



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA, DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS Y
MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN GAMMA-CONGLUTINA EN
Lupinus mutabilis

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingenieras en Biotecnología

Profesor Guía

Manuel E. Baldeón, MD., Ph.D

Autoras

Estefanía Cecilia Almeida Galarza

Érika Bodniza Morales

Año

2014

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con las estudiantes, orientando sus conocimientos para un adecuado desarrollo del tema escogido, y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.”

Manuel E. Baldeón, MD., Ph.D
C.C.1706483201

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DE LAS ESTUDIANTES

“Declaramos que este trabajo es original, de nuestra autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”

Estefanía Cecilia Almeida Galarza
C.C.1719537548

Érika Bodniza Morales
C.C. 0802701110

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a las siguientes personas que con su sabiduría y apoyo nos guiaron varias veces cuando perdíamos camino:

Ing. Stephanie Santander

Lien González-Pérez, Ph.D.

Santiago Aguirre, MSc.

Alejandro Cabrera, BSc.

Paul Cárdenas, MD. Ph.D.

A nuestra guía desde el primer momento en que iniciamos nuestro amor por la Biotecnología:

Ing. Emilia Vásquez

A los demás colaboradores de este trabajo de titulación, muchas gracias:

Gabriela Jaramillo-Koupermann,
MSc.

DEDICATORIA

Queremos dedicar este trabajo de titulación a Dios por bendecirnos, cuidarnos y darnos fuerzas para seguir adelante y poder enfrentar todos los problemas que se presentaron. A la Virgen María por cuidarnos y mimarnos durante todo el proceso. A nuestros padres, Iván y Janneth, y Ériko y Janine, por su apoyo, sus consejos y su aliento, y por enseñarnos a ser fieles a nuestros principios y perseguir nuestros sueños hasta alcanzarlos.

RESUMEN

Estudios previos demuestran que el consumo de *Lupinus* reduce los niveles de glucosa en la sangre en personas con diabetes tipo-2. La proteína γ -conglutina ha sido identificada como uno de los posibles principios activos en *Lupinus* responsable de la disminución de la glicemia debido a su funciones enzimáticas. El objetivo de esta investigación fue determinar la presencia y medir la expresión del gen γ -conglutina en tres variedades andinas de *L. mutabilis*. La presencia del gen en *Lupinus mutabilis* se realizó por PCR y la secuenciación de los fragmentos amplificados por el método de Sanger empleando big dye terminator. Se demostró la presencia del gen γ -conglutina en las tres variedades estudiadas de *L. mutabilis* y la secuenciación de los fragmentos amplificados mostró que existen polimorfismos entre *Lupinus mutabilis* y *Lupinus angustifolius* (especies originadas en la región mediterránea en Europa), mas no entre estas variedades andinas. La expresión génica se realizó mediante RT-qPCR y los datos demostraron que la variedad "V1" tuvo el mayor grado de expresión de γ -conglutina. Similar a estudios previos en variedades de *Lupinus* de Europa, los actuales resultados demostraron la presencia del gen γ -conglutina y de su expresión en las variedades de *L. mutabilis* andinas. No hubo diferencias en las secuencias amplificadas de las tres variedades andinas estudiadas. La obtención de la región codificante del gen γ -conglutina se realizó con la técnica de 3'RACE y 5'RACE, obteniendo la secuencia del cDNA con la cola poli-A correspondiente. Al alinear los fragmentos amplificados de *L. mutabilis* con *Lupinus albus* y *Lupinus angustifolius*, se encontraron variaciones en sitios específicos de las secuencias de DNA y cDNA.

ABSTRACT

Previous scientific publications have shown that the consumption of *Lupinus* reduces levels of blood glucose in people with type 2 diabetes. The conglutin-gamma protein has been identified as one of the possible active ingredients in *Lupinus* responsible for the decrease of blood glucose due to its enzymatic functions. The objective of this research was to determine the presence of conglutin-gamma and to measure its gene expression in three Andean varieties of *Lupinus mutabilis* ("chocho"). In order to determine the presence of the gene in *Lupinus mutabilis* a PCR was performed and subsequently sequenced using the Sanger sequencing method employing big dye terminator. The presence of conglutin-gamma gene was shown in the three varieties of *L. mutabilis* studied. The sequencing of the amplified fragments showed several polymorphisms existing between *Lupinus mutabilis* and *Lupinus angustifolius* (species originated in the Mediterranean region of Europe). However this was not seen between the three Andean varieties. Additionally, gene expression was performed by RT- qPCR and the data proved that variety "V1" had the highest degree of expression of conglutin-gamma. Similar to previous studies performed in varieties of European *Lupinus*, the current results demonstrate the presence of conglutin-gamma gene and its expression in Andean varieties of *L. mutabilis*. There were no differences between the sequenced fragments of the three Andean varieties of *L. mutabilis*. To obtain the entire coding region of conglutin-gamma 3'RACE and 5'RACE techniques were performed and the cDNA sequence ending with the poly-A tail was obtained. Several polymorphisms on specific sites were reported when the conglutin-gamma cDNA sequence of *L. mutabilis* was aligned with the sequences of *L. albus* and *L. angustifolius*.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Marco Teórico	7
1.1. Diabetes	7
1.1.1. Epidemiología	8
1.1.2. Diabetes tipo 2	9
1.1.2.1. Tratamiento convencional	10
1.1.2.2. Nuevas alternativas de tratamiento	12
1.2. Leguminosas	15
1.3. <i>Lupinus mutabilis</i>	16
1.3.1. Características generales.....	17
1.3.2. Contenido proteico	18
1.3.2.1. Proteína γ -conglutina.....	20
1.3.3. Factores antinutricionales.....	21
1.3.4. Otras especies domesticadas del género <i>Lupinus</i>	22
1.3.4.1. <i>Lupinus albus</i>	22
1.3.4.2. <i>Lupinus angustifolius</i>	22
1.3.4.3. <i>Lupinus luteus</i>	23
2. Materiales y Métodos	24
2.1. Lugar de desarrollo	24
2.2. Muestras de <i>Lupinus mutabilis</i>	24
2.3. Métodos	25
2.3.1. Estrategia experimental.....	25
2.3.2. Almacenamiento de las muestras	26
2.3.3. Diseño de cebadores.....	26
2.3.4. Extracción de ácidos nucleicos	27
2.3.4.1. Extracción de DNA para la identificación del gen γ -conglutina	27
2.3.4.2. Extracción de RNA para la determinación de la expresión del gen γ -conglutina y RACE.....	27

2.3.4.3. Extracción de DNA para la obtención de la región codificante del gen γ -conglutina.....	27
2.3.5. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	28
2.3.5.1. qPCR para la identificación del gen γ -conglutina	28
2.3.6. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-qPCR).....	29
2.3.7. Secuenciación para determinación de la presencia del gen γ -conglutina en tres variedades de <i>Lupinus mutabilis</i>	29
2.3.8. Método RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends – RACE)	30
2.3.8.1. 3'RACE	30
2.3.8.2. 5'RACE	31
2.3.9. Secuenciación de la región codificante de γ -conglutina	35
2.3.10. Alineamiento de secuencia obtenida mediante RACE en <i>L. mutabilis</i> con otras especies de <i>Lupinus</i>	35
2.3.11. Árbol filogenético.....	36
3.Resultados	37
3.1. Determinación de la presencia del gen γ -conglutina.....	37
3.2. Medición de la expresión relativa del gen γ -conglutina	42
3.3. 3' y 5' RACE	43
3.4. Arbol filogenético.....	57
4.Discusión.....	59
5.Conclusiones y Recomendaciones	64
5.1. Conclusiones.....	64
5.2. Recomendaciones	65
REFERENCIAS	66

Índice de Figuras

Figura 1. Prevalencia de la diabetes en población nacional por grupos de edad.....	9
Figura 2. Prevalencia de la diabetes en población nacional por subregión.....	9
Figura 3. <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet, chocho andino.....	17
Figura 4. Estrategia experimental de la identificación, medición de la expresión relativa y secuencia codificante del gen γ -conglutina.....	25
Figura 5. Esquema protocolo 3' RACE. Obtención del extremo 3' del cDNA...	31
Figura 6. Esquema protocolo 5' RACE. Obtención del extremo 5' del cDNA...	34
Figura 7. Identificación del fragmento del gen γ -conglutina por PCR de la V1 INIAP 450 Andino de <i>L. mutabilis</i>	37
Figura 8. Alineamiento de secuencias obtenidas del fragmento del gen γ -conglutina a partir de las variedades INIAP 450 Andino (Variedad 1), INIAP 451 "Guaranguito" (Variedad 2) y "Chocho criollo" (Variedad 3).	38
Figura 9. Alineamiento entre secuencia del fragmento de gen γ -conglutina obtenido en <i>L. mutabilis</i> y secuencia correspondiente en <i>L. albus</i> clon 32.....	39
Figura 10. Alineamiento entre secuencia del fragmento de gen γ -conglutina obtenido en <i>L. mutabilis</i> y secuencia correspondiente en <i>L. albus</i> clon 48.	40
Figura 11. Alineamiento entre secuencia del fragmento de gen γ -conglutina obtenido en <i>L. mutabilis</i> y secuencia correspondiente en <i>L. angustifolius</i> complete cds.....	41
Figura 12. Expresión relativa de γ -conglutina para las tres variedades de <i>L. mutabilis</i> estudiadas	42
Figura 13. Resultado de 3' RACE para Variedad 3 de <i>L. mutabilis</i> – Banda de aproximadamente 700 bp.	43
Figura 14. Resultado de 5' RACE "nested" PCR para Variedad 3 de <i>L. mutabilis</i> – Banda de aproximadamente 1100 bp.....	43

Figura 15. Secuencia de la región codificante en sentido 5' → 3' de <i>L. mutabilis</i>	44
Figura 16. Alineamiento entre secuencia de región codificante de γ -conglutina en <i>L. mutabilis</i> y la secuencia correspondiente en <i>L. albus</i> clon 32 reportada en NCBI	45
Figura 17. Alineamiento entre secuencia de región codificante de γ -conglutina en <i>L. mutabilis</i> y la secuencia correspondiente en <i>L. albus</i> clon 48 reportada en NCBI	49
Figura 18. Alineamiento entre secuencia de región codificante de γ -conglutina en <i>L. mutabilis</i> y la secuencia correspondiente en <i>L. angustifolius</i> mRNA reportada en NCBI.....	54
Figura 19. Arbol filogenético para visualizar el parentesco entre las especies de <i>Lupinus</i> consideradas en este estudio y <i>L. mutabilis</i>	57

Índice de Tablas

Tabla 1. Comparación de la composición de <i>L. mutabilis</i> (tarwi) y <i>Glycine max</i> (soya).....	19
Tabla 2. Cebadores utilizados en este estudio para la identificación de la presencia y medición de la expresión relativa del gen γ -conglutina en <i>L. mutabilis</i>	26
Tabla 3. Condiciones de la reacción 3' RACE PCR.	31
Tabla 4. Cebadores específicos diseñados para 5' RACE.....	32
Tabla 5. Condiciones de la reacción 5' RACE PCR y 5' RACE "Nested" PCR.	33
Tabla 6. Criterios configurados para la elaboración del árbol filogenético, mostrando el parentesco de <i>Lupinus mutabilis</i> y otras especies del género: <i>Lupinus albus</i> clon 32, <i>L. albus</i> clon 48 y <i>L. angustifolius</i>	36

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

La diabetes es una enfermedad en la que el nivel de glucosa en la sangre es alto para el funcionamiento normal del metabolismo, lo cual afecta diferentes órganos en las personas que la padecen. Existen dos tipos de diabetes, tipo 1 y tipo 2, la diabetes tipo 1 es causada por la falta de producción de insulina y la diabetes tipo 2 corresponde a la falta de función de la insulina producida. La diabetes tipo 2 es la más común. La diabetes es una enfermedad frecuente en la actualidad, constituye uno de las principales causas de mortalidad en el mundo y se estima que para el año 2030 será la séptima causa de mortalidad a nivel general (Organización Mundial de la Salud, 2012). En el Ecuador, es la segunda causa de mortalidad general (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2011), por lo tanto es de gran interés dentro del sistema de salud pública. Según datos del Anuario de Nacimientos y Defunciones del Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), durante el año 2013, se registraron 63 104 defunciones generales, siendo 4 695 de estas a causa de la Diabetes Mellitus.

En la actualidad el tratamiento de la diabetes tipo 2 (DM2) se ha enfocado en el uso de diferentes hipoglicemiantes tales como: la metformina entre las biguanidas, las sulfonilureas como la glibenclamida y distintas clasificaciones de las tiazolidinedionas, entre otros fármacos (Federación Internacional de Diabetes, 2008). Se ha reportado además la existencia de varios compuestos vegetales que presentan propiedades hipoglicemiantes, uno de ellos son los pertenecientes al género *Lupinus* que han demostrado tener propiedades antidiabéticas (Baldeón, et. al, 2012). Resultados del estudio del efecto de γ -conglutina en un modelo in vitro de mioblastos de ratón muestra funciones similares a la insulina, lo que demuestra el uso potencial de la proteína como agente terapéutico para la DM2 (Terruzzi, et. al, 2011, p. 198).

La dieta común de la población andina se compone de una variedad de granos y leguminosas. Una de las especies vegetales andinas más consumidas son los granos pertenecientes al género *Lupinus*. El *Lupinus* es una leguminosa herbácea, leñosa, que posee flores de diferentes colores y vainas (Porrás, 2010, p. 5). Entre sus características se destaca la capacidad de crecer en suelos pobres en minerales y en lugares de bajas temperaturas, otorgándole una mayor distribución al poder ser cultivada en varios ambientes (Porrás, 2010, p. 5). Entre las especies del género, *Lupinus mutabilis* crece en la región andina. Los nombres vernáculos de esta especie son altramuz andino, altramuz perla, altramuz de América del Sur, altramuz, tarwi, tarhui y en Ecuador se lo conoce como chocho. Es una semilla blanca cuyo contenido proteico es de aproximadamente el 40% (Jacobsen, 2006). El chocho se consume en gran cantidad en la región andina, en el continente europeo también existen especies de *Lupinus* igualmente consumibles como el *Lupinus albus*. Esta especie se caracteriza por generar frutos de mayor tamaño que el chocho andino, difiere en el sabor, color y otras características organolépticas (Jacobsen y Sherwood, 2002, p. 14).

En diferentes estudios se ha demostrado que el consumo de variedades de *Lupinus* o sus productos derivados reducen los niveles de glucosa en la sangre por lo que proteínas específicas en el *Lupinus* podrían interactuar con la insulina o la glucosa para disminuir la hiperglicemia (Terruzzi, et. al, 2011, p. 198). En el Ecuador existen estudios en los que se evalúa el efecto de consumo de chochos en individuos sanos e individuos que padecen de DM2 o hiperglicemia. Estos estudios demuestran que el consumo de la leguminosa por personas con niveles altos de glucosa disminuye los niveles de glucosa e insulina en sangre (Baldeón, et. al, 2011, p. 425). Además el consumo de chochos por individuos sanos no modifica las concentraciones de glicemia en estas personas. Por lo indicado el consumo de *L. mutabilis* corrige las alteraciones del metabolismo de la glucosa. Evidentemente, el consumo de chochos causa una mejoría en pacientes con DM2 mientras que no causa ningún efecto adverso en individuos sanos (Baldeón, et. al, 2012).

Actualmente se conoce que las conglutinas presentes en la especie *Lupinus albus*, que se consume en Europa, son de gran importancia. Existen cuatro tipos de conglutinas en esta leguminosa, α , β , γ y δ , siendo la γ -conglutina la de mayor interés en los estudios relacionados con la hiperglicemia. La función fisiológica de esta proteína no ha sido determinada con exactitud; sin embargo, es estructuralmente similar a las proteínas XEGIPs y TAXI-I, las mismas que actúan como glucosil hidrolasas y se encuentran en diferentes tipos de hongos. Se ha realizado la identificación de γ -conglutina en *L. albus* mediante secuenciación del cDNA (Scarafoni, et. al, 2009). Posiblemente la presencia de la proteína γ -conglutina sea la responsable en esta regulación hipoglicemiante, por lo que la administración oral de la proteína sí muestra eficacia en la modificación de la glucosa (Bertoglio, et. al, 2011, p. 937).

De igual manera, la identificación de los transcritos para las proteínas de almacenamiento, tres α -conglutinas, siete β -conglutinas, dos γ -conglutinas y cuatro δ -conglutinas, en semillas se realizó para *Lupinus angustifolius*. Los genes que codifican para este tipo de proteínas fueron caracterizados mediante secuenciación de los clones de cDNA derivados de semillas en crecimiento y se identificaron cuatro familias proteicas principales, entre las cuales se encuentra la γ -conglutina. Se concluyó que la γ -conglutina representa el 6% del contenido proteico en la semilla en *Lupinus angustifolius* (Foley, et. al, 2011).

Planteamiento del problema

La DM es hoy en día una de las principales causas de mortalidad en el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2012) y durante el año 2013, el 14% de las 63 104 defunciones generales registradas fueron a causa de la DM (INEC, 2013). El tratamiento convencional para la DM2 se basa en la administración de fármacos antidiabéticos, siendo las biguadinas los más comunes. La metformina es una biguanida de primera elección para el tratamiento de DM2, sin embargo, sus efectos adversos comprometen la salud de los pacientes y al interactuar con otros compuestos pueden inclusive favorecer la hiperglucemia

(Lorenzo, et. al, 2009, p. 637). En respuesta a esta enfermedad, en la actualidad no se han desarrollado en el país, investigaciones para tratamientos alternativos o complementarios a los tratamientos clásicos para este desorden metabólico, que representen una alternativa biológica para el control de la enfermedad.

Hipótesis

El gen γ -conglutina está presente y se expresa en la leguminosa de consumo ecuatoriano, *Lupinus mutabilis*, conocida comúnmente como chocho.

Alcance

El alcance de este trabajo de titulación es la identificación y comparación del nivel de expresión del gen codificante para la proteína γ -conglutina de tres variedades de *Lupinus mutabilis* cultivadas en el Ecuador, INIAP 450 Andino (Variedad 1), INIAP 451 "Guaranguito" (Variedad 2) y "Chocho criollo" (Variedad 3). Se pretendió identificar, mediante qPCR, PCR convencional, RACE y secuenciación, la presencia del gen γ -conglutina. La presencia de γ -conglutina en variedades de *Lupinus* andinas podría estar relacionada con el efecto hipoglicemiante que se ha evidenciado en estudios previos con el consumo de esta leguminosa en el país (Baldeón, et. al, 2012).

Además, se realizó la determinación y comparación de la expresión del gen de las semillas de *Lupinus mutabilis* con el fin de determinar la variedad que más γ -conglutina expresa y sugerir una potenciación en su producción a futuro.

Dentro de este trabajo de titulación se aplicaron varios conocimientos de biología molecular, genética molecular, ingeniería genética, y biomedicina, los cuales permitieron alcanzar el objetivo planteado y dilucidar la información necesaria para el futuro desarrollo de tratamientos para DM2 y otros tipos de hiperglicemia. La investigación se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación Traslacional de la Universidad de las Américas.

Justificación

La falta de estudios puntuales para determinar la presencia del gen γ -conglutina y conocer si este se expresa en las variedades de *L. mutabilis* hace que el presente estudio genético en las variedades andinas del Ecuador sea la base para iniciar futuros estudios de la proteína γ -conglutina. La identificación del gen y la medición de la expresión relativa contribuyen a justificar el efecto hipoglicemiante de *L. mutabilis* en la diabetes tipo-2 y por esta razón, es necesaria la realización de estos estudios ya que representan un avance importante en la búsqueda de alternativas para el tratamiento, control y prevención de Diabetes Mellitus; así también constituye la parte inicial de un proyecto de investigación de mucho mayor alcance que pretende desarrollar una alternativa de tratamiento de fácil acceso para combatir esta enfermedad.

Objetivos de la investigación

1. Objetivo General

Identificar la presencia del gen γ -conglutina, comparar su nivel de expresión en tres variedades de *Lupinus mutabilis* del Ecuador INIAP 450 Andino (Variedad 1), INIAP 451 "Guaranguito" (Variedad 2) y "Chocho criollo" (Variedad 3), y determinar la presencia de polimorfismos, intra-especie y con respecto a las secuencias del gen publicadas de *Lupinus albus* y *Lupinus angustifolius*.

2. Objetivos específicos

- Identificar la presencia del gen γ -conglutina en las variedades, INIAP 450 Andino (Variedad 1), INIAP 451 "Guaranguito" (Variedad 2) y "Chocho criollo" (Variedad 3) de *Lupinus mutabilis*.
- Determinar la presencia de polimorfismos en comparación con las secuencias reportadas de *Lupinus albus* y *Lupinus angustifolius* y

la presencia de polimorfismos asociados a la diferencia entre las variedades andinas de *Lupinus mutabilis*.

- Comparar el nivel de expresión relativa del gen γ -conglutina , en las variedades INIAP 450 Andino (Variedad 1), INIAP 451 "Guaranguito" (Variedad 2) y "Chocho criollo" (Variedad 3) de *Lupinus mutabilis* del Ecuador.
- Determinar el tamaño de la secuencia de cDNA del gen γ -conglutina de las variedades INIAP 450 Andino (Variedad 1), INIAP 451 "Guaranguito" (Variedad 2) y "Chocho criollo" (Variedad 3) de *Lupinus mutabilis* del Ecuador.

1. Marco Teórico

1.1. Diabetes

Entre las enfermedades crónicas no transmisibles, la diabetes mellitus (DM) es una de las enfermedades con mayor número de casos y de muertes en la actualidad. En el año 2013, el 76% de los casos de mortalidad debido a la DM en personas menores a los 60 años de edad se registró en África, seguido por un 55% de defunciones totales en el Sureste de Asia (IDF, 2013). La diabetes se clasifica en: 1) Diabetes Insulinodependiente o diabetes tipo 1, 2) Diabetes No Insulinodependiente o diabetes tipo 2 y 3) Diabetes gestacional (IDF, 2013). Sin embargo, varias clasificaciones denominan al tercer grupo como “Otros tipos de diabetes” en donde incluyen a algunos subtipos entre los que se destacan: 3.1) Diabetes gestacional y 3.2) Diabetes del adulto o diabetes MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young, en inglés) (Colino, s. f). Además, se habla de un grupo denominado también otros tipos de DM o diabetes específicas, casos que derivan de como consecuencia de otras enfermedades (Asociación Latinoamericana de Diabetes, s. f, p. 8). La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) ocurre cuando el organismo no utiliza eficientemente la insulina producida o simplemente no produce lo suficiente de esta hormona (IDF, 2013).

La insulina es una hormona producida por el páncreas y su principal función es la de permitir que las células del organismo transporten la glucosa como producto del metabolismo de los alimentos. Este transporte a su vez permite que la glucosa sea utilizada como energía y cuando no ocurre esto de manera apropiada, grandes cantidades de glucosa quedan libres circulando por el torrente sanguíneo, denominando esta condición como hiperglicemia (IDF, 2013).

Si bien es cierto que la diabetes afecta al metabolismo de los hidratos de carbono, las afectaciones son de distinta índole y también afecta al metabolismo proteico y lipídico del organismo, afectando varios tejidos y

desencadenando complicaciones graves y mortales. Entre las manifestaciones clínicas evidentes de DM2 están la pérdida de visión, complicaciones renales, afectación vascular, cardiopatías e inclusive el desarrollo de enfermedades cerebrales e intestinales graves. La DM2 genera un cuadro clínico tan amplio que puede empezar por simples desórdenes catabólicos hasta alcanzar problemas crónicos y en algunos casos mortales (Tébar y Escobar, 2009, p. 1).

1.1.1. Epidemiología

El incremento de casos de diabetes alrededor del mundo es evidente debido al exceso de sedentarismo y a la falta de educación nutricional y buena alimentación, entre otros factores de riesgo causados por los cambios en estilo de vida (González, et. al, 2013, p. 4). Para el año 2011, la OMS calificó a la diabetes como la séptima causa de mortalidad en el mundo. En el 2013, la International Diabetes Federation (IDF) identificó más de 380 millones de personas diagnosticadas con diabetes alrededor del mundo y ha estimado que para el 2035 el incremento será del 55%, existiendo aún personas no identificadas y no diagnosticadas. Asimismo, la OMS ha afirmado que la diabetes es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y se estima que será la séptima causa de mortalidad para el año 2030 (OMS, 2012). Además, los territorios con mayor número de casos son el centro y sur de África, y el área comprendida entre el Medio Oriente y el norte de África (IDF, 2013).

