



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS rs307355 Y
rs35744813 DEL GEN *TAS1R3* ASOCIADA A LA PERCEPCIÓN DEL SABOR
DULCE EN INDIVIDUOS DE LA POBLACIÓN ECUATORIANA

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

Profesora Guía

MsC Carolina Alejandra Salazar Ruales.

Autora

Ana Carolina Cárdenas Figueroa

Año

2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

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

MsC Carolina Alejandra Salazar Ruales.
Máster en Biotecnología
1718836099

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi 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.”

Ana Carolina Cárdenas Figueroa
0604086405

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto de Investigaciones Biomédicas por haberme brindado la oportunidad de crecer profesionalmente al realizar mis prácticas profesionales y mi Trabajo de Titulación. Agradezco al Doctor César Paz-Y-Miño por abrirme las puertas en el Instituto.

Agradezco a Carolina, mi profesora guía por su compromiso y enseñanzas en este proceso.

DEDICATORIA

A Miguel y Eugenia, quienes me han enseñado que cada paso debe realizarse con tenacidad, dejando huellas que perduren.

A mi hermano José, el mejor ejemplo, quien me ha enseñado a construir el futuro con constancia y dedicación.

A mis tías, Anita, Margarita, Myriam y Lucía, consideradas mis segundas madres, quienes con su amor infinito me han formado como la persona que soy hoy en día, quienes me han enseñado que se debe volar alto.

A mi mejor amiga Paty, por su incondicionalidad.

Los amo infinitamente, este solo es el principio de muchos sueños.

RESUMEN

La percepción del gusto está determinada por varios factores, entre ellos los factores genéticos. Estos últimos, se refieren a polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) presentes en la secuencia de los genes codificantes para los receptores del gusto. Se ha encontrado que dos SNPs: rs307355 y rs35744813 del gen *TAS1R3*, influyen en la variación de la percepción del sabor dulce. Estos SNPs están en la zona reguladora de la secuencia génica, afectando la actividad del promotor, disminuyendo el nivel de ARNm y la cantidad de moléculas de receptor *TAS1R3* dentro de las células receptoras del gusto. Un estudio previamente realizado en europeos, asiáticos y africanos, concluyó que el alelo T de ambos polimorfismos reducía la percepción ante la sacarosa. El objetivo de esta investigación fue evaluar las frecuencias genotípicas, alélicas y de haplotipos de los polimorfismos rs307355 y rs35744813 del gen *TAS1R3* en el grado de percepción del sabor dulce en individuos de población ecuatoriana (n=110). Se evaluó su umbral de detección ante la sacarosa. Además, se recogieron datos sobre ciertos hábitos, padecimiento de enfermedad y antecedentes familiares de enfermedades que podían influir en la percepción del sabor dulce. Las frecuencias genotípicas demostraron que la presencia del alelo T del polimorfismo rs35744813 afectó la sensibilidad ante la percepción de la sacarosa altamente concentrada (1 y 1,5%) ($p=0,008$ y $p=0,002$). El análisis de haplotipos también reveló influencia en la percepción de sacarosa a 1,5% ($p=0,018$). No existió relación significativa entre los hábitos y la percepción de la sacarosa ($p>0,05$). No obstante, existió significancia entre los antecedentes familiares de enfermedades y la percepción de sacarosa de concentración media (0,5%) ($p=0,022$). Se concluyó que los individuos ecuatorianos poseedores del alelo T de rs35744813 del gen *TAS1R3* se ven afectados en su percepción ante el sabor dulce. Finalmente, las frecuencias fueron muy similares a las de población europea, lo que se puede deber a la influencia genética que han tenido dentro del mestizaje. Se ha logrado sentar un conocimiento teórico de la influencia genética sobre la percepción al sabor dulce, pudiendo aportar al entendimiento de hábitos alimenticios y su impacto sobre la salud humana.

ABSTRACT

The perception of taste is determined by several factors, one of them are the genetic ones. The genetic factors are referred to the polymorphism of the single nucleotide (SNPs) that are located in the sequence of the encoding genes to the taste receptors. It has been found, that two of the SNPs: rs307355 and the rs35744813 of the gene *TAS1R3* influence in the variation of the sweet taste perception. These kind of SNPs are located in the regulator zone of the genetic sequence. This affects the promoter activity, diminishing the mRNA and the quantity of the molecules of the receptor *TAS1R3* that are inside the receptors of taste cells. A study made before in European, Asian and African people, concluded that the T allele of both polymorphisms reduced the perception of the sucrose. The objective of this research was to evaluate the phenotypic, allelic and haplotype frequencies of the polymorphisms rs307355 and rs35744813 of the *TAS1R3* gene. How all of these frequencies affects in the sweet perception in ecuadorian people (n=110). Also, It has evaluated the detection threshold with the sucrose consumption. There were also some data about certain habits, diseases and familiar records that could influence in the perception of the sweet flavor. The genotypic frequencies demonstrated that the presence of T allele of the polymorphism rs35744813, affects the perception sensitivity the highly concentrated saccharose (1 and 1,5%) ($p=0,008$ and $p=0,002$). The analysis of the haplotypes revealed the influence on the saccharose perception in 1,5% ($p=0,018$). There is no significant relationship between the habits and the saccharose perception. ($p>0,05$). However, it existed a significance between the familiar disease records and the media saccharose perception (0,5%) ($p=0,022$). We can conclude that ecuadorian people that have T allele rs35744813 of the *TAS1R3* gene are affected in their perception of the sweet flavor. Finally, the frequencies were very similar to the european population. Which is because of the genetic influence that ecuadorian people have because of the miscegenation. We have achieved the teoric knowledge about the genetic influence in the perception of the sweet flavor. With this research, we apport to the knowledge of the food habits and its impact on the human health.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Antecedentes	1
Planteamiento del problema	1
Justificación	3
Alcance	6
Objetivos.....	7
Objetivo General.....	7
Objetivos específicos.....	7
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	8
1.1 Percepción de los sabores.....	8
1.1.1 Mecanismos de percepción	8
1.1.2 Receptores del gusto y los diferentes sabores	12
1.2 Factores influyentes en la percepción de los sabores	16
1.3 Importancia de la percepción de los sabores	19
1.4 Sabor dulce.....	19
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	30
2.1 Recolección de datos	30
2.1.1 Recolección de datos individuales mediante encuesta.....	30
2.1.2 Evaluación de umbral de detección	30
2.2 Recolección de muestras de sangre	31
2.3 Procesamiento de muestras mediante la utilización de técnicas de biología molecular	31
2.3.1 Extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica	31
2.3.2 Análisis cualitativo y cuantitativo del ADN extraído	33
2.4 Determinación de genotipos	33
2.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa de punto final (PCR) para los polimorfismos rs307355 y rs35744813 del gen Tas1R3.	33
2.4.2. Secuenciación capilar	37

2.5 Análisis estadístico.....	40
2.5.1 Estratificación de subgrupos por umbral de detección y genotipo	41
CAPÍTULO III. RESULTADOS	43
3.1 Datos recogidos en la encuesta realizada.....	43
3.1.1 Edad y sexo	43
3.1.2 Hábitos de los individuos de la población muestreada	44
3.1.3 Enfermedades y antecedentes familiares	45
3.2 Evaluación del umbral de detección de la sacarosa	46
3.2.1 Detección de sacarosa a 0,05%	46
3.2.2 Detección de sacarosa a 0,10%	47
3.2.3 Detección de sacarosa a 0,34%	47
3.2.4 Detección de sacarosa a 0,5%	47
3.2.5 Detección de sacarosa a 1%	47
3.2.6 Detección de sacarosa a 1,5%	48
3.3 Extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica	49
3.3.1 Concentración de ADN obtenido	49
3.4 Determinación y análisis de genotipos	49
3.4.1 Amplificación de secuencias de interés mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	49
3.4.2 Secuenciación y análisis genotípico	50
3.4.3 Frecuencias genotípicas y alélica	52
3.5 Análisis de dosis umbral de sacarosa y hábitos	53
3.6 Análisis de dosis umbral de sacarosa-padecimiento de enfermedades y antecedentes familiares de enfermedades ..	53
3.7 Análisis de polimorfismos con los diferentes hábitos.	55
3.7.1 Polimorfismo rs307355 y hábitos	55
3.7.2 Polimorfismo rs35744813 y hábitos	55
3.8 Análisis de polimorfismos con padecimiento de enfermedades y antecedentes familiares de enfermedades ..	56
3.8.1 Polimorfismo rs307355- enfermedades y antecedentes familiares de enfermedades	57

3.8.2 Polimorfismo rs35744813- enfermedades y antecedentes familiares de enfermedades	58
3.9 Análisis de polimorfismos y dosis umbral	59
3.9.1 Polimorfismo rs307355 y dosis umbral	59
3.9.2 Polimorfismo rs35744813 y dosis umbral	62
3.10 Estratificación de subgrupos por umbral de detección y genotipo	65
3.10.1 Estratificación de subgrupos por umbral de detección y genotipo del polimorfismo rs307355	65
3.11.2 Estratificación de subgrupos por umbral de detección y genotipo del polimorfismo rs35744813	66
3.11 Análisis de haplotipos	67
3.12 Comparación de resultados obtenidos con respecto a población mundial	69
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN	73
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	84
5.1 Conclusiones	84
5.2 Recomendaciones	85
REFERENCIAS	87
ANEXOS	97

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

La necesidad de dilucidar el mecanismo mediante el cual se produce la sensación de sabor llevó a la identificación de los receptores celulares del gusto. A estos se los define como proteínas receptoras que reconocen ligandos pertenecientes a las cinco modalidades del gusto: salado, dulce, amargo, ácido y umami. En los mamíferos, los receptores del gusto se encuentran en las células neuroepiteliales de las papilas gustativas, dispuestas sobre la superficie de la lengua. En cuanto a los sabores amargo, dulce y umami, se trata de receptores acoplados a proteínas G (Nature.com subject areas, 2015).

De esta manera, se ha identificado que los receptores dispuestos en la membrana de las células receptoras del gusto son: la familia de receptores T2R asociados al sabor amargo; la familia T1R asociada a los sabores dulce y umami; los canales iónicos PKD1L3 y PKD2L1 correspondientes al sabor ácido; y los canales receptores de sodio al sabor salado (Bachmanov *et al.*, 2011, pp. 1-9).

La percepción de los sabores está considerada como un factor altamente influyente en la elección de los alimentos, además de ser descrita como la barrera nutricional del cuerpo humano (Feeney, *et al.*, 2010, pp. 135-142). Por otro lado, se considera que la percepción de los sabores es un rasgo característico que conforma el fenotipo de un individuo y como tal, está definido por factores genéticos y ambientales (Behrens, Roudnitzky, Meyerhof, Nuthetal, 2013, pp.180-186).

Con respecto a los factores genéticos, estos se encuentran íntimamente relacionados con el grado de percepción de los sabores en las personas. Esto se debe a que la sensibilidad ante un sabor puede variar en dependencia de variantes genéticas presentes en la secuencia de los genes codificantes de los receptores antes mencionados (Feeney *et al.*, 2010, pp. 135-142).

En cuanto a al sabor dulce, este cumple el papel de sensor energético en el cuerpo, ya que reconoce carbohidratos y proteínas que aportan energía al organismo (Feeney *et al.*, 2010, pp. 135-142). Como se mencionó anteriormente, la familia de receptores T1R es la responsable de la percepción de dicho sabor y se ha identificado que específicamente los genes responsables *TAS1R3* y *TAS1R2* son aquellos que codifican para un heterodímero compuesto por un receptor acoplado a una proteína G (Feeney, *et al.*, 2010, pp. 135-142).

Cabe recalcar que, dentro de la percepción del sabor dulce se toma en cuenta aquellos factores genéticos que antes se mencionaron. De esta manera, han sido identificados cierto número de variantes genéticas o polimorfismos de nucleótido simple (SNP) tanto en regiones codificantes como no codificantes de dichos genes (Feeney, *et al.*, 2010, pp. 135-142). Un estudio realizado en 2009 por Fushan y colaboradores reveló que dos polimorfismos no codificantes de *TAS1R3*: rs307355 y rs35744813, provocan una gran variabilidad en la percepción del sabor dulce debido a la influencia que estos tienen sobre la actividad del promotor. En el estudio, se demostró que el alelo T, reducía significativamente la actividad del promotor en comparación al alelo C; siendo estos resultados consistentes con el grado de percepción de los individuos estudiados en cuanto al sabor dulce (Fushan, Simpson, Slack, Manichaikul, y Drayna, 2009, pp. 1288–1293).

Es importante mencionar que la elección de consumir ciertos alimentos influye sobre el estado nutricional y de salud, así como en el riesgo de padecer enfermedades crónicas (García-Bailo, Toguri, Eny y El-Sohemy, 2009, pp. 69-80). Al hablar de desórdenes nutricionales y enfermedades relacionadas con el consumo de alimentos altos en azúcares, se presenta de nuevo la relación entre los factores genéticos y la elección de ciertas comidas. Basándose en las variantes alélicas de los polimorfismos rs307355 y rs35744813 del gen *TAS1R3*, ciertos individuos presentarán diferentes niveles de percepción del sabor dulce. Esto incide de forma directa en el consumo de azúcar, ya sea hacia niveles elevados o bajos (Raliou *et al.*, 2011, pp. 1-11).

Por lo tanto, la importancia de profundizar en el estudio del sistema gustativo radica en la constitución de un modelo que lleva a entender los mecanismos genéticos, moleculares, celulares, sistemáticos y su relación con respuestas sensoriales.

Planteamiento del problema

La percepción de un sabor es tomada en cuenta como rasgo fenotípico, debido a que es una característica que está determinada por el genotipo del individuo conjuntamente con factores ambientales con los que cada individuo está relacionado (Behrens *et al.*, 2013, pp.180-186).

Con respecto a factores ambientales se puede mencionar edad, género, consumo de drogas, tabaquismo, embarazo, menopausia, factores sociales y culturales, entre otros (Behrens *et al.*, 2013, pp.180-186). Sin embargo, en los últimos años se ha enfatizado en el estudio del rol que desempeñan los factores genéticos sobre la sensibilidad ante un sabor. Esto con el fin de caracterizar de manera más específica a diferentes poblaciones en cuanto a la percepción de un sabor u otro y consecuentemente a la elección de ciertos alimentos dentro de su dieta.

Por ahora, el problema radica en que el sistema del gusto, incluyendo los mecanismos genéticos, moleculares, celulares, sistemáticos y su relación con respuestas sensoriales, no han sido ampliamente estudiados (Behrens *et al.*, 2013, pp.180-186). La mayoría de estudios existentes acerca de polimorfismos influyentes en el grado de percepción de los sabores involucran individuos de poblaciones asiáticas, nativas americanas, africanas y europeas (Bachmanov *et al.*, 2011, pp. 1-9), por lo que se requiere una confirmación experimental en países latinoamericanos y en vías de desarrollo, puesto que las frecuencias polimórficas varían en cuanto a etnia y población de estudio.

Por otra parte, como se ha venido mencionando, este estudio está direccionado hacia la influencia genética dentro de la percepción del sabor dulce. Se ha considerado importante indicar que el consumo de altas cantidades de azúcar

dentro de la dieta de un individuo puede desencadenar en desórdenes nutricionales como sobrepeso y obesidad que representan un factor de riesgo para diabetes, enfermedades cardiovasculares, cáncer y muerte prematura (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2015), (Herrera *et al.*, 2009, pp. 568–576), (Kelly, Yang, Chen, Reynolds y He, 2008, pp. 1431–1437). El riesgo de contraer estas enfermedades no transmisibles crece con el aumento del índice de masa corporal (IMC) lo cual está íntimamente relacionado con una dieta rica en azúcares (OMS, 2015).

Desde del planteamiento y ejecución de este trabajo, no se han llevado a cabo otros estudios similares en individuos de población ecuatoriana. Por lo tanto, no existen resultados que contribuyan a categorizar a éstos individuos en cuanto a su percepción del sabor dulce. De esta manera, no se ha podido sentar una base teórica que contribuya al entendimiento de sus hábitos alimenticios a partir de la variación de su genotipo y la susceptibilidad de padecer enfermedades crónicas altamente incidentes y prevalentes en el país.

Justificación

El estudio en conjunto de rasgos genotípicos y fenotípicos es de interés en nuestra población puesto que, de esta manera se podrá explicar la base genética de muchas características que pueden tener un gran impacto en la salud humana. Además, el estudio de polimorfismos como marcadores de variación en diferentes características (con respecto a la percepción) no ha sido explorado en su totalidad.

La percepción de los sabores es una característica que representa uno de los factores más importantes en la elección de los alimentos a consumir. Es evidente, que la dieta y los hábitos alimenticios inciden directamente en la salud de las personas. De este modo, es conveniente un estudio que vincule variantes genéticas con el grado de sensibilidad ante los sabores.

Como se mencionó anteriormente, el sabor dulce tiene un papel especial dentro de las preferencias alimentarias y la salud humana. Al profundizar en el

estudio de los polimorfismos que afectan la percepción del sabor dulce se deja establecido un conocimiento teórico. Dicho conocimiento podría explicar la diferencia que presentan los individuos de poblaciones distintas ante la percepción de alimentos dulces. De esta manera, el presente estudio pretende aportar al entendimiento de hábitos alimenticios y las patologías desarrolladas a partir de estos, tomando en cuenta su base genética.

Se han seleccionado los polimorfismos (SNPs): rs307355 y rs35744813 del gen *TAS1R3* en el presente estudio ya que, estos no se ven implicados en cambios de aminoácidos a nivel de proteína sino más bien en la disminución de la actividad del promotor. Por lo tanto, resulta interesante la investigación de polimorfismos que afectan la transcripción del gen (Bachmanov *et al.*, 2011, pp. 1-9), (Fushan *et al.*, 2009, pp. 1288–1293).

Además, al realizarse dicho estudio en individuos de población ecuatoriana, se aporta a la caracterización genética (en cuanto a percepción) de poblaciones distintas a las estudiadas hasta el momento. Logrando establecer diferencias genotípicas y fenotípicas a nivel mundial con los datos obtenidos.

En Ecuador, entre las enfermedades relacionadas con el alto consumo de azúcares y que son de gran incidencia y prevalencia, se destaca la diabetes, la misma que ha sido identificada como la primera causa de muerte en el país (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos [INEC], 2013, p. 34).

Se considera importante caracterizar a una población determinada en cuanto a su percepción genotípica y fenotípica del sabor dulce, con el fin de regular el consumo de azúcar. Por lo tanto, esta investigación pretende aportar el conocimiento teórico al dilucidar los genotipos y haplotipos. A partir de lo cual se puede llegar al entendimiento de hábitos alimenticios en población ecuatoriana y las patologías desarrolladas a partir de estos hábitos con el fin de promover una alimentación adecuada.

Alcance

El presente estudio fue direccionado hacia la caracterización de los individuos de la población ecuatoriana al determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos rs307355 y rs35744813 y su relación con los umbrales de detección del sabor dulce.

Se ha considerado importante direccionar este estudio hacia la percepción genotípica y fenotípica del sabor dulce, debido a que el consumo de cantidades elevadas de azúcar, o alimentos dulces, se relaciona con Diabetes y enfermedades cardiovasculares; problemas altamente incidentes y prevalentes en Ecuador (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC), 2011).

Se espera relacionar patrones fenotípicos y genotípicos mediante análisis estadístico. Así mismo, se busca agrupar a la población en base al patrón genotípico mediante estratificación de subgrupos por umbral de detección.

Investigaciones relacionadas a factores genotípicos que influyen directamente en el grado de percepción de los sabores en las personas, no han sido ampliamente desarrolladas en países latinoamericanos y menos aún en población ecuatoriana.

