajos con respecto a la población control (Aref et al., 2013). Por otra parte los cuadros de obesidad dentro de los pacientes con LLA podrían influir en la supervivencia de los mismos tal como se menciona en el estudio elaborado por Ethier et al, donde se estudiaron a 238 niños entre 2 y 18 años de edad con LLA, concluyeron que los niños que presentaban cuadros de obesidad disminuyen la probabilidad de supervivencia hasta en 5 años con respecto a los pacientes que se encontraban dentro de un peso normotrófico (OR=3.68 IC=95%: 1.71-7.68, p=0.001) (Ethier, y otros, 2012), esto es razonable puesto a que la bibliografía menciona que el exceso de tejido adiposo afectan la farmacocinética de los diferentes agentes quimioterapéuticos lo que impide el adecuado funcionamiento de los mismos, e incluso la obesidad está relacionada con la producción de sustancias tóxicas que agravan el cuadro cancerígeno y favorecen su progresión, también es importante recordar que tanto la leptina como su receptor pueden ser fundamentales en el



desarrollo y progresión cancerígena ya que cumple funciones tanto en la proliferación celular, la angiogénesis y la apoptosis celular (López Facundo et al., 2015; Shahab & Mohammad, 2016). Por esta razón es necesario que se estudie esta hormona pleitrópica y su receptor de manera más profunda para poder dilucidar de mejor manera tanto los SNPs como la expresión de la leptina misma junto a su receptor e identificar de mejor manera la influencia que tienen sobre este cuadro neoplásico que es el más frecuente en población pediátrica a nivel mundial.



CAPÍTULO 4

5. Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

Se determinó que la frecuencia genotípica para el SNP 2548G>A es de 81 y 19% para G/A y A/A respectivamente y que el alelo más frecuente es el alelo raro A (59%), mientras que para el SNP Gln223Arg se obtuvo las siguientes frecuencias 66, 34, 58 y 32% para A/G, G/A, A y G respectivamente.

Dentro de la población estudiada se determinó que la mayor parte de esta se declarará como mestiza y que el 56.25% de la población de estudio está dentro del rango de edad de 10-18 años, se determinó también que la mayoría de los pacientes presentan son normotróficos y que en cuanto a los valores clínicos un 10% de la población estudiada presenta anemia, no se evidenció daño renal, y un 9.9% de los pacientes presentaba posibles alteraciones hepáticas.

De acuerdo con la frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos 2548G>A y Gln223Arg se determinó que tanto para el sexo como la etnia el grupo heterocigoto G/A(2548G>A) y A/G (Gln223Arg) se presentan con mayor frecuencia, mientras que para el IMC, para ambos polimorfismos los pacientes con peso saludable se distribuyen en mayor porcentaje dentro de las frecuencias genotípicas heterocigotas G/A(*LEP*) y A/G (*LEPR*) y homocigotas A/A, mismas que se encontraban con mayor porcentaje.

Se determinó que no existe una diferencia significativa en cuanto a la distribución genotípica y alélica de los polimorfismos 2548G>A y Gln223Arg entre las dos poblaciones de estudio (SOLCA Cuenca y Loja).

Pese a que no fue parte de nuestros objetivos se analizó si hay o no una posible asociación entre los polimorfismos en cuestión y el IMC, en la que se determinó que no existe como tal una asociación significativa de riesgo o protección en relación con esta variable, esto con



una relación de OR: 1.30 (0.558-3.032; p=0.546) para 2548G>A y para Gln223Arg OR: 0.696(0.344-1.408; p=0.315).

Recomendaciones

Se debe promover la investigación genética a nivel de Ecuador y Latinoamérica, de manera especial determinar cómo cada SNP se distribuye a nivel poblacional y detectar las diferencias en dicha distribuciones, pues en los diferentes estudios con lo que hemos correlacionado se ve la influencia de la etnia para la distribución variada de los SNP 2548G>A y Gln223Arg .

El papel de los SNP 2548G>A y Gln223Arg en los cuadros de neoplasias hematológicas como la leucemia no está del todo dilucidado, por lo que resultaría de interés se realice una mayor cantidad de estudios en poblaciones con este tipo de patologías y volver más claro el panorama con respecto a estas variantes genéticas y este tipo de neoplasias, de manera especial en población pediátrica, ya que en estos los estudios son realmente escasos.