Respecto a Latinoamérica, el incremento en casos de diabetes para el 2035 será del 59,8% (IDF, 2013) y la enfermedad será una de las principales causas de mortalidad y morbilidad. En el Ecuador, existen más de 530.000 personas diagnosticadas con diabetes en el 2013 (MSP, 2013). Además, la prevalencia actual de la enfermedad para la población de 50 a 59 años es de 10,3% como se observa en Gráfico 1, enfatizando el incremento de casos de la enfermedad a partir del tercer decenio (ENSANUT, 2013). En la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición se reportó que la prevalencia de diabetes es mayor en el área urbana con un 3.2% concluyendo que Quito y la Costa urbana son las regiones

que presentan mayor número de casos. Cabe recalcar que dentro de esta encuesta no se toman en cuenta las personas con diabetes bajo tratamiento con niveles de glicemia normales al momento de la medición debido a que no registra antecedente de la enfermedad (ENSANUT, 2013).



1.1.2. Diabetes tipo 2

La diabetes tipo 2 (DM2) o diabetes no Insulinodependiente (DNID) es el tipo de diabetes más común con más del 90% de los casos de DM a nivel mundial (Cano-Pérez, et. al, s. f, p. 7). Se caracteriza por la no utilización eficiente de la

insulina, es decir, implica la resistencia a la acción periférica de la insulina, a una secreción defectuosa de la hormona o ambas. La resistencia a la insulina puede mejorar si llega a existir una reducción de peso y/o tratamiento farmacológico de la misma, sin embargo, los niveles de insulina nunca llegan a normalizarse (American Diabetes Association, 2010, p. S64). Existen varios factores que promueven la DM2 y es frecuente que la mayoría de personas con diabetes tipo 2 presentan obesidad abdominal, cuya condición desencadena el síndrome metabólico, y por lo tanto, la resistencia a insulina aparece (Tébar y Escobar, 2009, p. 3). Es importante considerar que el riesgo de aparición de la DM2 aumenta debido a factores como peso, edad, sedentarismo, es muy común en personas con hipertensión y con dislipidemia, así como en mujeres que han padecido diabetes gestacional en el pasado (American Diabetes Association, 2010, p. S64). Además, se cree que existe predisposición genética aunque esto no está claramente definido (Medical Biochemistry, 2013) e inclusive esta predisposición genética es mayor en este tipo de diabetes que en el subtipo autoinmune de DT1 (American Diabetes Association, 2010, p. S64).

En varios estudios, muchos científicos han determinado que la diabetes tipo 2 es un padecimiento de factores ambientales y genéticos, siendo una enfermedad poligenética. Como resultado de estos y otros factores, defectos de sensibilidad y de secreción insulínica coexisten y son las causas de la fisiopatología de la DM2 (Conget, 2002).

1.1.2.1. Tratamiento convencional

El tratamiento para el desorden metabólico de DM siempre depende del tipo de diabetes que el individuo presente. Un paciente de DM2 requiere insulino terapia cuando la persona presenta una descompensación metabólica aguda severa, el tratamiento convencional de la DM2 es la administración de hipoglicemiantes orales. De acuerdo a la Guía ALAD para la DM2, el momento indicado para iniciar un tratamiento con fármacos antidiabéticos es cuando la

persona que padece DM2 no ha logrado mejoría con cambios terapéuticos en el estilo de vida, es decir, una reducción gradual de las glucemias.

Existen varios tipos de antidiabéticos orales que son seleccionados basándose en su efectividad, mecanismo de acción, potencia, contraindicaciones, efectos secundarios y costo (Aschner, et. al, s. f, p. 25). Entre los más comunes están las biguanidas, fármacos que actúan directamente sobre la resistencia a la insulina. Para 1960, la metformina, fenformina y buformina pertenecían al grupo de las biguanidas, sin embargo, las dos últimas, debido a su relación con un cuadro de acidosis láctica, fueron retiradas del mercado (Cialzeta, 2009, p. 16). En la actualidad, la metformina es un antidiabético oral de primera línea muy utilizado. Su principal función es de reducir la gluconeogénesis hepática y en efecto reducir la absorción intestinal de la glucosa. Asimismo, a pesar de que no estimula la secreción de insulina, sí potencia los efectos de la hormona en tejidos periféricos (Cialzeta, 2009, p. 17).

La absorción de esta biguanida se da rápidamente en el intestino teniendo una biodisponibilidad oral que puede alcanzar el 60%. Además, no se une a proteínas plasmáticas y es fácilmente excretada de forma activa por el riñón (Velásquez y col., 2009, p. 636). Sin embargo, existen ciertos efectos colaterales y contraindicaciones producto de la administración de metformina en los que se destacan: trastorno en la absorción de Vitamina B12, probabilidad de acidosis láctica, posibles alteraciones como diarrea, náuseas y vómito. Además, se han reportado casos de insuficiencia renal, insuficiencia hepática e inclusive descompensación cardíaca (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2011, p. 24). De igual manera, no es recomendable el uso de esta biguanida durante el embarazo y la lactancia, enfermedades del hígado, alcoholismo, entre otras (Cialzeta, 2009, p. 19).

Otros fármacos utilizados son las sulfonilureas, clasificadas dentro de generaciones según las características fármaco-dinámicas que presentan sus principios activos. Por ejemplo, las sulfonilureas de "última generación", tales como la Glimepirida y Glicazida, son las preferidas debido a su capacidad de disminuir en un 1,5% los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c), además

de sus efectos favorables sobre el sistema cardiovascular, endotelial y sobre las células β (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2011, p. 24). Sin embargo, existen ciertos efectos colaterales y contraindicaciones producto de la administración de sulfonilureas como: hipoglicemia, reacciones alérgicas, problemas digestivos, intolerancia al alcohol y muy infrecuentemente, ictericia y problemas hematológicos (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2011, p. 26). Además, pueden interactuar desfavorablemente con sustancias tales como el ácido acetilsalicílico y los betabloqueantes (Rodelgo, 2012).

1.1.2.2. Nuevas alternativas de tratamiento

, las investigaciones para buscar alternativas y nuevos tratamientos para la enfermedad se incrementan. Recientemente, el descubrimiento de la segregación de incretinas, factores que incrementan la respuesta de células β y suprimen la secreción de glucagón, por parte del intestino luego de la ingestión ha contribuido con el desarrollo de mejores terapias. El estudio de glucagón y procesos a nivel de riñón que impiden una reabsorción adecuada de glucosa en un individuo con hiperglicemia, han permitido que se definan nuevas alternativas de tratamiento para la DM2 (Piemonte, 2011). Por lo tanto, según Bianchi y Del Prato, 2011, los nuevos tratamientos farmacológicos se clasifican según su objetivo en nuevas terapias para:

- Mejoramiento de la función de células β :

Actualmente, los fármacos de mayor interés son agentes que apuntan al sistema de las incretinas y que estén diseñados para aumentar la disponibilidad de la hormona GLP-1 (glucagón-like peptide-1, en inglés) o péptido análogo del glucagón. Una de las funciones principales de esta hormona intestinal es potenciar la segregación de insulina dependiente de glucosa y la supresión de glucagón; además, interviene en la reducción de la ingesta de alimentos y la pérdida de peso (Gil-Hernández, 2010, p. 436). La función de interés en el tema de diabetes es la capacidad de GLP-1 de prevenir la pérdida de células β en animales que padecen de la enfermedad y favorece al sistema cardiovascular y reduce la probabilidad de infarto miocárdico. Sin embargo,

GLP-1 en su estado puro es degradada rápidamente en el torrente sanguíneo por la enzima peptidasa DPP-4 y es por esta razón que las nuevas terapias buscan el desarrollo de agonistas del receptor de GLP-1 resistentes a DPP-4, como la exenatida y liraglutida, y el uso de inhibidores de DPP-4, como la sitagliptina, linagliptina, alogliptina, entre otros. Es importante considerar que anteriormente se inyectaban estos fármacos, sin embargo, actualmente se administran oralmente y aunque no tienen efectos adversos significativos, los agonistas presentan una intervención importante en la pérdida de peso mientras que los inhibidores DPP-4 no. Sin duda, el agonista más estudiado es la exenatida, que hoy en día presenta menores efectos colaterales y se requiere de su administración sólo una vez por semana. De igual manera, la linagliptina es el inhibidor de DPP-4 preferido al mejorar el control glicémico y al ser el único que no se excreta mediante el riñón (Bianchi y Del Prato, 2011, p. 28).

Por otro lado, la glucocinasa es de interés para la secreción de insulina. Esta enzima fosforila y regula el metabolismo de la glucosa en las células β del páncreas justamente para favorecer la liberación de insulina. Se conoce que activadores de la glucocinasa mejoran su eficacia y al expresarse también en el hígado, existe mejor consumo de glucosa y deposición de glucógeno. Sin embargo, uno de los mayores riesgos de la utilización de estos compuestos es la hipoglicemia (Bianchi y Del Prato, 2011, p. 29).

- Mejoramiento del metabolismo hepático de la glucosa:

Generalmente, en personas con DM2, la eficacia del efecto del glucagón de elevar el nivel de glucosa en la sangre aumenta. Es por esto que para favorecer al metabolismo hepático, los nuevos tratamientos se basan en un efecto anti-glucagón mediante el uso de anticuerpos o antagonistas de los receptores de glucagón (Bianchi y Del Prato, 2011, p. 30). Actualmente, el desarrollo de inhibidores metabólicos de la glucosa podría ser la principal alternativa.

- Mejoramiento de la sensibilidad de la insulina

Para el tratamiento de DM2 existen dos fármacos disponibles en el mercado que actúan como sensibilizadores de la insulina: metformina y pioglitazona (agonista de PPAR-gamma, receptor gamma que estimula la proliferación de peroxisomas). Como parte de los estudios para el desarrollo de nuevas terapias, los agonistas PPAR-alpha/gamma o “glitazares”, evolución de los “glitazones,” son el foco de atención debido a que la activación simultánea de PPAR-gamma y PPAR-alpha tienen efectos positivos en el metabolismo de lípidos y glucosa. El agonista de este tipo más estudiado es el alglitazar, que ya ha demostrado su intervención en el mejoramiento del control glicémico. A pesar de que sigue presentando retención de fluidos como su principal desventaja, no se ha reportado ningún caso de falla cardíaca y se considera más eficaz y con mejor perfil lipídico que la pioglitazona. Actualmente, alglitazar se prueba en ensayos clínicos a grande escala para determinar su capacidad de reducir riesgos cardiovasculares en personas con diabetes y enfermedad coronaria.

Por otra parte, también se han investigado las PTPs (Protein Tyrosine Phosphatases, en inglés), reguladores negativos en la cascada de señalización de la insulina que desfosforilan los receptores de insulina, como posibles alternativas de tratamiento. Por ejemplo, la reducción de la presencia de la proteína PTP-1B mejora la sensibilidad de la insulina, el metabolismo de la glucosa y además previene la obesidad en modelos animales que han sido alimentados desordenadamente. De igual manera, inhibidores selectivos de la enzima 11 β -HSD1 (11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1, en inglés, cataliza la conversión de cortisona inactiva en cortisol activa) se analizan para el tratamiento de DM2 y otros componentes dentro del síndrome metabólico ya que esta enzima puede normalizar el exceso de glucocorticoides en el tejido y reducir la obesidad, resistencia a la insulina, entre otras. (Bianchi y Del Prato, 2011, p. 31).

- Reducción de la toxicidad de la glucosa:

Debido a que un cuadro de hiperglicemia crónica produce un efecto tóxico en la secreción y acción de la insulina (Tébar y Escobar, 2008, p. 299), la disminución de las concentraciones de glucosa plasmática es clave para mantener la homeostasis y evitar futuras complicaciones. Los inhibidores del co-transportador 2 de glucosa sódica (SGLTP2) hoy en día están dentro de la clase de fármacos reductores de glucosa. La principal función de los inhibidores selectivos de SGLTP2 es incrementar la excreción de glucosa a través de la orina reduciendo así la concentración de glucosa plasmática sin depender de la insulina, el riesgo de hiperglicemia e inclusive la reducción de la presión sanguínea. El inhibidor de este tipo más estudiado es la dapagliflozina, que bajo su uso se ha reportado el incremento en la tasa de infecciones urinarias, sin embargo, su gravedad es prácticamente nula al intervenir con tratamientos comunes, que consisten de un amplio grupo heterogéneo de drogas sintéticas (Bianchi y Del Prato, 2011, p. 31).

1.2. Leguminosas

Durante muchos años, las leguminosas al igual que los cereales, frutas y raíces tropicales han conformado la alimentación humana (CICO, 2009, p. 3), siendo base fundamental para la evolución y adaptación. En la dieta tradicional andino-ecuatoriana, las leguminosas son componentes infaltables y representan uno de los rubros agrícolas más importantes de la economía andina. En conjunto con las oleaginosas, las leguminosas son fuente rica de proteínas y entre las más comunes en el Ecuador y en el continente latinoamericano se destacan la soya, el algodón, y el girasol como oleaginosa, entre otras (Porrás, 2010, p. 3). Varias leguminosas constituyen el grupo de alimentos tradicionales que se consumen en nuestras poblaciones desde los inicios y en la actualidad, son de gran interés para la industria alimentaria gracias a sus proteínas altamente funcionales y beneficiosas para la salud humana.

La familia Fabaceae o también conocida como Leguminosae se compone de plantas dicotiledóneas que reúne árboles, arbustos y hierbas anuales y perennes. Se caracterizan porque a su fruto, al igual que su nombre, se lo denomina legumbre, es decir, un tipo de fruto que crece dentro de vainas; además, sus hojas son compuestas y estipuladas, característica diferenciada de las leguminosas. En la actualidad, la familia Leguminosae se compone de tres subfamilias principales, Caesalpinoideae, Mimosoideae y Papilionoideae, que a su vez están constituidas por más de 700 géneros que incluyen un sinnúmero de especies (Stevens, 2006).

El área geográfica donde crecen las leguminosas se ha concluido que depende de factores importantes tales como la humedad, la temperatura y el cambio temporal de las condiciones ambientales causante de un cambio prolongado en el ecosistema (disturbio). En base a estos, varias bibliografías reconocen cuatro biomas esenciales de las leguminosas: 1) bosques tropicales secos y matorrales, intolerantes al fuego (disturbio) y semiáridos, 2) bosques tropicales estacionalmente secos, abiertos y tolerantes al fuego, 3) bosques tropicales húmedos y 4) climas templados en el hemisferio norte y sur (Grether, 2005, p. 75). Muchos géneros de leguminosas pudieron ser ubicadas en los distintos biomas mencionadas anteriormente, sin embargo, existen especies que comparten biomas o se encuentran en medio de dos debido a sus diversificaciones y adaptaciones que ha desarrollado la planta.

1.3. Lupinus mutabilis

El lupino o chocho como se lo conoce en el Ecuador es un grano perteneciente al género *Lupinus* que ha servido de alimento durante varios años para la población andina. *Lupinus* es una leguminosa herbácea, leñosa, que posee flores de distintos colores y vainas (Porras, 2010, p. 5). Tiene la capacidad de crecer en suelos pobres en minerales y en lugares de temperaturas bajas, otorgándole una mayor distribución al poder ser cultivada en distintos ambientes (Porras, 2010, p. 5). La especie propia de la zona andina es *Lupinus mutabilis* Sweet y su fruto es conocido como chocho, tarvi, tarhui o tarwi

(Jacobsen y Sherwood, 2002, p. 14). Su distribución comprende los países andinos de Ecuador, Perú y el norte de Bolivia, y solamente en estos territorios se han encontrado más de 80 especies del género *Lupinus*.

En el Ecuador, el chocho es cultivado como leguminosa andina nativa que representa un rubro primario al ser comercializada ampliamente y ser un alimento de fácil acceso para las distintas poblaciones que de este requieran (FAO, s. f). El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) tiene una colección vegetal de *Lupinus*, siendo la mayoría de especies cultivadas en territorios ecuatorianos. Según varios estudios, la variación genética de estas variedades es debido al cruce producido por los propios agricultores y por mutaciones entre cultivares (Falconí, 2012, p. 12). Adicionalmente, el



Figura 3. *Lupinus mutabilis* Sweet, chocho andino.
Tomado de: Bolster, 2014.

chocho muestra esta diversidad genética en base a las diferencias que se presentan en estructura de la planta, tolerancia a distintos suelos, temperatura, periodo vegetativo, alcaloides, resistencia a plagas, entre las diferentes especies (Jacobsen y Mujica, 2006, p. 459).

1.3.1. Características generales

La especie *Lupinus mutabilis* generalmente se auto-poliniza, pero también existen algunos casos de polinización cruzada, hecho que depende de las condiciones ecológicas y la ubicación donde la planta crece. (Falconí, 2012, p. 13). Sus características agronómicas principales comprenden: su período vegetativo común que dura aproximadamente entre 140 y 233 días, días de floración de 56 a 86 días, contenido de alcaloides, entre otros (Jacobsen y

Mujica, 2006, p. 460). Generalmente, *L. mutabilis* puede llegar a medir dos metros de altura sin ramificaciones notables. En el tallo principal pueden crecer hasta 18 hojas, siendo las ramificaciones más maduras las que se encuentran más arriba.

Se conoce que dentro de su valor nutricional posee un alto contenido de aceites y proteínas (35-45%), siendo las especies silvestres más ricas en proteínas, y por esta razón, el interés por cultivar el chocho ha ido en incremento (Jacobsen y Mujica, 2006, p. 462). El rendimiento del grano es de 800 a 2700 kg/ha, aunque se ha reportado un rendimiento de hasta 8000 kg/ha cuando el cultivo recibe todos los requerimientos necesarios y ha sido manejado adecuadamente. De igual manera, otro de los intereses de la semilla de *Lupinus* es sus beneficios para la salud que incluyen la influencia del grano en el control glicémico (Hodgson y Ping, 2008).

1.3.2. Contenido proteico

En la actualidad, el interés de cultivar chochos se debe a su significativo valor nutricional que se encuentra almacenado en sus cotiledones, así como también por su rendimiento al alcanzar 765 kg de producción de proteína por hectárea (Villacrés, et. al, 2009, p. 6). Es una fuente valiosa de aceites, grasas y especialmente de proteínas al contener un 35 a 45% de componente proteico, siendo este mayor en los granos del género *Lupinus* que en otras leguminosas como la soya, fréjol y chícaro (Porrás, 2010, p. 8) como se observa en la Tabla 2. Justamente, el fitomejoramiento busca aumentar el contenido proteico y por esta razón es distinto entre las variedades estudiadas. La variedad INIAP 450 Andino, mejorada a partir de ecotipos locales con el objetivo de aumentar su rendimiento y otorgar a la planta cierta susceptibilidad a plagas, se caracteriza por poseer un grano seco de color crema y forma redonda que contiene 45.02% de proteína (INIAP, 2010). Asimismo, la variedad INIAP 451 "Guaranguito" modificada para alcanzar tolerancia a enfermedades, y aumento en el número de vainas por planta y granos por vaina, posee un grano de

tamaño mediano y de color blanco y su contenido proteico es menor a la variedad INIAP 450 con 42.7% de proteína (INIAP, 2010).

Las proteínas que contiene el chocho son estudiadas a profundidad debido a ciertas funciones específicas de interés. Entre estas funciones se destaca el uso del chocho como un alimento saludable rico en ácidos grasos favorable para las personas con sobrepeso crónico (Jacobsen y Sherwood, 2002, p. 14). De igual manera, destaca la capacidad reguladora del liofilizado proteico de *Lupinus*. En relación con otras leguminosas, la diferencia en contenido proteico es considerable, siendo rico en lisina (Jacobsen y Sherwood, 2002, p. 14). Se cree que el consumo constante de chochos mejorará la salud de poblaciones en condiciones desfavorables no solo por su contenido proteico, sino por los porcentajes de grasa que permiten nutrir adecuadamente.

Tabla 1. Comparación de la composición de *L. mutabilis* (tarwi) y *Glycine max* (soya).

Componente	Tarwi	Soya
Proteína	44.3	33.4
Grasa	16.5	16.4
Carbohidratos	28.2	35.5
Fibra	7.1	5.7
Ceniza	3.3	5.5
Humedad	7.7	9.2

Adaptado de: Jacobsen y Sherwood, 2002, p. 14.

La distribución de las fracciones proteicas presentes en *Lupinus* consiste de albúminas y globulinas, siendo las albúminas más ricas en aminoácidos esenciales. Las albúminas componen una unidad de proteínas heterogénea al contar con fracciones de distintos pesos moleculares que forman complejos con ácidos nucleicos y carbohidratos. Por otra parte, las globulinas son solubles en soluciones salinas y se destacan por su contenido de aminoácidos y su tamaño. Se conoce que en la variedad de Europa, *Lupinus albus*, las globulinas fueron fraccionadas, obteniendo las denominadas conglutinas.

Mediante electroforesis, se obtuvo cuatro tipos: α , β , δ y γ (Porras, 2010, p. 9). De las conglutinas α y β se sabe que su función principal es la de almacenamiento y su naturaleza es ácida, la cual se mostró mediante enfoque isoeléctrico (Duranti, et. al, 2008). Sin embargo, las tipo α y γ tienen funciones aún desconocidas, a pesar de que se ha descrito en el estudio de Duranti, 2008 la naturaleza básica de la γ -conglutina (Porras, 2010, p. 9).

1.3.2.1. Proteína γ -conglutina

La γ -conglutina es una glicoproteína homotetramérica de la semilla de *Lupinus* (Scarafoni, et. al, 2010, p. 143). Además, compone el 5% de las globulinas totales de la semilla, y si bien ha sido caracterizada molecularmente, su función fisiológica es aún desconocida. La proteína está compuesta por dos subunidades vinculadas mediante un puente disulfuro derivadas de un precursor que se sintetiza durante el desarrollo de la semilla y son de aproximadamente 30 y 17 kDa, respectivamente (Bertoglio, et. al, 2011, p. 934). Entre las funciones de la γ -conglutina, se conoce que se une a iones metálicos divalente como el zinc y el nítrógeno e inclusive a la insulina (Scarafoni, et. al, 2010, p. 143). A pesar de que no se ha determinado aún una función específica de la proteína, desde el punto de actividad biológica, la γ -conglutina pura que ha sido administrada oralmente reduce eficientemente la glucosa plasmática en ratas que presentan sobrecara de glucosa y además son dosis-dependiente (Bertoglio, et. al, 2011, p. 934). Esta actividad similar a la de la insulina también ha sido descrita en un estudio realizado en mioblastos de ratón (Terruzzi, et. al, 2011, p. 198). De igual manera, el estudio del efecto de la proteína γ -conglutina en humanos se realizó mediante la administración de la misma en distintas dosis. La dosis intermedia, correspondiente a 1500 mg, dio el máximo efecto en reducción de glicemia durante un período de evaluación de 180 minutos a partir de la administración oral (Bertoglio, et. al, 2011, p. 938).

1.3.3. Factores antinutricionales

Dentro del contenido químico de los chochos existen sustancias antinutritivas que amenoran el beneficio nutricional y el consumo del grano. Entre los factores que se destacan están las saponinas, estrógenos, cianógenos, fitatos, oligosacáridos como la rafinosa y los alcaloides (Porras, 2010, p. 10), siendo este último el que presenta mayor riesgo al estar en mayor concentración que los demás con un 3,7% en la especie *L. mutabilis* (Villacrés, 2014). Para el consumo tradicional del chocho, el grano es cultivado y sufre un proceso de desamargado para deshacerse del carácter tóxico propio del grano (Villacrés, et. al, 2009, p. 6). Cabe mencionar que para la salud humana estas sustancias son tóxicas e inclusive teratogénicas, de igual manera para el ganado que se alimenta de la planta (Zamora-Natera, et. al, 2009, p. 672). Como resultado del proceso de desamargado, el desecho es una sustancia de color marrón que son los alcaloides. Los alcaloides en el chocho, de igual manera presentes en todas las especies del género *Lupinus*, son de naturaleza básica y de tipo quinolizidínico al poseer quinolizidina, un heterociclo nitrogenado bicíclico. Generalmente, estos compuestos se encuentran en las ramas y semillas, aunque se distribuyen en toda la planta (Villacrés, et. al, 2009, p. 6).