Al dilucidar los genotipos y haplotipos, este estudio pretende aportar el conocimiento teórico de la relación genética con la percepción del sabor dulce. Se busca presentar uno de los factores fuertemente influyentes en los hábitos alimenticios de los ecuatorianos y de esta manera, se abre la posibilidad de promover una alimentación saludable con el fin de prevenir problemas nutricionales y enfermedades crónicas.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar las frecuencias de los polimorfismos funcionales rs307355 y rs35744813 del gen *TAS1R3* en el grado de percepción del sabor dulce en individuos de la población ecuatoriana

Objetivos específicos

- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos rs307355 y rs35744813 del gen *TAS1R3* mediante análisis de amplicones por secuenciación capilar.
- Asociar los patrones genotípicos con el nivel de detección del sabor dulce mediante análisis estadístico.
- Agrupar a los individuos incluidos en el estudio en base al patrón genotípico mediante estratificación de subgrupos por umbral de detección.
- Comparar los umbrales de detección de sabor dulce en base al patrón genotípico de la población ecuatoriana con respecto a la población mundial mediante revisión bibliográfica.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

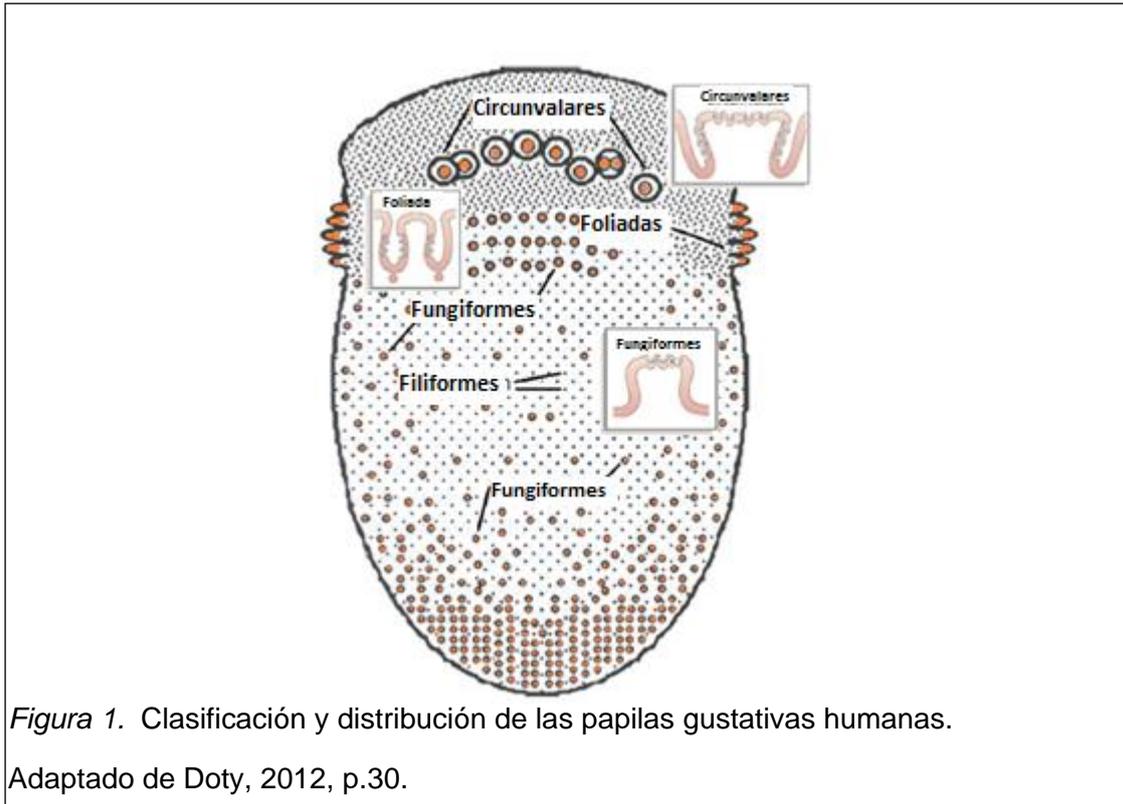
1.1 Percepción de los sabores

1.1.1 Mecanismos de percepción

La percepción de los sabores se complementa con el olfato, el sistema somatosensorial, el sistema auditivo y con los sistemas sensoriales visuales, para en conjunto formar el sabor o sistemas del gusto. En las últimas décadas, se ha venido ampliando el estudio de la percepción de los sabores, debido a que el sabor es el primer paso que lleva a la obtención de energía, al mantenimiento del equilibrio electrolito adecuado y a evitar la ingestión de sustancias tóxicas. Resulta interesante mencionar que la sensibilidad ante sustancias químicas disueltas en agua ha sido un punto clave en la evolución. Es así que muchas especies han desarrollado sus mecanismos sensoriales, pues su supervivencia dependía de la afinidad o rechazo ante una sustancia u otra. Esto se refleja claramente en los sistemas sensoriales sofisticados que desarrollaron los vertebrados (Doty, 2012, pp. 29-46).

Se han propuesto definiciones de diferente índole para la percepción de los sabores. La definición anatómica, enfocada hacia la especie humana describe que antes de llegar a la sensación del gusto, la saliva solubiliza la sustancia ingerida, pues esta es la encargada de llevarlas hacia las papilas gustativas. La saliva es secretada de varias glándulas, entre ellas: parótida, glándulas submandibulares y glándula sublingual (Doty, 2012, pp. 29-46).

Por otra parte, las papilas gustativas son estructuras protuberantes visibles sobre la superficie de la lengua. A las papilas se las puede clasificar según su estructura y tamaño en: fungiformes, foliadas, circunvalares y filiformes, cada una con funciones específicas (Figura 1) (Doty, 2012, pp. 29-46).



Aproximadamente, existen 10,000 papilas gustativas que contienen entre 60 y 120 células receptoras (TRCs) dispuestas en la lengua, el paladar y la epiglotis. Las TRCs son distintas para cada sabor, es decir que habrá un estímulo selectivo. Dichas células de la cavidad oral son detectores cruciales para monitorizar las propiedades de la comida y así permitir al cerebro que tome decisiones en cuanto a aceptar, apreciar, rechazar o ingerir una sustancia; por lo tanto las TRCs permiten llevar a cabo una necesidad vital como es alimentarse (Bigiani y Prandi, 2011, pp. 214-217). De esta manera se han podido clasificar cinco sabores: salado, dulce, umami, amargo y ácido (Gutiérrez y Simon, 2011, pp. 231-238). Cada papila gustativa tiene un poro denominado fosa del gusto y es en donde se produce la unión entre el estímulo gustativo y las TRCs. Las TRCs son clasificadas según su morfología en: células tipo I u oscuras, las mismas que tienen un cuello estrecho que entreteteje a las células de tipo II o claras, las que poseen un cuello corto y grueso, y por último las células de tipo III o intermedias tienen el núcleo alargado y su cuerpo en forma de huso, lo cual determina el contacto que tienen con fibras nerviosas

simpáticas. En cuanto a su función, las células tipo I tienen un rol muy parecido a las células gliales de otros órganos. Para el estudio específico de estas células se llevó a cabo RT-PCR, microscopía electrónica e inmunotinción en ratas, de tal manera que se mostró la expresión específica de un transportador de glutamato/espartato en ellas. Las células tipo II responden ante el estímulo de sustancias dulces, umami y amargas; además de liberar ATP, lo que es necesario para que se dé la unión entre las células y los nervios involucrados en el gusto; un estudio de Yang y colaboradores, 2000 demostró que estas células expresan proteínas G involucradas en la traducción en cascada de la percepción del sabor (Yang, Tabata, Crowley, Margolskee y Kinnamon, 2000, pp.139-151). Por último, las células tipo III expresan proteínas involucradas en la transmisión simpática (Bigiani y Prandi, 2011). En la figura 2 se muestra la distribución de las TRCs dentro de la papila gustativa.

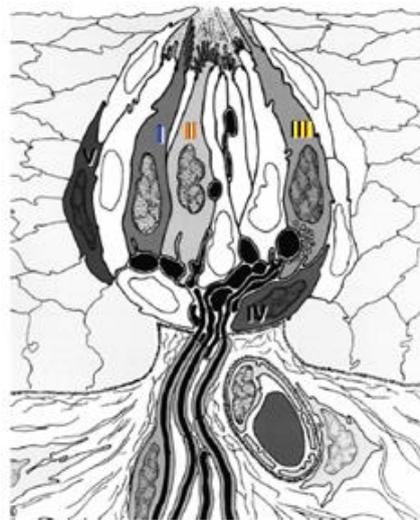


Figura 2. Esquema distribución de las TRCs (tipos I, II y III) en la papila gustativa.

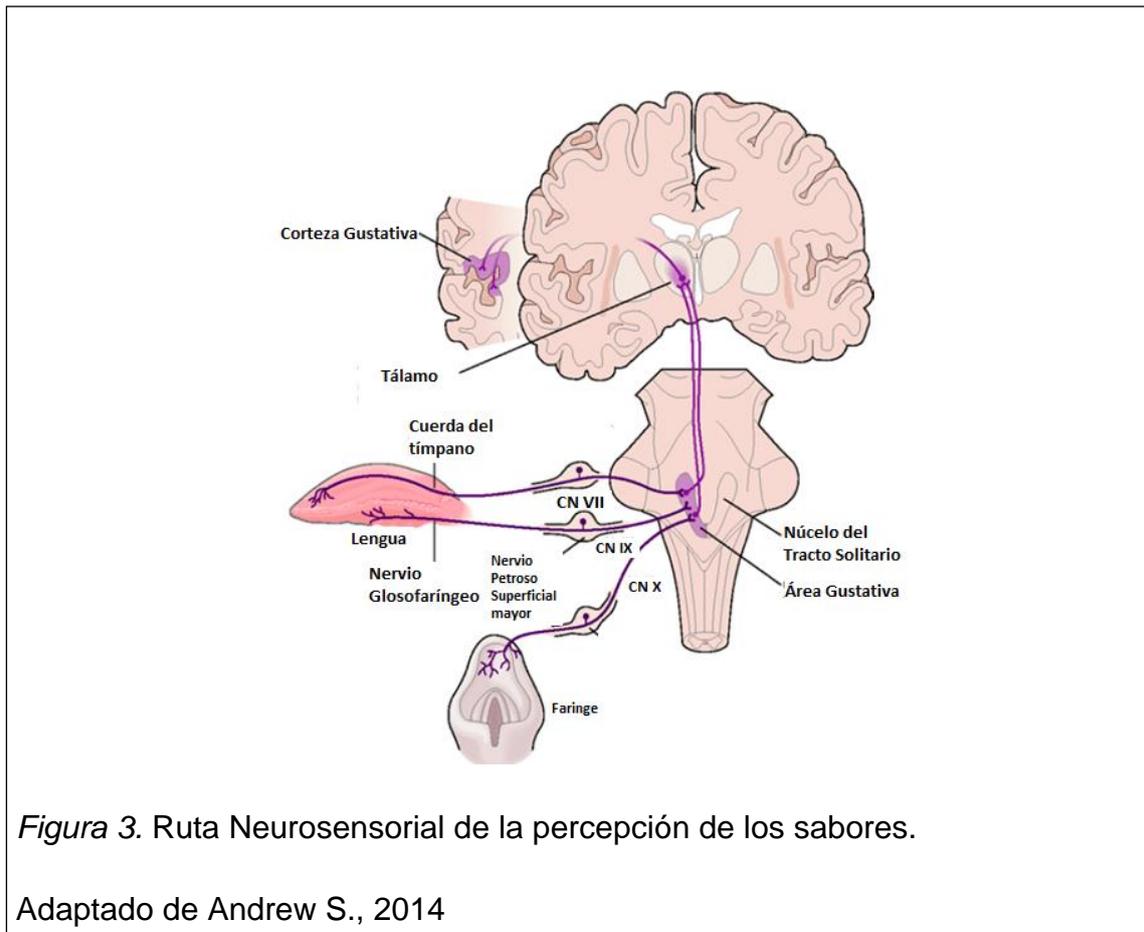
Adaptado de Doty, 2012, p.31.

Por otra parte, el extremo apical de las TRCs está expuesto en la cavidad oral y este interactúa con los estímulos que generalmente son generados por sustancias químicas solubles en agua (Bachmanov y Beauchamp, 2007, pp. 389–414)

Además, dentro de las TCRs se expresan receptores del gusto que de igual manera son específicos para la detección de cada sabor (Sugita, 2006, pp. 2000-2015). Se trata de quimiorreceptores que interactúan con el estímulo y envían señales al cerebro, lo que resulta en la percepción del sabor (Bachmanov y Beauchamp, 2007, pp. 389–414). Se ha observado que aproximadamente 50 genes son los que están involucrados con la percepción del gusto. Dichos genes serán los que codifican para cada familia de receptores asociados a un sabor en particular (Doty, 2012, pp. 29-46).

El proceso mediante el cual se produce la sensación de percepción empieza cuando los receptores entran en contacto con la sustancia química y producen un cambio en el potencial de la membrana celular o en la concentración de calcio intracelular, lo que lleva a la liberación de neurotransmisores en las fibras nerviosas aferentes del gusto. Las fibras aferentes que se encuentran inervadas a las TCRs transmiten la información obtenida (intensidad y tipo de sabor) hacia la corteza gustativa en la corteza cerebral y el tálamo, a través de la sinapsis. Por otra parte, cabe señalar que dentro de la percepción del sabor actúan nervios craneales diferentes como son: nervio facial (CN VII), cuerda del tímpano (haz de fibras nerviosas), nervio petroso superficial mayor, nervio glosofaríngeo (CN IX) y nervio vago (CN X) (Doty, 2012, pp 29-46).

El proceso nervioso de la percepción del gusto consiste en que la información es llevada a partir de los receptores del gusto hacia el núcleo del tracto solitario del tronco cerebral. A continuación, la información pasa a las neuronas del núcleo parabranchial, luego al tálamo y por último a la corteza gustativa (Figura 3) (Sugita, 2006, pp. 2000-2015) (Doty, 2012, pp 29-46).



1.1.2 Receptores del gusto y los diferentes sabores

Existen varios procesos y receptores específicos para cada una de las modalidades del gusto (Bachmanov y Beauchamp, 2007, pp. 389–414). Además, como se ha venido mencionando se han realizado estudios de electrofisiología, biología molecular, genética, así como estudios en la secuencia de los genomas de los mamíferos y gracias a esto también se ha logrado esclarecer cuáles son aquellos receptores que actúan para los diferentes estímulos de cada sabor (Sugita, 2006, pp. 2000-2015)

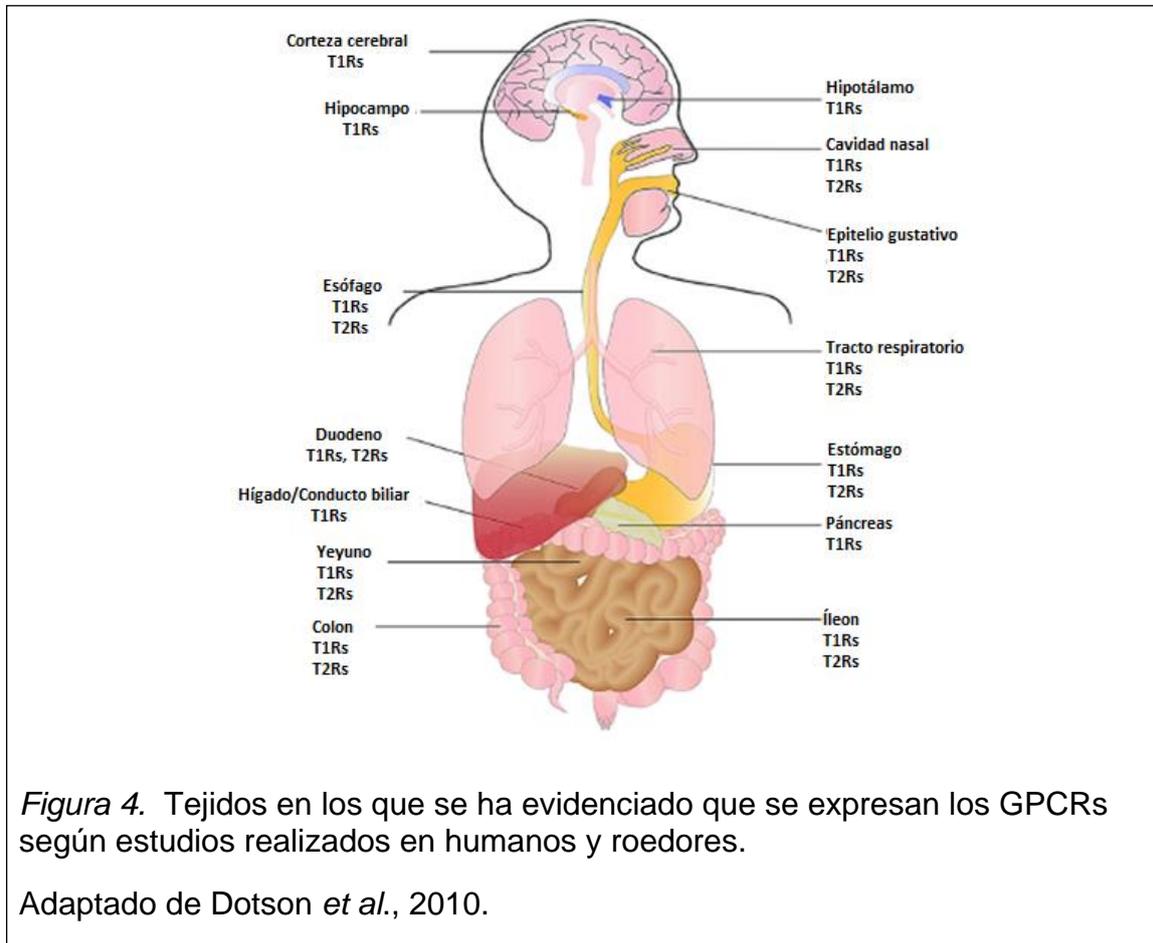
Con respecto al sabor salado, la sustancia salada comúnmente ingerida es NaCl para su percepción. Sin embargo, se ha encontrado que otros iones estimulan la percepción de lo salado, entre ellos se encuentran: NH_4^+ , K^+ , Li^+ . NaCl cumple un papel muy importante en el organismo, ya que, regula la

presión sanguínea, el volumen sanguíneo y la homeostasis, así como también mantiene el balance electrolítico. El mecanismo de percepción del sabor salado aún no ha sido completamente esclarecido, sin embargo, se conoce que existen canales de sodio (ENaCs) epiteliales localizados en la membrana de las células receptoras de las papilas gustativas y que poseen un rol importante ante la percepción de NaCl. El Na⁺ al pasar por los ENaCs va despolarizando a las células receptoras del gusto (TCRs) dando lugar a la respuesta del sabor salado (Garcia-Bailo *et al.*, 2009, pp. 69-80).

En el sabor ácido, las TCRs al tener contacto con sustancias ácidas se despolarizan, permitiendo la entrada de Ca²⁺ a su interior y esta es la razón de percepción ante lo ácido. Son algunas las sustancias estimulantes de este sabor, entre ellas: ácido cítrico, ácido acético, ácido tartárico y ácido láctico. A pesar de no conocer ampliamente acerca de los responsables de la percepción del sabor ácido, según estudios realizados en mamíferos roedores se encontró que estaban involucrados canales iónicos con la percepción de sustancias ácidas, entre ellos dos receptores de potencial transitorio: PKD2L1 y PKD1L3 (Garcia-Bailo *et al.*, 2009, pp. 69-80).

Por otra parte, en particular existe una pequeña familia de receptores asociados a proteínas G (GPCRs) denominados T1R1, T1R2 Y T1R3. Estos son dímeros con dominios extracelulares N-terminal amplios, responsables de la percepción del sabor dulce y umami. Estos receptores transmembrana perciben moléculas fuera de la célula y se encargan de activar las vías de transducción de señales y la respuesta celular. El sabor amargo también es percibido por una familia de GPRCs, en este caso T2R. Ambas familias de GPCRs son expresadas en las células receptoras de tipo II (Doty, 2012, pp 29-46). Es importante recalcar que los GPCRs no solo se expresan en la cavidad oral, ya que estos funcionan como quimiosensores a lo largo de todo el organismo. Están presentes en células de tejidos como los intestinos, células pancreáticas, entre otros (Figura 4) (Dotson, Viques, Steinle y Munger., 2010, pp. 447-454). Se ha mencionado esto debido a la relación que se plantea más

adelante de los receptores del gusto, especialmente del sabor dulce con desórdenes nutricionales y enfermedades altamente prevalentes e incidentes como es la diabetes.