Se sugiere realizar estudios donde a más de investigar los polimorfismos en cuestión, también se vincule con estudios de niveles séricos tanto de leptina como de su receptor, puesto que varios estudios asocian los niveles de estos con problemas de obesidad, y esto puede influir en la disminución de la probabilidad de vida de los pacientes.

**Bibliografía**

- American Society of Clinical Oncology. (2017, Mayo). *Cancer.net*. Retrieved from Leucemia - linfocítica aguda - ALL - en adultos: Estadísticas: <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cancer/leucemia-linfocitica-aguda-all-en-adultos/estadisticas>
- AL-Jumaily, E. F., & Zgaer, S. H. (2014). A Review: "Leptin Structure and Mechanism Actions". 3, 8.
- Aref, S., Ibrahim, L., Azmy, E., & Al Ashary, R. (2013, July). Impact of serum adiponectin and leptin levels in acute leukemia. *Hematology* 18, 18(4), 198-204. doi:10.1179 / 1607845412Y.0000000059
- Carrillo Vázquez, J. P., López Alcantar, J., Benítez Cardoza, C. G., Zamorano, A., López Camarrillo, C., Reyes López, C. A., & Marchat, L. A. (2011). Relevancia de polimorfismos en el gen de la leptina y su receptor para el desarrollo de la obesidad. In J. M. Muñoz Cano, *Obesidad: Problema multifactorial* (pp. 17-38). Mexico D.F: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- Chagnon, Y., Wilmore, J., Borecki, I., Gagnon, J., Pérusse, L., Chagnon, M., . . . Bouchard, C. (2000). Associations between the leptin receptor gene and adiposity in middle-aged Caucasian males from the HERITAGE family study. *J Clin Endocrinol Metab. Jan*; 85(1), 29-34.
- Coleman, D. L. (2010). A historical perspective on Leptin. *Nature Medicine* 16(10), 1097-1099.
- Diez Ibarbia, A. (2011, Diciembre 12). *Influencia del Polimorfismo Gln223Arg del receptor de leptina en el sobrepeso*. Retrieved Julio 9, 2018, from Repositorio abierto Universidad de Cantabria: <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/510/Diez%20Ibarbia%200A.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- EDVOTEK. (2019, Marzo 13). *COMPañIA DE EDUCACIóN EN BIOTECNOLOGÍA*. Retrieved from <http://www.edvotek.com/site/pdf/101sp.pdf>
- Falcón Gerónimo, J. J., Gazga Urioste, C., González Torres, C., & Nájera Medina, O. (2012). REGULACIÓN DE LA INMUNIDAD POR LA LEPTINA*. *REB*, 31(3), 92-99. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2012/reb123c.pdf>
- Farina, H., Ripoll, G., & Gasparri, J. (2010, Marzo). *Universidad Nacional de Quilmes*. Retrieved from Introducción a la Biología Celular y Molecular: <https://ibcmunq.files.wordpress.com/2010/03/tp5.pdf>



- Flak, J. N., & Myers, M. G. (2016). Minireview: CNS Mechanisms of Leptin Action. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 30(1), 3-12. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1232>
- Garcés, M. F., Gomes, B., Stekman, H., & López, A. (2016, Junio 2). *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=367948532003>
- GeneCards Suite. (2018). *Gen LEPR*. Retrieved from Gene cards human gene database: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LEPR>
- Gotoda, T., Manning, B., Goldstone, A., Imrie, H., Evans, A., Strosberg, A., . . . Aitman, T. (1997). Leptin receptor gene variation and obesity: lack of association in a white British male population. *Hum Mol Genet.* , 869-876.
- Guerra-Castillo, F. X., Ramos-Cervantes , M. C., Rosel-Pech, C., Jiménez-Hernández, E., & Bekker-Méndez, V. C. (2016). Detección de translocaciones relevantes por PCR en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda . *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* , 302-308.
- Hidalgo Avilés, M. C., & Pólit García, A. L. (2017, Septiembre 13). *Estado nutricional en pacientes pediátricos de 2 a 12 años con Leucemia Linfoblástica Aguda hospitalizados en el Instituto Oncológico Nacional Dr. Juan Tanca Marengo, SOLCA-2016*. Retrieved from Repositorio Universidad Católica Santiago de Guayaquil : <http://repositorio.ucsg.edu.ec/handle/3317/9066>
- Hinuy, H., Hirata, M., Forti, N., Diament, J., Sampaio , M., Armaganijan, D., . . . Hirata, R. (2008). Leptin G-2548A promoter polymorphism is associated with increased plasma leptin and BMI in Brazilian women. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* Jun;52(4), 611-6.
- Larios-Farak, T. C., Rendón-García, H., Ornelas-Caballos, J. R., Covarrubias-Espinoza, G., Ríos-García, C. G., & Morales-Peralta, A. (2016). Supervivencia de Niños con Leucemia Linfoblástica Aguda de Riesgo Intermedio. *Boletín clínico del Hospital Infantil del Estado de Sonora*, 19-25.
- Lassaleta Atienza, A. (2016). Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatría Integral Órgano de expresión de la Sociedad Española de Pediatría Extrahospitalaria y Atención Primaria*, 380-390.
- Leukemia & Lymphoma Society. (2017). What is leukemia . *Understanding leukemia*, 8.
- Londoño-Lemos, M. E. (2017). Aproximaciones farmacológicas para el tratamiento de la obesidad. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 46(1), 71-127. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v46n1.67293>López Facundo , N. A., Tejocote Romero, I., Rodríguez Castillejos , C., & Jaimes García , Y. (2015). Impacto de la obesidad en el pronóstico de supervivencia y recaída en niños con