En la actualidad, muchos agricultores se benefician de los alcaloides para combatir plagas y enfermedades que afectan al cultivo (Ortega, et. al, 2010, p. 112). Por esta razón, son varios los estudios que han logrado obtener el extracto alcaloideo con el fin de determinar las funciones específicas de cada componente al fraccionar el extracto completo (Zamora-Natera, et. al, 2009, p. 674). Entre los alcaloides más comunes se encuentran la afillina, epiafilina, esparteína y sus distintas isoformas y, lupanina y sus distintas isoformas y en el caso de los alcaloides provenientes de la especie *Lupinus angustifolius*, ya se han determinado sus funciones antibacterianas contra cepas de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Porras, 2010, p. 10). De la misma forma, en el Ecuador ya se ha comprobado la actividad antimicrobiana de *L. mutabilis* contra *S. aureus* y *Escherichia coli* (Villacrés, et. al, 2009, p. 12).

1.3.4. Otras especies domesticadas del género *Lupinus*

1.3.4.1. *Lupinus albus*

A *L. albus* también se lo conoce como Lupino Blanco o White Lupin, en inglés. Es una planta anual que puede llegar a medir de 30 a 120 centímetros de altura. Como característica definida, la planta posee su corola generalmente de color blanco, pero también se han observado de color grisáceo o azul claro, y sus semillas son cuadradas y blancas y están decoradas por puntos color salmón y café oscuro (Kurlovich, 2002). A diferencia de nuestro chocho andino, sus frutos son de mayor tamaño y tienen ciertas diferencias en el sabor. Además, al remover la cáscara, el grano es de color anaranjado oscuro, difiriendo así de *L. mutabilis*. Su distribución geográfica comprende toda la región mediterránea, pero existen variedades en Egipto, donde la coloración de la corola es más oscura y sus semillas más pequeñas (Kurlovich, 2002).

En cuanto al contenido nutricional de *L. albus*, estudios han demostrado que existe una variabilidad intraespecífica del contenido proteico. Generalmente, el porcentaje de proteínas de la especie es de 33-53,7%, pero en ambientes húmedos subtropicales es de 55% (Kurlovich, 2002).

1.3.4.2. *Lupinus angustifolius*

Algunos de los nombres comunes de *L. angustifolius* son Lupino Azul o Lupino de hoja estrecha, Narrow-leafed Lupin, en inglés. A pesar de que sus características dependen del área donde habite la planta, las variedades silvestres por lo general poseen vainas estrechas, hojas y semillas más pequeñas que otras especies y no se la considera una planta de altura. La coloración de la semilla varía mucho considerando el área geográfica e incluye una gama de color que va desde el gris oscuro y café grisáceo, fruto de plantas con flores rosadas, con puntos claros de distinto tamaño hasta gris claro y blanco, fruto de plantas con flores blancas y lilas (Kurlovich, 2002). *L. angustifolius* tiende a crecer en suelos ventilados como el campo, cerca de

hierbas, al lado de reservorios e inclusive en arenas alledañas a los perfiles costeros. Su distribución geográfica comprende los países de Irán, Turquía, Grecia, aunque es ampliamente cultivada en el norte de Europa, Sureste de Estados Unidos y Nueva Zelanda.

Con respecto al contenido nutricional, estudios que se desarrollaron en pollos determinaron menor valor nutricional de esta especie en comparación con *L. albus*. Si bien es cierto que *L. angustifolius* contiene entre 27 y 30% de proteínas (Rojas y Catrileo, 1998), esta cantidad es inferior a las de otras especies de *Lupinus*.

1.3.4.3. *Lupinus luteus*

L. luteus o también conocida como Altramuz Amarillo, Lupino Amarillo o Lupino Gelbe es una especie anual, aunque existen especies silvestres cuatrienales y bienales, que crece hasta 80 centímetros de altura con ramificaciones basales. Como su nombre lo indica, su corola es de color amarillo brillante, sus vainas son largas y vellosas y sus semillas son esféricas de coloración variable, desde cafés rosados y amarillentos hasta violetas oscuros. Cabe recalcar que estas características dependen de la ubicación de la planta y se expresan menos que en la especie *L. angustifolius* (Kurlovich, 2002). Esta especie prefiere suelos arenosos y volcánicos, poseyendo una distribución geográfica amplia que comprende el área costera de la parte oeste de la Península Ibérica, Marruecos, Túnez, Algeria e Islas y el sur de Italia. Se han encontrado algunas variedades en Israel, Líbano y al norte de Francia, pero principalmente *L. luteus* es cultivado en el norte de Europa, Bielorrusia, Ucrania y en menor cantidad en el oeste de Australia y Sudáfrica.

Por otra parte, *L. luteus* posee alrededor del 37% de proteína total, sin embargo, dentro de esta medición se incluye al nitrógeno no proteico lo que deja al porcentaje en 26% de proteína verdadera (Gil y Ruiz, 2010, p. 157). A pesar de que representa un valor nutricional importante, *L. mutabilis* y otras especies domesticadas de *Lupinus* son más ricas en proteínas y es por esta razón la preferencia de cultivar estas otras.

2. Materiales y Métodos

2.1. Lugar de desarrollo

Este trabajo de titulación se lo realizó en el área de biología molecular del Centro de Investigación Traslacional, ubicado en el bloque cinco de la sede Queri de la Universidad de las Américas. Las extracciones de ácidos nucleicos, reconstitución de cebadores, reconstitución de kits comerciales, preparación de mezclas para PCR, qPCR, RT-qPCR, y 5'RACE y 3'RACE se realizaron en cámara de flujo laminar clase II A2 en un medio de trabajo estéril pre tratado con nucleasas y luz ultravioleta.

La secuenciación del fragmento de PCR para la identificación de la presencia del gen γ -conglutina se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de las Américas. La secuenciación de los productos de 3' y 5' RACE se realizó en el área de biología molecular de Netlab Laboratorios Especializados.

2.2. Muestras de *Lupinus mutabilis*

Las tres variedades de *Lupinus mutabilis* que formaron parte de este estudio fueron provistas por la Ing. Elena Villacrés del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIAP. La denominada Variedad 1 corresponde al híbrido INIAP 450 Andino, la Variedad 2 a INIAP 451 "guaranguito", ambas cultivadas dentro del Centro de Investigaciones Santa Catalina, y finalmente la Variedad 3 corresponde al llamado "chocho criollo", que es la leguminosa comúnmente cultivada por los agricultores en el Ecuador.

2.3. Métodos

2.3.1. Estrategia experimental

En la Figura 4 se ilustra el desarrollo experimental de la investigación:

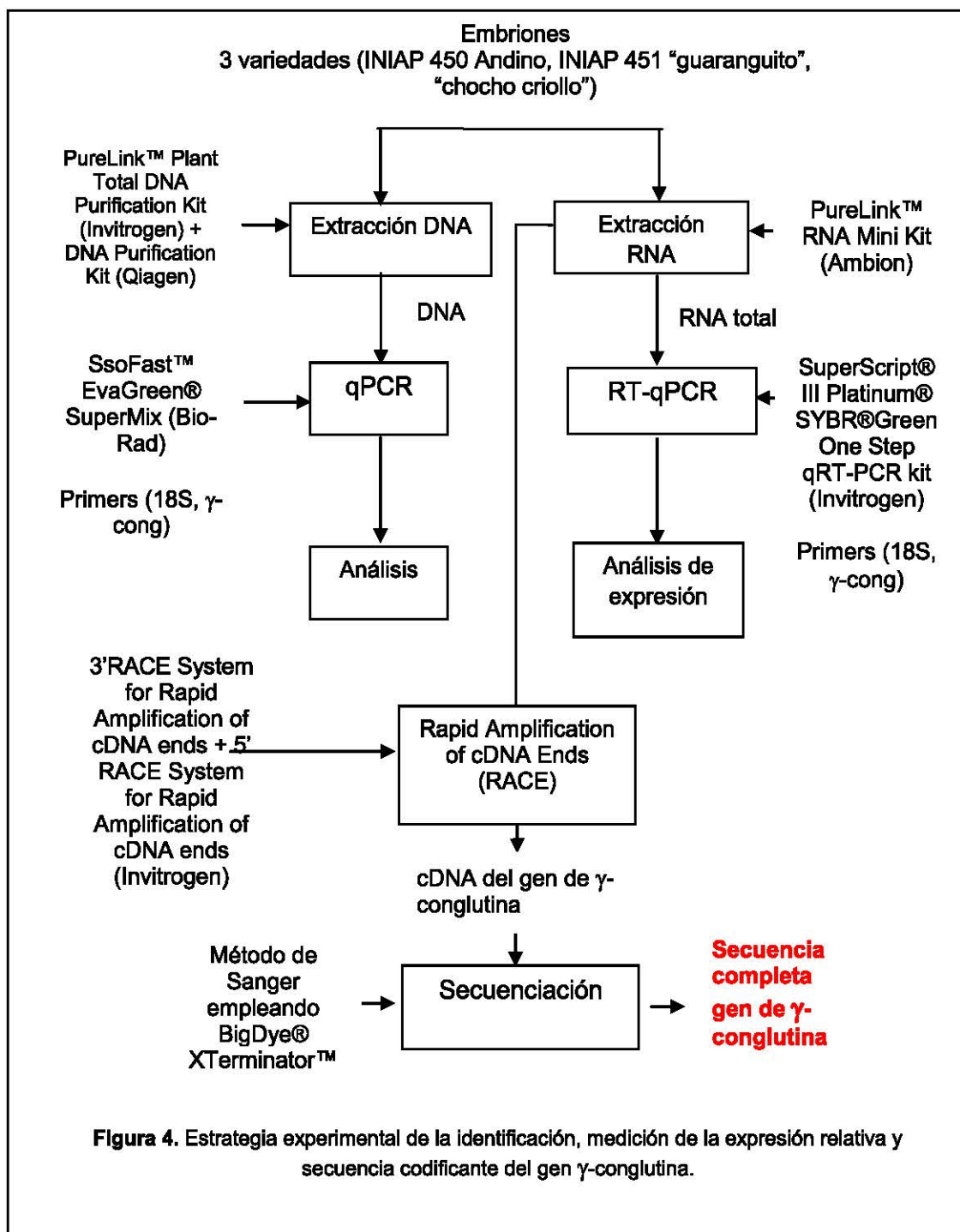


Figura 4. Estrategia experimental de la identificación, medición de la expresión relativa y secuencia codificante del gen γ -conglutina.

2.3.2. Almacenamiento de las muestras

Las semillas secas de las variedades INIAP 450 Andino, INIAP 451 “Guaranguito” y “Chocho criollo” se almacenaron en bolsas con cierre plástico, a temperatura ambiente, en oscuridad, en el área de laboratorio general correctamente etiquetadas.

2.3.3. Diseño de cebadores

Se utilizaron dos pares de cebadores para la identificación y medición de la expresión del gen γ -conglutina. Un par para el gen 18s y un par para el gen γ -conglutina, denominado “ γ -cong”, diseñados a partir de la secuencia del gen *Lupinus albus*, clon 48, para la proteína γ -conglutina, reportada por Scarafoni, et. al. en el 2005. Se accedió a la secuencia en la base de datos de NCBI con el código de acceso AJ297568.2 y los cebadores fueron escogidos utilizando la herramienta “Pick Primers” dentro del menú de análisis de la secuencia.

Tabla 2. Cebadores utilizados en este estudio para la identificación de la presencia y medición de la expresión relativa del gen γ -conglutina en *L. mutabilis*.

Nombre del cebador	Secuencia en dirección 5' → 3'	Tamaño (bp)
18S F	ATG ATA ACT CGA CGG ATC GC	20
18S R	CTT GGA TGT GGT AGC GCT TT	20
γ -cong F	AGC CAA CTC TCA CCA TTG CT	20
γ -cong R	TTG TTT GGG AGA CCC TTT TG	20

2.3.4. Extracción de ácidos nucleicos

2.3.4.1. Extracción de DNA para la identificación del gen γ -conglutina

La extracción del DNA genómico de las tres variedades de *Lupinus mutabilis* se hizo mezclando los reactivos de dos kits comerciales, PureLink™ Plant Total DNA Purification Kit de Invitrogen (kit 1) y QIAamp® DNA Mini Kit de Qiagen (kit 2).

Se partió de 100mg de embriones de cada variedad de *L. mutabilis*, se los maceró con nitrógeno líquido y la muestra pulverizada se colocó en un tubo Eppendorf® estéril de 1,5 ml. Se añadieron 250 μ l de buffer R2 del kit 1, se agitó por vórtex hasta homogenizar y se adicionaron 15 μ l de SDS 20% y 30 μ l de RNasa A, se incubó a una temperatura de 55C por 15 minutos. Posteriormente se añadieron 180 μ l del buffer ATL del kit 2 y 30 μ l de proteinasa K, se mezcló por vórtex durante 15 segundos y se incubó a una temperatura de 56C overnight. El lavado y la elución se realizaron como lo indica el inserto del kit QIAamp DNA Mini Kit de Qiagen.

2.3.4.2. Extracción de RNA para la determinación de la expresión del gen γ -conglutina y RACE

Para la extracción de RNA se partió de 100 mg de embriones de cada variedad de *L. mutabilis*, se los maceró con nitrógeno líquido y la muestra pulverizada se colocó en un tubo Eppendorf® estéril de 1,5 ml. Se utilizó el kit PureLink® RNA Mini Kit de Ambion y TRizol® LS Reagent de Invitrogen según lo propuesto en el protocolo Using TRizol® Reagent with the PureLink® RNA Mini Kit incluido en el manual del kit.

2.3.4.3. Extracción de DNA para la obtención de la región codificante del gen γ -conglutina

Para esta extracción se utilizó el kit High Pure PCR Template Preparation Kit de Roche. Para el proceso de lisis se maceraron 100mg de embriones de *L. mutabilis* con nitrógeno líquido y se añadieron 800 μ l de PBS. La muestra se

colocó en dos tubos Eppendorf® de 1,5ml, 400µl en cada tubo, se añadió 200 µl de Binding Buffer y 40µl de proteinasa K reconstituida y se incubó por 10 minutos a 70°C. Se añadieron 100µl de isopropanol se traspasó la mezcla a un High Filter Tube incluido en el kit y se centrifugó 1 minuto a 8000 x g, posteriormente para el lavado y la elución se procedió como lo indica el manual del kit. Las muestras fueron almacenadas a -20°C para su cuantificación y posterior utilización.

2.3.5. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

2.3.5.1. qPCR para la identificación del gen γ -conglutina

Para la identificación del gen γ -conglutina en las tres variedades de *Lupinus mutabilis* se utilizó 10µl de SsoFast™ Evagreen® Supermix de Bio-Rad, 1µl de Platinum Taq® DNA Polymerase de Invitrogen, 1µl de cada cebador, forward y reverse, del set γ -cong (ver sección 2.3.3.) y agua libre de nucleasas de Invitrogen para completar el volumen total de reacción. Por cada variedad se realizó un duplicado de la reacción y un control negativo, con un volumen de 5µl de DNA para un volumen total de reacción de 25µl.

Como control de amplificación se utilizó el gen RNA ribosomal 18S y se trabajó los cebadores específicos para este gen (ver sección 2.3.3.), los demás reactivos fueron los mismos. Por cada variedad se realizó un duplicado de la reacción y un control negativo, con un volumen de 5µl de DNA y 5µl de agua libre de nucleasas en el caso del control negativo para un volumen total de reacción de 25µl.

Para la comprobación de la presencia de la proteína γ -conglutina en las tres variedades de *L. mutabilis* se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en el que se cargó una mezcla de 2µl de 10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer con 8µl del producto de qRT-PCR, a 85 voltios durante 50 minutos.

2.3.6. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-qPCR)

Para la medición de la expresión relativa del gen γ -conglutina de las tres variedades de *Lupinus mutabilis* se realizó una RT-qPCR con el kit SuperScript[®] III Platinum[®] SYBR[®] Green One-Step RT-qPCR Kit: 10 μ l de 2X SYBR[®] Green Reaction Mix y 1 μ l SuperScript[®] III RT/Platinum Taq[®] Mix. Se agregó 1 μ l de cada cebador, forward y reverse, del set γ -cong (ver sección 2.3.3.) y agua libre de nucleasas de Invitrogen para completar el volumen total de reacción. Por cada variedad se realizó un duplicado de la reacción y un control negativo, con un volumen de 5 μ l de DNA y 5 μ l de agua libre de nucleasas en el caso del control negativo, para un volumen total de reacción de 25 μ l.

Como gen de referencia se utilizó el gen RNA ribosomal 18S de acuerdo a lo descrito por Scarafoni, et. al. en el 2010 y se trabajó con los cebadores específicos para este gen (ver sección 2.3.3.), los demás reactivos fueron los mismos. Por cada variedad se realizó un duplicado de la reacción y un control negativo, con un volumen de 5 μ l de DNA y 5 μ l de agua libre de nucleasas en el caso del control negativo para un volumen total de reacción de 25 μ l.

Se obtuvieron los resultados a partir de los picos de temperatura de melting arrojados por el análisis de expresión del equipo CFX96 de Bio-Rad.

2.3.7. Secuenciación para determinación de la presencia del gen γ -conglutina en tres variedades de *Lupinus mutabilis*

La secuenciación para la identificación de la presencia del gen γ -conglutina en las tres variedades de *Lupinus mutabilis* se realizó por el método de Sanger a partir del producto de la qPCR realizada para las tres variedades (ver sección 2.3.5.1). Para la purificación de las muestras se utilizó el kit AMPure[™] Purification Kit, se corrió un gel de agarosa al 2% en el que se cargó una mezcla de 2 μ l de BlueJuice[™] Gel Loading Buffer con 8 μ l del producto purificado, para comprobar el proceso. Para la PCR de secuenciación se

utilizaron los primers γ -cong y las muestras ya purificadas, y el BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystems®.

La purificación final se la realizó por el método Agencourt® ClearSEQ® y se cargó en el plato de secuenciación del secuenciador ABI 3100 Avant DNA Sequencer de Applied Biosystems®.

2.3.8. Método RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends – RACE)

2.3.8.1. 3'RACE

Con el propósito de obtener la secuencia codificante completa del gen γ -conglutina en el *L. mutabilis*, se utilizó el método de RACE. Este método consiste en la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos a partir de RNA mensajero o RNA total entre un sitio interno específico y el extremo 3' o 5' del RNA mensajero. Los productos obtenidos mediante 3' y 5' RACE pueden ser secuenciados directamente sin ningún paso de clonación intermedio y al combinarlos, se obtiene una secuencia de cDNA completa.

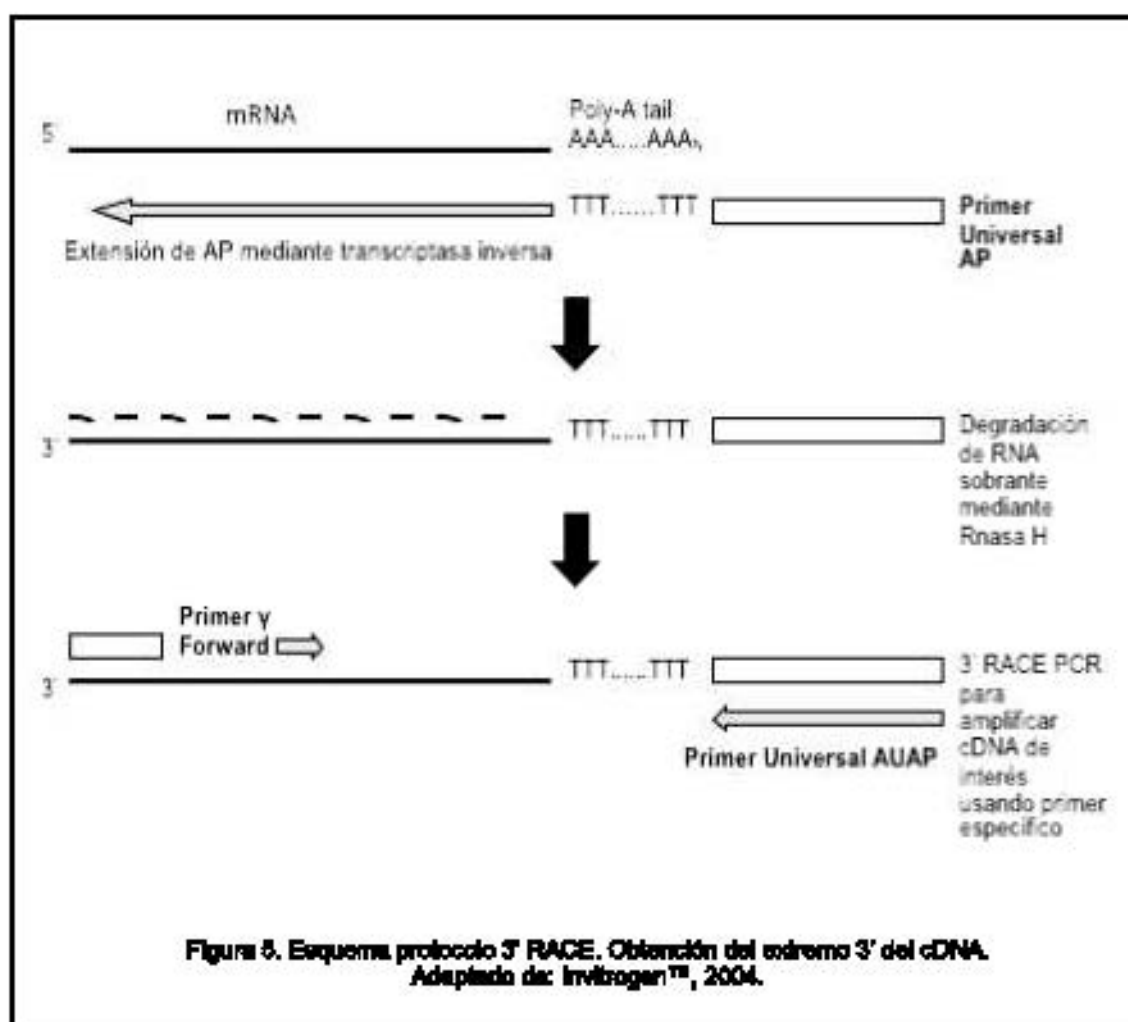
Para la técnica 3'RACE se utilizó el RNA total (ver sección 2.3.4.2), y un cebador específico forward para γ -conglutina siguiendo el protocolo detallado en el manual del kit 3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends de Invitrogen™. En resumen, utilizando como plantilla inicial el RNA total, se procedió a la síntesis de la primera cadena cDNA utilizando un cebador cuyo sitio de anclaje es la cola poli-A y con acción de la enzima transcriptasa reversa se obtuvo el cDNA (ver Figura 5). Subsecuentemente, teniendo como base el cDNA se realizó la amplificación usando dos cebadores: cebador gamma forward, específico y diseñado para este estudio, el cual se une al sitio de interés en el cDNA; y el cebador universal AUAP, cuyo blanco es el cDNA complementario del RNA mensajero al extremo 3' del mismo. Las modificaciones más importantes que se realizaron del protocolo establecido fue el uso de Platinum™ Taq y no de la Taq polimerasa convencional, para el aumento de la especificidad de la reacción.

La reacción se lleva a cabo bajo las siguientes condiciones:

Tabla 3. Condiciones de la reacción 3' RACE PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo en minutos	Ciclos
Denaturación	94°C	3	36
Annealing	55°C	0.5	
Extensión	72°C	2	
Extensión final	72°C	5	

Adaptado de: Life Technologies™, 2010.