De esta manera, los genes que codifican para el receptor del sabor amargo son entre 20 y 35 (Chaudhari y Roper, 2010, pp. 284-296). A pesar de que la familia T2R es muy extensa en cuanto al reconocimiento de sustancias, no logran distinguir algunas entre sí (Doty, 2012, pp. 29-46). La función del reconocimiento del sabor amargo es proteger contra la ingesta de sustancias tóxicas o venenosas aun cuando su concentración es muy baja. (Feeney *et al.*, 2010, pp. 135-142). Las principales sustancias reconocidas por la familia T2R son cicloheximida, β -glucopiranosidos, feniltiocarbamida (PTC) y propiltiouracilo (PROP) (Sugita, 2006, pp. 2000-2015).

El sabor umami, cuyo nombre proviene de Japón y que significa “buen sabor” fue descrito por primera vez en 1909 por Ikeda. La sustancia que estimula la percepción de sabor umami es el aminoácido L-glutamato, encontrado en el glutamato monosódico. Sin embargo, L-aspartato también tiene este efecto. A nivel molecular este sabor está íntimamente relacionado con la percepción del sabor dulce. Los receptores heteroméricos T1R1 y T1R3 son los que permiten la percepción de este sabor (Garcia-Bailo *et al.*, 2009, pp. 69-80).

Por último, como se mencionó anteriormente, el sabor que también está determinado por receptores asociados a proteínas G (GPCRs) es el sabor dulce. Al igual que el umami, el dulce es un sabor reconocido por receptores heterodiméricos, en este caso T1R2 y T1R3 (receptores tipo 1, miembros 2 y 3). El sabor dulce se profundiza en la siguiente sección.

De esta manera, queda claro que para la percepción de cada sabor existen diferentes receptores participantes (Figura 5). A nivel molecular, detrás de cada uno de ellos están los genes responsables de su expresión.

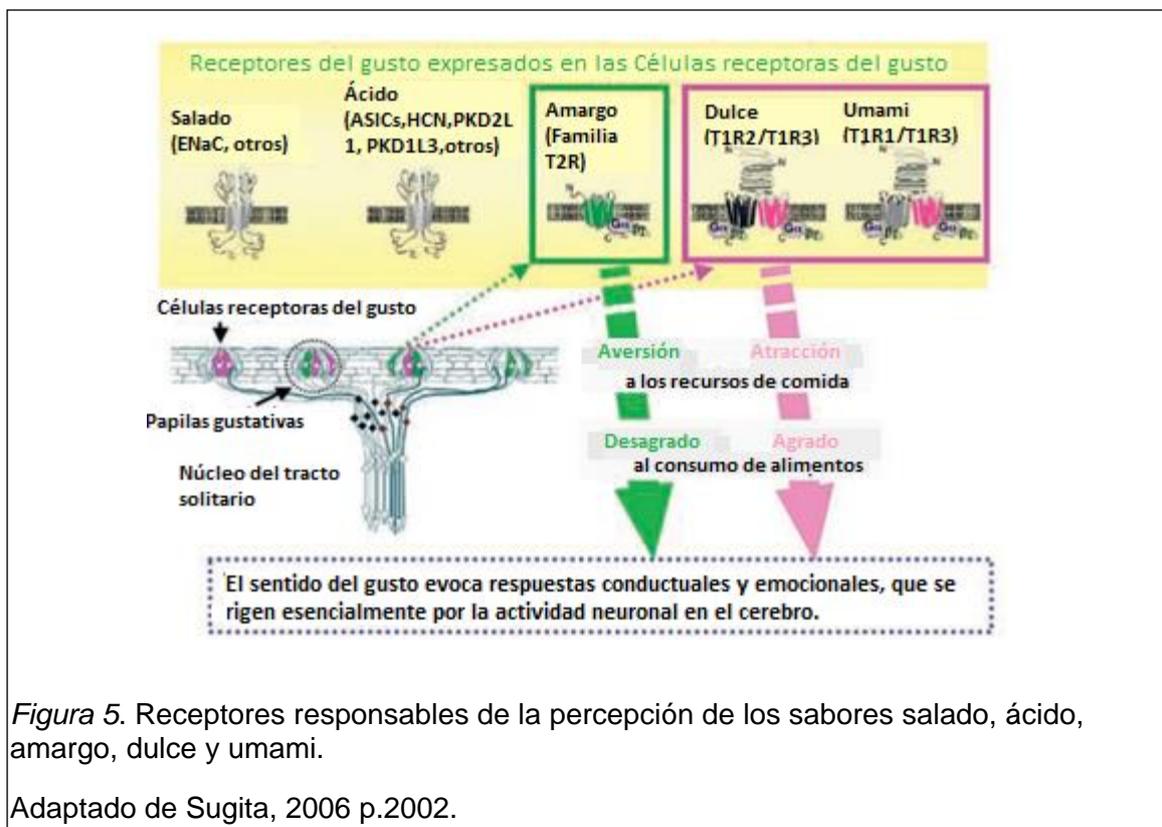


Figura 5. Receptores responsables de la percepción de los sabores salado, ácido, amargo, dulce y umami.

Adaptado de Sugita, 2006 p.2002.

1.2 Factores influyentes en la percepción de los sabores

Cabe mencionar que la percepción de los sabores es un factor muy importante en la elección del consumo de los alimentos y consecuentemente de la dieta que lleva un individuo. Es por ello que se ha considerado conveniente mencionar aquellos factores que tienen una influencia en la percepción. A estos se los puede dividir en factores ambientales y factores genéticos.

1.2.1 Factores ambientales y externos

Al estar en contacto con el ambiente, la percepción de los sabores es una característica que depende de factores externos que pueden disminuir o aumentar la capacidad de percepción de una persona ante un determinado sabor.

Para empezar, ciertos hábitos de los individuos pueden ser factores causantes de la variación en el nivel de sensibilidad al gusto. Entre ellos se encuentran el consumo de tabaco (Grunberg, 1986, pp. 101-105; Hall, McGee, Tunstall, Duffy y Benowitz, 1989, pp. 81-86; Rodin, 1989, pp. 303-317; Lemon, Brassler y Smith, 2005, pp. 3719-3729; Simons, Bouche, Carstens y Carstens, 2006, pp. 1877-1886 ; Pepino y Mennella, 2007, pp. 1891-1899), consumo de café (Masi, Dinnella, Monteleone y Prescott, 2015, pp. 219-226; Ly y Drewnowsky, 2001, pp. 41-47). Consumo de alcohol y consumo de drogas o medicamentos, ya que el consumo de ciertos fármacos también es un factor que puede afectar los componentes neuronales periféricos (Behrens *et al.*, 2013, pp.180-186; Doty y Bromley, 2004, pp. 1229-1254; Naik, Shetty y Maben, 2010, pp. 240-243).

Por otro lado, un medio ambiente contaminado de metales pesado también juega un papel dentro de las diferencias en el grado de percepción. Además, desde un punto de vista de evolución y adaptación, el embarazo también es un factor que influye en el grado de percepción de los sabores; por ejemplo, el sabor amargo tiene mayor sensibilidad debido a que esto representa un

rechazo ante sustancias tóxicas para proteger al feto (Behrens *et al.*, 2013, pp.180-186).

El balance hormonal también tiene que ver dentro del grado de percepción, pues las hormonas son encargadas de regular la sensación de hambre y saciedad en los seres vivos (Behrens *et al.*, 2013, pp.180-186)

Un factor importante en el grado de sensibilidad ante un sabor es la edad, una de las teorías que explica cómo influye esta, es el cambio que se produce en la membrana celular a lo largo de los años. De esta manera los receptores y canales iónicos también se ven modificados (Boyce y Shone., 2006, pp.239-241).

Otro tipo de factores son los somatosensoriales que son propios de los alimentos como por ejemplo la temperatura, ya que esta puede influir en la unión de las moléculas con los receptores (Green y Natchigal., pp. 488-495).

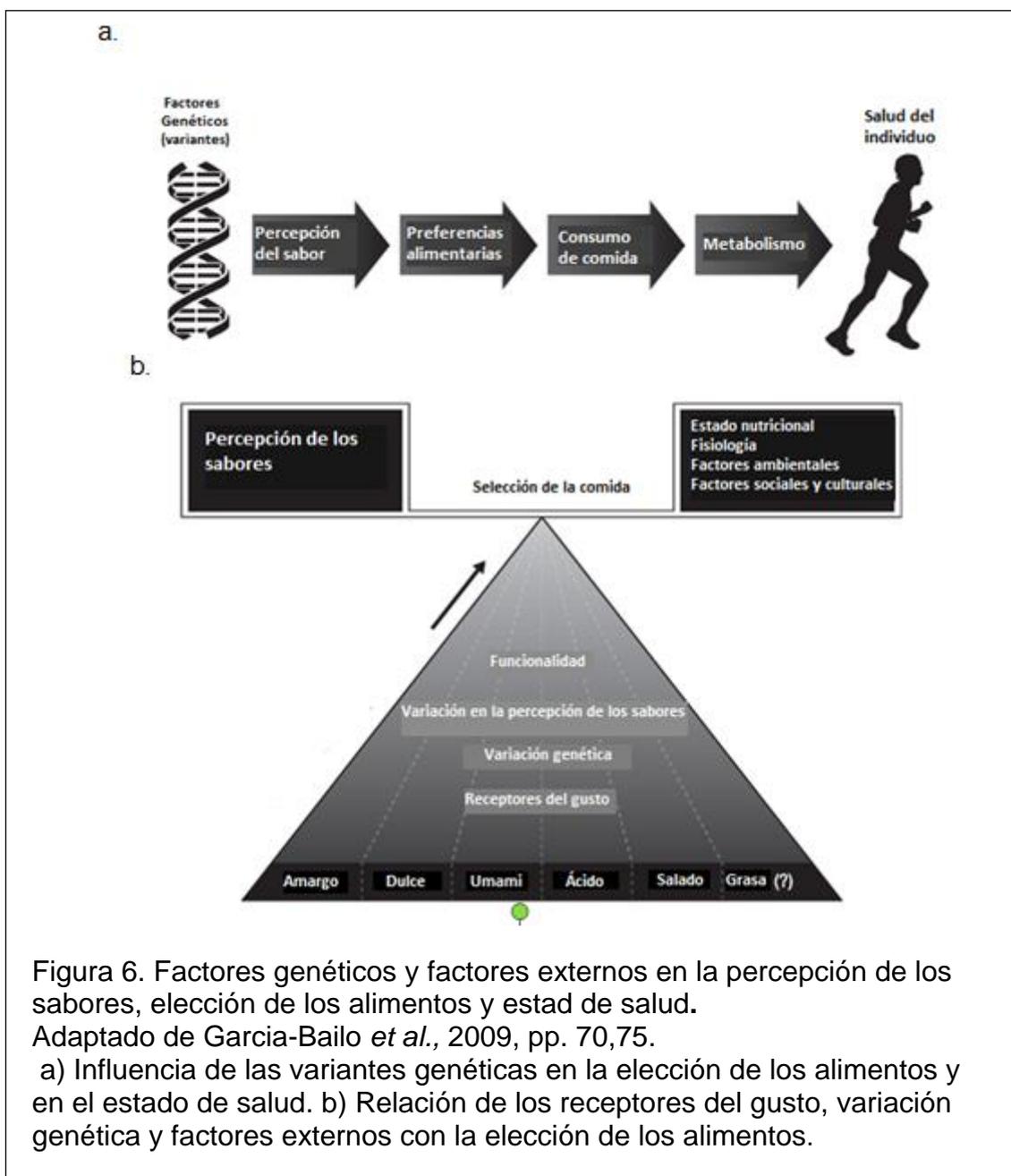
1.2.2 Factores genéticos

Al hablar de factores genéticos, no referimos a las variantes encontradas en la secuencia de los genes que codifican para los receptores del gusto. Cabe mencionar que la percepción de los sabores es una característica fenotípica, pues está determinada tanto por factores ambientales como por la secuencia de los genes codificantes para los receptores del gusto (Behrens *et al.*, 2013, pp.180-186).

Al hablar de factores genéticos en este trabajo, nos referimos a variantes conocidas como polimorfismos de nucleótido simple o SNPs. Los SNPs son variantes genéticas que implican el cambio de una base nitrogenada por otra en la secuencia de ADN. Estos se pueden deber a errores durante la replicación y son útiles como marcadores en genética de poblaciones, estudios evolutivos y en identificación de enfermedades (Vaquero, 2008, pp. 105-111).

De este modo, surge la pregunta de por qué son importantes los factores genéticos en la percepción de los sabores, y esto se responde con la influencia que los SNPs tienen en la funcionalidad fenotípica de los receptores.

Además, es importante señalar el impacto que tienen los factores genéticos conjuntamente con los externos sobre la elección de los alimentos dentro de la dieta de una persona, lo cual está directamente relacionado con su estado de salud. (Figura 6)(Garcia-Bailo *et al.*, 2009, pp. 69-80).



1.3 Importancia de la percepción de los sabores

Una vez explicados los mecanismos de la percepción de los sabores y los factores que influyen en ella, surge la inquietud de por qué es importante esta parte del funcionamiento del organismo de los humanos.

El sentido del gusto es importante porque regula la variación de la cantidad de nutrientes, alerta sobre el peligro de toxinas y además actúa dentro de la estrategia de la alimentación de los humanos. Además, la percepción de los sabores influye en nuestra manera de pensar, decidir y nuestro comportamiento hacia los alimentos, tanto consciente como inconscientemente es decir, esta sirve de guía en la ingestión (Breslin, 2013, pp. 409-418).

Por otro lado como se ha mencionado, los receptores del gusto se expresan en tejidos aparte de la cavidad oral, como por ejemplo el estómago y el intestino grueso y delgado. En estos órganos los receptores cumplen funciones distintas a la actividad sensorial, como provocar respuestas metabólicas anticipatorias cuando se ingieren nutrientes. De esta manera, la importancia en cuanto a los receptores también se centra en la ayuda que estos proporcionan en la regulación del metabolismo (Breslin, 2013, pp. 409-418).

1.4 Sabor dulce

El sabor dulce es el encargado de reconocer y consumir la energía calórica y los nutrientes necesarios para subsistir. Es decir, el sabor dulce es un factor fuertemente influyente en la aceptación y consumo de los alimentos. Se ha demostrado además, que a partir de la percepción de este sabor surgen respuestas de apertura del apetito (McCaughey, 2008, pp. 1024-1042). Por otro lado, numerosos estudios han demostrado que el mecanismo de percepción del sabor dulce es muy similar entre mamíferos. Es por ello que han surgido numerosas investigaciones realizadas en roedores y a partir de estas se han llevado a cabo estudios en humanos (Bachmanov *et al.*, 2011, pp. 1-9).

De esta manera, los mecanismos moleculares de la percepción del sabor dulce fueron esclarecidos en 2001 por varios estudios en roedores. En estos se encontró que dichos receptores están codificados por la familia de genes que lleva su mismo nombre: *TAS1R* (Bachmanov *et al.*, 2001; Kitagawa *et al.*, 2001; Max *et al.*, 2001; Montmayeur *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2001; Sainz *et al.*, 2001).

Se ha dicho que los responsables de la percepción del sabor dulce son receptores heterodiméricos de la familia de T1R asociados a proteínas G (GPCRs). La característica peculiar de estos GPCRs es que son capaces de reconocer una variedad amplia de sustancias de diferente índole, entre ellas: carbohidratos (Glucosa, Fructosa, Sacarosa y Maltosa), aminoácidos (Glicina, D-fenilalanina, D-triptófano-prolina, D-alanina, D-serina y L-glutamina), péptidos, proteínas (Curculina, Monelina y Taumatina), azúcares artificiales, edulcorantes (Aspartamo, Sucralosa, Dulcina, Acefulsamo K, Ciclamato, Sacarina, Monatina, etc) y otros compuestos orgánicos (Sorbitol) (Garcia-Bailo *et al.*, 2009, pp. 69-80; Doty., 2012, pp. 29-46). Por otra parte, los receptores tienen un dominio extracelular denominado Dominio de Venus atrapamoscas (VFTD), el mismo que tiene sitios activos para ligandos. El modelo del dominio extracelular fue propuesto por Morini y colaboradores en 2005 al calcular la energía libre que se producía cuando se unían los ligandos estimulantes con los receptores del sabor dulce (figura 7) (Morini, Bassoli y Borgonovo., 2011, pp. 254-259).

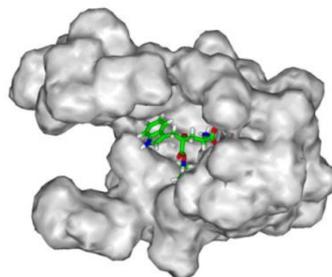


Figura 7. Ligando (molécula de edulcorante monelina) unido a un sitio de del dominio VFTD del receptor T1R2. Modelo propuesto por Morini *et al.*, 2005. Tomado de Morini, *et al.*, 2011, p.257

Al tener contacto los diferentes ligandos estimulantes del sabor dulce con los GPCRs la respuesta neuronal es distinta con relación a la de los demás sabores. El proceso empieza cuando se activan las subunidades alpha (α), beta (β) y gamma (γ) (complejo $\beta \gamma$) de la proteína G se activan y esto lleva a cabo una cascada de eventos a través de diferentes rutas bioquímicas que dan como resultado la despolarización de las células receptoras TRCs. En conjuntos, las subunidades llevan a dos eventos celulares: aumento de Ca^{2+} y liberación de ATP. De esta manera, se activan los nervios involucrados para llevar las señales al cerebro (Gutiérrez y Simon, 2011, pp. 231-238).

1.4.1 Genética de la percepción del sabor dulce

Los genes T1R que codifican para los receptores GPCRs de la percepción del sabor dulce en humanos se encuentran en una región conservada del cromosoma 1 (1p36), en el orden: *TAS1R2* y *TAS1R3*. Estos genes son ortólogos a los de roedores y contienen exones codificantes que se traducen de 842 a 858 aminoácidos. Las proteínas resultantes tienen 7 hélices transmembrana que en conjunto forman un dominio heptahelical, un dominio VFT con extremo N-terminal y un dominio rico en cisteína conectado al dominio heptahelical (Bachmanov *et al.*, 2011, pp. 1-9).

Por otro lado, se realizaron estudios con mapeo de QTL (locis de variantes cuantitativas) para esclarecer la influencia de la variación de dichos genes en la expresión del fenotipo. Se ha encontrado que *TAS1R2* tiene polimorfismos que inciden directamente en el grado de percepción del sabor dulce debido al cambio producido a nivel de aminoácidos (Kim, Wooding, Riaz, Jorde y Drayna, 2006, p. 599). Por el contrario en el gen *TAS1R3* se ha encontrado SNPs que se relacionan con el nivel de sensibilidad al sabor dulce pero que no influyen sobre el cambio de aminoácidos (Bachmanov *et al.*, 2011, pp. 1-9).

1.4.1.1 Gen *TAS1R3* y variantes genéticas influyentes sobre la percepción del sabor dulce

Es importante mencionar aquellos estudios que han contribuido al descubrimiento del gen *TAS1R3* y sus variantes genéticas relacionadas con la percepción del sabor dulce. En primer lugar, Fuller en 1974 contribuyeron al descubrimiento del locus denominado *Sac*, en donde se encuentra la preferencia a la sacarina (Fuller., 1974, pp. 33-36). Veinticinco años más tarde se descubrió la familia de receptores T1R, asociados a proteínas G (Hoon, Lindemeier, Battey, Ryba y Zuker, 1999, pp. 541-551). Las primeras investigaciones para esclarecer la información acerca del gen *TAS1R3* y su relación con la preferencia a los azúcares, así como con el nivel de percepción del sabor dulce fueron realizadas en roedores mediante experimentos de mapeo genético (Bachmanov *et al.*, 2001, pp 925-933; Nelson, Hoon, Chandrashekar, Zhang, Ryba y Zuker., 2001, pp 381-390; Reed *et al.*, 2004, pp. 938–946).

Hoy se conoce que la secuencia del gen *TAS1R3* comprende un total de 6322 pb de ADN genómico, transcrito a un ARN-m de 343 pb (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2015). Además, según un estudio realizado en 2007, existe un solo promotor ubicado cadena arriba de la secuencia codificante para las proteínas (Toyono, Seta, Kataoka y Toyoshima., 2007, pp. 641-648). Por otro lado, el gen *TAS1R3* contiene seis exones que se traducen en 852 aminoácidos (NCBI, 2015; Kiuchi *et al.*, 2009, p. 55) (Figura 8).