leucemia aguda linfoblástica del estado de México. *Gaceta Mexicana de Oncología Septiembre-Octubre;14(5)*, 242-249.

- Mistry , T., Gordon, M., Sartorius , B., & Naidoo, D. P. (2018). Candidate gene polymorphisms related to lipid metabolism in Asian Indians living in Durban, South Africa. *Indian J Med Res* , 148(2), 169-179. doi:10.4103 / ijmr.IJMR_1150_16.
- Mohammadzadeh, G., Mohammad-Ali, G., [...], & Ahmadi , B. (2015, Mr-Apr). The Relationship between -2548 G/A Leptin Gene Polymorphism and Risk of Breast Cancer and Serum Leptin Levels in Ahvazian Women. *Iranian Journal of Cancer Prevention* , 8(2), 100-108. doi:10.17795/ijcp-5266
- OMS. (2007). *Organización Mundial de la Salud*. Retrieved from IMC (0-19 años): https://www.who.int/growthref/who2007_bmi_for_age/en/
- OMS. (2018, Febrero 1). *Organización Mundial de la Salud*. Retrieved from Cáncer, datos y cifras: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Ortega Sánchez, M. A., Osnaya Ortega, M. L., & Rosas Barrientos, J. V. (2007). Leucemia linfoblástica aguda. *Medicina Interna de México*, 26-33.
- Paz-Filho, G., Mastronardi, C., Bertoldi Franco, C., Boyang Wang , K., Wong, M.-L., & Licinio, J. (2012). Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications Leptina: mecanismos moleculares, efeitos pró-inflamatórios sistêmicos e implicações clínicas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinología & Metabología* 56 (9), 596-607.
- Periáñez-Párraga, L., Pérez-Rodríguez, O., Pazo-Oubiña, F. d., & Crespí-Monjo, M. (2009). Acute toxicity of high doses of methotrexate in treatment of ALL in children: a case study. *Farmacia Hospitalaria* , 33(3), 121-179. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19712601>
- Pisabarro , P., Ernesto, I., Recalde, A., Barrios , E., Arocena, A., Aguirre, B., . . . Bonifacio, J. L. (1999). Leptina: una hormona secretada por el tejido adiposo. Primer estudio en muestra poblacional Uruguaya. *Rev Med Uruguay* , 15, 43-38. Retrieved from <http://www.rmu.org.uy/revista/1999v1/art6.pdf>
- Rodríguez, P., Maia, L., Santos, M., Peterle, G., Alves, L., Takamori, J., . . . Silva-Conforti, A. (2015). Leptin receptor expression and Gln223Arg polymorphism as prognostic markers in oral and oropharyngeal cancer. *Genetics and Molecular Research* 14 (4), 14979-14988.
- Sánchez, J. C. (2005). Perfil fisiológico de la leptina. *Colombia Médica*, 36, 10.
- Sánchez, M. A. O., Ortega, M. L. O., & Barrientos, J. V. R. (2007). Leucemia linfoblástica aguda. *Medicina Interna de México*, 8.