Una vez que se obtuvo la secuencia 3' del gen γ -conglutina, se procedió a identificar el extremo 5'. Con este propósito, se diseñaron cebadores específicos a partir de la secuencia obtenida de 3'RACE y se utilizó el protocolo detallado en el manual del kit 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends de Invitrogen™. La Tabla 4 muestra la secuencia de los cebadores específicos que se utilizaron en 5'RACE:

Tabla 4. Cebadores específicos diseñados para 5' RACE.

Nombre del cebador	Secuencia en dirección 5'→ 3'	Tamaño (bp)
GSP1	GCATGTTACCTTGAAGCCTC	21
GSP2	GTGGTGGTGAATCTGGAGCACTC	23
GSP3	GTTCCGCATGTACGTGGGTGG	20

Los 3 cebadores específicos que se utilizaron tenían la dirección reversa en la plantilla de cDNA y se utilizaron como cebadores forward los cebadores universales AAP y AUAP del kit. La secuencia de los cebadores reverse correspondieron a sitios diferentes en dirección antisentido de tal manera que el producto del cebador GSP1 debía contener la secuencia que se amplificaría con el cebador GSP2, y el producto del cebador GSP2 debía contener la secuencia amplificada de GSP3 (Ver Figura 6). Esto permitiría verificar la validez de los productos amplificados.

Para la síntesis de la primera cadena de cDNA empleando RNA total como plantilla, se utilizó el cebador reverse GSP1 y la enzima transcriptasa inversa. Se procedió a purificar el cDNA obtenido mediante columnas S.N.A.P del kit con el fin de separar dNTPs sobrantes, GSP1 y proteínas. Subsecuentemente,

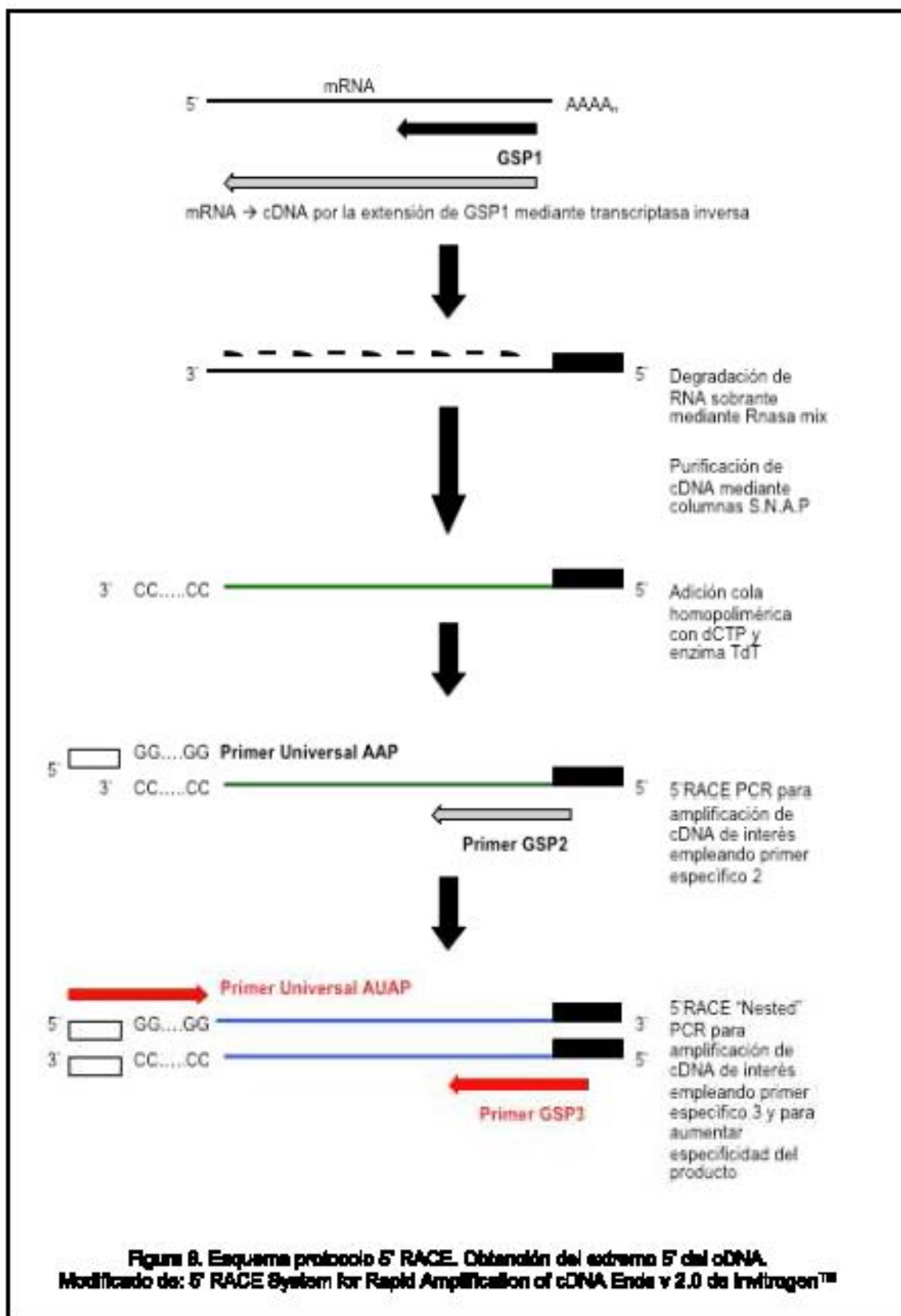
se añade una cola homopolimérica al extremo 3' del cDNA utilizando la enzima TdT y dCTP, que servirá de sitio de anclaje para el cebador universal AAP en la PCR (Ver Figura 6). Esta estrategia permitió obtener la región 5' de γ -conglutina comprendida entre la cola poli-C y el cebador GSP1 (Ver Figura 6, sección verde). Para la primera amplificación, se utilizaron los siguientes cebadores: cebador GSP2 específico, el cual se une al sitio de interés en el cDNA; y el primer universal AAP (Ver Figura 6, sección azul). Finalmente, se realizó una amplificación final ("nested" PCR) utilizando el producto entre GSP2 y AAP de la reacción anterior con los cebadores GSP3 y el cebador universal AUAP (Ver Figura 6, sección roja). Esta estrategia permitió amplificar y posteriormente secuenciar fragmentos de distinto tamaño del cDNA de la γ -conglutina de forma específica.

Tabla 5. Condiciones de la reacción 5' RACE PCR y 5' RACE "Nested" PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo en minutos	Ciclos
Denaturación	94°C	1	35
Annealing	55°C	1	
Extensión	72°C	2	
Extensión final	72°C	5	

Tomado de: Invitrogen™, 2004.

Finalmente para la comprobación de la amplificación de los distintos fragmentos del gen γ -conglutina se realizaron geles de agarosa al 1% en el que se cargó una mezcla de 2 μ l de 10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer con 18 μ l del producto de 3' RACE o 5'RACE.



2.3.9. Secuenciación de la región codificante de γ -conglutina

La secuenciación para la obtención de la región codificante de γ -conglutina en *Lupinus mutabilis* se realizó por el método de Sanger a partir de la PCR de 3' y 5' RACE (ver sección 2.3.8). Para la purificación de las muestras se utilizó el kit PureLink™ PCR Purification Kit. Para la PCR de secuenciación se utilizaron dos grupos de primers, dependiendo los productos a secuenciarse. Para el fragmento de 3' RACE se utilizó el primer forward γ -cong y para 5' RACE se empleó el primer reverse GSP3 diseñado exclusivamente para esta amplificación, las muestras ya purificadas y el BigDye® Terminator v3.1 of Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystems®.

La purificación final se la realizó mediante el kit BigDye® X-Terminator™ Purification Kit y se cargó en el plato de secuenciación del secuenciador 3500 Genetic Analyzer de Applied Biosystems®.

2.3.10. Alineamiento de secuencia obtenida mediante RACE en *L. mutabilis* con otras especies de *Lupinus*

El alineamiento de la secuencia de la región codificante de γ -conglutina en *L. mutabilis* con las secuencias de cDNA reportadas para *L. albus* y *L. angustifolius* se realizó mediante el método de alineamiento del software Mega6 Explorer con ClustalW. ClustalW es un programa de alineamientos basado en construcción progresiva al ser capaz de alinear secuencias de forma muy eficaz, aunque no garantiza el mejor alineamiento posible. El método de ClustalW consiste en realizar alineamientos de par en par para construir un árbol guía y detectar similitudes entre las secuencias que están siendo comparadas basándose en la distancia genética (Blanca y Cañizares, 2014).

2.3.11. Árbol filogenético

Para obtener el árbol filogenético el alineamiento de todas las secuencias se realizó mediante el software MEGA6 Explorer utilizando la configuración “default” que contiene los siguientes criterios:

Tabla 6. Criterios configurados para la elaboración del árbol filogenético, mostrando el parentesco de *Lupinus mutabilis* y otras especies del género: *Lupinus albus* clon 32, *L. albus* clon 48 y *L. angustifolius*.

Análisis	Reconstrucción filogenética
Alcance	Todos los taxones seleccionados
Método estadístico	“Neighbor-joining”
Test filogenético	
Prueba de filogenia.	Ninguna
Modelo de sustitución	
Tipo de sustitución	Nucleotídica
Sustituciones incluidas	Transiciones y transversiones
Tasas y Patrones	
Tasas entre sitios	Tasas uniformes
Patrón entre lineajes	Homogeneo
Subconjunto de datos a utilizarse	Delección completa

Adaptado de: Mega6 Explorer, 2014.

3. Resultados

3.1. Determinación de la presencia del gen γ -conglutina

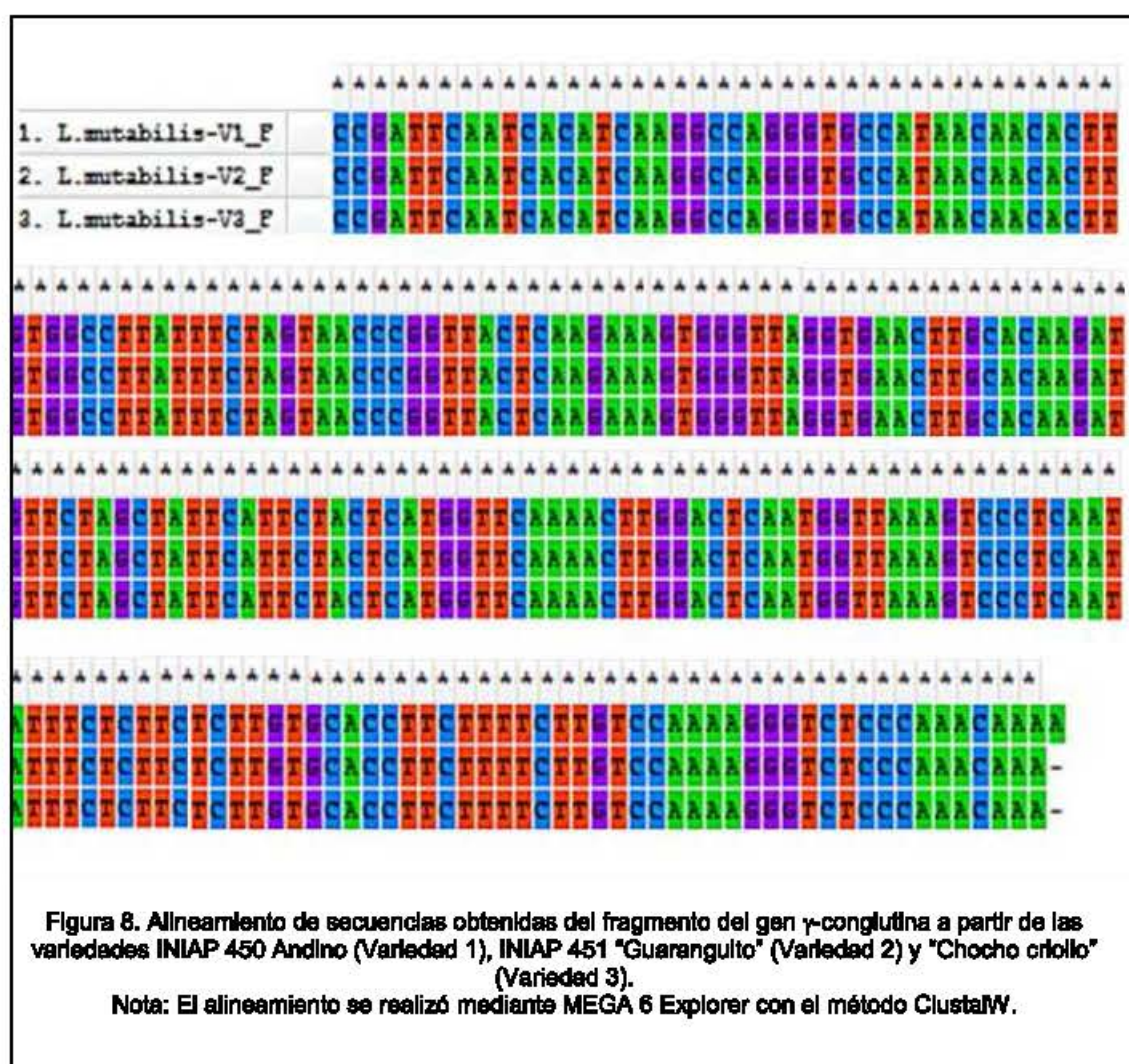
Con el propósito de identificar la presencia del gen γ -conglutina en las variedades de *L. mutabilis*, INIAP 450 Andino (Variedad 1); INIAP 451 "Guaranguito" (Variedad 2); y "Chocho criollo" (variedad 3), inicialmente se realizó la amplificación de una sección del gen a partir de DNA genómico por PCR para lo cual se diseñaron cebadores en base a la secuencia del indicado gen de *L. albus* clon 48. La Figura 5 confirma la presencia del gen γ -conglutina en *Lupinus mutabilis* mediante la amplificación de γ -conglutina y un control positivo del gen 18S. Se obtuvo un producto de 246 bp, tamaño esperado para el gen γ -conglutina. El mismo resultado se obtuvo para las Variedades 2 y 3. Como control positivo se utilizó una muestra de DNA que se aisló de *L. albus* y se obtuvieron los mismos resultados (estos datos no se indican). No se obtuvieron productos amplificados por PCR con los cebadores reportados por Scarafoni, et. al, 2010.



Figura 7. Identificación fragmento del gen γ -conglutina por PCR de la V1 INIAP 450 Andino de *L. mutabilis*.

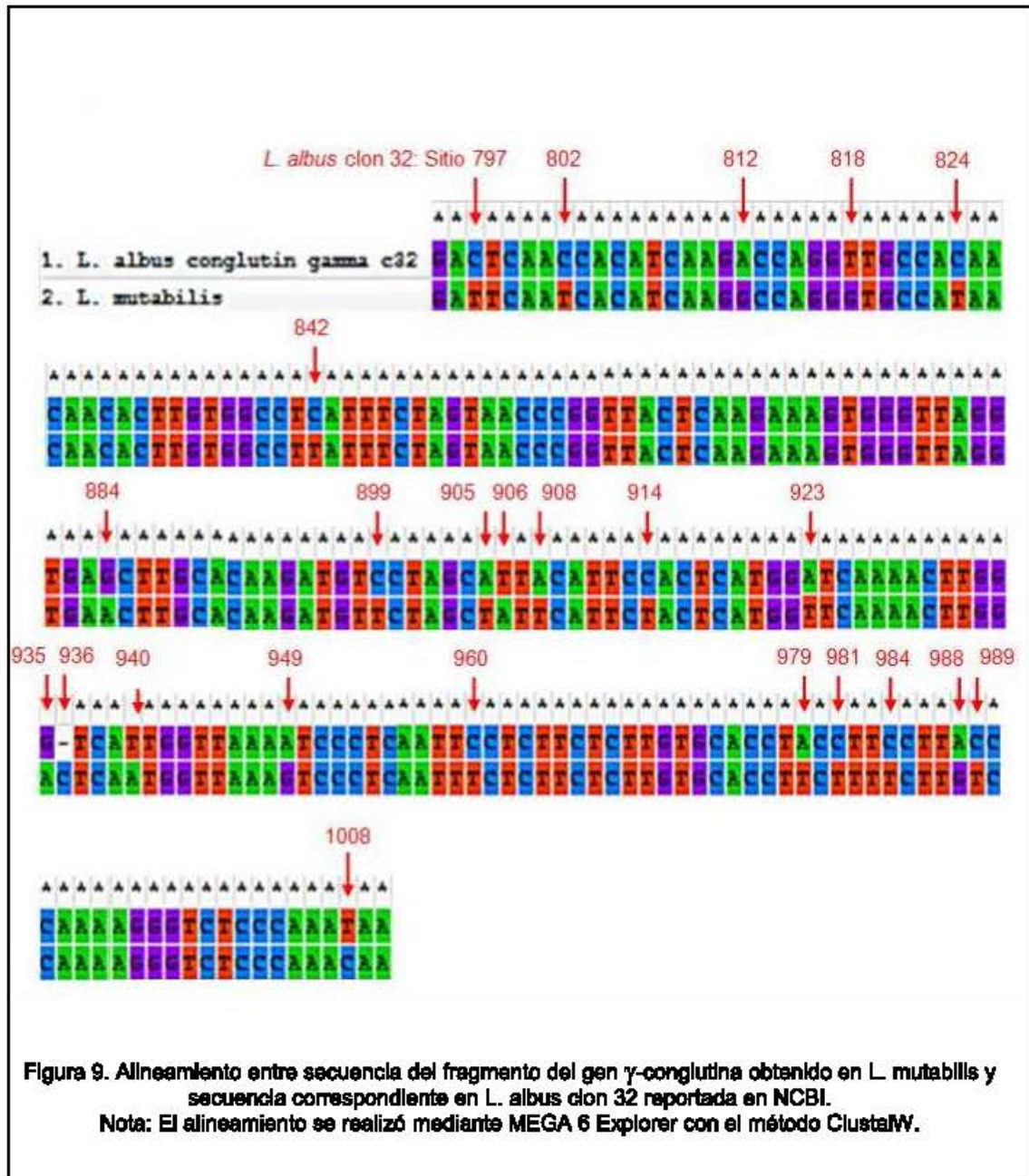
Nota: 1.- Marcador de 100 bp. 2 y 3.- *L. mutabilis* V1 DNA gen 18S, 4.- Control negativo gen 18S, 5 y 6.- *L. mutabilis* V1 DNA cebadores de la literatura, 7.- Control negativo gen cebadores de la literatura (y), 8 y 9.- *L. mutabilis* V1 DNA gen cebadores de este estudio, 10.- Control negativo gen cebadores de este estudio.

Subsecuentemente se procedió a la secuenciación de los productos amplificados de γ -conglutina de *L. mutabilis*. El alineamiento de los fragmentos amplificados y secuenciados de las 3 variedades *Lupinus mutabilis* estudiadas demostró un alineamiento perfecto en el que no se encontraron polimorfismos intra-especie (Ver Figura 8).



Subsecuentemente se procedió al alineamiento de los fragmentos obtenidos de las variedades de *L. mutabilis* con las secuencias de γ -conglutina de *L. albus* (clon 32 y clon 48) y *L. angustifolius*, reportadas en NCBI. Ver Figuras 9, 10 y 11. Los datos demostraron que hubo 24 polimorfismos en la fracción amplificada de γ -conglutina entre *L. mutabilis* y *L. albus* clon 32, 34 polimorfismos entre *L. mutabilis* y *L. albus* clon 48 y 25 polimorfismos entre *L. mutabilis* y *L. angustifolius*.

- *L. albus* clon 32 No. de Accesoión AJ297490.1 V.S. *L. mutabilis*



• *L. albus* clon 48 No. de Accesoión AJ297568.2 V.S. *L. mutabilis*

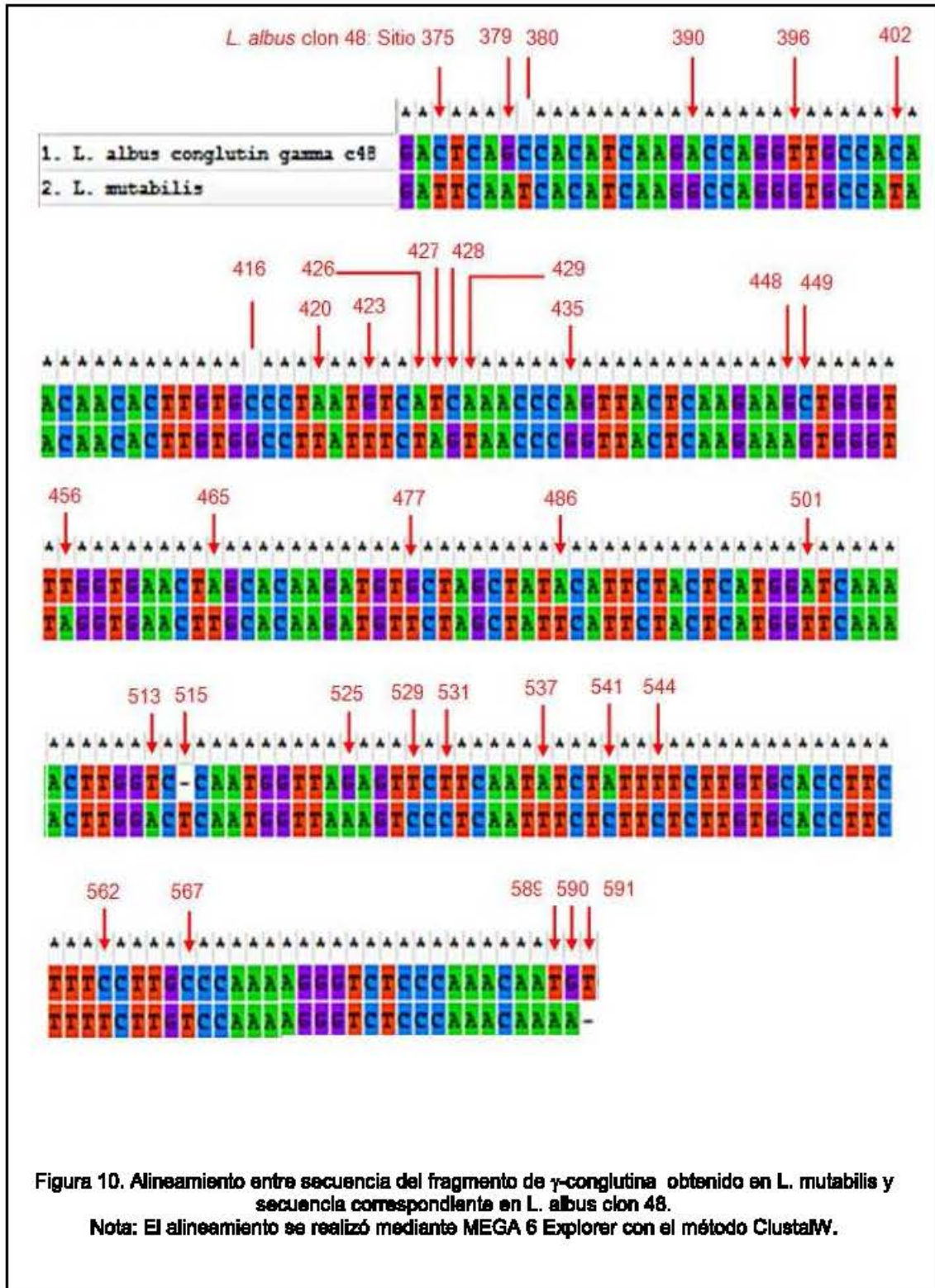
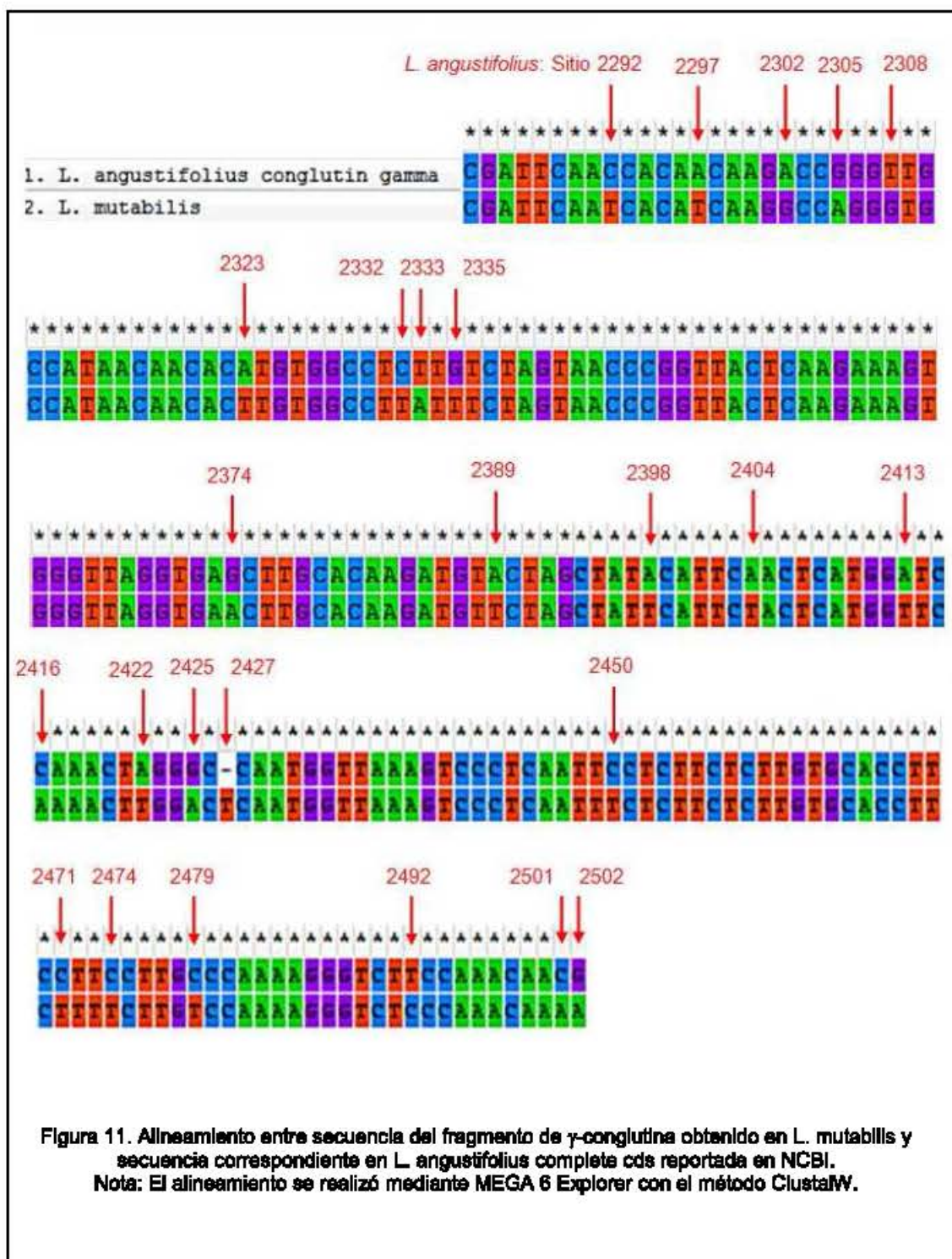


Figura 10. Alineamiento entre secuencia del fragmento de γ -conglutina obtenido en *L. mutabilis* y secuencia correspondiente en *L. albus* clon 48.