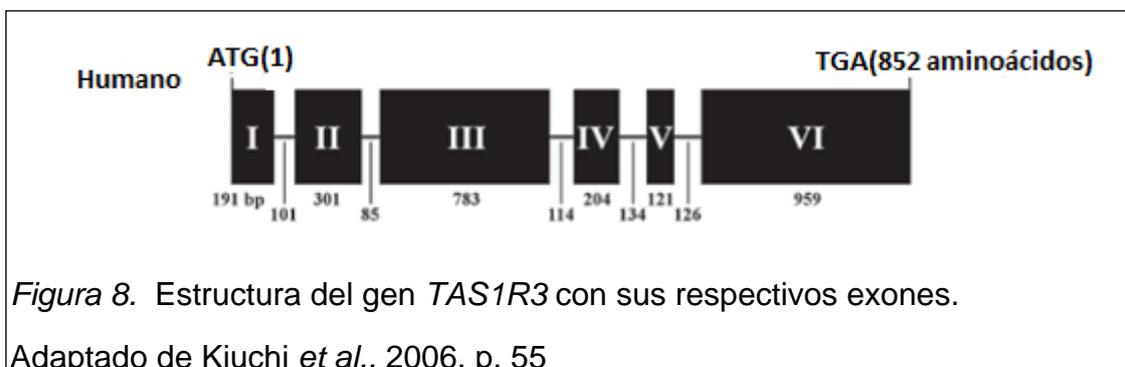


Figura 8. Estructura del gen *TAS1R3* con sus respectivos exones.

Adaptado de Kiuchi *et al.*, 2006, p. 55

Los estudios realizados para esclarecer las variantes genéticas dentro del gen *TAS1R3* se llevaron a cabo en 2006 por Kim y colaboradores (Kim *et al.*, 2006, p.599). La investigación consistió en comparar la diferencia de nucleótidos entre secuencias con el número de posiciones de nucleótidos variables en una muestra de población. De esta manera fueron identificados 12 SNPs en el gen *TAS1R3* (6 sinónimos: sin cambio de aminoácido y 6 no sinónimos: con cambio de aminoácido).

Posteriormente, se realizó un estudio con luciferasa como reportera para demostrar como dos SNPs sinónimos: rs307355 y rs35744813 influyen en la actividad del promotor puesto que, se conocía la existencia de los polimorfismos pero no las consecuencias que estos dejaban en la expresión. Se encontró que los SNPs están en la secuencia reguladora del gen *TAS1R3*, específicamente en las posiciones 1527 y 1266 respectivamente. Los SNPs rs307355 y rs35744813 al afectar la actividad del promotor también afectan el nivel de m-RNA y la cantidad de moléculas de receptor *TAS1R3* dentro de las células receptoras del gusto (Fushan *et al.*, 2009, pp. 1288–1293).

Conjuntamente se midió la dosis umbral ante la percepción del sabor dulce de individuos de diferentes poblaciones, dando como resultado un estudio que relacionó factores genéticos y expresión fenotípica. Es así que se esclareció la razón de por qué dos SNPs que no implican cambio de aminoácido en los receptores, influyen directamente en el grado de sensibilidad de las personas ante una sustancia (sacarosa) que activa a *TAS1R3* (Fushan *et al.*, 2009, pp. 1288–1293).

Los polimorfismos de nucleótido simple rs307355 y rs35744813 son C/T. En el estudio mencionado, se demostró que aquellos individuos que llevaban los alelos C/T presentaron una disminución de aproximadamente el 25% en la percepción de sacarosa, mientras que los individuos portadores de los alelos T/T presentaron una disminución aproximada del 50% en la percepción de la misma sustancia.

Por último, es importante mencionar que los resultados obtenidos hasta el momento no reportan datos en población sudamericana sobre la relación que tiene el gen *TAS1R3* y sus SNPs con la percepción del sabor dulce, tampoco su frecuencia e incidencia. Además, se ha establecido que el gen *TAS1R3* y los SNPs rs307355 y rs35744813 tienen diferentes frecuencias a nivel poblacional, por lo que Fushan y colaboradores proponen que la herencia de este gen en cuanto a su transcripción es distinta entre poblaciones. Hasta el momento se han estudiado en individuos europeos, africanos (Fushan *et al.*, 2009, pp. 1288–1293), asiáticos (Woong Bae, Kyung Kim, Jun Kwon, Jin Choi Y Kyung Ye, 2011, pp. 412-416) y norteamericanos (Mennella, Finkbeiner y Reed, 2012, pp. 1285-1291). Mientras que, en otro estudio que implica SNPs de otros genes involucrados en la percepción del sabor dulce se evaluaron a individuos caucásicos, afro-americanos y descendientes asiáticos (Fushan, Simons, Slack, y Drayna, 2010, pp. 579-592). Esto crea la necesidad de generar información y reportes sobre el comportamiento del gen *TAS1R3* y su receptor codificado en población sudamericana.

1.4.2 Relación de los receptores del sabor dulce y sus factores genéticos asociados al alto consumo de azúcares, desórdenes nutricionales y enfermedades

Como se ha dicho, la percepción de los sabores es uno de los factores más importantes en la elección de la comida dentro de la dieta de una persona y por consiguiente, juega un papel primordial en su estado de salud (Garcia-Bailo *et al.*, 2009, pp. 69-80).

Con respecto al sabor dulce, los factores genéticos (SNPs), influyen en el grado de percepción de los azúcares de una persona, lo que incide de forma directa en el consumo de azúcar, ya sea hacia niveles elevados o bajos (Raliou *et al.*, 2011, pp. 1-11).

Se ha considerado importante indicar que el consumo de altas cantidades de azúcar dentro de la dieta de un individuo puede desencadenar en desórdenes

nutricionales como sobrepeso y obesidad que representan un factor de riesgo para diabetes, enfermedades cardiovasculares, cáncer y muerte prematura (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2015; Herrera *et al.*, 2009, pp. 568–576; Kelly, Yang, Chen, Reynolds y He, 2008, pp. 1431–1437).

La creciente prevalencia de sobrepeso en la sociedad occidental está relacionada con el consumo de azúcares refinados y grasa. Mucho más allá del estilo de vida de los individuos y de razones metabólicas, la diferencia en la percepción de los sabores es una razón que influye en la elección de los alimentos y en el consumo calórico entre quienes poseen sobrepeso, obesidad y un peso normal. De esta manera, se realizó un estudio con el fin investigar la relación entre el peso corporal, la altura del cuerpo, y las capacidades sensoriales, en particular la sensibilidad del olor y sabor. Se realizó una evaluación sensorial de los sabores salado, amargo y dulce. Se encontró que independientemente de la edad, las capacidades sensoriales eran menores en aquellas personas con un peso elevado (Simchen, Koebnick, Hoyer, Issanchou, Zunft., 2006, pp. 698-705).

Por otra parte, la obesidad es un desorden nutricional complejo pero que en general está relacionado con el sobreconsumo de alimentos. Se han realizado investigaciones que demuestran que la percepción de los sabores en humanos y roedores obesos se ve afectada, ya que el estímulo en cuanto a azúcares y grasas es menor. De este modo, si se altera la percepción del gusto, los comportamientos de alimentación podrían ser impactados de manera significativa, lo que podría contribuir al desarrollo de la obesidad. (Kovacs y Hajnal., 2008, pp. 2145-2157; Simchen *et al.*, 2006, pp. 698-705)

Otro trabajo realizado en roedores, utilizando el método de “imagen de calcio” demostró en sus resultados que el estímulo del sabor dulce se veía afectado. Existía un menor número de células receptoras del gusto en los animales obesos y por consiguiente las señales que desencadenan la percepción del sabor también se redujeron (Maliphol, Garth y Medle., 2013, pp. 1-9). Además, una investigación demuestra que las personas obesas además de percibir el sabor dulce con menor intensidad en comparación con personas de peso

normal, también tienen mayor preferencia a alimentos dulces (Bartoshuk, Duffy, Hayes, Moskowitz y Snyder., 2006, pp. 1137-1148).

Por otra parte, una investigación reveló que existe relación entre los niveles de leptina y los umbrales de detección del sabor dulce. La leptina es una hormona producida en las células adiposas que regula la ingesta de comida, el uso de la energía y el peso corporal. El estudio sugiere que la leptina puede ser un modulador de la sensación del sabor dulce, involucrado en la regulación de la ingesta de alimentos (Nakamura *et al.*, 2008, pp. 2661-2665).

Todos estos estudios indican una relación entre la percepción del sabor dulce con la regulación metabólica que de una u otra manera pueden desencadenar en desórdenes nutricionales como el sobrepeso y la obesidad.

Por otro lado, aparte de examinar polimorfismos en los genes de los receptores del sabor dulce, es importante también mencionar la relación que existe entre los receptores del gusto y los desórdenes en la absorción de la glucosa, lo que puede contribuir al riesgo de padecer diabetes (Mace, Affleck, Pate y Kellett., 2007, pp. 379-392; Margolskee *et al.*, 2007, pp. 15075-15080; Breslin, 2013, pp. 409-428).

Una investigación muy importante ha revelado que los receptores del gusto TAS1Rs Y TAS2Rs pueden estar implicados en la modulación de la respuesta de la incretina (hormona implicada en la secreción de la insulina por el páncreas y en la disminución en los niveles de glucosa en la sangre). Considerando a dichos receptores como objetivos potenciales para nuevos fármacos hipoglucemiantes necesarios para tratar la diabetes mellitus tipo 2 (Dotson *et al.*, 2010, pp. 447-454).

1.4.2.1 Problemas de salud relacionados con el alto consumo de azúcares a nivel mundial y en Ecuador

1.4.2.1.1 Principales riesgos, desórdenes nutricionales y enfermedades

El consumo en grandes cantidades de azúcar o alimentos dulces se relaciona con desórdenes nutricionales severos como sobrepeso y obesidad, cuya tasa es alarmante en países desarrollados y en desarrollo (OMS, 2015). Se evalúa un estado de sobrepeso y obesidad en cuanto al índice de masa corporal (IMC): $\text{Peso (en kilogramos) / Talla al cuadrado (en metros)}$, cuyos valores son $\text{IMC} \geq 25$ $\text{IMC} \geq 30$, respectivamente. Estudios epidemiológicos han revelado que la obesidad es un factor de riesgo en diabetes, enfermedades cardiovasculares (Herrera, et al, 2009), cáncer y muerte prematura (Kelly, Yang, Chen, Reynolds y He, 2008, pp. 1431–1437).

Antes se consideraba que este problema sólo afectaba a los países desarrollados, pero las estimaciones de la OMS muestran que el sobrepeso y la obesidad están aumentando de forma impresionante en los países de bajos y medianos ingresos. Esto se debe a varios factores, como el cambio generalizado de la dieta hacia un aumento del consumo de calorías, grasas, sales y azúcares, así como a la disminución de la actividad física ocasionada por el carácter sedentario del trabajo actual, el cambio de los medios de transporte y la creciente urbanización. En 2014 más de 1.9 millones de adultos mayores de 18 años, tenían sobrepeso. De ellos más de 600 millones fueron obesos. En general, aproximadamente el 13% de la población mundial adulta (11% de hombres y 15% de las mujeres) eran obesos en 2014 (OMS, 2015). Se ha evidenciado además que la prevalencia de sobrepeso en América latina y el Caribe es de 32,3 y para el 2030 se estima que será de 43,6 millones. Asimismo en cuanto a obesidad se habla de 19,6 y 38,3 millones respectivamente. El riesgo de contraer estas enfermedades no transmisibles crece con el aumento del IMC. Por otro lado, la OMS afirma que estos

desórdenes nutricionales son en gran medida prevenibles es decir, podrían evitarse con una dieta saludable y una actividad física regular (OMS, 2015).

1.4.2.1.2 Aspectos generales de la diabetes y su impacto en la salud humana.

La Diabetes tipo 2 (DT2) es una de las enfermedades más importantes relacionada con el alto consumo de azúcares y como se ha mencionado con los receptores del gusto del sabor dulce; además de tener un grave impacto en la salud humana. La DT2 está caracterizada por la deficiencia a la insulina o resistencia de la misma, resultando en un desbalance de las homeostasis de la glucosa. La DT2 es el principal factor de riesgo para el desarrollo de otras enfermedades como neuropatías, enfermedades renales, enfermedades cerebrovasculares, retinopatías y en el peor de los casos puede desencadenar en muerte prematura (Dotson *et al.*, 2010, pp. 447-454). La OMS plantea puntos claves de por qué la DT2 es un problema de salud muy grave:

- Más de 347 millones de personas en todo el mundo tienen diabetes, es decir que existe una epidemia global emergente de esta enfermedad.
- Se predice que para el año 2030 la diabetes se convertirá en la séptima causa de muerte en el mundo y que el total de muertes a causa de esta aumente en más de un 50% en los próximos 10 años.
- La diabetes se ha convertido en una de las principales causas de muerte prematura en la mayoría de países, principalmente a través del aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV). Las ECV son responsables de entre el 50% y el 80% de las muertes en personas con diabetes.

Además, asegura que la práctica de al menos treinta minutos de intensidad moderada de actividad física casi todos los días conjuntamente con una dieta saludable, pueden reducir drásticamente el riesgo de desarrollar DT2 (OMS, 2015).

1.4.2.1.3 Problemas de salud en Ecuador

La realidad antes descrita no es ajena al Ecuador. Según la última (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición [ENSANUT] 2011-2013, pp. 1-113) realizada en el país, la prevalencia de obesidad y sobrepeso en personas adultas de 20 a 60 años es de 62,8% y el total de personas en 2013 con sobrepeso y obesidad fue de 5,558.185. Además existen datos que revelan la práctica de una mala alimentación en el Ecuador, pues el consumo de carbohidratos y gaseosas es muy elevado, mientras que la porción de frutas y verduras diarias no alcanzan a la cantidad recomendada de 400g/día. Por último, las conclusiones de dicha encuesta sugieren que los profesionales de la salud realicen una consejería nutricional, proveyendo información sustentada en la evidencia científica (ENSANUT., 2012, pp. 1-47). Esto resulta interesante dentro de este estudio, ya que, se ha mencionado que la investigación realizada busca sentar bases científicas que aporten al entendimiento de hábitos alimenticios y las patologías desarrolladas a partir de estos hábitos, tomando en cuenta su base genética, abriendo la posibilidad de promover una alimentación saludable con el fin de prevenir los problemas nutricionales y las enfermedades crónicas que se han venido describiendo.

En Ecuador, según estimaciones realizadas en el 2011, la diabetes mellitus tipo 2, la enfermedad hipertensiva y la enfermedad cerebrovascular fueron las principales causas de muerte (INEC, 2011). Estas enfermedades aportan con la mayor cantidad de consultas y egresos hospitalarios desde hace más de dos décadas. Para finalizar, la prevalencia de diabetes revelada por la ENSAUT, para la población de 10 a 59 años, es de 2.7% (ENSANUT., 2012, pp. 1-47).

Se enfatiza la gravedad de desórdenes nutricionales y de DT2 en este estudio debido a que la presencia de los polimorfismos rs307355 y rs35744813 pueden influir en la percepción del azúcar y por consiguiente en el consumo de niveles elevados o bajos de lo mismo. Se ha venido mencionando que una alimentación poco saludable, alta en azúcares representa un factor de riesgo para el desarrollo de estos problemas de salud.

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

2.1 Recolección de datos

2.1.1 Recolección de datos individuales mediante encuesta

Se muestreó una población de 110 individuos seleccionados nacidos en Ecuador. A los mismos que se les realizó una encuesta (anexo 1) en la cual se incluyen datos sobre su edad, sexo, ciertos hábitos que se consideraron importantes para el desarrollo del estudio (consumo de tabaco, consumo de café, consumo de alcohol, consumo de medicamentos), padecimiento de enfermedades y antecedentes familiares de enfermedades. El estudio fue aprobado por el comité de bioética de la Universidad de Las Américas. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado (anexo 2)

2.1.2 Evaluación de umbral de detección

2.1.2.1 Preparación de soluciones de sacarosa a diferentes concentraciones

Se prepararon disoluciones de sacarosa con agua destilada a las siguientes concentraciones 0,05%, 0,10%, 0,34%, 0,50%, 1% y 1,50%. El rango de concentraciones fue basado en estudios realizados previamente en los que se evaluó el umbral de detección de sacarosa. Dichos estudios utilizaron el método: “prueba triangular de elección forzada”, la misma que consiste en ofrecer a los catadores 3 bebidas distintas, con solución a evaluar (sacarosa) y agua destilada. El umbral de detección fue establecido cuando el individuo encontraba diferente a una de las tres soluciones ofrecidas en el estudio, luego de haber probado varias veces. Si más de la mitad de individuos en estudio lograban determinar que la misma solución era distinta de las demás, se establecía esa concentración como umbral de detección (Fogel y Blissett, 2014, pp. 309-316; Zhang *et al.*, 2009, pp. 93-99). De esta manera se lograron establecer los rangos de concentración para evaluar la percepción de la sacarosa y es por ello que hemos tomado como referencia esas investigaciones para realizar la escala de diluciones de sacarosa a diferente concentración dentro de este estudio. Posteriormente, se colocó cada una de

las disoluciones de sacarosa en frascos falcon (Corning, New York, USA) rotulados con cada concentración. Las disoluciones fueron preparadas un día antes de cada muestreo.

2.1.2.2 Prueba de sensibilidad de la percepción del sabor dulce

Se proporcionó a los individuos 5mL de cada una de las disoluciones con su respectiva concentración, partiendo de la solución menos concentrada hacia la solución más concentrada. Después de probar cada solución, los participantes bebieron agua con el fin de evitar que se mezclen las soluciones en la cavidad oral. Una vez saboreada cada solución se preguntó si percibían o no el sabor dulce y sus respuestas fueron registradas.

2.2 Recolección de muestras de sangre

Para proseguir con el estudio genotípico fue necesaria la obtención de muestras de sangre. La muestra de sangre periférica de cada individuo se colocó en tubos con anticoagulante EDTA-K3 (1,8 mL de EDTA anhidro por mL de sangre), debidamente rotulados de acuerdo a un código interno del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su llegada al laboratorio y extracción de ADN.

2.3 Procesamiento de muestras mediante la utilización de técnicas de biología molecular

2.3.1 Extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica

Para la extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica se utilizó el kit PureLink®GenomicDNA (Invitrogen™).

Se programó la temperatura de un bloque térmico AccuBlock™ Digital Dry Block (Labnet, NJ, USA) a 55°C. Posteriormente, se transfirieron 200µL de sangre periférica en cada tubo eppendorf de 1,5 mL (Axygen CA, USA), debidamente rotulados con su respectivo código. Seguidamente, para cada muestra de sangre se añadió 20 µL de Proteinasa K y 20 µL de RNasaA,

contenidas en el kit. A continuación, se mezcló mediante vortex y se los incubó durante dos minutos a temperatura ambiente. Al tiempo de incubación, se colocó 200 μL de buffer de lisis incluido en el kit y se mezcló nuevamente mediante vortex hasta obtener una solución homogénea. A la solución se la incubó en el bloque térmico a 55°C durante 10 minutos, con el fin de promover la digestión de proteínas. Al finalizar este tiempo, los tubos se retiraron del bloque térmico y a cada uno se le colocó 200 μL de etanol fresco a una concentración de 96% y se prosiguió a mezclar mediante vortex hasta conseguir una solución homogénea. El volumen obtenido hasta ese momento fue de aproximadamente 640 μL y fue transferido a una columna de extracción con tubo recolector proporcionada por el kit. Las columnas fueron llevadas a centrifugar a 10,000 x g durante un minuto a temperatura ambiente. Al cabo de esto, se descartó el tubo recolector que contenía el líquido remanente en él y se colocó la columna en un tubo recolector nuevo. A continuación, se agregó 500 μL de buffer de lavado 1 (previamente preparado con etanol) incluido en el kit y se prosiguió a centrifugar la columna a 10,000 x g durante un minuto a temperatura ambiente. Se descartó el tubo recolector con el líquido que quedó en él. La columna fue colocada en un nuevo tubo recolector y se agregó 500 μL de buffer de lavado 2 (previamente preparado con etanol) incluido en el kit, se centrifugó la columna a máxima velocidad (17,200 x g) durante 3 minutos a temperatura ambiente. De igual manera, se descartó el tubo recolector y se colocó la columna en un tubo eppendorf de 1,5 mL estéril. A continuación, se colocó 30 μL de buffer de elución en el centro de la membrana de la columna (se colocó ese volumen para obtener una mayor concentración de ADN), se incubó durante un minuto a temperatura ambiente y después se centrifugó a máxima velocidad durante un minuto a temperatura ambiente. Terminado este paso, se descartó la columna y se conservó el tubo eppendorf que contuvo el ADN de cada individuo. Finalmente, se rotularon todos los tubos y se los almacenó a -20°C.