- Sahin, S., Rüstemoğlu, A., Tekcan, A., Taşliyurt, T., Güven, H., & Yiğit, S. (2013). Investigation of Associations between Obesity and LEP G2548A and LEPR 668A/G Polymorphisms in a Turkish Population. *Disease Markers* 35(6), 673-677.
- Santos M., J. L. (2009). Sistema leptina-melanocortinas en la regulación de la ingesta y el peso corporal. *Revista Médica de Chile*, 1225-1234.
- Shahab , U., & Mohammad, R. M. (2016, Junio). Role of leptin and leptin receptors in hematological malignancies. *Leukemia & lymphoma*, 10-16.
doi:10.3109/10428194.2015.1063145
- Shahid , A., Rana, S., Mahmood, S., & Saeed, S. (2015). Role of leptin G-2548A polymorphism in age- and gender-specific development of obesity. *Journal of Biosciences September*; , 40(3), 521-530. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26333398>
- Sida Medina, R. (2010, Enero). *Asociación de los polimorfismos G-2548A y A223G en el gen leptina y su receptor con Diabetes tipo 2 en la ciudad de Durango*. Retrieved Septiembre 30, 2018, from Repositorio Instituto Politécnico Nacional Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional: <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8599/237.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Solé, X., Guinó, E., Valls, J., Iniesta, R., & Moreno, V. (2006). SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22(15), 1928-9. Retrieved from Bioinformatics.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad 2*, 70-78.
- ThermoFisher . (2016). *PureLink Genomic DNA mini Kit*. Retrieved from ThermoFisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K182002>
- ThermoFisher Scientific. (2018). *Thermo Fisher Scientific*. Retrieved from Ensayos Taqman SNP Genotyping: https://www.thermofisher.com/order/genome-database/?pearUXVerSuffix=pearUX2&elcanoForm=true#!/genotyping/assays/genotyping_all/?keyword=rs1137101%20LEPR
- Wasik, M., Górska, E., Popko, K., Pawelek, K., Matisiak, M., & Demkow, U. (2006, September). The Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor gene and peripheral blood/bone marrow leptin level in leukemic children. *Polish Physiological Society* , 57(4), 375-383. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17072067>
- Yiannakouris, N., Melistas, L., Yannakoulia, M., Mungal, K., & Mantzoros, C. (2003). The-2548G/A polymorphism in the human leptin gene promoter region is



associated with plasma free leptin levels; interaction with adiposity and gender in healthy subjects. *Hormones (Athens) Oct-Dec 2(4)*, 229-36.

Zavala Laya, M. H. (2008). Fisiología de la Leptina en el control de la ingesta y homeostasis energética como enfoque hacia la prevención de la obesidad. *Medicrit Revista de Medicina Interna y Crítica*, 5(2), 74-81. Retrieved from <http://www.medicrit.com/rev/v5n2/5274.pdf>

Zayani, N., Omezzine , A., Boumaiza, I., Achour , O., Rebhi, L., Rejeb , J., . . . Bouslama, A. (2017). Asociación de ADIPOQ, leptina, LEPR y polimorfismos de resistina con parámetros de obesidad en Hammam Sousse Sahloul Heart Study. *J Clin Lab Anal. nov*; 31 (6), 1-10.

Zhang , S., Jiang, J., Chen, Z., Wang, Y., Tang, W., Liu, C., . . . Chen, Y. (2018). Investigation of LEP and LEPR polymorphisms with the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in Eastern Chinese Han population. *Onco Targets Therapy*, 2083-2089.

ANEXOS

Anexo 1: Carta aprobación del 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-VGVS-2016-0244-O, 26 de Abril de 2016

Quito, 5 de enero de 2018

Señor

Dr. Fausto Leonardo Zaruma Torres

Investigador Principal

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 **“Translocaciones cromosómicas y polimorfismos genéticos de enzimas de la vía del folato y de transportadores de metotrexato como posibles marcadores predictores de la toxicidad en niños con leucemia linfoblástica aguda.”**, ha sido aprobada el día de hoy como un estudio *fullboard*, 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 diciembre 19, 2017 que incluyen:

- Solicitud de revisión y aprobación de estudio de investigación, 14 páginas;
- Solicitud de aplicación al consentimiento informado por escrito, 5 páginas;
- Solicitud de aplicación al asentimiento informado por escrito, 5 páginas; □
Herramientas, 8 páginas;

Casilla Postal 17-12-841, Quito, Ecuador

comitebioetica@usfq.edu.ec

PBX (593-2) 297-1700 ext 1149

2017-106E



- Hoja de vida del Investigador principal, 3 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: **2017-106E**. 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.