Nota: El alineamiento se realizó mediante MEGA 6 Explorer con el método ClustalW.

• *L. angustifolius* No. de Accesoión L39786.1 V.S. *L. mutabilis*



3.2. Medición de la expresión relativa del gen γ -conglutina

Una vez identificado el gen γ -conglutina en *L. mutabilis*, se procedió a estudiar su expresión a nivel de RNA por RT-qPCR. Como se observa en el Figura 12, la V1, INIAP 450 Andino, presentó mayor expresión de γ -conglutina que las variedades V2 y V3. Los niveles de expresión de γ -conglutina de V2 y V3 fueron similares. De acuerdo a la prueba "t de student" realizada entre V1 y V2, y V1 y V3 no existen diferencias significativas debido a que el valor de p es de 0.5.

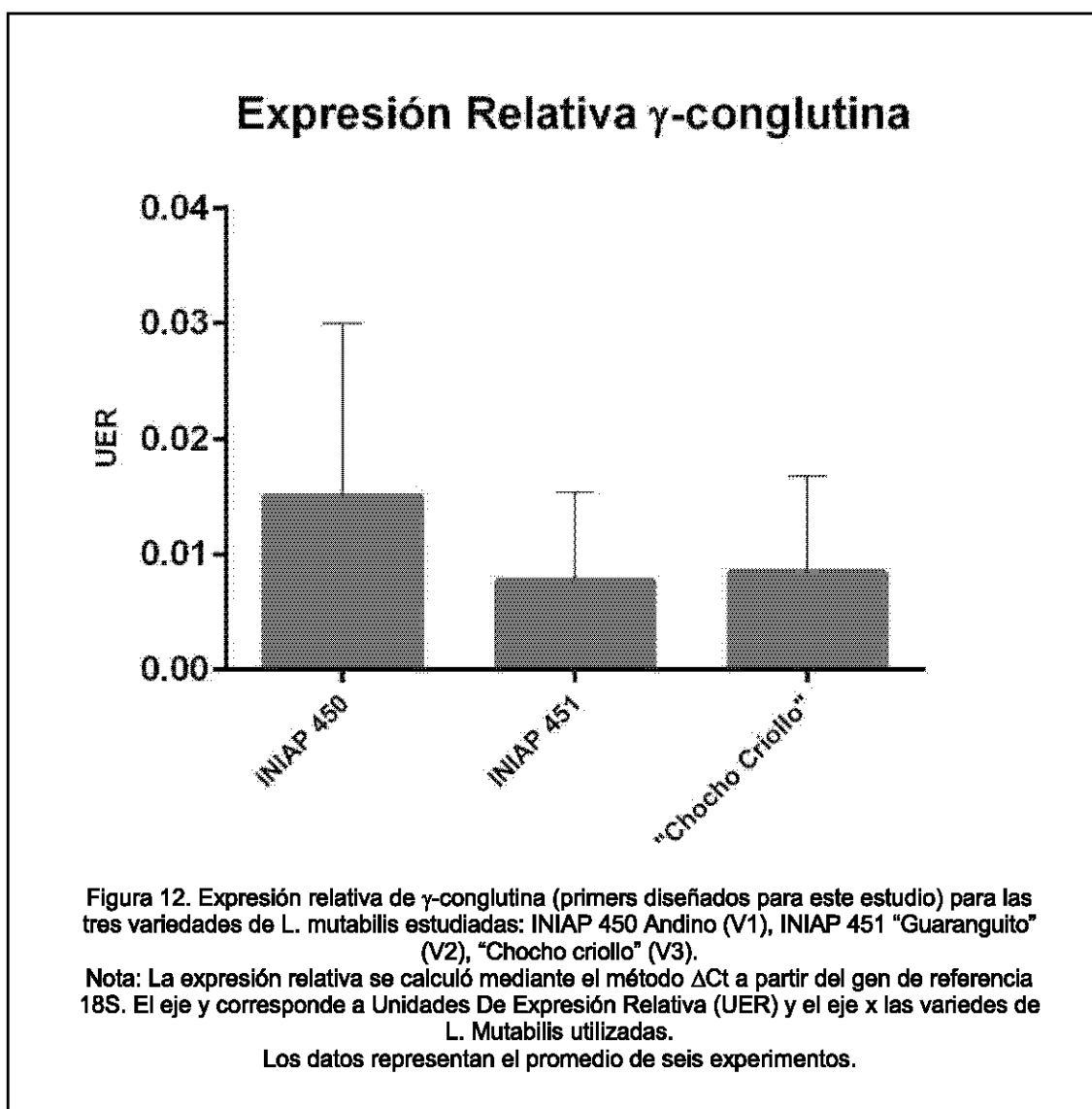
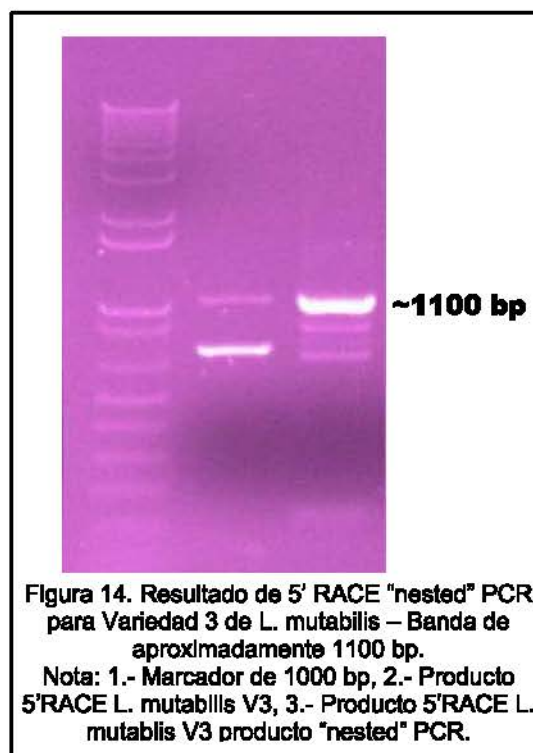
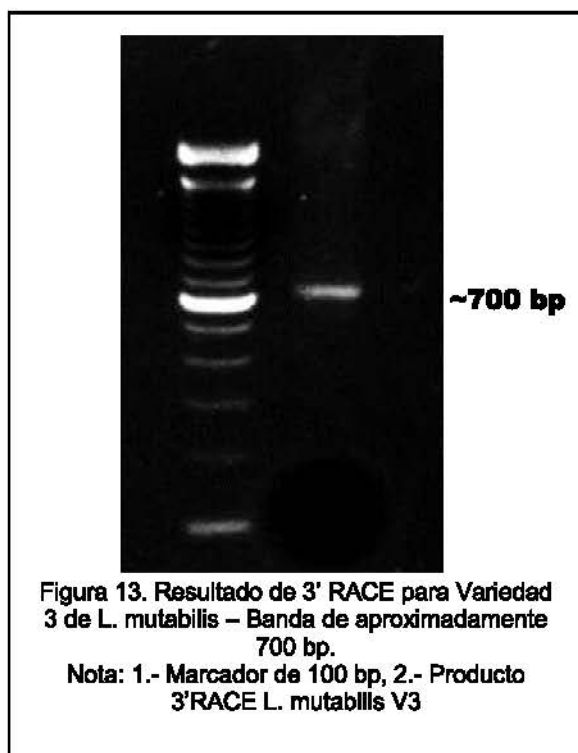


Tabla 7. Expresión relativa con respecto a 18s promediada para las tres variedades de *L. mutabilis* estudiadas: INIAP 450 Andino (V1), INIAP 451 "Guaranguito" (V2) y "Chocho criollo" (V3).
Nota: La expresión relativa se calculó mediante el método ΔCt a partir del gen de referencia 18s.

Variedades <i>L. mutabilis</i>	Porcentaje γ -conglutina
INIAP 450 Andino V1	1,50%
INIAP 451 "Guaranguito" V2	0,77%
"Chocho criollo" V3	0,84%

3.3. 3' y 5' RACE

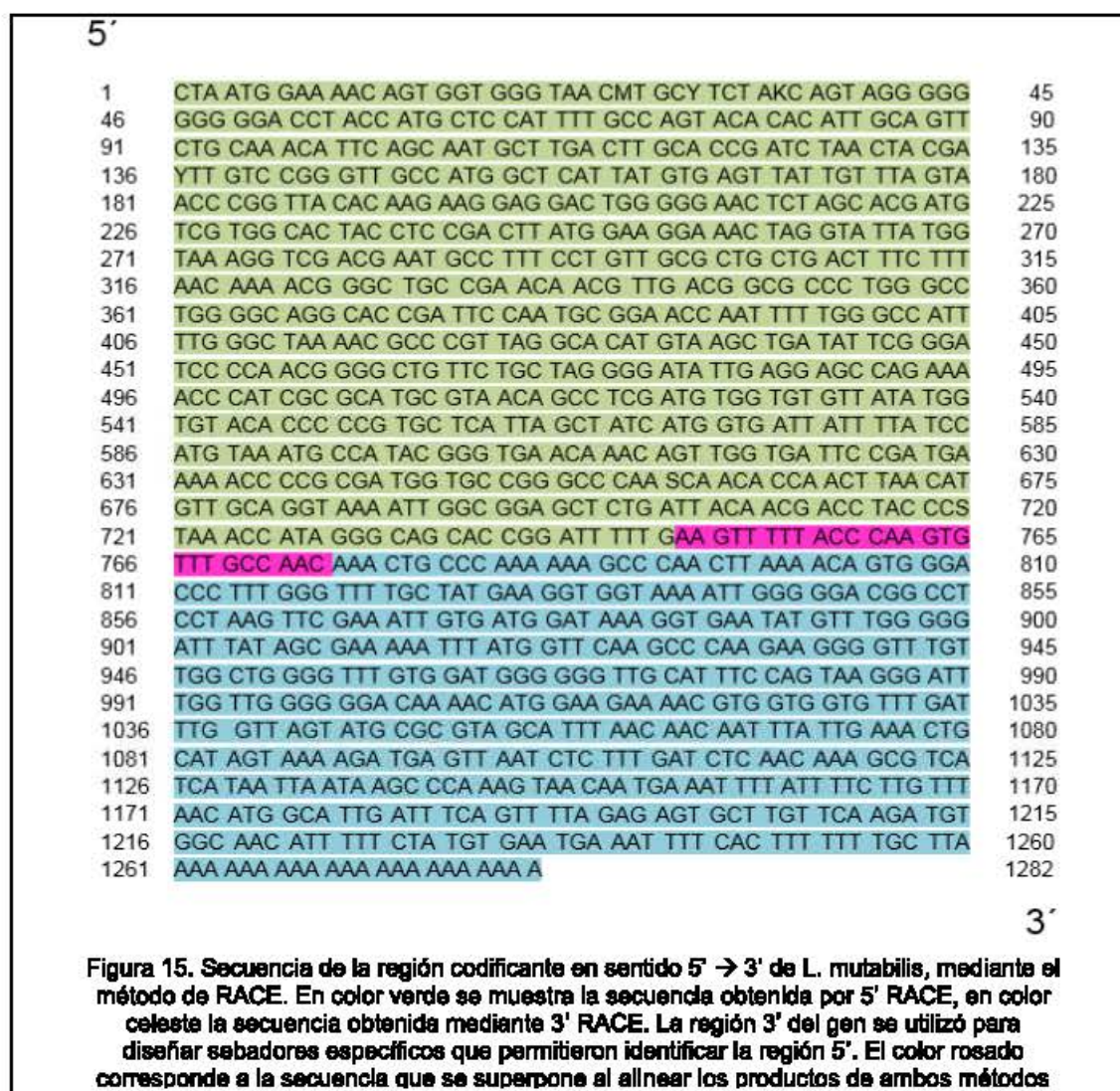
Para determinar la secuencia completa del gen γ -conglutina en *L. mutabilis*, se utilizó el método de RACE como se describió en la sección de materiales y métodos. En las Figuras 10 y 11, se observan las bandas correspondientes a los fragmentos obtenidos mediante RACE:



Para 3' RACE se logró amplificar un fragmento de aproximadamente 700bp empleando el cebador forward diseñado utilizado para la identificación del gen

y la medición de su expresión relativa. La secuencia obtenida termina en la cola poli-A del ARN mensajero. En el caso de 5' RACE se obtuvo el fragmento de interés de aproximadamente 1100bp empleando los tres cebadores reverse diseñados para esta amplificación.

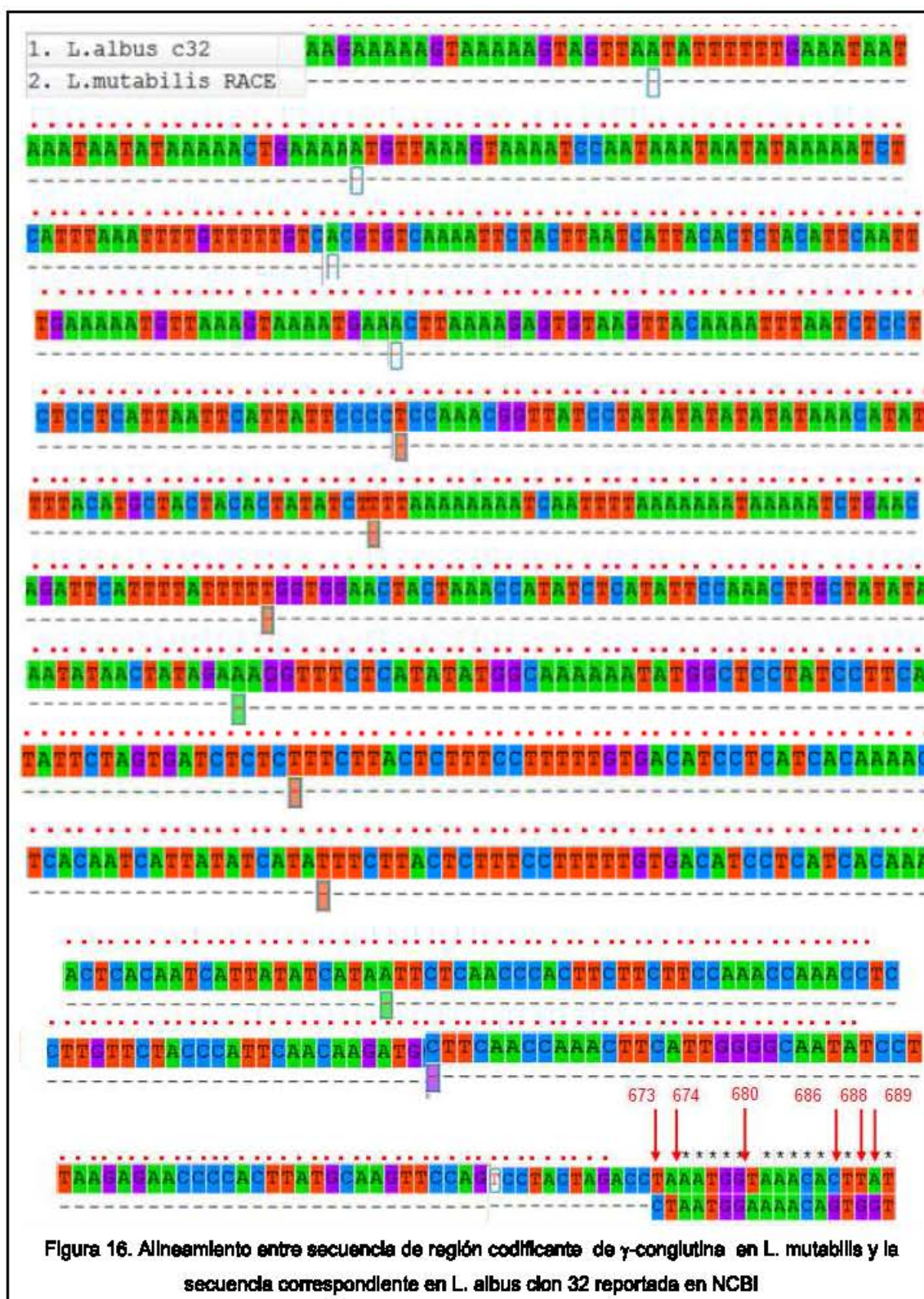
En la Figura 15 se muestra la secuencia codificante del gen γ -conglutina obtenida mediante secuenciación por el método de Sanger de los fragmentos amplificados en 3' y 5' RACE:



Posteriormente, se alineó la secuencia de la región codificante de *Lupinus mutabilis* con las secuencias de cDNA de γ -conglutina de las variedades *L. albus* (clon 32 y clon 48) y *L. angustifolius*. Los datos demuestran que hubo 465

polimorfismos entre *L. mutabilis* y *L. albus* clon 32, 465 polimorfismos y 16 gaps internos con *L. albus* clon 48, y 424 y 13 gaps internos con *L. angustifolius*.