2.3.2 Análisis cualitativo y cuantitativo del ADN extraído

Para el análisis cualitativo se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v. Para esto, se pesó agarosa liofilizada y se disolvió en Tris-Borato-EDTA (TBE 1X). Para facilitar la disolución de la agarosa se utilizó un microondas. Posteriormente se añadió Bromuro de Etidio en una proporción de 1 μ L por cada 20mL de gel en estado líquido.

En cuanto al análisis cuantitativo, las muestras de ADN fueron cuantificadas en NanoDrop 2000 (ThermoScientific, Waltham, MA) de acuerdo a las condiciones del fabricante con respecto a la medición de ácidos nucleicos. En la cuantificación también se observó la pureza de las muestras en cuanto a los rangos de absorción de cada molécula. Los valores fueron obtenidos en unidades de concentración ng/ μ L. Cada muestra de ADN fue diluida a una concentración de 30ng/ μ L a partir de la concentración inicial obtenida.

2.4 Determinación de genotipos

Los polimorfismos rs307355 y rs35744813 se estudiaron mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final para amplificar la secuencia de interés y secuenciación capilar Sanger para determinar la presencia o ausencia de los polimorfismos en cada una de las amplificaciones de todas las muestras de estudio.

2.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa de punto final (PCR) para los polimorfismos rs307355 y rs35744813 del gen *TAS1R3*.

2.4.1.1 Diseño de cebadores

En primera estancia, se diseñaron los cebadores o primers que limitaban la zona de interés, es decir, el lugar de la secuencia en donde se encontraba los polimorfismos de estudio. Se utilizó la herramienta de diseño de cebadores del National Center for Biotechnology Information (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), en base a una zona marcada del gen *TAS1R3*. El fragmento tuvo un total de 606 bases. Las secuencias de

los cebadores Forward y Reverse fueron:

5'-GTGTGCCATCTGTGCAATGTG-3'

5'- GCGCATGGTACACGCGAAT-3'

2.4.1.2 Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa de punto final (PCR).

2.4.1.2.1 Reconstitución de cebadores y comprobación de su concentración.

Antes de realizar la amplificación de los fragmentos de ADN de interés se reconstituyeron los primers o cebadores proporcionados por eurofins Genomics.

Este proceso consistió en resuspender el cebador en agua grado molecular o Milli-Q®estéril. Posteriormente, se comprobó la concentración de los cebadores, ya que, según el proveedor esta era de 100µM. Este procedimiento consistió en realizar diluciones seriadas de unos cebadores forward y reverse de concentración conocida: 100µM, aquellos fueron proporcionados por el Instituto de Investigaciones Biomédicas. Las diluciones seriadas fueron a las siguientes concentraciones: 75µM, 50µM, 25µM, 10 µM y 5µM. A continuación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (véase apartado 2.3.2), en la que se comparó la intensidad de las bandas de los cebadores controles con los cebadores proporcionados para este estudio. De esta manera se logró conocer la verdadera concentración de los primers del gen *TAS1R3*, la misma que fue de 30µM.

2.4.1.2.2 Estandarización de volúmenes y concentraciones para mix de reacción

Tomando en cuenta que el ADN provino de sangre periférica, para la amplificación del fragmento de interés se establecieron las condiciones descritas en la tabla 1, para un volumen final de reacción de 25 μL .

Tabla 1. Concentraciones establecidas para reacción de PCR para amplificación de rs307355 y rs35744813 del gen *TAS1R3*

Compuesto	Stock	Disolución	Final	Volumen 1X (μL)
H ₂ O grado PCR				14,25
	5X		1X	5
Buffer(MgCl ₂)10x	50mM		3	1,5
Cofactor MgCl ₂	100mM	10mM	0,2mM	0,5
Deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)	100 μM	10 μM	0,2 μM	0,5
Primer Forward				
Primer Reverse	100 μM	10 μM	0,2 μM	0,5
<i>Taq platinum</i> DNA polimerasa (Thermo Fisher Scientific-Invitrogen)	5 U/ μL	1,5 U/ μL	0,02U/ μL	0,25
Muestra de ADN	30 ng/ μL (aprox)			2,5
Volumen Final				25

2.4.1.2.2 Estandarización de la temperatura para la reacción de PCR

Es muy importante que la temperatura de annealing o hibridación sea la adecuada, pues esta determina que el cebador se una correctamente al fragmento de ADN que va a amplificar (Pelt-Verkuil, Belkum y Hays, 2008, pp. 122-124). Para su estandarización, se tomó en cuenta la temperatura Melting promedio (62°C). Partiendo de 62°C, se restaron 5° de temperatura (57°C) y a partir de esta temperatura se estableció un rango de temperatura que fue desde 52°C a 62°C. Posteriormente, se realizó una PCR con las condiciones mencionadas en el apartado 2.4.1.2.1 y con el rango de temperatura de annealing antes mencionado, en un termociclador SureCycler8000 (Agilent, Santa Clara CA). A continuación, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa para comprobar cuál era la temperatura adecuada, mediante observación de la intensidad de banda. La banda más intensa perteneció a 57°C. Las condiciones de temperatura para toda la reacción se detalla en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones utilizadas para reacción de PCR para amplificación de rs307355 y rs35744813 del gen *TAS1R3*

Paso	Ciclos	Tiempo (min)	T (°C)
Denaturación inicial	1	3:00	94°C
Denaturación		0:50	94°C
Hibridación	35	0:50	57°C
Elongación		1:00	72°C
Elongación final	1	3:00	72°C

Una vez estandarizadas todas las condiciones, se prosiguió a realizar la PCR de las 110 muestras de ADN en tandas de varias muestras. Después de cada tanda, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (véase apartado 2.3.2) a 120 V por 25 minutos. Los resultados se revelaron en un transiluminador ImageQuant300 (General Electric, Fairfield, USA), para así comprobar la

calidad y pureza de los amplificadores, pues siempre se incluyó un control negativo.

2.4.2. Secuenciación capilar

La secuenciación capilar o de Sanger se basa en leer cada base nitrogenada, las cuales están marcadas defectivamente, debido a los dideoxinucleótidos incluidos en la mezcla de reacción. De este modo, la reacción que se está llevando a cabo se detendrá al encontrar la base defectiva y así aparecerán bandas progresivamente (Divan y Royds, 2013, pp 67-69). Cada nucleótido será marcado con 4 colores diferentes de fluorescencia. Dichas bandas serán reconocidas por un láser de acuerdo a su fluorescencia emitida. Los datos generados serán pasados a un sistema computarizado para facilitar su lectura (Paz-Y-Miño y López-Cortés, 2014, p.29).

Una vez comprobados los amplificadores, se llevó a purificar cada fragmento mediante el Kit Agencourt AMPureXP® (Applied Biosystems, Austin, TX), las recomendaciones del fabricante fueron modificadas para obtener una mayor eficiencia del Kit y optimización de los resultados. Se colocó 15 µL de AMPureXP® por cada 10 µL de producto de PCR, se mezcló mediante vortex y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se colocaron los tubos en la placa magnética durante 5 minutos hasta que se formó el anillo y el líquido estuvo totalmente claro. Se aspiró el líquido sin tocar el anillo y se añadieron 200 µL de etanol (fresco: máximo 7 días de preparado) al 70% y se incubó durante 30 segundos. El lavado con etanol al 70% se repitió y se eliminó los remanentes de este mediante el multicanal. Se dejó secar los tubos en la estufa a 37°C durante 20 minutos. Después, se resuspendió el anillo en 30 µL de agua Milli-Q® estéril y se mezcló mediante vortex. Finalmente, los tubos fueron colocados nuevamente en la placa magnética durante 30 segundos a temperatura ambiente. Se extrajo el líquido transparente (este contenía los amplificadores de ADN purificados) y se los traspasó a nuevos tubos de PCR estériles.

Una vez purificado el fragmento de PCR, se procedió a realizar una PCR de secuencia mediante los reactivos del kit BigDye® Terminator 3.1Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, TX, USA). De igual modo, las recomendaciones del fabricante fueron modificadas para optimizar los resultados. Las condiciones de concentración utilizadas se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Mezcla de Reacción para PCR de secuencia.

Compuesto	Concentración Final	Volumen final
Agua Milli-Q®estéril		1,5
BigDye® Terminator mix		0,5
BigDye® Terminator Sequencing buffer 5X	0,75X	0,9
Primer Forward o Reverse	0,27 µM	1,6
Producto amplificado purificado		1,5
Volumen de reacción		6µL

Cabe mencionar que para el polimorfismo rs307355 se utilizó el primer Forward y para el polimorfismo rs35744813, se utilizó el primer Reverse, en dependencia de la zona en la que se encontraba cada uno y el alcance de amplificación de cada primer. Por otro lado, los amplificados purificados se servían en un área libre de productos de PCR para evitar contaminación. Además, las condiciones de temperatura, tiempo y ciclos ajustadas en un termociclador SureCycler8000 (Agilent, Santa Clara CA) de la PCR de secuenciación se especifican en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones utilizadas para reacción de PCR de secuencia.

Paso	Ciclos	Tiempo (min)	T (°C)
Denaturación inicial	1	3:00	96°C
Denaturación		0:10	96°C
Hibridación	25	0:05	50,5°C
Elongación		4:00	60°C

Una vez obtenidos los amplificadores, nuevamente fueron purificados mediante el kit Agencourt CleanSEQ® (Applied Biosystems, Austin, TX). De nuevo las condiciones del fabricante fueron adaptadas. Se agregó 2 µL de Agencourt CleanSEQ® (Applied Biosystems, Austin, TX) y 16,2 µL de etanol al 85 % fresco (máximo 7 días de preparado) a cada producto de PCR. Se mezcló mediante vortex y se dejó incubar los tubos en la placa magnética durante 3 minutos a temperatura ambiente hasta que se formó el anillo. Al tiempo de incubación, se retiró el líquido sin topar las paredes de los tubos. Posteriormente, se agregó 100 µL de etanol al 85 % y se incubó durante 30 segundos a temperatura ambiente. Se retiró el etanol por inversión de la placa sobre papel absorbente. A continuación, se repitió el lavado con etanol al 85 % y se retiró el remanente de alcohol mediante el multicanal. Se dejó incubar los tubos en la estufa a 37°C durante 25 minutos. Al terminar este tiempo, se retiró la placa con los tubos de la estufa y se prosiguió a resuspender el anillo obtenido en 20 µL de agua Milli-Q® estéril. Se mezcló mediante vortex y se colocaron los tubos a la placa magnética durante 30 segundos. Se colocaron los 20 µL al plato de carga del equipo. La secuencia del fragmento en estudio se analizó en el secuenciador GeneticAnalyzer3130 (Applied Biosystems, Austin, TX). La carga de muestras del plato fue programada en el software Foundation Data Collection Version 3.0. Al terminar la secuenciación de las muestras analizadas, los resultados se leyeron en el software Sequencing Analysis 5.3.1, para de esta manera comprobar la presencia o ausencia de los polimorfismos en estudio. Los resultados no concluyentes fueron analizados por duplicado para confirmar la presencia de las variantes.

2.5 Análisis estadístico

Todos los datos del Proyecto Sabores del Instituto de Investigaciones Biomédicas se encuentran en la base de datos del instituto. Para empezar el análisis estadístico, se calcularon las frecuencias de hábitos practicados por los individuos y que podían influir en el grado de percepción de la sacarosa (consumo de tabaco, consumo de café, consumo de alcohol y consumo de drogas o medicinas). Además, se calcularon las frecuencias de enfermedades y antecedentes familiares de los individuos, para ello se dividió cada grupo sobre el total de individuos ($n=110$). Después, fueron calculados los porcentajes de individuos que lograron percibir la sacarosa a las distintas concentraciones (0,05%, 0,10%, 0,34%, 0,50%, 1% y 1,50%), dividiendo el número de individuos que percibió a cada concentración por el total de individuos. Posteriormente, una vez obtenidas las secuencias de interés de todos los individuos para los polimorfismos rs307355 y rs35744813 se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas. Las frecuencias genotípicas fueron calculadas dividiendo el número de cada genotipo (homocigoto dominante (C/C), heterocigoto (C/T) u homocigoto recesivo (T/T)) por el total de individuos. Las frecuencias alélicas fueron calculadas partiendo de las frecuencias genotípicas. Para el cálculo se dividió el número de alelos mutados para el número total de alelos siendo el número de alelos el doble de individuos dentro del estudio. Por lo tanto, se aplicó la ecuación de Hardy-Weinberg $(p+q)^2=p^2+2pq+q^2=1$, en donde p^2 corresponde al homocigoto dominante, q^2 a homocigoto recesivo y $2pq$ a heterocigoto. La suma de las frecuencias debe ser igual a 1.0. (Paz-y-Miño y López-Cortés, 2014, p.50). Posteriormente, para encontrar la existencia de relaciones estadísticamente significativas entre las frecuencias genotípicas y el grado de percepción de sacarosa se aplicó la prueba estadística exacta de Fisher, ya que las frecuencias esperadas resultaron menores a 5. Para esto se utilizó el software SPSS STATISTICS 2.0 (IBM, USA) bajo licencia académica, el mismo que generó tablas de contingencia entre dos factores. Este mismo método fue aplicado para realizar las siguientes relaciones: frecuencias de percepción de las concentraciones de

sacarosa- hábitos; frecuencias de percepción de las concentraciones de sacarosa -enfermedades y antecedentes familiares de enfermedades; genotipos-hábitos; genotipos- enfermedades y antecedentes familiares de enfermedades. Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de haplotipos para los polimorfismos rs307355 y rs35744813, realizando las posibles combinaciones entre los alelos de ambos polimorfismos. Se calcularon además las frecuencias de cada haplotipo (CC, CT y TT) y se llevó a realizar la respectiva relación con las frecuencias de percepción de sacarosa utilizando también la prueba estadística exacta de Fisher.

2.5.1 Estratificación de subgrupos por umbral de detección y genotipo.

Para la estratificación se consideraron 2 variables que fueron: el genotipo y la percepción de sacarosa a diferentes concentraciones. A partir de ellas se impusieron 3 subgrupos dentro del grupo detección de sacarosa (Súper catadores, catadores medios y no catadores) y 3 subgrupos dentro del grupo de genotipos obtenidos (Homocigoto Dominante, Heterocigoto y Homocigoto recesivo). Se combinaron ambos subgrupos y en total se obtuvieron 9 subgrupos que fueron los siguientes (tabla 5).

Tabla 5. Estratificación de subgrupos por umbral de detección y genotipo

Genotipo	Catadores		
	Súper Catadores	Catadores Medios	No Catadores
Homocigoto Dominante	Súper catadores con genotipo homocigoto dominante	Catadores medios con genotipo homocigoto dominante	No catadores con genotipo homocigoto dominante
Heterocigoto	Súper catadores con genotipo heterocigoto	Catadores medios con genotipo heterocigoto	No catadores con genotipo heterocigoto
Homocigoto Recesivo	Súper catadores con genotipo homocigoto recesivo	Catadores medios con genotipo homocigoto recesivo	No catadores con genotipo homocigoto recesivo

Cabe mencionar que esta estratificación de subgrupos de catadores fue establecida en base a investigaciones previamente realizadas en cuanto al umbral de detección de la sacarosa (apartado 2.1.2.1) y a la estratificación de subgrupos realizada en primera estancia para la percepción del sabor amargo y luego en combinación con el sabor dulce (Drewnowski *et al.*, 1997, pp. 649-655). Para ello, en dichos estudios se utilizaron escalas como la LMS (Labeled Magnitude Scale) que establece límites: nada de sabor-el sabor más intenso posible. De esta manera se ha podido estratificar la percepción del sabor dulce en los tres subgrupos antes mencionados (Prescott, Ripandelli y Wakeling, 2001, pp. 993-1003). Es así que, dentro de este estudio se llegó a establecer los subgrupos subgrupo catadores de la siguiente manera (tabla 6):

Tabla 6. Clasificación de catadores según su umbra de detección ante la sacarosa

Subgrupo de Catadores	Percepción de sacarosa
Súper Catadores	Percepción a partir de las concentraciones mínimas de 0,05% y 0,10%.
Catadores Medios	Percepción a partir de las concentraciones 0,34% y 0,5%.
No catadores	Percepción solamente a las máximas concentraciones de 1% y 1,5%.

Para cada polimorfismo se realizó la estratificación anteriormente descrita. De igual manera se llevó a calcular la frecuencia de cada subgrupo y se analizó su relación con cada genotipo mediante la prueba exacta de Fisher.

CAPÍTULO III. RESULTADOS

3.1 Datos recogidos en la encuesta realizada

Una vez firmado el consentimiento informado (anexo 2), este permitió recoger los datos de cada individuo dentro de la población en estudio como son: sexo, edad, consumo de tabaco, consumo de café, consumo de alcohol, consumo de drogas o medicinas, enfermedades, y antecedentes familiares de enfermedades (anexo 3). Los datos recogidos se encuentran en la base de datos del proyecto sabores del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

3.1.1 Edad y sexo

Los individuos de la población muestreada fueron 110 con un total de 45 (40,90%) hombres y 65 (59,10%) mujeres ecuatorianos entre 17 y 62 años. La edad media fue de 20,46 años. La mayor cantidad de individuos muestreados está bajo la media: 82 individuos (74,55%) y el resto sobre la edad media: 28 individuos (25,45%). Se agrupó a los individuos en rangos de edad 17-25, 26-32 y 33-62 de acuerdo a lo descrito por (Mojet, Heidema y Hazelhof, 2003, pp. 397-413; Mojet, Heidema y Hazelhof, 2005, pp. 413-423) en cuanto a la influencia de la edad en la percepción del gusto. En la tabla 7 se muestran las frecuencias y la relación porcentual de edad y sexo de los individuos de la población estudiada.

Tabla 7. Tabla demográfica de edad y sexo de los individuos dentro de la población de estudio.

	Edad							
	17-25		26-32		33-62		Total	
	n	% del total						
Sexo								
Femenino	61	59,20%	3	2,70%	1	0,90%	65	59,10%
Masculino	42	93,80%	2	1,80%	1	0,90%	45	40,90%
Total	103	93,60%	5	4,50%	2	1,80%	110	100%

3.1.2 Hábitos de los individuos de la población muestreada

Como se mencionó en el apartado 2.1.1, a los individuos muestreados se les realizó una encuesta en la que constaban sus hábitos como: consumo de tabaco, consumo de café, consumo de alcohol y consumo de medicamentos o drogas, debido a que se consideró importante la influencia de dichos factores externos en la percepción del sabor dulce. Los porcentajes encontrados para los 110 individuos son las siguientes:

3.1.2.1 Consumo de tabaco

En la población muestreada (n=110), 33 individuos (30%) fue identificada como fumadores y 77 individuos (70%) como no fumadores.

3.1.2.2 Consumo de café

En cuanto a las personas que consumen café, se encontró que 58 individuos (52,77%) consumían café y 52 individuos (42,27%) que no.

3.1.2.3 Consumo de alcohol

Otro de los hábitos de los individuos en estudio fue el consumo de alcohol. Los resultados de personas que lo hacían eventualmente fue de 48 (43,64%) frente a 62 individuos (56,36%) que no consumían alcohol eventualmente.

3.1.2.4 Consumo de drogas o medicamentos

Al preguntar a las personas si consumían drogas o medicamentos, se lo hizo de manera general, es decir, si lo hacen permanentemente o en ese momento debido a algún tratamiento temporal. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: 22 (20%) personas consumían algún tipo de medicamento y 88 (80%) no lo hacían.