Comité la fecha de terminación del estudio

Atentamente,

William F. Waters, PhD



Deseándole los mejores éxitos en

su investigación, se solicita a los investigadores que notifiquen al

Presidente Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos

USFQ cc. Archivo general, Archivo protocolo

Casilla Postal 17-12-841, Quito, Ecuador

comitebioetica@usfq.edu.ec

PBX (593-2) 297-1700 ext 1149

Anexo 2: Carta compromiso SOLCA Cuenca

Cuenca, 11 de enero de 2018

Doctor

Hernán Valdivieso



JEFE DEL DEPARTAMENTO DE
DOCENCIA Su despacho.

De mis consideraciones.

Revisado el protocolo “**TRASLOCACIONES CROMOSOMICAS Y POLIMORFISMOS GENETICOS DE ENZIMAS DE LA VIA DEL FOLATO Y DE TRANSPORTADORES DE METOTREXATO COMO POSIBLES MARCADORES PREDICTORES DE LA TOXICIDAD EN NIÑOS CON LEUCEMIA LIFOBLASTICA AGUDA**” y una vez que se han realizado los ajustes correspondientes de acuerdo a las observaciones realizadas, considero, desde el punto de vista metodológico, que el proyecto puede ser ejecutado.

Le reitero mi consideración y estima.

Atentamente,

Dr. Fray Martínez Reyes Asesor Metodológico

Anexo 3: Carta compromiso SOLCA Loja

Oficio N° 2017.332.SNL.P

Loja, 19 de mayo de 2017

Doctor PhD

Fausto Leonardo Zaruma Torres

DIRECTOR DEL PROYECTO -

DOCENTE INVESTIGADOR DE LA UNIVERSIDAD DE CUENCA

Email: fausto.zaruma@ucuenca.edu.ec

Telf: 405-1005 / 505-1120 / 0983051850



Cuenca

De mi consideración:

Me es grato dirigirme a usted para expresarle un saludo cordial, a la vez comunicarle que el Consejo Directivo de SOLCA Núcleo de Loja en sesión llevada a cabo el 18 de mayo de 2017, conoció la carta enviada por parte del Dr. Oswaldo Aguirre Valdivieso, Miembro del Consejo Directivo de la institución, mediante la cual adjunta el proyecto investigativo: “Translocaciones cromosómicas y polimorfismos genéticos de enzimas de la vía del folato y de transportadores de metotrexato como posibles marcadores predictores de la toxicidad en niños con leucemia linfoblástica aguda”, luego de lo cual resolvió conceder el aval y la aceptación para ser copartícipe de este importante proyecto.

Con mis sentimientos de consideración y estima.

Atentamente,

Lic. Claudio Burneo Burneo

PRESIDENTE EJECUTIVO DE SOLCA NÚCLEO DE LOJA

CBB/sisb

c.c. Dr. Oswaldo Aguirre Valdivieso, Miembro del Consejo Directivo SOLCA Loja

Anexo 4: Resultados observados en el fotodocumentador para la electroforesis

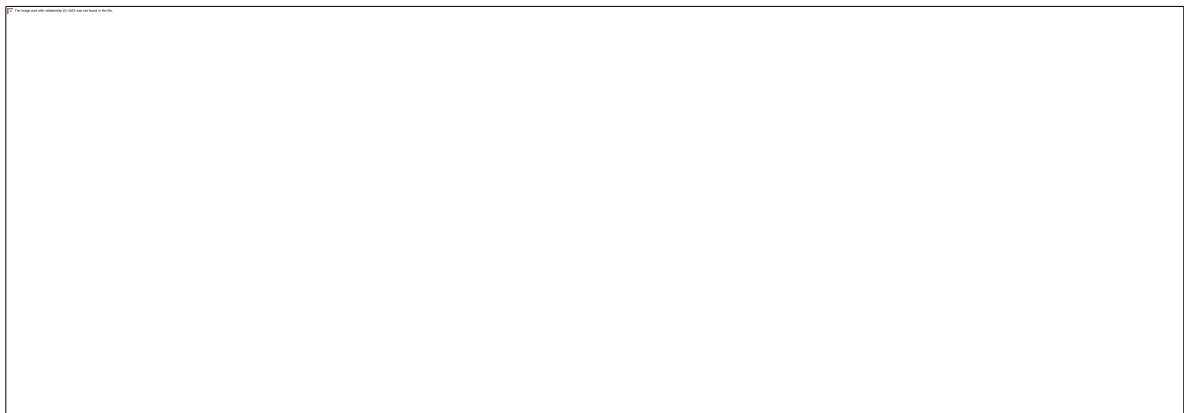


Figura 25: *Electroforesis realizada en las muestras de ADN genómico.*