- *L. albus* clon 32 No. de Accesoión AJ297490.1 V.S. *L. mutabilis* RACE



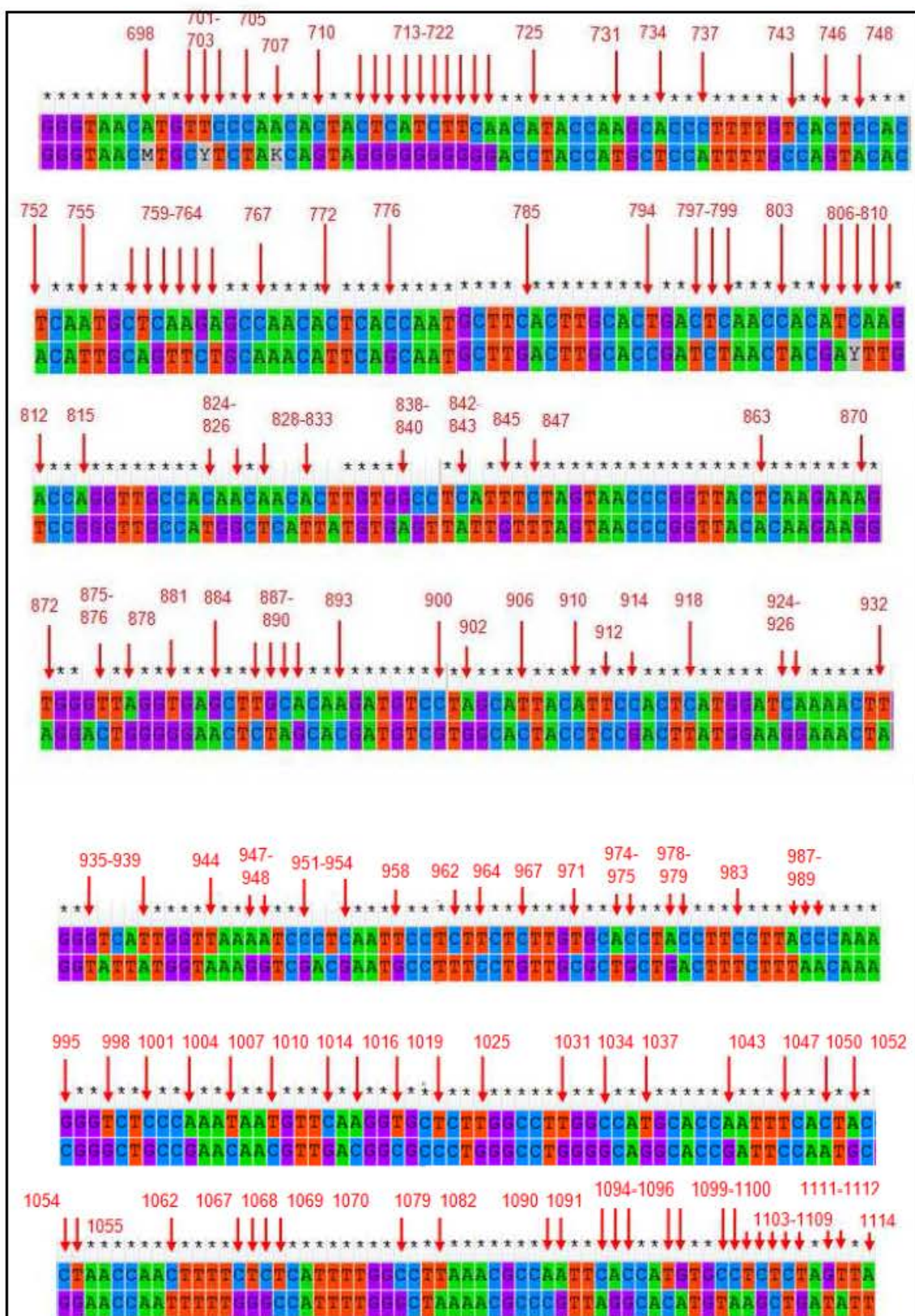
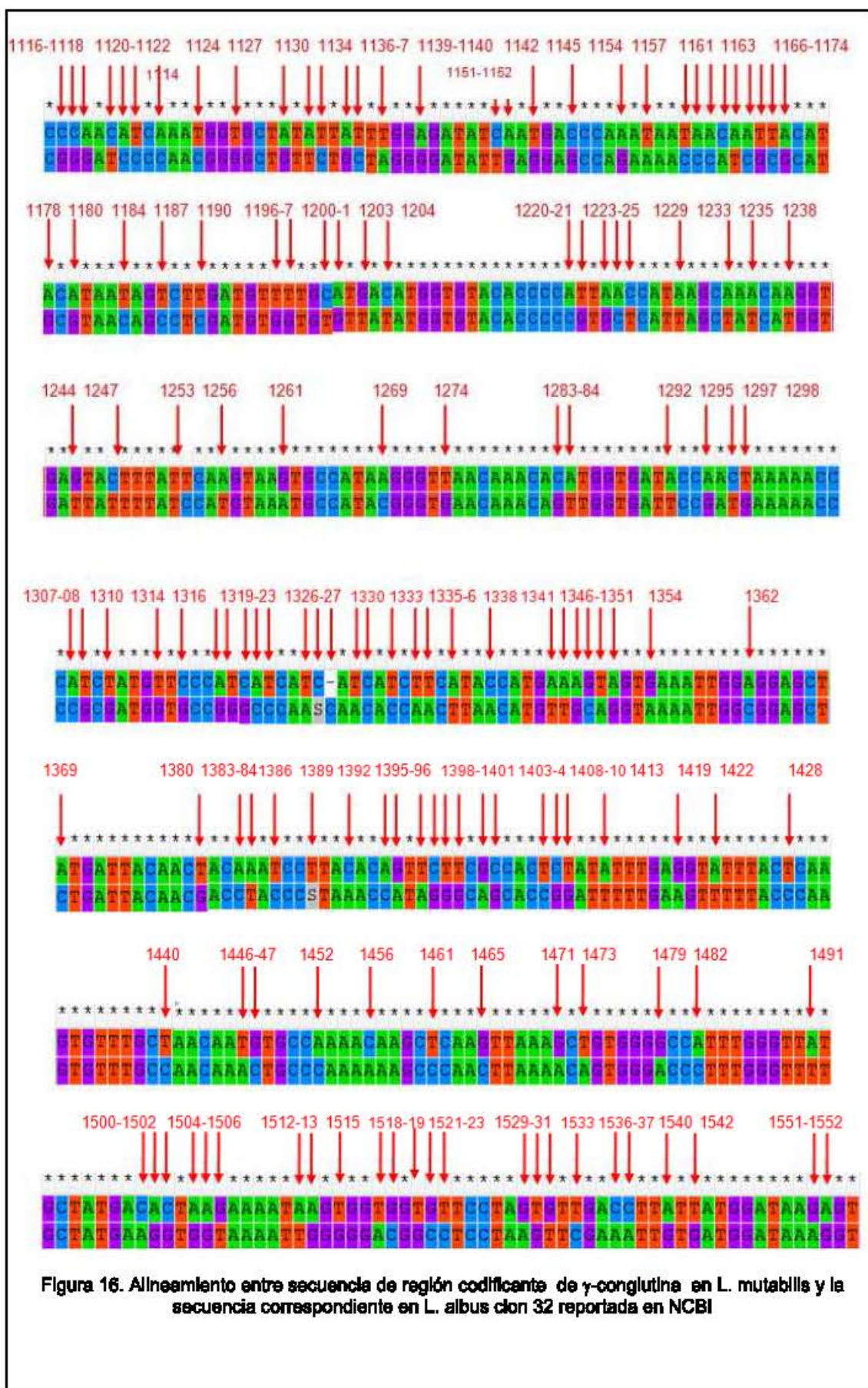
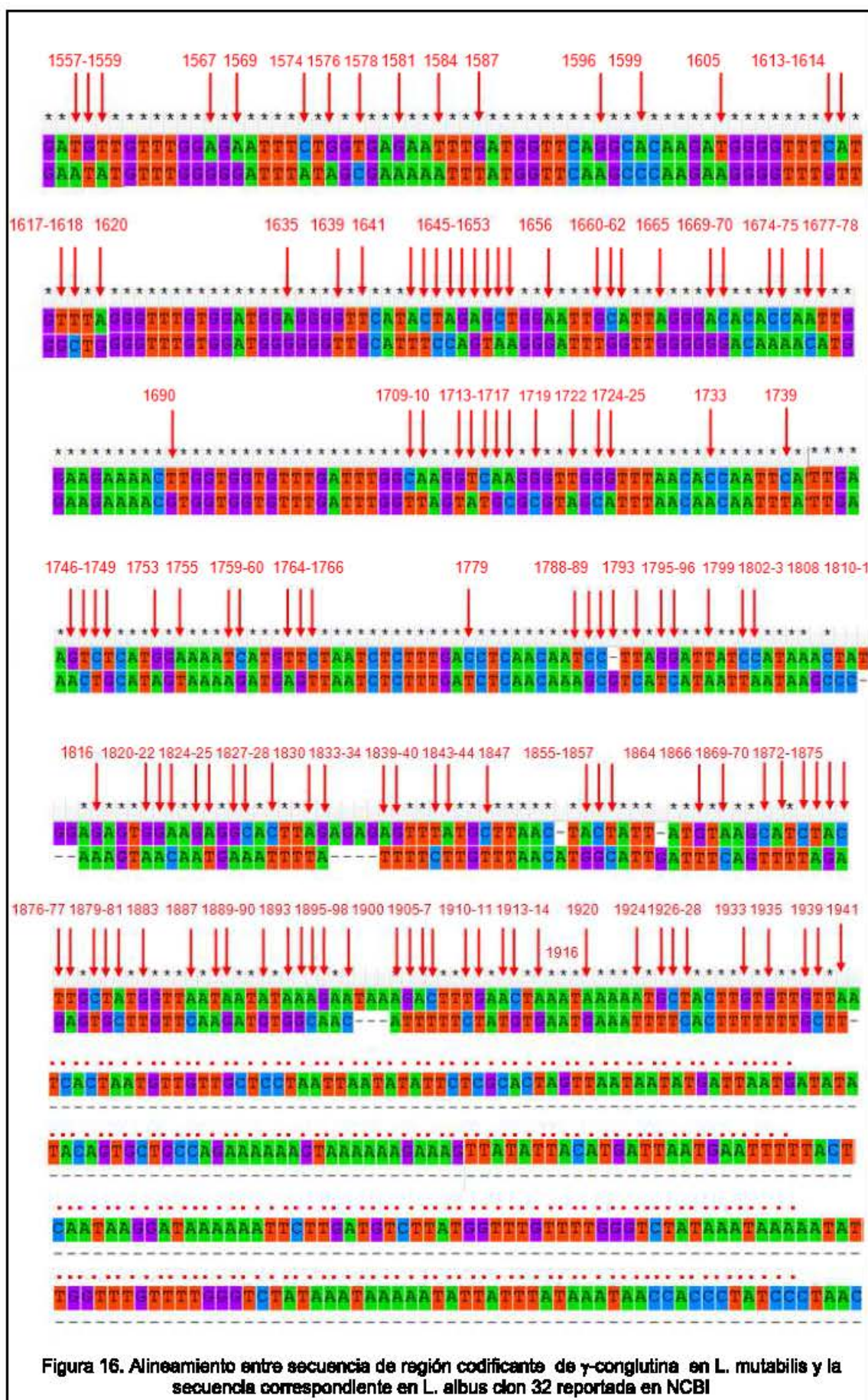


Figura 16. Alineamiento entre secuencia de región codificante de γ -conglutina en *L. mutablis* y la secuencia correspondiente en *L. albus* clon 32 reportada en NCBI





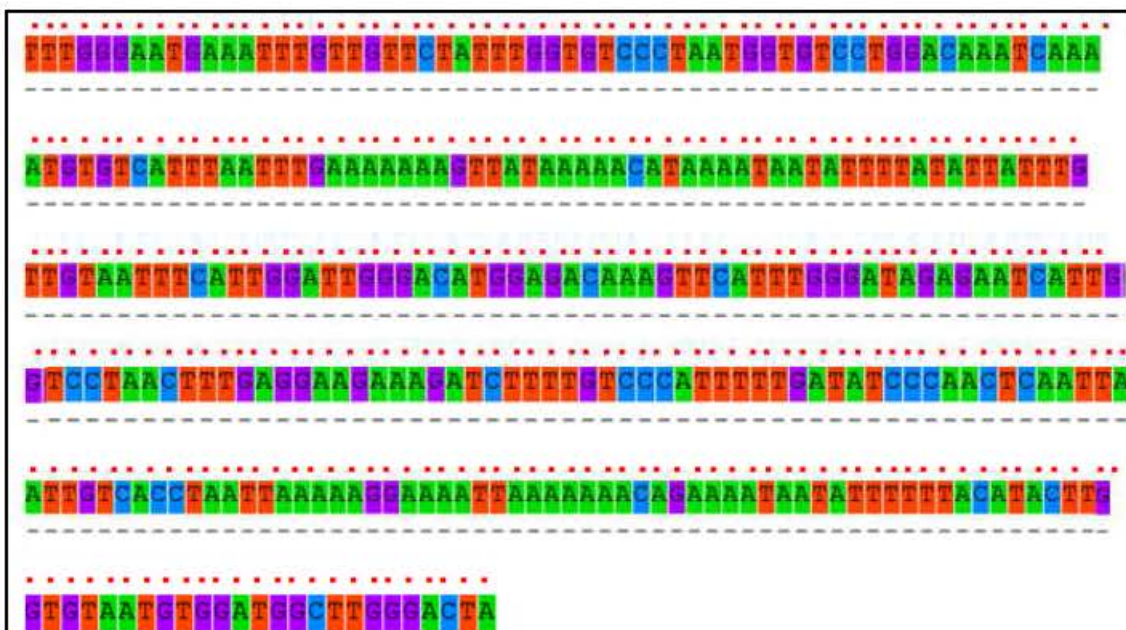


Figura 16. Alineamiento entre secuencia de región codificante de γ -conglutina en *L. mutabilis* y la secuencia correspondiente en *L. albus* clon 32 reportada en NCBI
 Nota: El alineamiento se realizó mediante MEGA 6 Explorer con el método ClustalW. Los puntos rojos indican gaps, los asteriscos indican identidades y las flechas indican el sitio del polimorfismo.

- *L. albus* clon 48 No. de Accesoión AJ297568.2 V.S. *L. mutabilis*

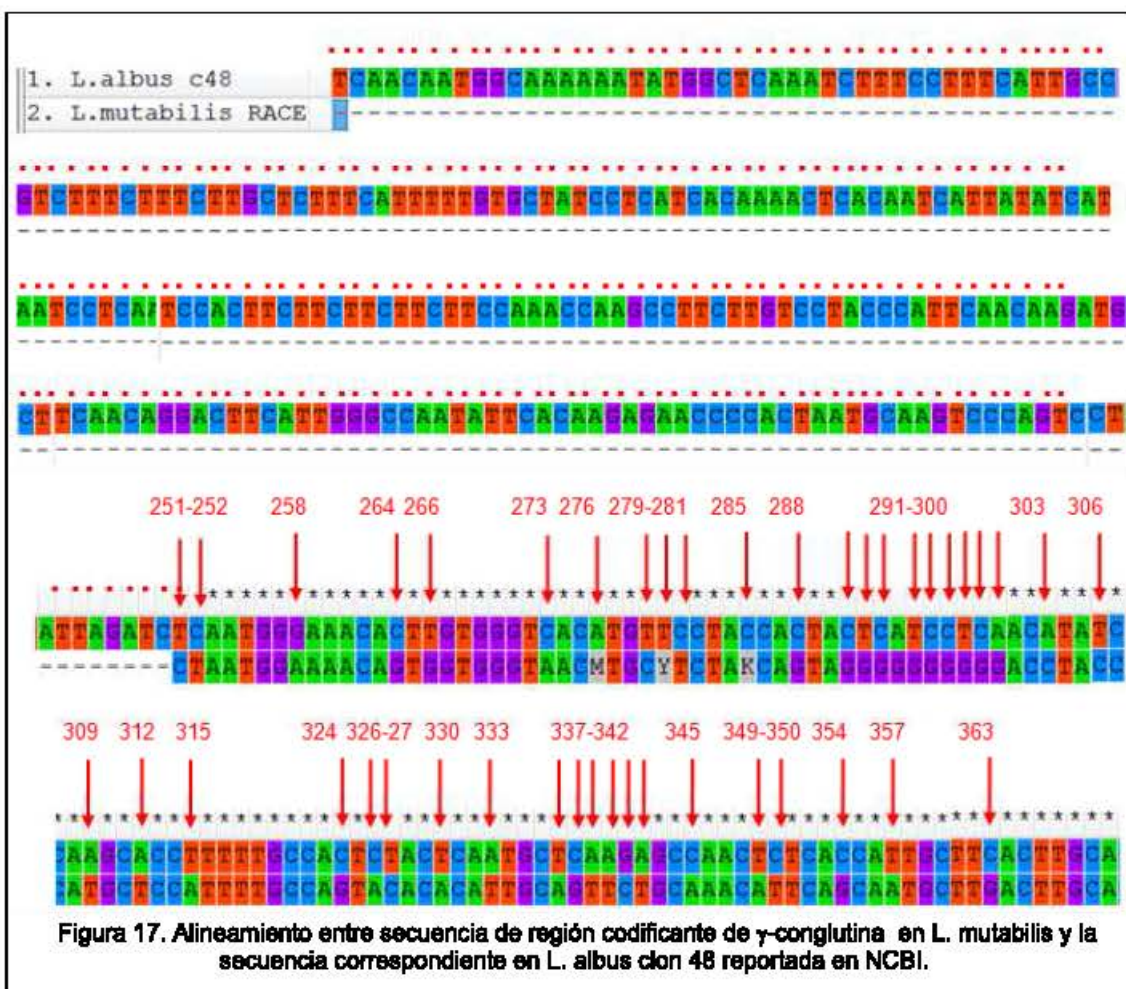
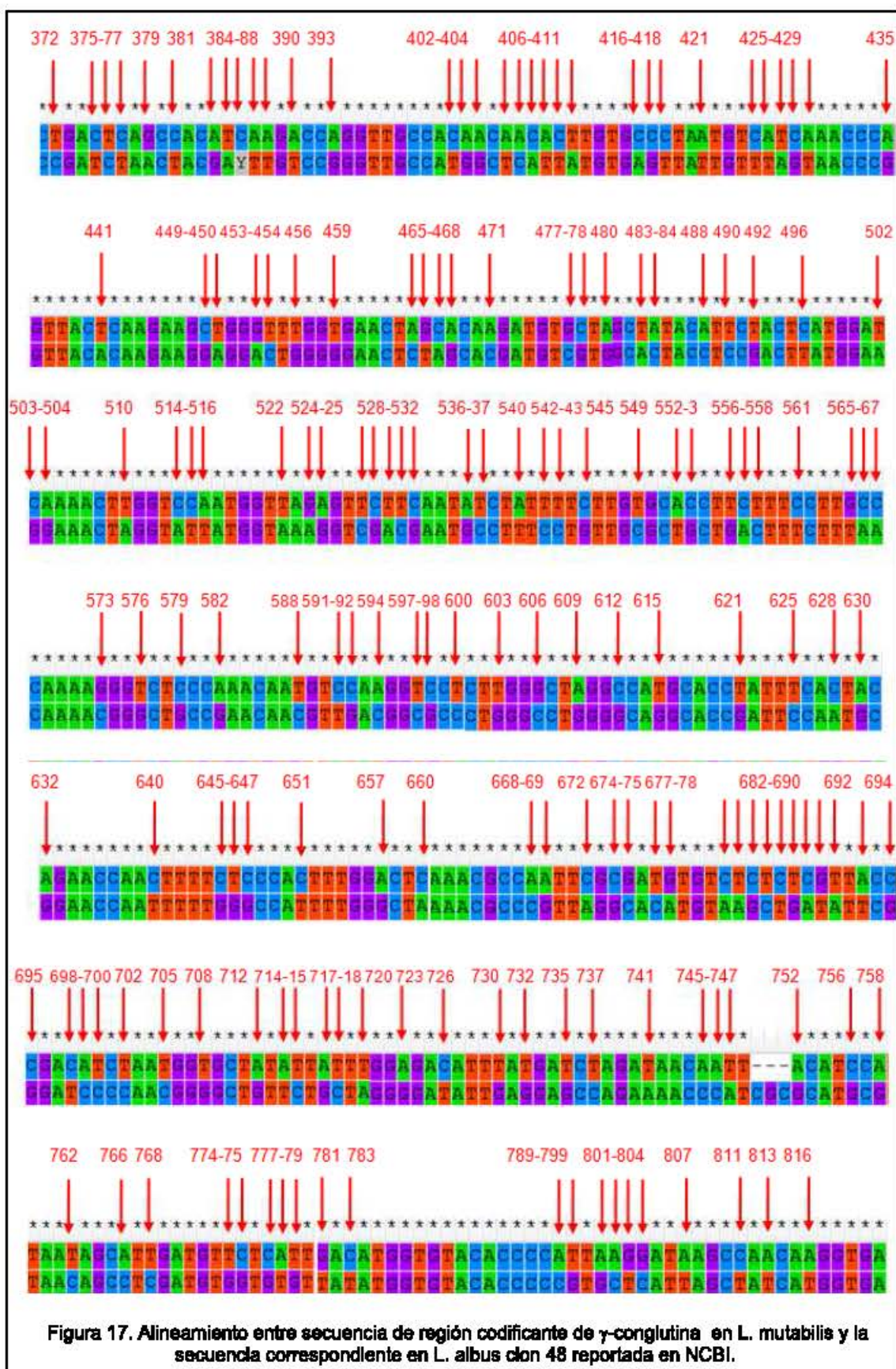
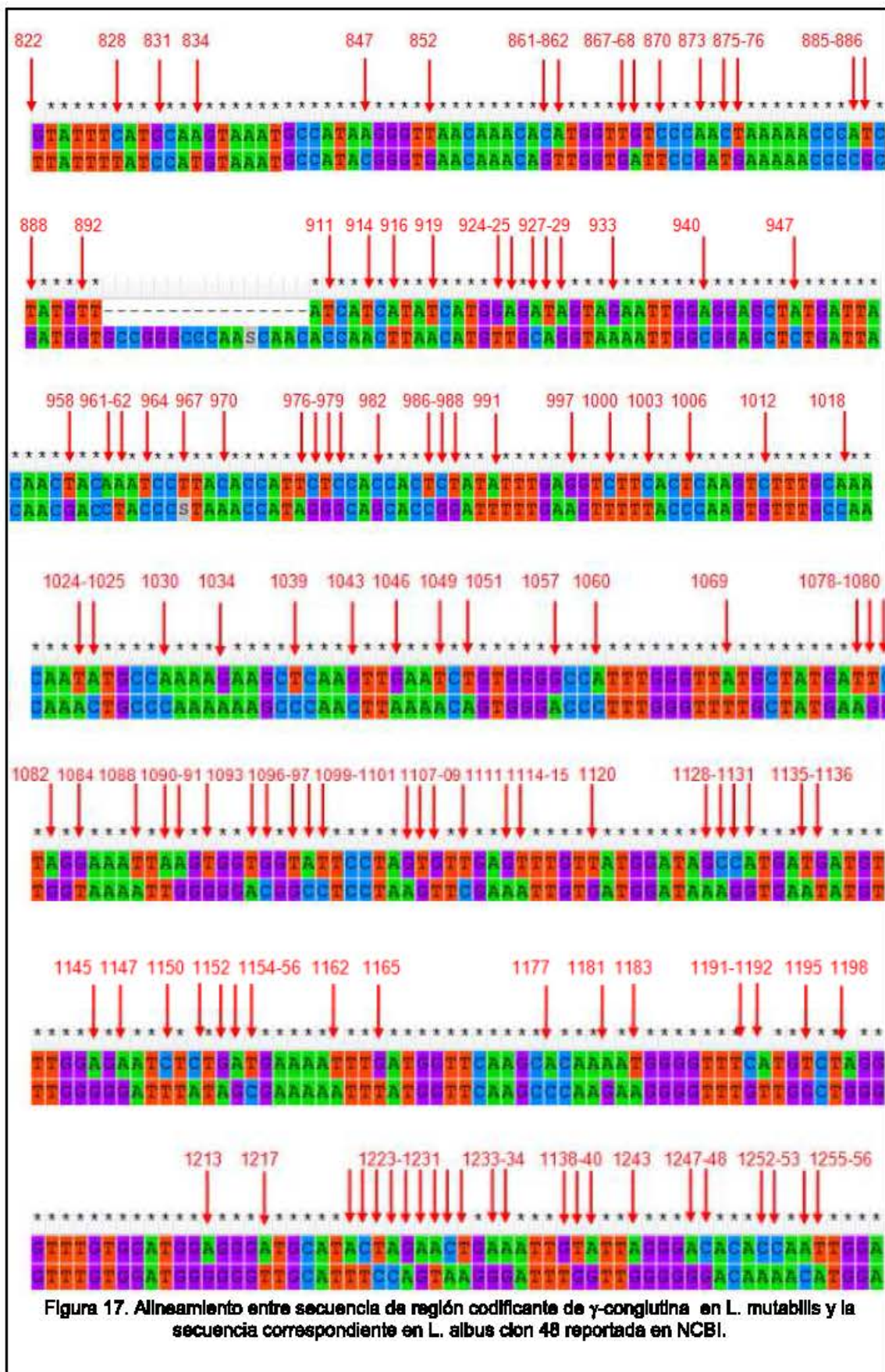
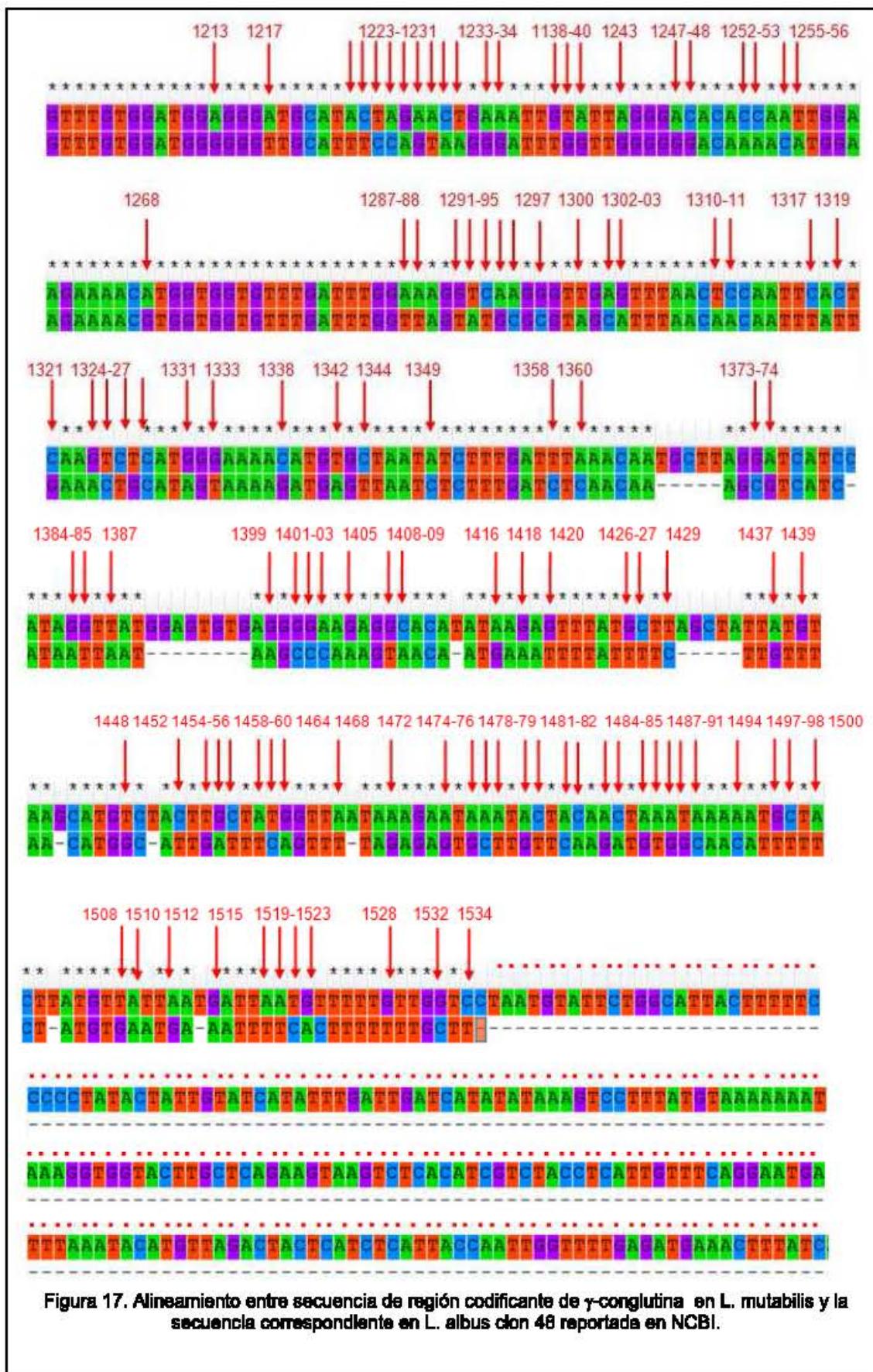


Figura 17. Alineamiento entre secuencia de región codificante de γ -conglutina en *L. mutabilis* y la secuencia correspondiente en *L. albus* clon 48 reportada en NCBI.