En la tabla 8 se aprecian los porcentajes de cada uno de los hábitos que se consideraron influyente en la variación de la percepción del sabor dulce, practicados por los 110 individuos en estudio

Tabla 8. Distribución porcentual de los hábitos considerados influyentes en la percepción del sabor dulce.

Hábitos		n	% del total
Consumo de cigarrillo	Sí	33	30%
	No	77	70%
	Total	110	100%
Consumo de café	Sí	58	52,77%
	No	52	42,27%
	Total	110	100%
Consumo de alcohol	Sí	48	43,64%
	No	52	56,36%
	Total	110	100%
Consumo de medicamentos	Sí	22	20%
	No	88	80%
	Total	110	100%

3.1.3 Enfermedades y antecedentes familiares

En la encuesta realizada a los individuos muestreados se les preguntó si padecían alguna enfermedad y los antecedentes familiares de enfermedades. Los datos obtenidos son importantes debido a la posible relación que se ha venido mencionando entre la percepción de los sabores y el estado de salud, más aún entre la percepción del sabor dulce y problemas nutricionales así como enfermedades como la diabetes. Los porcentajes encontrados fueron las siguientes:

3.1.3.1 Padecimiento de enfermedades

Del total de 110 individuos los que aseguraron padecer alguna enfermedad fueron 44 (40%) y el resto 66 individuos (60%) dijeron no padecer ninguna.

3.1.3.2 Antecedentes familiares de enfermedades

La mayoría de individuos: 64 (58,18%) mencionó tener algún antecedente familiar de enfermedad mientras que 46 individuos (41,81%) aseguraron que no.

En la tabla 9 se pueden apreciar las frecuencias y la distribución porcentual de aquellos individuos que aseguraron padecer enfermedades y tener antecedentes familiares de enfermedades.

Tabla 9. Distribución porcentual de individuos que aseguraron padecer enfermedad y poseer antecedentes familiares de enfermedades

Enfermedades y Antecedentes Familiares	n	% del total
Padece enfermedad	Sí	44 40%
	No	66 60%
	Total	110 100%
Posee antecedente familiar de enfermedad	Sí	64 58,18%
	No	46 41,81%
	Total	110 100%

3.2 Evaluación del umbral de detección de la sacarosa

Como se mencionó en el apartado 2.1.2.1, se proporcionó a todos los individuos las diluciones de sacarosa a diferentes concentraciones (0,05%, 0,10%, 0,34%, 0,50%, 1% y 1,50%) para evaluar la detección de esta y así probar la sensibilidad de ellos a la percepción del sabor dulce (anexo 4). De un total de 110 individuos, se muestran los porcentajes de los que percibieron la sacarosa a cada concentración.

3.2.1 Detección de sacarosa a 0,05%

Esta dilución corresponde a la concentración más baja. Se observó que la mayoría de individuos, es decir 99 de ellos (90%) no lograron percibir la sacarosa a la concentración de 0,05%. Mientras que, solo 11 individuos (10%)

de un total de 110 individuos fueron capaces de detectar el sabor dulce producido por la sacarosa a esta concentración tan baja.

3.2.2 Detección de sacarosa a 0,10%

Este resultado fue similar al anterior, ya que, 86 individuos (78,2%) no detectaron el sabor dulce de la sacarosa. Mientras que, 24 de ellos (21,8%) sí lo hicieron. Cabe destacar que esta dilución poseía el doble de concentración que la anterior, sin embargo, la mayoría del total de 110 individuos no fue capaz de percibir la sacarosa a dicha concentración.

3.2.3 Detección de sacarosa a 0,34%

Esta dilución estuvo el triple de concentrada que la anterior y los resultados fueron siguiendo el mismo patrón, pues en este caso al ser mayor la concentración, 66 individuos (60%) no percibieron la sacarosa y 44 individuos (40%) si lograron hacerlo.

3.2.4 Detección de sacarosa a 0,5%

En este caso, la concentración de esta dilución de sacarosa no aumentó drásticamente con relación a la anterior. Los resultados obtenidos muestran un equilibrio, puesto que 51 individuos (46,4%) no percibieron el sabor dulce de la sacarosa mientras que 59 individuos (53,6%) si fueron capaces de hacerlo.

3.2.5 Detección de sacarosa a 1%

Esta dilución estuvo el doble de concentrada que la anterior. El número de individuos que logró percibir la sacarosa a 1% aumentó considerablemente con respecto a la anterior dilución. De esta manera, tan solo 13 individuos (11,81%) no lograron detectar la sacarosa, mientras que 97 individuos (88,2%) si fueron capaces de hacerlo.

3.2.6 Detección de sacarosa a 1,5%

Esta fue la última dilución proporcionada a los individuos de la población muestreada y por ende fue la que estuvo más concentrada. De esta manera los resultados muestran que solamente 9 individuos (8,2%) no fueron capaces de percibir la sacarosa. Al contrario, 101 individuos (91,8%) si lo lograron.

En la tabla 10 se muestran los porcentajes de detección de la sacarosa ante las diferentes diluciones con sus respectivas concentraciones. Se observa claramente que los resultados se encuentran en orden ascendente, puesto que los porcentajes de personas que lograron percibir la sacarosa aumentan conforme lo hace la concentración.

Tabla 10. Distribución porcentual de individuos que lograron percibir las soluciones de sacarosa a distintas concentraciones

Percepción de Sacarosa			
Concentración		n	%
0,05%	Sí	11	10%
	No	99	90%
	Total	110	100%
0,1%	Sí	24	22%
	No	86	78%
	Total	110	100%
0,34%	Sí	44	40%
	No	66	60%
	Total	110	100%
0,5%	Sí	59	46,4%
	No	51	53,6%
	Total	110	100%
1%	Sí	97	88,2%
	No	13	11,8%
	Total	110	100%
1,50%	Sí	101	91,8%
	No	9	8,2%
	Total	110	100%

Más adelante, se relacionan a aquellos individuos que no fueron capaces de percibir la sacarosa a esta concentración con su genotipo con respecto a los polimorfismos en estudio.

3.3 Extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica

3.3.1 Concentración de ADN obtenido

Una vez extraído el ADN genómico, se obtuvieron la mínima y máxima concentración de ADN de los 110 individuos muestreados, las que fueron: 27,3 y 532,1 ng/μL, respectivamente.

3.4 Determinación y análisis de genotipos

3.4.1 Amplificación de secuencias de interés mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez estandarizada la PCR según lo mencionado en el apartado 2.4.1.2.2, se llevó a cabo la amplificación de los fragmentos de interés en donde se encontraban los polimorfismos rs307355 y rs35744813. Se obtuvo como resultado los fragmentos amplificados de aproximadamente 606 pares de bases (figura 9).

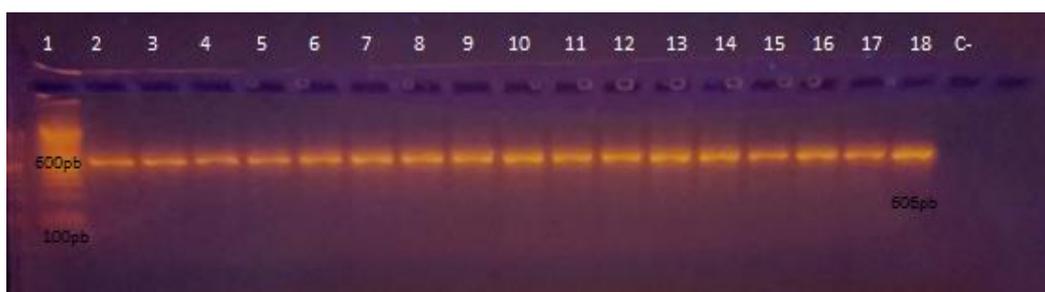


Figura 9. Electroforesis de 17 fragmentos de ADN de 606 pb amplificados del gen *TAS1R3* mediante PCR.

a. Las bandas en el gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio representan de izquierda a derecha marcador de peso molecular de 100pb (carril 1), 17 muestras de ADN amplificado para el gen *TAS1R3* de los individuos en estudio (carriles 2-18) y el control negativo (carril 19)

3.4.2 Secuenciación y análisis genotípico

Se obtuvieron genotipos homocigotos dominantes (C/C), homocigotos recesivos (T/T) y heterocigotos (C/T) para los dos polimorfismo estudiados: rs307355 y rs35744813.

3.4.2.1 Secuenciación y análisis de polimorfismo rs307355

Para la secuenciación del polimorfismo rs307355, se obtuvieron los tres genotipos: 79 homocigotos dominantes (C/C) (71,8%) ,27 heterocigotos (C/T) (24,5%) y 4 recesivos (T/T) (3,6%) (Tabla 11).

Tabla 11. Distribución porcentual de genotipos obtenidos para el polimorfismo rs307355

Genotipos	Recuento	Porcentaje
Homocigoto Dominante	79	71,8%
Heterocigoto	27	24,5%
Homocigoto recesivo	4	3,6%
Total	110	100,0%

En la figura 10 se presentan las secuencias para cada uno de los genotipos del polimorfismo rs307355.

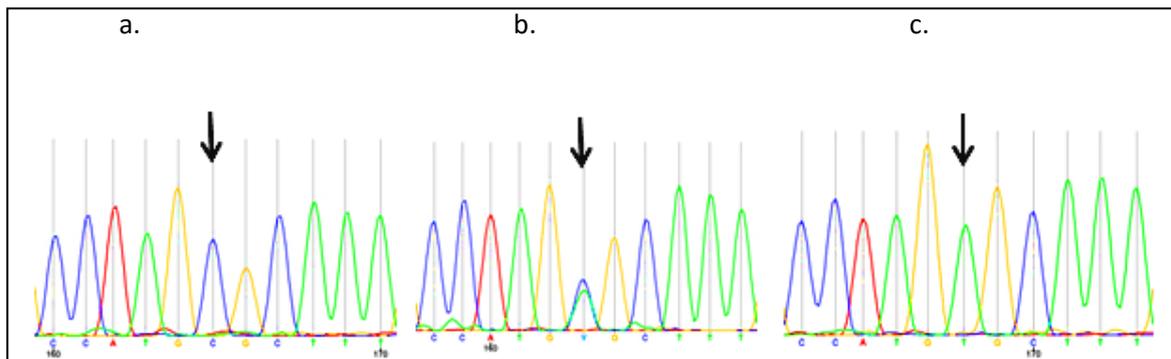


Figura 10. Secuencias correspondientes al polimorfismo rs307355 del gen *TAS1R3*.

Se observa las secuencias del fragmento correspondiente al SNP rs307355 de diferentes muestras, obteniendo: a. Secuencia para homocigotos dominantes (C/C), b. secuencia para heterocigotos (C/T), c. secuencia para homocigotos recesivos (T/T). En los electroferogramas, cada pico es de un color distinto, perteneciendo cada uno a una base en particular, siendo de esta manera: azul: citosina; amarillo: guanina; rojo: adenina y verde: timina.

3.4.2.2 Secuenciación y análisis del polimorfismo rs35744813.

Para la secuenciación del polimorfismo rs35744813, se obtuvieron los tres genotipos: 76 homocigotos dominantes (C/C) (69,1%), 29 heterocigotos (C/T) (26,36%) y 5 homocigotos recesivos (T/T) (4,5%) (Tabla 12).

Tabla 12. Distribución porcentual de genotipos obtenidos para el polimorfismo rs307355

Genotipo	Recuento	Porcentaje
Homocigoto Dominante	76	69,1%
Heterocigoto	29	26,4%
Homocigoto Recesivo	5	4,5%
Total	110	100,0%

En la figura 11 se observan las secuencias de los genotipos obtenidos para el polimorfismo rs35744813.

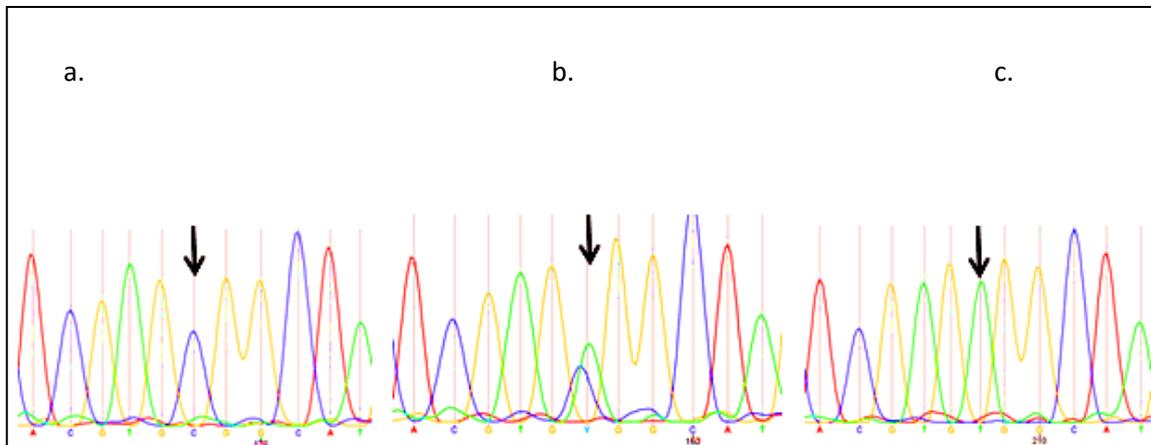


Figura 11. Secuencias correspondientes al polimorfismo rs35744813 del gen *TAS1R3*

Se observa las secuencias del fragmento correspondiente al SNP rs35744813 de diferentes muestras, obteniendo: a. secuencia para homocigotos dominantes (C/C), b. secuencia para heterocigotos (C/T), c. secuencia para homocigotos recesivos (T/T). En los electroferogramas, cada pico es de un color distinto, perteneciendo cada uno a una base en particular, siendo de esta manera: azul: citosina; amarillo: guanina; rojo: adenina y verde: timina.

3.4.3 Frecuencias genotípicas y alélica

En este apartado se muestra la frecuencia de los genotipos obtenidos para cada polimorfismo conjuntamente con la frecuencia de cada alelo (C o T) presentes en los polimorfismos rs307355 y rs35744813 del gen *TAS1R3*. Se determinó cuáles fueron los alelos más frecuentes, como se muestra en la tabla 13, los alelos C (0,84 y 0,83) fueron los que predominaron.

Tabla 13. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs307355 y rs35744813

	Frecuencia Genotípica			Frecuencia Alélica	
	C/C	C/T	T/T	C	T
rs307355	0,7183	0,245	0,0364	0,84	0,159
rs35744813	0,691	0,264	0,045	0,83	0,177

3.5 Análisis de dosis umbral de sacarosa y hábitos

Antes de analizar los factores genéticos, se demostró si existía influencia de los hábitos: consumo de tabaco, consumo de café, consumo de alcohol y consumo de droga o medicamentos con la percepción de sacarosa dentro de la población en estudio se relacionó ambos grupos. Los resultados obtenidos no demuestran una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) que evidencie la influencia de factores externos dentro de la percepción de la sacarosa en esta población.

3.6 Análisis de dosis umbral de sacarosa-padecimiento de enfermedades y antecedentes familiares de enfermedades

Al considerar importante la influencia de ciertas enfermedades y antecedentes familiares de las mismas, dentro de la percepción del sabor dulce se llevó a relacionar estas características. En cuanto a la relación de individuos que aseguraron padecer alguna enfermedad, no se obtuvo ninguna diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$). Por el contrario, al relacionar el grupo de individuos que tuvieron antecedentes familiares de enfermedad y los que no con el grupo de percepción de sacarosa a una concentración de 0,5%, es decir, una concentración que logró percibir la mitad de la población (apartado 3.2.4), se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,0022$). Esto se puede observar en la tabla 14, en donde 24 individuos (21,8%) dentro del total no lograron percibir la sacarosa a esta concentración y tienen antecedentes familiares de enfermedades. Lo que resulta interesante dentro de esta relación

es que los individuos que no percibieron la sacarosa a dicha concentración y que aseguraron tener antecedentes familiares de enfermedades relevantes, mencionaron en su mayoría que familiares directos padecían cáncer, hipertensión y diabetes (figura 12).

Tabla 14. Relación de frecuencia y porcentajes de los individuos que percibieron y no percibieron la sacarosa a una concentración de 0,5% y que aseguraron tener antecedentes familiares de enfermedades.

Percepción de Sacarosa a 0,5%	Individuos con antecedentes familiares		Individuos sin antecedentes familiares		Total	
	n	% del total	n	% del total	n	% del total
No percibió a 0,5%	27	24,50%	24	21,80%	51	46,40%
Si percibió a 0,5%	19	17,30%	40	36,40%	59	53,60%
Total	46	41,80%	64	58,20%	110	100%
p	0,022					

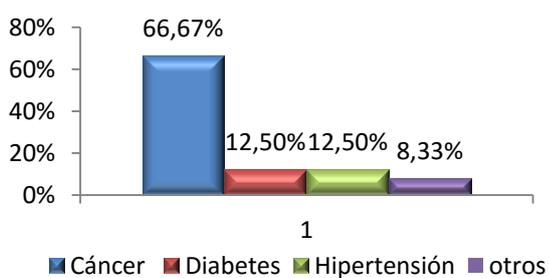


Figura 12. Porcentaje de individuos que no percibieron la sacarosa a 0,5% con antecedentes familiares de enfermedades

a. Antecedentes familiares de cáncer (barra azul), antecedentes familiares de diabetes (barra roja), antecedentes familiares con hipertensión (barra verde), otros (barra lila)

3.7 Análisis de polimorfismos con los diferentes hábitos.

3.7.1 Polimorfismo rs307355 y hábitos

Una vez obtenidas las frecuencias genotípicas se llevó a relacionar cada polimorfismo con los hábitos de los 110 individuos en estudio, con el fin de establecer la percepción del sabor dulce con factores externos. Sin embargo, la relación de los genotipos C/C, C/T y T/T no tuvieron una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) al relacionarlos con consumo de tabaco, consumo de café, consumo de alcohol y consumo de droga o medicamentos. En la tabla 15 se muestran las relaciones de los genotipos del polimorfismo rs307355 con los diferentes hábitos de los individuos.

Tabla 15. Relación de frecuencias y porcentajes de los diferentes hábitos interrogados a los individuos en estudio y sus genotipos respecto al polimorfismo rs307355.

Hábitos	Genotipos de polimorfismo rs307355							Total	p
	C/C		C/T		T/T				
	n	% del total	n	% del total	n	% del total			
Consumo de cigarrillo	sí	26	23,6	7	6,4	0	0	33	
	no	23	48,2	20	18,2	4	3,6	77	
Total		79	71,8	27	24,6	4	3,6	110	0,446
Consumo de café	sí	41	37,3	15	13,6	2	1,8	58	
	no	38	34,5	12	10,9	2	1,8	52	
Total		79	71,8	27	24,5	4	3,6	110	0,934
Consumo de alcohol	sí	37	33,6	11	10	0	0	48	
	no	42	38,2	16	14,5	4	3,6	62	
Total		79	71,8	27	24,5	4	3,6	110	0,193
Consumo de medicinas	sí	17	15,5	4	3,6	3	0,9	22	
	no	62	56,4	23	20,9	1	2,7	88	
Total		79	71,9	27	24,5	4	3,6	110	0,656

3.7.2 Polimorfismo rs35744813 y hábitos

De igual forma, se relacionó los genotipos C/C, C/T y T/T de este polimorfismo con los hábitos de cada individuo: consumo de tabaco, consumo de café,

consumo de alcohol y consumo de drogas o medicamentos. En esta relación tampoco se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p>0,05$), como se observa en la tabla 16.