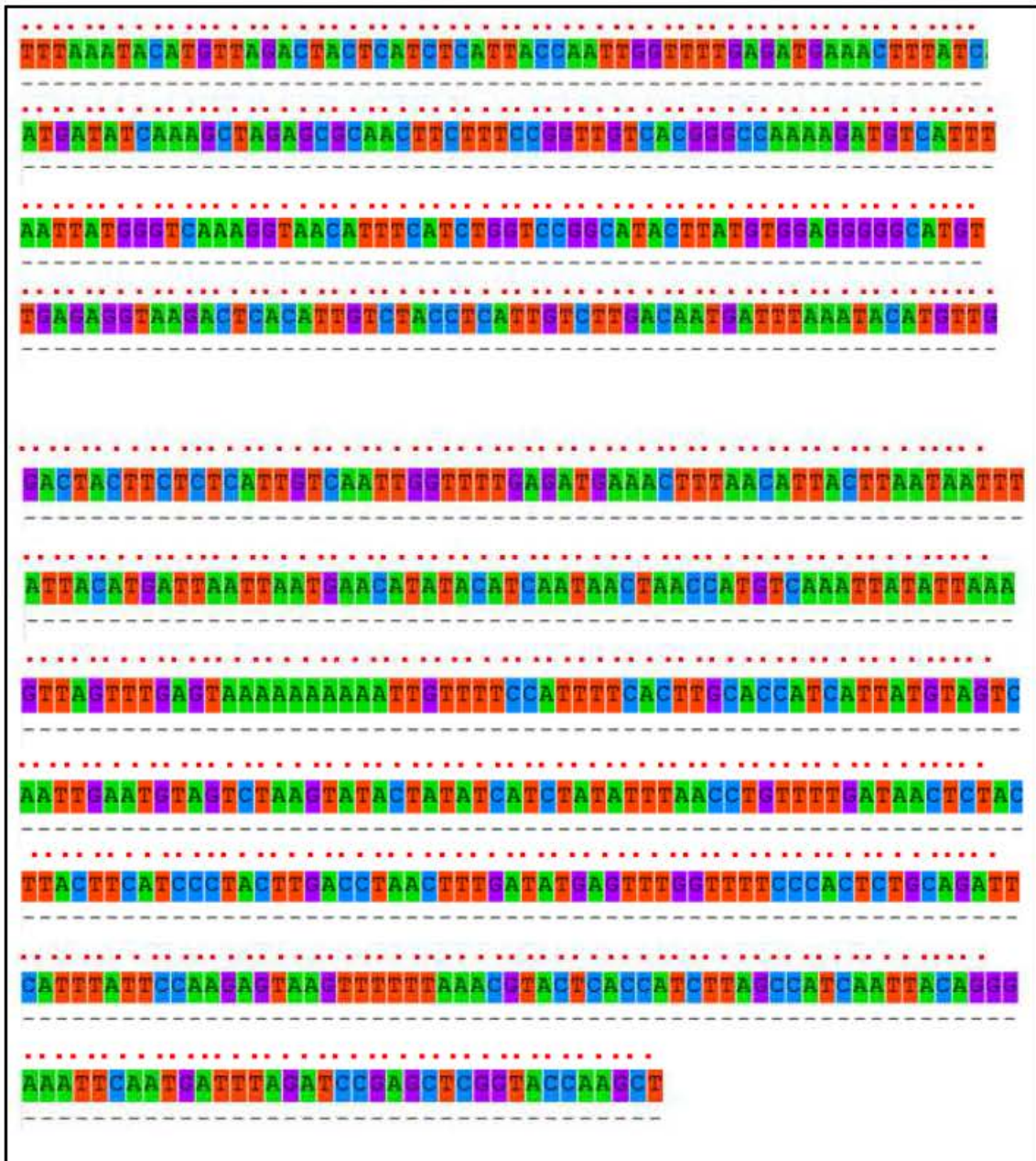
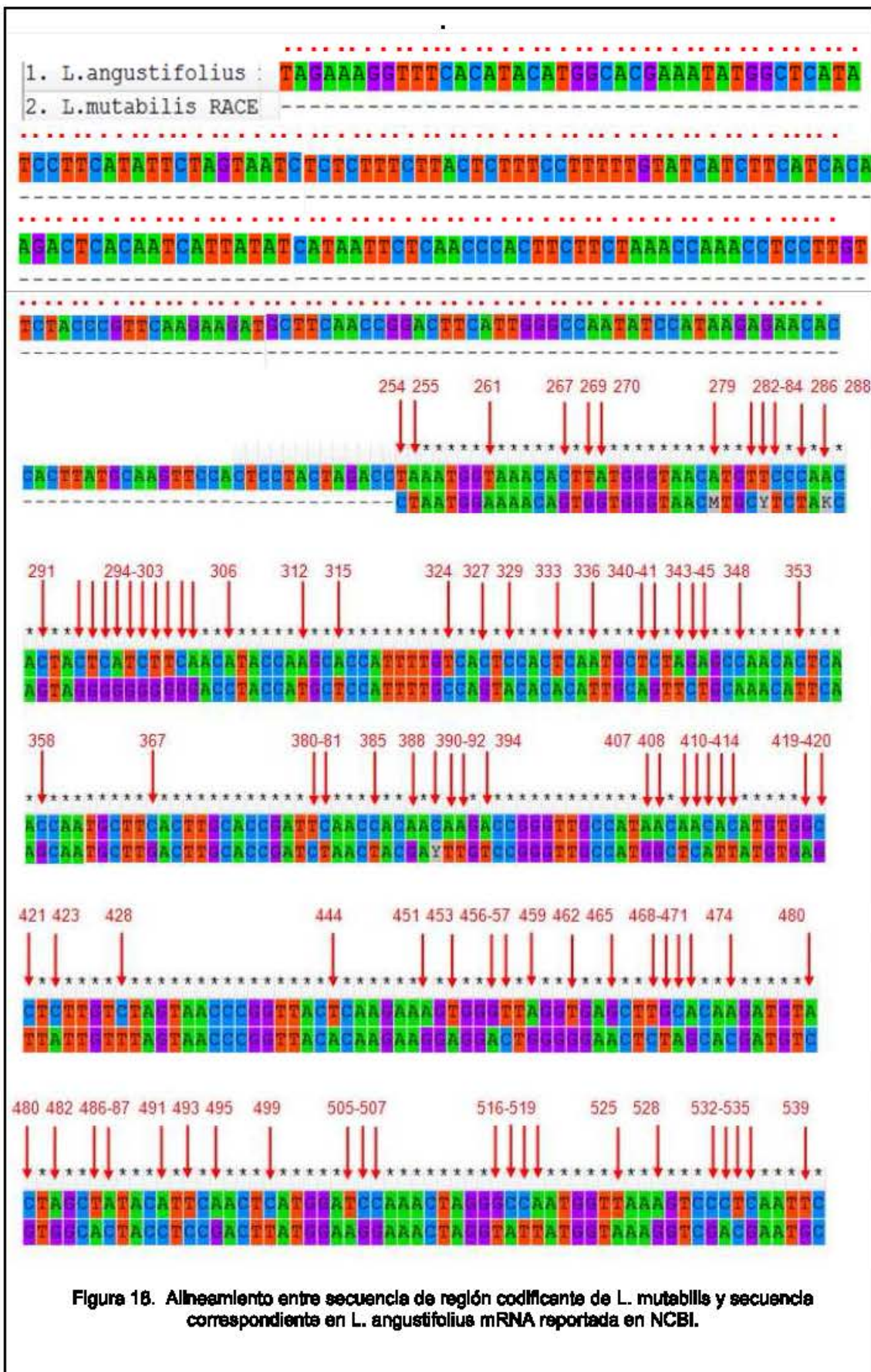


Figura 17. Alineamiento entre secuencia de región codificante de γ -conglutina en *L. mutabilis* y la secuencia correspondiente en *L. albus* clon 48 reportada en NCBI.
 Nota: El alineamiento se realizó mediante MEGA 6 Explorer con el método ClustalW. Los puntos rojos indican gaps, los asteriscos indican identidades y las flechas indican el sitio del polimorfismo

- *L. angustifolius* No. de Accesoión L39786.1 V.S. *L. mutabilis* RACE



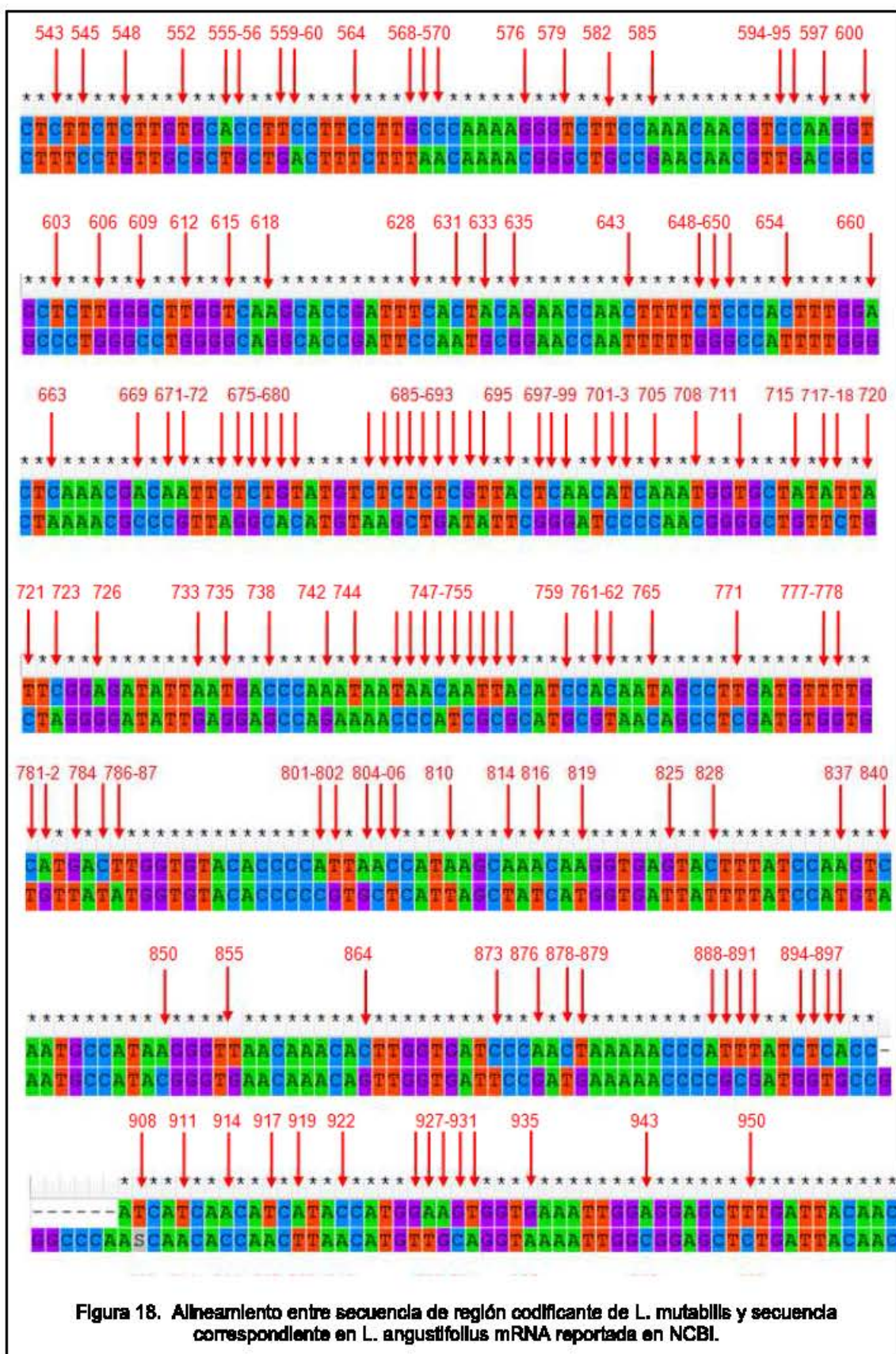
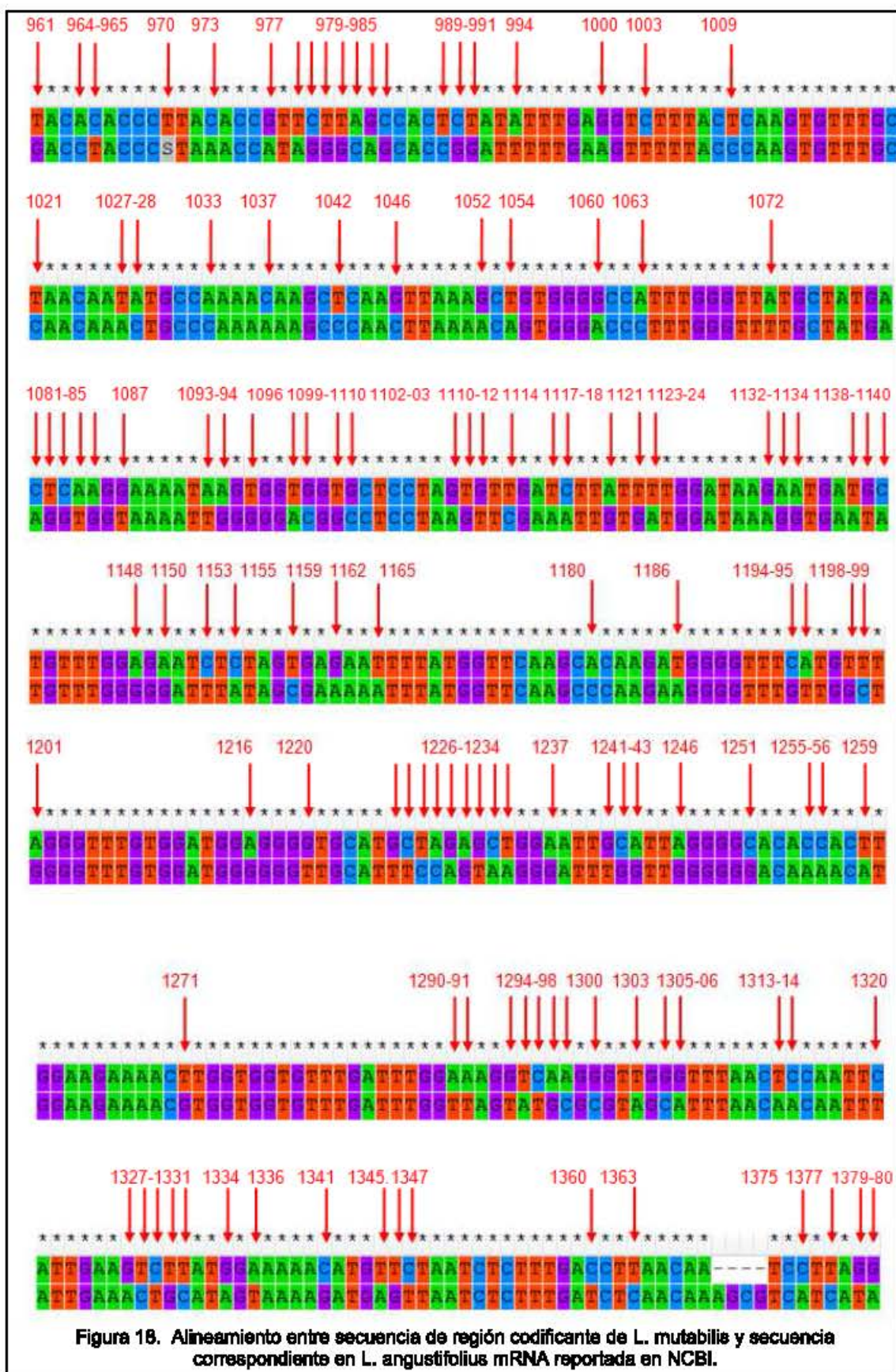
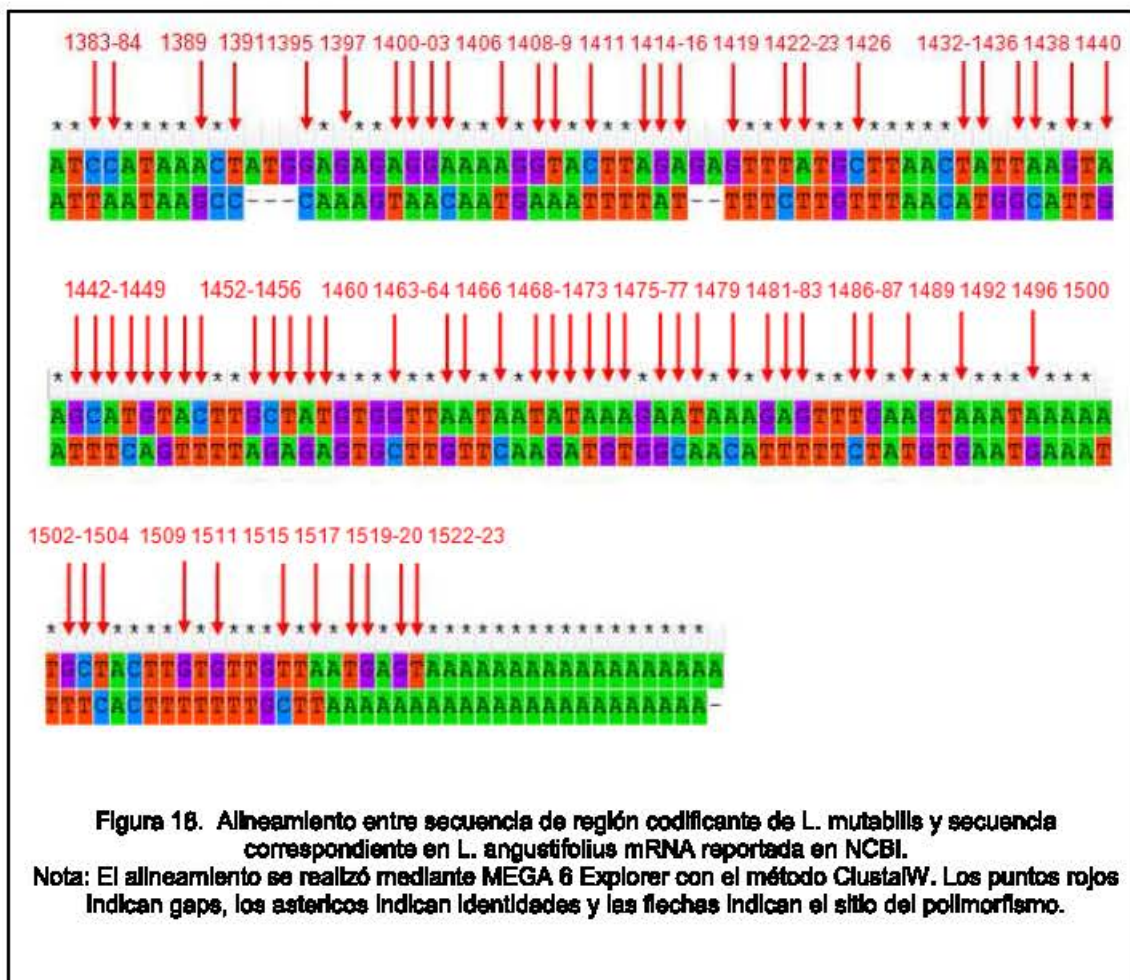
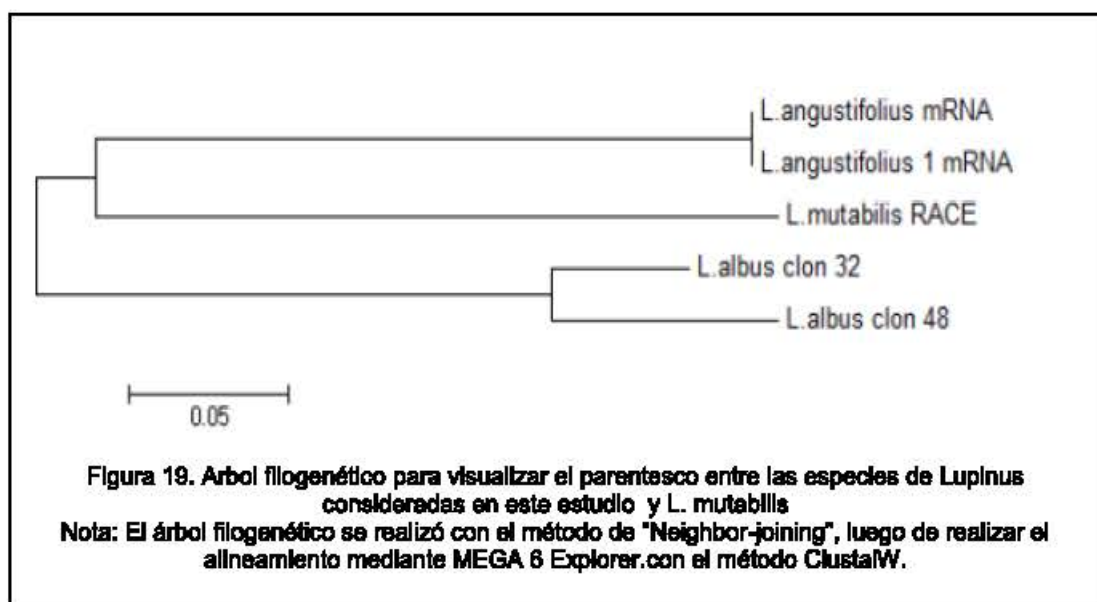


Figura 18. Alineamiento entre secuencia de región codificante de *L. mutabilis* y secuencia correspondiente en *L. angustifolius* mRNA reportada en NCBI.





3.4. Arbol filogenético



Finalmente se hizo un análisis filogenético del gen g-conglutina entre las secuencias de *L. angustifolius*, *L. albus* y *L. mutabilis* (Ver Figura 19). Los datos demostraron que el gen g-conglutina de *L. mutabilis* tuvo mayor similitud con la secuencia de *L. angustifolius* que con el gen de *L. albus*. Estos datos concuerdan con el número de polimorfismos entre *L. mutabilis* y *L. angustifolius* y *L. albus* (Ver Figuras 16, 17 y 18).

4. Discusión

Se cree que la proteína γ -conglutina posee un efecto hipoglicemiante debido a sus propiedades físico-químicas y su presencia se ha reportado en otras especies de *Lupinus* en Europa como *Lupinus albus* (Scarafoni, et. al., 2010) y *Lupinus angustifolius* (Gayler, et. al., 1995). Sin embargo, para la especie *Lupinus mutabilis*, originaria de la zona andina, no se había reportado información alguna. Dentro de este estudio se determinó que la especie de lupino cultivada y consumida en Ecuador, *Lupinus mutabilis*, cuenta con la presencia del gen para la proteína γ -conglutina que ha sido descrita previamente en otras especies de este género (Scarafoni, et. al., 2010) (Gayler, et. al., 1995). La identificación de la presencia de este gen en *L. mutabilis* se realizó mediante qPCR a partir de DNA genómico utilizando cebadores específicos, diseñados para este proyecto, en base a la secuencia reportada en NCBI, para γ -conglutina de *Lupinus albus*, por Scarafoni et. al., en 2010.

Inicialmente se estudió la presencia del gen γ -conglutina por PCR y se utilizó como control positivo DNA de *L. albus*. Así se pudo confirmar la región amplificada se trataba de γ -conglutina, cuando se utilizó DNA de *L. mutabilis* al comparar el tamaño de los fragmentos amplificados. Adicionalmente, fue necesaria la secuenciación del fragmento obtenido para comprobar que se trataba de γ -conglutina, ya que al no existir información alguna de este gen ni de la proteína en sí para *Lupinus mutabilis*, este era la mejor manera de comprobar el resultado observado en la electroforesis. Al alinear la secuencia del fragmento amplificado del gen para *L. mutabilis* con la secuencia reportada de *L. albus* se encontraron 28 polimorfismos V.S. clon 32 y 34 polimorfismos V.S. clon 48, los que pueden deberse a la diferencia entre especies y a la diferencia climática y de condiciones de cultivo que se da entre los lugares en que cada una es cultivada.

Para la medición de la expresión relativa de γ -conglutina para *Lupinus mutabilis* se realizó una RT-qPCR. En ambas RT-qPCR hubo amplificación

para las tres variedades de *Lupinus mutabilis*. Fue posible, mediante el software del equipo CFX96 Touch™ Real Time PCR Detection System, medir la expresión relativa del gen en las tres variedades de *Lupinus mutabilis*, datos que indicaron que la Variedad 1 o INIAP 450 “Andino”, que es una de las variedades desarrolladas por el instituto, fue la que presentó un mayor nivel de expresión del gen γ -conglutina, las variedades 2 y 3 tuvieron una expresión similar de γ -conglutina.

La diferencia en la expresión relativa del gen γ -conglutina entre las tres variedades de *Lupinus Mutabilis* puede deberse a que ambos híbridos, INIAP 450 e INIAP 451 son variedades fitomejoradas y la variedad 3 o “chocho criollo” es la variedad que se cultiva tradicionalmente y no ha sido mejorada. Por otra parte el nivel de expresión en la variedad 3 puede diferir debido a que las otras variedades son cultivadas bajo condiciones controladas (INIAP, 2010) mientras que el “chocho criollo” es cultivado sin un control específico de condiciones.

Como la selección genética de la variedad 2, INIAP 451 “guaranguito” se enfocó principalmente en la mejora de características organolépticas, de resistencia y de producción (INIAP, 2010) al realizar el fitomejoramiento puede haberse disminuido la expresión de γ -conglutina.

La diferencia de la expresión relativa también puede explicar la diferencia en la cantidad de proteína total que se encuentra en la composición de cada una de las variedades estudiadas, esta información fue facilitada por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuarias, mediante las fichas técnicas correspondientes a las variedades V1 y V2, las cuales son variedades desarrolladas por el instituto. De acuerdo a la información reportada por INIAP, la variedad 450 Andino (Variedad 1) está compuesta por un 45.02% de proteína, mientras que la variedad 451 “guaranguito” está compuesta por un 42.7% de proteína, lo que puede relacionarse con la diferencia en la expresión de γ -conglutina, ya que como se mencionó anteriormente, se reportó mayor expresión de la misma para la variedad 1 que para la variedad 2. La expresión

de γ -conglutina podría no ser la única responsable de la diferencia en la cantidad proteica entre las variedades estudiadas, sin embargo el tener un mayor nivel de expresión resulta en una mayor síntesis proteica por lo que posible relacionarla directamente con la composición de la semilla.

Después de la confirmación de la presencia del gen γ -conglutina en las tres variedades estudiadas de *Lupinus mutabilis* y la medición de la expresión relativa de la misma en las tres variedades cultivadas en el Ecuador, era indispensable conocer el tamaño aproximado de la región codificante del gen γ -conglutina. Para alcanzar este objetivo se utilizó la técnica de Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE), la técnica se divide en dos partes, 3' RACE y 5' RACE que permiten conocer la secuencia codificante completa de un gen, así como su sitio de inicio de transcripción como lo menciona Pallás, 2007.

La técnica 3' RACE presentó pocos inconvenientes al realizarla ya que al tener la cola poli-A propia del mRNA se utiliza un solo cebador específico para el gen que se busca conocer, por lo que no existe la generación de un alto número de fragmentos inespecíficos y la secuenciación del fragmento obtenido se realizó sin ningún inconveniente. El fragmento secuenciado fue de aproximadamente 500bp incluyendo la cola poly-A, la secuencia obtenida fue un poco menor a la observada en gel de agarosa, de 700bp aproximadamente, lo que puede deberse al ruido propio del secuenciador.

Por otra parte la técnica 5' RACE fue más compleja debido a que el protocolo sugerido en kits comerciales propone el uso de dos y hasta tres cebadores específicos para el gen en estudio, pero al no haber información reportada previamente para el gen γ -conglutina de *Lupinus mutabilis* no fue posible el diseño de estos cebadores hasta conocer la región obtenida por 3'RACE, ya que el diseño de los mismos fue a partir de la secuencia obtenida. De 5'RACE se obtuvo un producto de 1100bp aproximadamente, de acuerdo a lo observado en gel de agarosa, pero al igual que en 3'RACE al secuenciar el producto de 5'RACE se obtuvo una secuencia un poco más corta de lo

esperado, siendo esta de 800bp aproximadamente, con una pequeña región que se superpone con la secuencia obtenida a partir de 3'RACE, lo que puede deberse al ruido propio del secuenciador y a que el cebador proveído en el kit de 5'RACE de Invitrogen™ es un Abridged Universal Adaptor Primer (AUAP), el cual puede generar inespecificidad en el momento de realizar la PCR de secuenciación.

La secuencia completa obtenida de RACE es de 1259bp sin tomar en cuenta la cola poli-A. El inicio de la región 5' del cDNA γ -conglutina no logró obtenerse mediante esta técnica y corresponde a unos 240bp aproximadamente, lo que coincide con la diferencia entre el producto de 5'RACE observado en agarosa y la secuencia obtenida. Sin embargo, al alinear las secuencias publicadas en NCBI para la región codificante de γ -conglutina de *Lupinus albus* y *Lupinus angustifolius* se observó la región inicial, faltante en la secuencia obtenida en *L. mutabilis*, es una región conservada y con un corto número de polimorfismos. Por esta razón es posible inferir que el tamaño de la región faltante es de aproximadamente 240 bp, y consecuentemente, el tamaño de la región codificante de γ -conglutina de *Lupinus mutabilis* es de 1500bp aproximadamente.

Al alinear la secuencia codificante de γ -conglutina obtenida en *L. mutabilis* con los clones 32 y 48 de *L. albus* y la secuencia de *L. angustifolius*, la secuencia de γ -conglutina de *L. mutabilis* presenta varios polimorfismos concentrados en la región intermedia de la secuencia y varios gaps en los extremos de la misma en comparación con *L. albus*. Sin embargo, al alinearla con la secuencia correspondiente en *L. angustifolius*, el número de polimorfismos es menor, existen gaps en el extremo 5' y un porcentaje alto de similitud en el extremo 3'. El número de polimorfismos identificados entre las secuencias de γ -conglutina reportadas para *Lupinus albus* y *Lupinus angustifolius*, en comparación con la secuencia encontrada para *Lupinus mutabilis* se explica no solamente al tratarse de especies distintas, sino también a la diferencia geográfica y climática en la que cada especie es cultivada, lo que por motivos de adaptación pudo haberse provocado un cambio en las secuencias de γ -conglutina. Por otra

parte al no haber encontrado polimorfismos entre las secuencias obtenidas de las tres variedades de *Lupinus mutabilis* que formaron parte de este estudio es posible deducir que las modificaciones realizadas a las variedades INIAP 450 e INIAP 451, al menos en la secuencia en sí del gen no provocan cambios, siendo la única, pero importante diferencia, el nivel de expresión relativa del gen que se observó entre las tres variedades.

Al realizar el árbol filogenético fue posible observar, de acuerdo a la secuencia obtenida para el gen γ -conglutina de *Lupinus mutabilis*, que existe un parentesco más cercano entre *Lupinus angustifolius* y *Lupinus mutabilis* mientras que con la especie *Lupinus albus* tiene una mayor diferencia. Este resultado se respalda con los alineamientos realizados ya que existe un menor número de polimorfismos entre la secuencia de γ -conglutina para *Lupinus mutabilis* y las de γ -conglutina para *Lupinus angustifolius* y un mayor número de polimorfismos entre la secuencia de *Lupinus mutabilis* y las de *Lupinus albus*. De igual manera se pudo evidenciar que existen más diferencias entre *Lupinus albus* y *Lupinus angustifolius* que entre cada una de estas especies y *Lupinus mutabilis* e inclusive se pudo observar al alinear las secuencias que las dos secuencias reportadas de γ -conglutina de *Lupinus albus* presentan diferencias entre si.

Con la secuencia codificante del gen γ -conglutina hubiera sido deseable predecir la secuencia de amino ácidos de la proteína. Sin embargo debido a que no se pudo determinar el inicio del marco de lectura del gen no fue posible hacer dicha predicción.

5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

Al confirmar la presencia de la proteína γ -conglutina en *L. mutabilis*, se logró demostrar que este contiene uno de los posibles agentes responsables de regular la glucosa en la sangre de pacientes que presentan DM2, permitiendo así, que el consumo de "chocho" se convierta en un posible tratamiento alternativo para esta enfermedad a futuro.

La técnica de RT-qPCR permitió medir los niveles relativos de expresión del gen γ -conglutina en *Lupinus mutabilis*, lo que propone que esta técnica puede ser considerada para mejorar los análisis de contenido proteico de otras plantas comestibles y realizar comparaciones de ser estas necesarias, así como también garantizar la calidad de las nuevas variedades que se desarrollen a partir distintas plantas en el Ecuador y alrededor del mundo.

La variedad que presentó una mayor expresión relativa de γ -conglutina fue la variedad 1 o INIAP 450 "Andino". La diferencia en los niveles de expresión relativa de γ -conglutina en las tres variedades estudiadas puede deberse principalmente a los cambios que han sufrido las variedades desarrolladas por INIAP, ya que estas corresponden a híbridos obtenidos por fitomejoramiento.

El gran número de polimorfismos encontrados entre especies pueden ser producto de adaptación a las diferentes condiciones geográficas y climáticas en las que se ha desarrollado cada especie. Al no haber polimorfismos entre las secuencias de γ -conglutina obtenidas de las tres variedades de *Lupinus mutabilis* que formaron parte de este estudio es posible concluir que las modificaciones realizadas a las variedades INIAP 450 e INIAP 451 no generaron cambios en la región codificante del gen.

La identificación de la presencia de γ -conglutina en *Lupinus mutabilis*, siendo uno de los posibles compuestos que otorgan actividad hipoglicemiante al consumo de la leguminosa, es de gran importancia ya que en investigaciones posteriores podría evaluarse la acción de la proteína en modelos animales para determinar si el efecto hipoglicemiante de los lupinos se debe únicamente a la presencia de γ -conglutina.

5.2. Recomendaciones

En primer lugar se recomienda diseñar primers degenerados para el inicio de la región codificante para obtener un producto de PCR en el que se encuentren los 240bp que no pudieron ser obtenidos mediante RACE.

Se recomienda extender el proyecto de investigación hacia la clonación en vectores del gen de la proteína γ -conglutina y su posterior expresión en células procariotas o eucariotas. Así como también se considera importante el análisis de la proteína obtenida mediante la expresión y la proteína purificada de las semillas de *Lupinus mutabilis* para determinar las características de la proteína como sitios activos, estructura tridimensional, solubilidad y especificidad, para su futura evaluación como alternativa a los tratamientos actuales para DM2.

REFERENCIAS

- American Diabetes Association. (2010). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 33(1) (2010), S62-S69.
- Aschner, P., Alvarado, B., Arbañil, H., Arguedas, C., Argueta, M., Aylwin, C., Barragán, D., Benítez, A., Caballero, R., Calvagno, M., Chacra, A., Díaz, O., Escobar, I., Fortich, A., Gruber, E., Hernández, M., Hernández, T., Hernández, A., Jadzinski, M., Javiel, G., Lerario, A., López, G., Moreira, V., Ramos, O., Rosas, J., Ruiz, A., Segarra, P., Sierra, I., Vaca, C., Villena, J. y Violante, R., col. García de los Ríos, M. (s. f). Guías ALAD para diagnóstico control y tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2.
- Asenjo, S., Muzzo, S., Pérez, M.V, Ugarte, F. y Willshaw, M. (2007). Consenso en el diagnóstico y tratamiento de la diabetes tipo 1 del niño y del adolescente. *Revista Children's Pediatrics*, 78(5) (2007), 534-541.
- Barrio, R. (2007). Diabetes monogénicas: enfoque diagnóstico y tipos más frecuentes. *Avances en Diabetología*, 23 (5), 333-340.
- Bertoglio, J.C., Calvo, M., Hancke, J., Burgos, R., Riva, A., Morazzoni, P., Ponzone, C., Magni, C. y Duranti, M. (Mayo, 2011). Hypoglycemic effect of lupin seed γ -conglutin in experimental animals and healthy human subjects. *Phytotherapy*, 82(7), 933-938.
- Bianchi, C. y Del Prato, S. (2011). Looking for new pharmacological treatments for Type 2 Diabetes. *Diabetes Voice*, 56(1) (2011), 28-31.
- Blanca, JM. y Cañizares, J. (2014). Alineamientos múltiples. Recuperado el 24 de noviembre de 2014 de <http://personales.upv.es/jcanizar/bioinformatica/multiple.html>.
- Burd, I. (2012). Diabetes Gestacional. University of Maryland Medical Center. Recuperado el 30 de mayo de 2014 de

<http://umm.edu/health/medical/spanishpreg/embarazos-de-cuidados-especiales/diabetes-gestacional>.

Campo, M. y Posada, G. (2008). Factores de riesgo para Diabetes Gestacional en población obstétrica. *Revista CES Medicina*, 22(1) (2008), 59-69.

Cano, J., Franch, J., Mata, M., Mundet, X. y Santos, P. (s. f). Diabetes mellitus tipo 2: Protocolo de actuación. Grupo de estudio de la diabetes en atención primaria de Salud (GEDAPS). FMS – Protocolos, 7-49.

Capraro, J., Magni, C., Scarafoni, A. y Duranti, M. (Agosto, 2009). Susceptibility of Lupin γ -Conglutin, the Plasma Glucose-Lowering Protein of Lupin Seeds, to Proteolytic Enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), p. 8612-8616.

Centro de Información e Inteligencia Comercial. (2009). Perfiles del producto: Perfiles del fréjol. Recuperado el 20 de agosto de 2014 de <http://www.pucesi.edu.ec/pdf/frejol.pdf>

Cialzeta, J (2009). Antidiabéticos Orales. Cátedra Farmacología y Medicina – Universidad Nacional del Nordeste, Argentina. Recuperado el 18 de junio de 2014 de <http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/clas2do/201012.pdf>

Colino, E. (s. f). Tipos de diabetes. Recuperado el 20 de junio de 2014 de http://www.fundaciondiabetes.org/diabetesinfantil/la_diabetes/tipos_diabetes.htm

Conget, I. (2002). Diagnosis, Classification and Pathogenesis of Diabetes Mellitus. *Revista Española de Cardiología*, 55(5) (2002), 528-535.

Cowell, I. y Austin, C. (1997). *Methods in Molecular Biology™: cDNA Library Protocols*. Humana Press. Totowa, Estados Unidos.

- Diabetesalud. (s. f). La diabetes: Tipos de diabetes. Recuperado el 26 de mayo de 2014 de <http://www.diabetesalud.com/diabetes/que-es-la-diabetes/tipos-de-diabetes>.
- Duranti, M., Consonni, A., Magni, C., Sessa, F. y Scarafoni, A. (2008). The major proteins of lupin seed: Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. *Trends in Food and Technology*, 71 (2008), 1-11.
- Falconí, C. (2012). *Lupinus mutabilis* in Ecuador with special emphasis on anthracnose resistance. Recuperado el 26 de mayo de 2014 de <http://edepot.wur.nl/210228>.
- Foley, R., Gao, L., Spriggs, A., Soo, L., Goggin, D., Smith, P., Atkins, C. y Singh, K. (2011). Identification and characterisation of seed storage protein transcripts from *Lupinus angustifolius*. *BMC Plant Biol* 11: 59.10.1186/1471-2229-11-59.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (s. f). Tarwi o Chocho (*Lupinus mutabilis*). En Jacobsen, S. y Sherwood, S. (2002). *Cultivo de granos andinos en Ecuador: informe sobre los rubros quinua, chocho y amaranto*. Quito, Ecuador: Editorial Abya Yala.
- Fornasini, M., Castro, J., Villacrés, E., Narváez, L., Villamar, M. y Baldeón, M. (2012). Hypoglycemic effect of *Lupinus mutabilis* in healthy volunteers and subjects with dysglycemia. *Nutrición Hospitalaria*, 27(2) (2012), 425-433.
- Gil, A. y Ruiz, M. (2010). *Tratado de Nutrición-Tomo II: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- González, J., Ruiz, C. y Revuelta, M. (2013). *Boletín Epidemiológico Diabetes Mellitus Tipo 2 – Primer Trimestre 2013*. Secretaría de Salud, México. Recuperado 28 de mayo de 2014 de

http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/bol_diabetes/dm2_bol1_2013.pdf

Grether, R. (2005). Reseña de "Legumes of the World" de Lewis, G., Shire, B., Mackinder, B., Lock, M. Boletín de la Sociedad Botánica de México, 77 (2005), 75-77.

Hodgson, J. y Ping, L. (2008). Potential for benefit of lupin on obesity and cardiovascular disease risk in humans. En Palta, J., Berger, J. Proceedings of the 12th International Lupin Conference. Caterbury, Nueva Zelanda: International Lupin Association.

International Diabetes Federation. (2013). IDF Diabetes Atlas, 6th edition. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation. Recuperado el 28 de mayo de 2014 en <http://www.idf.org/diabetesatlas>.

Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2013). Diabetes y enfermedades hipertensivas entre las principales causas de muerte en el 2013. Quito, Ecuador: INEC. Recuperado el 4 de noviembre de 2014 en <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/diabetes-y-enfermedades-hipertensivas-entre-las-principales-causas-de-muerte-en-el-2013/>

Jacobsen, S. y Mujica, A. (2006). El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) y sus parientes silvestres. Botánica Económica de los Andes Centrales, (2006), 458-482.

Jacobsen, S. y Sherwood, S. (2002). Cultivo de granos andinos en Ecuador: informe sobre los rubros quinua, chocho y amaranto. Quito, Ecuador: Editorial Abya Yala.

Kurlovich, B. (2002). Lupins: Geography, Classification, Genetic Resources and Breeding. St. Petersburg, Rusia – Pellosoiniemi, Finlandia: OY International North Express.

LeRoith, D., Taylor, S. y Olefsky, J. (2004). Diabetes Mellitus A Fundamental Clinical Text. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.

Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J., Moro, M. y Portolés, A. (2009). *Farmacología: Básica y Clínica*, de Velásquez. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.

Medical Biochemistry Page. (2013). Definición de la Diabetes. Recuperado el 30 de mayo de 2014 de <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/diabetes-sp.php>

Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2011). La Diabetes es la segunda causa de muerte general en el país. Recuperado el 26 de junio de 2013 de http://instituciones.msp.gob.ec/misalud/index.php?option=com_content&view=article&id=257:la-diabetes-es-la-segunda-causa-de-muerte-general-en-el-pais&catid=52:edusalud&Itemid=244

Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2011). Protocolos Clínicos y Terapéuticos para la atención de Enfermedades Crónicas No Transmisibles (diabetes 1, diabetes 2, dislipidemias, hipertensión arterial). Recuperado el 20 de junio de 2014 de https://www.iess.gob.ec/documents/10162/51880/Protocolos_ECNT_01_de_junio_2011_v.pdf

Naqvi, S., Harper, A., Carter, C., Ren, G., Guirgis, A., York, W.S. y Thornburg, R.W. (2005). Nectarin IV, a potent endoglucanase inhibitor secreted into the nectar of ornamental tobacco plants: Isolation, cloning, and characterization. *Plant Physiology* 139 (2005), 1389–1400.

Ortega, E., Rodríguez, A., David, A. y Zamora, A. (2010). Caracterización de semillas de lupinuo (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia. *Revista UNAL Acta Agronómica*, 59(1) (2010), 111-118.

Pauly, M., Andersen, N., Kauppinen, S., Kofod, L., York, W.S., Albersheim, P. y Darwill A. (1999). A xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast, purification and

characterization of the recombinant enzyme. *Glycobiology*, 9(1) (1999), 93-100.

Piemonte, L. (2011). Review of "*Looking for new pharmacological treatments for Type 2 Diabetes.*" Recuperado el 27 de junio de 2014 de <http://www.idf.org/looking-new-pharmacological-treatments-type-2-diabetes>

Porras, J. (2010). Caracterización del proceso de obtención de aislados de la proteína de *Lupinus silvestre* en el Estado de Hidalgo. Recuperado el 26 de junio de 2013 de <http://itzamna.bnct.ipn.mx/dspace/bitstream/123456789/9178/1/18.pdf>

Rodelgo, T. (2012). Antidiabéticos (remedios contra la diabetes). Recuperado el 20 de junio de 2014 de <http://www.onmeda.es/enfermedades/diabetes-tratamiento-antidiabeticos-%28remedios-contra-la-diabetes%29-1725-13.html>

Rodríguez, M. (2002). Desarrollo de una alternativa tecnológica para la obtención de cremogenados de chirimoya (*Annona cherimola* Mill), guayaba (*Psidium guajava* L) y Mango (*Mangifera indica*). Cantón Mejía-Pichincha, Ecuador: Archivo histórico del INIAP.

Rodríguez, M., Sobrá, S., Silva, L., Junquera, C., Pérez, M., Ríos, C., Ania, J., Rojas, M., León, J., Pellicer, M., Paniagua, S., Arcas, M., Gálvez, D., Castellón, L., De la Cortina, C., Herrera, N., Bazán, P., Juradao, M., Rico, M., Azañón, R., García, M., Boceta, J., Valverde, E., Cara, J., Puertas, E., Peris, C., Silva, M., Romero, A., García, A. y Perillán, C. (2004). Diplomados en Enfermería/ATS del Consorcio Hospitalario General Universitario, Temario 3. Madrid, España: Editorial MAD.

Rojas, C., Catrileo, A. (Julio, 1998). Grano de Lupino Blanco (*Lupinus albus*) y Australiano (*Lupinus angustifolius*) entero o chancado, en la engorda invernal de novillos. *Agro sur*, 26 (2), 70-77.

- Scarafoni, A., Ronchi, A. y Duranti, M. (Diciembre, 2009). γ -Conglutin, the Lupinus albus XEGIP-like protein, whose expression is elicited by chitosan, lacks of the typical inhibitory activity against GH12 endoglucanases. *Phytochemistry*, 71 (2010), 142-148.
- Stevens, P.F. (2006). Fabaceae. Recuperado en Angiosperm Phylogeny Website.
- Téba, F., Escobar, F. (2009). La diabetes mellitus en la práctica clínica. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Terruzzi, I., Sinesi, P., Montesano, C., Scarafoni, A., Luzi, L. y Duranti, M. Insulin-mimetic action of conglutin- γ , a lupin seed protein, in mouse myoblasts. *Nutrition, Metabolic And Cardiovascular Diseases*, 21 (2011), 197-205.
- Velásquez, B., Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J., Moro, M. y Portolés, A. (2009). Farmacología Básica y Clínica. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Villacrés, E., Peralta, E., Cuadrado, L., Revelo, J., Abdo, S. y Aldaz, R. (2009). Propiedades y Aplicaciones de los Alcaloides del Chocho. Quito, Ecuador: INIAP-ESPOCH-SENESCYT.
- Zamora, F., García, P. y Ruiz, M. y Salcedo, E. (2009). Composición de alcaloides en semillas de *Lupinus mexicanus* (fabaceae) y evaluación antifúngica y alelopática del extracto alcaloideo. *Interciencia*, 42(2) (2009), 672-676.