Tabla 16. Relación de frecuencias y porcentajes de los diferentes hábitos interrogados a los individuos en estudio y sus genotipos respecto al polimorfismo rs35744813

Hábitos		Genotipos del polimorfismo rs35744813						Total	p
		C/C		C/T		T/T			
		n	%del total	n	%del total	n	%del total		
Consumo de cigarrillo	sí	24	21,8	9	8,2	0	0	33	
	no	52	47,3	20	18,2	5	4,5	77	
Total		76	69,1	27	26,4	4	4,5	110	0,513
Consumo de café	sí	40	36,4	16	14,5	3	1,8	58	
	no	36	32,7	13	11,8	2	2,7	52	
Total		76	69,1	27	26,3	5	1,8	110	0,787
Consumo de alcohol	sí	35	31,8	13	12	0	0	48	
	no	41	37,3	16	14,5	5	4,5	62	
Total		76	69,1	29	26,3	5	10,8	110	0,158
Consumo de Medicina	sí	17	15,5	5	4,5	0	0,	22	
	no	59	53,6	24	21,8	5	4,5	88	
Total		76	69,1	29	26,3	5	4,5	110	0,689

3.8 Análisis de polimorfismos con padecimiento de enfermedades y antecedentes familiares de enfermedades

Las variantes de cada polimorfismo fueron relacionadas con la frecuencia de enfermedades y antecedentes familiares de enfermedades que los individuos en estudio revelaron en la encuesta realizada. A continuación se muestra los resultados obtenidos con respecto a esos datos.

3.8.1 Polimorfismo rs307355- enfermedades y antecedentes familiares de enfermedades

Los resultados encontrados al relacionar las frecuencias de los genotipos del polimorfismo rs307355 C/C, C/T y T/T con las frecuencias de las personas que aseguraron padecer y no padecer enfermedad, se reveló que en cada genotipo predominaron aquellas no enfermas (C/C: 40,9%, C/T: 17,3% y T/T: 1,8%). Por el contrario, en cuanto a la relación entre las frecuencias genotípicas y las frecuencias de las personas con y sin antecedentes familiares de enfermedad prevaleció el porcentaje de aquellas personas que si tenían (C/T: 16,4% y T/T: 2,7%). Sin embargo, no se obtuvo diferencia estadísticamente significativa para ninguna de las dos relaciones ($P > 0,05$). En la tabla 17 se muestran los datos.

Tabla 17. Relación de frecuencias y porcentajes de los genotipos obtenidos para el polimorfismo rs307355 con el padecimiento de enfermedades y antecedentes familiares de enfermedades.

		Genotipos del polimorfismo rs307355							
		C/C		C/T		T/T			
Enfermedades y Antecedentes Familiares		n	% del total	n	% del total	n	% del total	Total	p
			sí	34	30,9	8	7,3	2	1,8
Padece Enfermedad	no	45	40,9	19	17,3	2	1,8	66	
	Total	79	71,8	27	24,5	4	3,6	110	0,48
Posee antecedentes familiares de enfermedad	sí	43	32,7	18	16,4	3	2,7	64	
	no	36	39,1	9	8,2	1	0,9	46	
Total		79	71,8	27	24,50	4	3,6	110	0,522

3.8.2 Polimorfismo rs35744813- enfermedades y antecedentes familiares de enfermedades

Los resultados encontrados al relacionar las frecuencias y porcentajes de los genotipos del polimorfismo rs35744813 C/C, C/T y T/T con las frecuencias y porcentajes de los individuos que padecían enfermedades y los que no, se encontró que predominaba aquel grupo que aseguró no tener ninguna dolencia en cada genotipo enfermas (C/C: 39,1%, C/T: 19,1% y T/T: 1,8%). Al contrario, en cuanto a antecedentes familiares de enfermedad con los distintos genotipos de este polimorfismo, se encontró que en cada genotipo fueron mayores tanto la frecuencia y porcentaje de aquellos individuos que aseguraron tener antecedentes familiares de alguna enfermedad (C/C: 37,3%, C/T: 18,2% y T/T: 2,7%). Sin embargo, no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en ninguna de las dos relaciones ($p > 0,05$). En la tabla 18 se pueden visualizar los resultados anteriormente descritos.

Tabla 18. Relación de frecuencias y porcentajes de los genotipos obtenidos para el polimorfismo rs357448133 con el padecimiento de enfermedades y antecedentes familiares de enfermedades.

		Genotipos del polimorfismo rs35744813						Total	p
		C/C		C/T		T/T			
Enfermedades y Antecedentes Familiares		n	% del total	n	% del total	n	% del total		
	Padece enfermedad	sí	33	30	8	7,3	3	2,7	44
no		43	39,1	21	19,1	2	1,8	66	
Total		76	69,1	29	26,4	5	4,50	110	0,254
Posee antecedentes familiares de enfermedad	sí	41	37,30	20	18,2	3	2,70	64	
	no	35	31,80	9	8,2	2	1,80	46	
Total		76	69,10	29	26,40	5	4,50	110	0,383

3.9 Análisis de polimorfismos y dosis umbral

En este apartado se muestran los resultados obtenidos al relacionar los genotipos de los polimorfismos rs307355 y rs35744813: Homocigoto Dominante C/C, Heterocigoto C/T y Homocigoto Recesivo T/T con la percepción de las soluciones de sacarosa a distintas concentraciones. Es decir, a este punto de los resultados ya se llega a la relación de características genotípicas y fenotípicas. A continuación, se observan las frecuencias y porcentajes de cada concentración con aquellas obtenidas en cada genotipo para ambos polimorfismos.

3.9.1 Polimorfismo rs307355 y dosis umbral

En esta relación se obtuvieron resultados variados. Los más relevantes son aquellos porcentajes de los individuos dentro del grupo genotípico Homocigoto Dominante, pues a partir de la concentración de 0,5% de Sacarosa, la mayoría de individuos fueron capaces de percibirla, de esta manera a una concentración de 0,5 %, el 40% del total de individuos fue capaz de percibir; a una concentración de 1%, el 65,5% fue capaz de percibir la sacarosa y a la concentración de 1,5%, el 68,20% la percibió. De igual manera, resulta interesante los porcentajes dentro el grupo genotípico Heterocigoto (C/T) a las concentración de 0,5%, pues la mitad de individuos (12%) logró percibir y la otra mitad (15%) no logró percibir la sacarosa. Por otro lado, dentro del grupo genotípico Homocigoto Recesivo T/T, dentro de la concentración de sacarosa 0,05%, un 0% de individuos logró percibir la sacarosa a la mínima concentración. Sin embargo, ninguna de las relaciones de las variantes obtenidas en este polimorfismo con las frecuencias de las personas que percibieron la sacarosa a una determinada concentración, tuvieron una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$). En la tabla 19 se observan los porcentajes de estos datos dentro de todos los grupos posibles dentro de esta relación (polimorfismo, concentración y total). En la figura 13 se logra visualizar más claramente la distribución porcentual de las personas que

percibieron la sacarosa a distintas concentraciones y que poseen un genotipo en particular.

Tabla 19. Relación entre genotipo obtenido del polimorfismo rs307355 y dosis umbral con respecto a las diferentes concentraciones de sacarosa.

Concentraciones		Genotipos								p
		C/C		C/T		T/T		Total		
		n	% total	n	% total	n	% total	n	% total	
Percibió a 0,05%	sí	7	6,4	4	3,6	0	0	11	10	0,652
	no	72	65,60	23	20,9	4	3,6	99	90	
	total	79	71,80	27	24,5	4	3,6	110	100	
Percibió a 0,1%	si	16	14,50	6	5,5	2	1,8	24	21,8	0,312
	no	63	57,30	21	19,1	2	1,8	86	78,2	
	total	79	71,80	27	24,5	4	3,6	110	100	
Percibió a 0,34%	si	46	30	9	8,2	2	1,8	44	40	0,649
	no	33	41,8	18	16,4	2	1,8	66	60	
	total	79	71,80	27	24,5	4	3,6	110	100	
Percibió a 0,5%	si	44	40	12	10,9	3	2,7	59	53,6	0,405
	no	35	31,80	15	13,6	1	0,9	51	46,4	
	total	79	71,80	27	24,5	4	3,6	110	100	
Percibió a 1%	si	72	65,5	22	20	3	2,7	97	88,2	0,181
	no	7	6,4	5	4,5	1	0,9	13	11,8	
	total	79	71,8	27	24,5	4	3,6	110	100	
Percibió a 1,5%	si	75	68,2	23	20,9	3	2,7	101	91,8	0,09
	no	4	3,6	4	3,6	1	0,9	9	8,2	
	total	79	71,8	27	24,5	4	3,6	110	100	

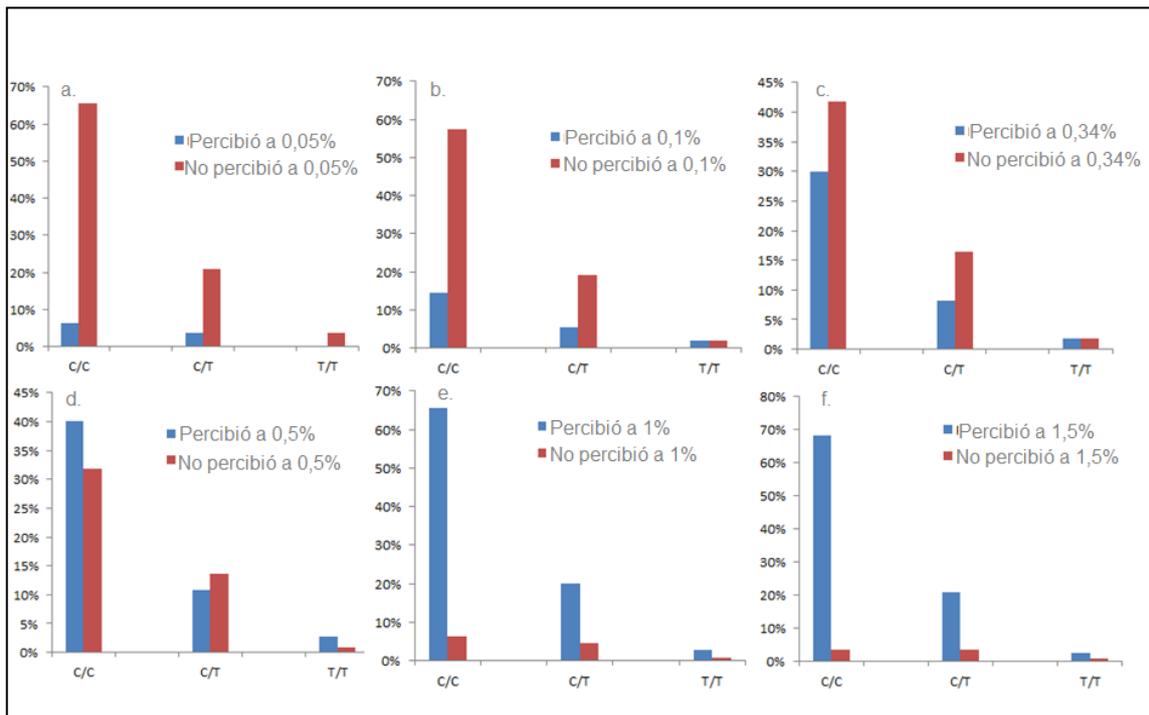


Figura 13. Porcentaje de personas con un genotipo determinado (C/C, C/T y T/T) del polimorfismo rs307355 que percibieron la Sacarosa a determinada concentración.

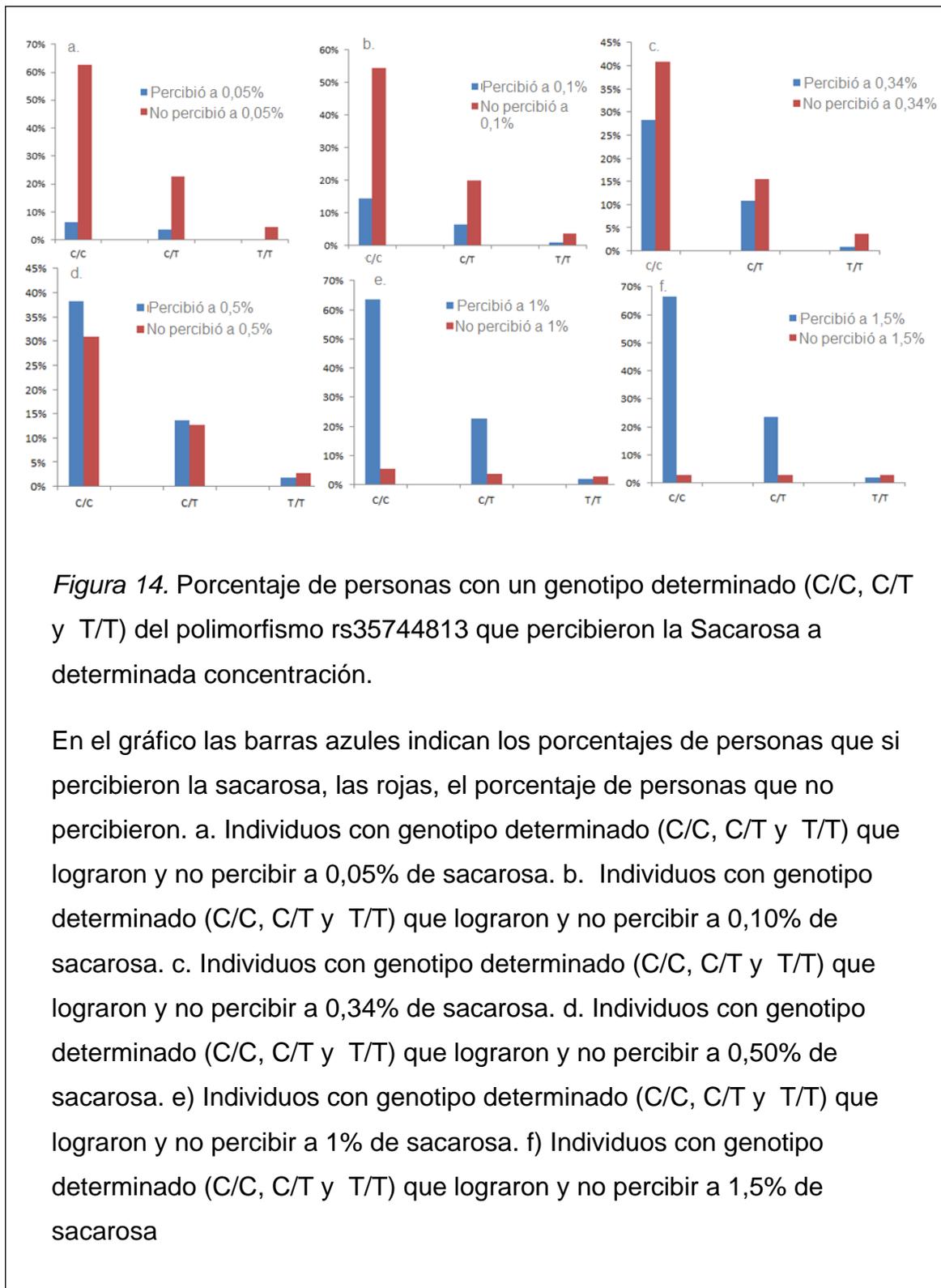
En el gráfico las barras azules indican los porcentajes de personas que si percibieron la sacarosa, las rojas, el porcentaje de personas que no percibieron. a. Individuos con genotipo determinado (C/C, C/T y T/T) que lograron y no percibir a 0,05% de sacarosa. b. Individuos con genotipo determinado (C/C, C/T y T/T) que lograron y no percibir a 0,10% de sacarosa. c. Individuos con genotipo determinado (C/C, C/T y T/T) que lograron y no percibir a 0,34% de sacarosa. d. Individuos con genotipo determinado (C/C, C/T y T/T) que lograron y no percibir a 0,50% de sacarosa. e) Individuos con genotipo determinado (C/C, C/T y T/T) que lograron y no percibir a 1% de sacarosa. f) Individuos con genotipo determinado (C/C, C/T y T/T) que lograron y no percibir a 1,5% de

3.9.2 Polimorfismo rs35744813 y dosis umbral

Existió mayor relevancia al influir en la percepción de sacarosa de los 110 individuos en este polimorfismo comparado con el polimorfismo rs307355. Dentro del grupo de genotipo Homocigoto Dominante (C/C), a partir de la concentración de 0,5%, la mayoría de los individuos logró percibir la sacarosa. De esta manera, a una concentración de 0,5%, un 38,20% del total individuos lograron percibir la sacarosa; a la concentración de 1%, un 63,60% de individuos percibieron la sacarosa y a 1,5% de sacarosa, 71,60% de individuos la percibieron. Por otra parte, dentro del grupo genotípico Heterocigoto (C/T) a las concentraciones del medio dentro de la escala de diluciones de sacarosa (0,34% y 0,5%), los resultados obtenidos fueron que aproximadamente la mitad de individuos en ambos casos lograron percibir la sacarosa. Es así que a la concentración de 0,34%, 12 (10,90%) individuos captaron la sacarosa, mientras que 17 individuos (15,90%) no lo hicieron; a la concentración de 0,5%, 15 individuos (13,60%) captaron la sacarosa, frente a 14 individuos (48,30%) que no lo lograron. Finalmente, los resultados más interesantes fueron dentro del grupo genotípico Homocigoto Recesivo T/T, pues se nota claramente que a todas las concentraciones la menor cantidad de individuos fueron capaces de percibir la sacarosa. Como se visualiza en los resultados: concentración de 0,05% (0 individuos: 0%), concentración de 0,1% (1 individuo: 0,90%), concentración de 0,34% (1 individuo: 0,90%), concentración de 0,5% (2 individuos: 1,80%), concentración 1% (2 individuos: 1,80%) y concentración 1,5% (2 individuos: 1,80%), todos estos porcentajes dentro del total de individuos. Además, en la relación entre este grupo genotípico y la percepción de sacarosa a 1% se obtuvo diferencia estadísticamente significativa ($p=0,008$), asimismo con el grupo de percepción a 1,5% ($p=0,002$). En la tabla 20 se observan las frecuencias y porcentajes de genotipos con respecto al polimorfismo rs35744813 y la dosis umbral a la que las personas lograron percibir la sacarosa a distintas concentraciones. Asimismo, en la figura 14 se nota más claramente la distribución porcentual de estos datos.

Tabla 20. Relación entre genotipo obtenido del polimorfismo rs35744813 y dosis umbral con respecto a las diferentes concentraciones de sacarosa.

		Genotipos								
		C/C		C/T		T/T		Total		
		n	% total	n	% total	n	% total	n	% total	p
Concentraciones										
Percibió a 0,05%	sí	7	6,4	4	3,6	0	0	11	10	
	no	69	62,7	25	22,7	5	4,5	99	90	
	total	76	69,1	29	26,4	5	4,5	110	100	0,703
Percibió a 0,1%	si	16	14,5	7	6,4	1	0,9	24	21,8	
	no	60	54,5	22	20	4	3,6	86	78,2	
	total	76	69,10	29	26,4	5	4,5	110	100	0,914
Percibió a 0,34%	si	31	28,2	12	10,9	1	0,9	44	40	
	no	45	40,9	17	15,5	4	4	66	60	
	total	76	69,1	29	26,4	5	4,5	110	100	0,778
Percibió a 0,5%	si	42	38,2	15	13,6	2	1,8	59	53,6	
	no	34	30,9	14	12,7	3	2,7	51	46,4	
	total	76	69,1	29	26,4	5	4,5	110	100	0,835
Percibió a 1%	si	70	63,6	25	22,7	2	1,8	97	88,2	
	no	6	5,5	4	3,6	3	2,7	13	11,8	
	total	76	69,1	29	26,4	5	4,5	110	100	0,008
Percibió a 1,5%	si	73	66,4	26	23,6	2	1,8	101	91,8	
	no	3	2,7	3	2,7	3	2,7	9	8,2	
	total	76	69,1	29	26,4	5	4,5	110	100	0,002

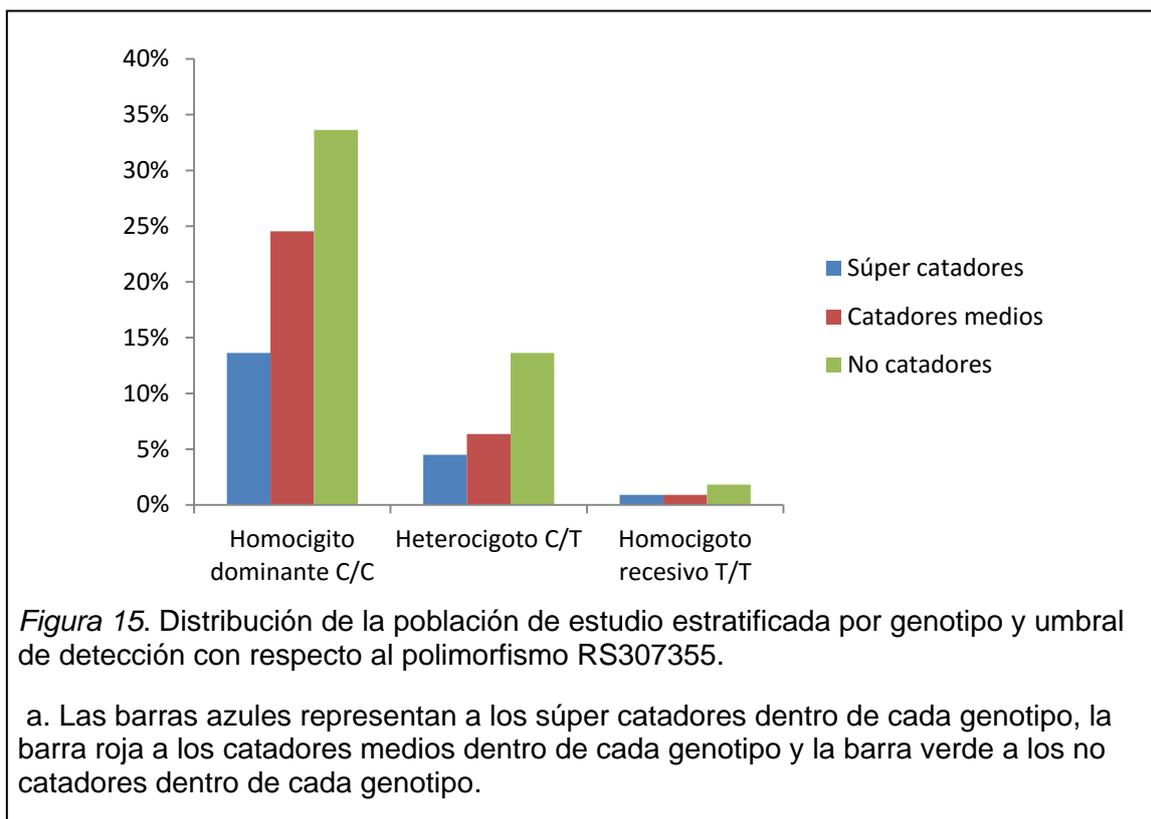


3.10 Estratificación de subgrupos por umbral de detección y genotipo

Como se describió en el apartado 2.5.1, la estratificación de subgrupos en cuanto a umbral de detección se basó en investigaciones previamente realizadas. De esta manera, se tomó en cuenta los rangos de concentración a partir de los cuales eran capaces de percibir los individuos. Posteriormente, cada subgrupo: Súper catadores, Catadores Medios y No catadores fue relacionando con el genotipo obtenido para cada polimorfismo: rs307355 y rs35744813.

3.10.1 Estratificación de subgrupos por umbral de detección y genotipo del polimorfismo rs307355

Para el polimorfismo rs307355 el subgrupo de no catadores fue el que prevaleció en la población dentro de todos los subgrupos genotípicos. Es así que se observan los siguientes porcentajes de no catadores dentro de cada genotipo: C/C (33,6%), C/T (13,6%), T/T (1,8%). Por otra parte, el subgrupo Catadores Medios fue el segundo más frecuente dentro de todos los genotipos obtenidos: C/C (24,5%), C/T (6,4%) Y T/T (0,9%). Finalmente, el subgrupo menos frecuente dentro de los genotipos fue el de súper catadores: C/C (13,6%), C/T (4,5%), T/T (0,9%). Lo que resulta interesante dentro de esta relación es que dentro del grupo T/T existan mayor frecuencia de no catadores. En la figura 15 se observa la distribución porcentual de los estratos establecidos para la población de acuerdo a su umbral de detección y genotipo del polimorfismo rs307355.



3.11.2 Estratificación de subgrupos por umbral de detección y genotipo del polimorfismo rs35744813

Los resultados para este polimorfismo fueron muy similares a los anteriores, puesto que para este caso también predominó el subgrupo de no catadores dentro de todos los genotipos: C/C (32,7%), C/T (12,7%) y T/T (3,6%). Seguido por el subgrupo de catadores medios: C/C (22,7%), C/T (8,2%) y T/T (0,9%). De igual modo, el grupo menos frecuente para cada genotipo fue el de súper catadores: C/C (13,6%), C/T (5,5%) y T/T (0%). Lo más interesante dentro de estos resultados es que no se encontró ningún individuo “súper catador” dentro del genotipo Homocigoto recesivo T/T, y además la mayor cantidad de individuos fueron no catadores para ese mismo genotipo. En la figura 16 se observa la distribución porcentual de los estratos establecidos para la población de acuerdo a su umbral de detección y genotipo del polimorfismo rs35744813.

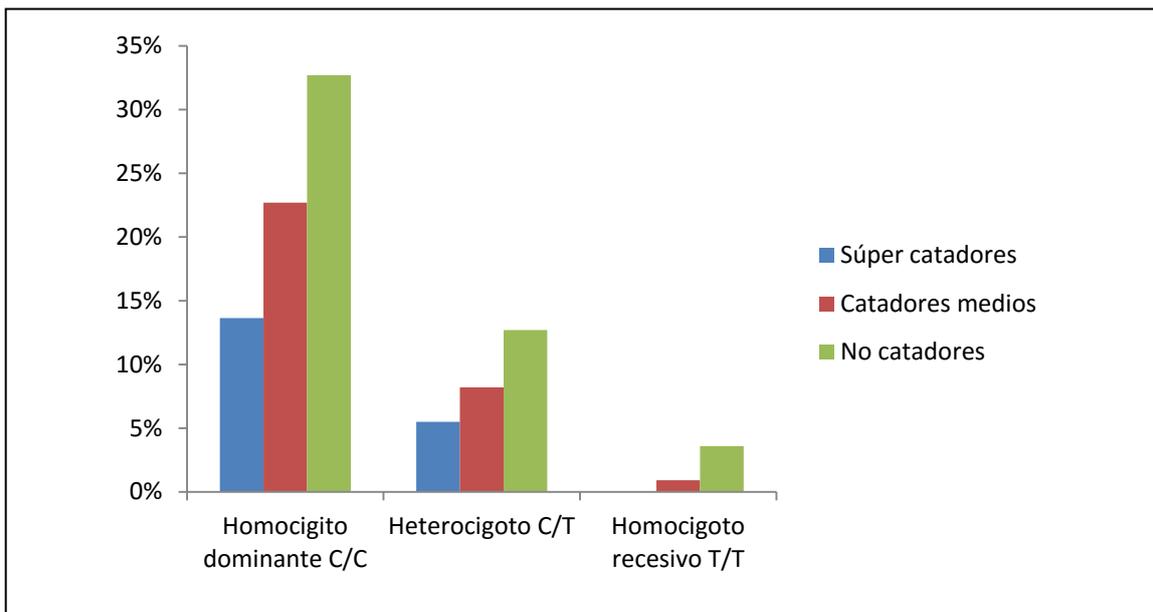


Figura 16. Distribución de la población de estudio estratificada por genotipo y umbral de detección con respecto al polimorfismo rs35744813.

a. Las barras azules representan a los súper catadores dentro de cada genotipo, la barra roja a los catadores medios dentro de cada genotipo y la barra verde a los no catadores dentro de cada genotipo.

3.11 Análisis de haplotipos

Se llevó a cabo el análisis de haplotipos de los polimorfismos rs307355 y rs35144813. De esta manera, según las posibles combinaciones se obtuvieron los haplotipos CC, CT y TT. Los porcentajes de los haplotipos fueron los siguientes: CC: 92,7%; CT: 4,5% y TT: 2,7% (Tabla 21). Además, se relacionaron las frecuencias de los haplotipos obtenidos con las frecuencias de la percepción del sabor dulce dentro de la población en estudio. Los resultados obtenidos arrojaron una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,018$) para la relación de haplotipos con la percepción de sacarosa a la concentración más alta (1,5%) (Tabla 22).

Tabla 21. Distribución porcentual de haplotipos CC, CT y TT obtenidos para los polimorfismos rs307355 y rs35744813 dentro de la población en estudio.

Haplotipos	Frecuencia	Porcentaje
CC	102	92,7%
CT	5	4,5%
TT	3	2,7%
Total	110	100,0%

Tabla 22. Relación de porcentajes de Haplotipos y percepción de sacarosa a 1,5%

		Haplotipos				
Percepción de Sacarosa a 1,5%			CC	CT	TT	Total
	No percibe	n	6	2	1	9
	% del total	5,5%	1,8%	0,9%	8,2%	
Sí Percibe	n	96	3	2	101	
	% del total	87,3%	2,7%	1,8%	91,8%	
Total	n	102	5	3	110	
	% del total	92,7%	4,5%	2,7%	100%	
p	0,018					

3.12 Comparación de resultados obtenidos con respecto a población mundial

En un estudio realizado en 2009 por Fushan *et al*, se utilizó luciferasa para demostrar como el alelo T en los SNPs rs307355 y rs35744813 reducían la actividad del promotor en comparación a los que poseían el alelo C. Estos resultados eran concomitantes con el fenotipo de los individuos, es decir, con la percepción del sabor dulce. Dicho estudio demostró que la percepción del sabor dulce está fuertemente influenciada por la herencia de los alelos C o T de los polimorfismos en estudio. El estudio incluyó a 92 individuos europeos, 37 individuos asiáticos y 15 individuos africanos y se demostró que ambos SNPs constituyen el 16% de variabilidad en la percepción del sabor dulce dentro de la población en estudio. Cada población estaba influenciada de diferente manera, es decir, los alelos T/T afectaron la percepción del sabor dulce en diferente medida para europeos, asiáticos y africanos.

Comparando los resultados de Fushan *et al*, 2009 con los recogidos en el estudio realizado en individuos de población ecuatoriana con respecto al polimorfismo rs307355 y rs35744813 se observa claramente que con la población que presenta mayor similitud es con la europea puesto que mostró mayor porcentaje para haplotipo homocigoto dominante C/C. De esta manera, en individuos europeos el porcentaje fue de 92%, mientras que en ecuatorianos fue de 92,7%. Del mismo modo, en cuanto a homocigoto recesivo TT estas dos poblaciones muestran similitud al poseer el menor porcentaje: individuos europeos (8,5%) e individuos ecuatorianos (2,7%). El porcentaje de heterocigotos CT fue el menor en ambas poblaciones, ya que en individuos europeos fue de 0,5% mientras que en individuos ecuatorianos de 4,5%. En cuanto a frecuencias alélicas, para el polimorfismo rs307355 los individuos europeos obtuvieron una predominancia para el alelo C (0,92), al igual que los ecuatorianos (0,84), frente al alelo T. De igual forma sucedió para el polimorfismo rs35744813, pues la frecuencia alélica que predominó fue la del alelo C en europeos (0,91) y ecuatorianos (0,83).

Por otra parte, las frecuencias de haplotipos en individuos asiáticos resulta distinta a la de los individuos ecuatorianos, ya que, si bien es cierto prevalecen los haplotipos CC, sin embargo, la frecuencia para el haplotipo CT es de 0%. Mientras que, en individuos de población ecuatoriana el haplotipo CT fue el segundo más frecuente con 4,5%. De igual modo, resulta muy distinto el porcentaje del haplotipo TT, pues en individuos asiáticos se evidenció un alto porcentaje del 22%, frente a los individuos ecuatorianos que tuvieron solamente un 4,5%. En cuanto a frecuencias alélicas, para el polimorfismo rs307355 los individuos asiáticos obtuvieron una predominancia para el alelo C (0,78), al igual que los ecuatorianos (0,84), frente al alelo T. De igual forma sucedió para el polimorfismo rs35744813, pues la frecuencia alélica que predominó fue la del alelo C en asiáticos (0,78) y ecuatorianos (0,83).

Por último, si se comparan las frecuencias de haplotipos de individuos africanos y ecuatorianos se nota claramente que difieren en gran medida. Es así que las frecuencias de africanos entre haplotipos CC y TT se encuentran bastante cercanas (40 %y 37%), lo que no ocurre en individuos de población ecuatoriana, pues es claro que el porcentaje del haplotipo CC sobrepasa por mucho al haplotipo TT (92,7% y 4,5%). Por lo tanto, en el estudio de Fushan *et al.*, 2009, la población africana fue aquella en obtener mayor frecuencias de homocigoto mutado T/T, alelo T y haplotipo TT. En cuanto a frecuencias alélicas, para el polimorfismo rs307355 los individuos africanos obtuvieron una predominancia para el alelo C (0,63), al igual que los ecuatorianos (0,84), frente al alelo T. Para el polimorfismo rs35744813, la frecuencia alélica que predominó fue la del alelo T en africanos (0,60), mientras que para ecuatorianos fue la menor (0,17).

En la tabla 23 se muestran los resultados obtenidos por Fushan *et al.*, 2009 comparados con los resultados en individuos de población ecuatoriana.

Tabla 23. Comparación de frecuencias alélicas y de Haplotipos de individuos europeos, asiáticos y africanos de los polimorfismos rs307355 y rs35744813.

Población	n	Frecuencia Alélica en %				Frecuencia de Haplotipos en % (rs307355 y rs35744813)		
		rs307355		rs35744813		CC	CT	TT
		C	T	C	T			
Europea	92	92	8	91	9	91	0,5	8,5
Asiática	37	78	22	78	22	78	0	22
Africana	15	63	37	40	60	40	23	37
Ecuatoriana	110	84	15,9	83	17,7	92,7	4,5	2,7

Adaptado de Fushan *et al.*, 2009, p. 1292.

Nota: Las frecuencias alélicas y de haplotipos se compararon con el estudio realizado por Fushan y colaboradores en 2009.

Otro estudio fue realizado en 2011 en población coreana. Este consistió en obtener las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos RS307355 y RS35744813 en individuos que padecían de un desorden en la percepción del sabor dulce. El estudio en un total de 150 individuos (50 con desorden y 100 sanos). Los resultados revelaron que existió una relación estadísticamente significativa entre los genotipos, alelos, haplotipos y los pacientes con desórdenes del gusto frente a los individuos controles. Las frecuencias genotípicas para RS307355 fueron C/C (67% en casos- 28% en controles), C/T (31% en casos-15% en controles), T/T (2% en casos-14% en controles. Para rs35744813 las frecuencias genotípicas fueron exactamente las mismas. Las frecuencias alélicas para rs307355 fueron C (71% en caso-82,5% en controles) y T (29% en casos-35% en controles). De igual forma, las frecuencias alélicas para RS35744813 resultaron ser iguales. Además, el haplotipo TT mostró ser más frecuente (35%) en aquellos pacientes con desórdenes del gusto (Woong

Bae, Kyung Kim, Jun Kwon, Jin Choi Y Kyung Ye, 2011, pp. 412-416). Si estos resultados se comparan con los obtenidos en población ecuatoriana, suponiendo que todos los individuos ecuatorianos en estudio son individuos sanos, las frecuencias genotípicas para rs307355 y rs35744813 son muy parecidas. Además, es claro que en ambas poblaciones el alelo T está involucrado en aquellos individuos que no logran percibir el sabor dulce o que tienen desórdenes del gusto.

Por último, existe la evidencia de un estudio realizado en niños y sus madres habitantes de filadelfia sobre las preferencias hacia ciertas concentraciones de sacarosa disueltas en agua y su relación con los genotipos obtenidos para el polimorfismo rs35744813. En este caso, no se evaluó el grado de percepción sino más bien el grado hedónico (de placer) al probar el azúcar. Se encontró que en la madres (entre 34 y 41 años), la prevalencia del alelo T estaba relacionada con la preferencia hacia el azúcar, mas no en los niños (Mennella, Finkbeiner y Reed, 2012, pp. 1285-1291). En este caso, no se puede comparar rasgos específicos con los individuos de población ecuatoriana, puesto que son estudios completamente distintos. Sin embargo, cabe destacar que el genotipo T/T está relacionado con una menor percepción de sacarosa y una mayor preferencia hacia ella.

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

Este estudio fue realizado para evaluar las frecuencias de los polimorfismos rs307355 y rs35744813 en el grado de percepción de la sacarosa en individuos de la población ecuatoriana, tal y como describe su objetivo general. Sin embargo, también se consideraron factores externos que pudieran estar ligados a la percepción del sabor dulce y sus receptores.

En primera estancia, se calcularon las frecuencias de algunos hábitos que podían influir dentro de la percepción de sacarosa y su posible relación con el genotipo de los individuos para los polimorfismos rs307355 y rs35744813. No se encontró una relación significativa con ninguno de los hábitos: consumo de tabaco, consumo de café, consumo de alcohol y consumo de drogas o medicinas.

Es importante mencionar que existen estudios que respaldan la importancia de los hábitos en la percepción de los sabores. Por ejemplo, en cuanto al consumo de cigarrillo y la percepción de los sabores se ha revelado resultados contrastantes en múltiples estudios, pues unos afirman la relación directa del consumo de tabaco y la disminución en el consumo de alimentos dulces (Grunberg, 1986, pp. 101-105), mientras que otros afirman que dejar de fumar aumenta el consumo de azúcar (Hall, McGee, Tunstall, Duffy y Benowitz, 1989, PP. 81-86; Rodin, 1989, pp. 303-317). Además, otros sugieren que la nicotina es la responsable de modificar la percepción del sabor pues se ha encontrado que esta puede excitar a las neuronas gustativas en el núcleo del tracto solitario (Lemon, Brassler y Smith, 2005, pp. 3719-3729), y que puede llevar a la supresión de la actividad nerviosa en los centros de la alimentación del cerebro, dando como consecuencia una inhibición de la sensación de sabor (Simons, Bouche, Carstens y Carstens, 2006, pp. 1877-1886). De igual manera, en cuanto al grado de percepción de sacarosa y el consumo de tabaco existen resultados contradictorios, ya que unos evidencian disminución en la sensibilidad de percibir la sacarosa (Pepino y Mennella, 2007, pp. 1891-1899), mientras que otros no encontraron una evidencia significativa (Sato, Endo y Tomita, 2002, pp. 74-82; Mullings, Donaldson, Melichar y Munafò, 2010,

pp. 1709-1715). Cabe recalcar que esta última investigación sugiere que no pudo encontrar una relación significativa debido a que la población de fumadores difería en la frecuencia de consumo de tabaco. Por lo tanto, en este estudio realizado en individuos de población ecuatoriana, al no obtener una relación significativa entre el consumo de tabaco y la percepción de la sacarosa, se especula que influye mucho la diferencia en cuanto a la frecuencia de consumo de cigarrillo. Según la OMS (2006), la evaluación de consumo de cigarrillo (en número), lleva a categorizar a los individuos de esta manera: fumador leve (menos de 5 cigarrillos diarios), fumador moderado (un promedio de 6 a 15 cigarrillos diarios), fumador severo (más de 16 cigarrillos por día en promedio). En el presente trabajo, la mayoría de individuos fueron fumadores leves, seguidos por fumadores moderados, y no existieron fumadores severos. Además, se sugieren realizar más estudios con respecto a este aspecto, puesto que los realizados hasta el momento no llegan a una conclusión clara sobre la influencia de fumar y la percepción de los sabores.

En cuanto al consumo de café, la percepción de sacarosa y los genotipos obtenidos no se encontró una diferencia estadísticamente significativa. En la población de estudio un 52,73% aseguraron consumir café, mientras que un 42,27% mencionaron que no. Con respecto a los individuos que no consumen café, esto sugiere que sería necesario realizar estudios que relacionen la percepción del sabor dulce y el sabor amargo, especialmente para el compuesto PROP y la cafeína, pues como asegura un estudio, el subgrupo de no catadores para PROP percibe con mayor intensidad compuestos dulces como la sacarosa (Masi, Dinnella, Monteleone y Prescott, 2015, pp. 219-226). Además otro estudio reportó que quienes no percibían el PROP, tenían mayor gusto por el azúcar (Yeomans, Tepper, Rietzschel y Prescott, 2007, pp. 264-273). Cabe mencionar que los individuos que perciben con mayor intensidad PROP también lo hacen con la cafeína (Ly y Drewnowsky, 2001, pp. 41-47), es por ello que se han puesto dichos estudios como referencia. Por lo tanto, una vez obtenidos resultados para el sabor dulce, se considera necesario evaluar la población de estudio en cuanto a la percepción de azúcar y PROP

conjuntamente, con el fin de probar la hipótesis de las investigaciones antes mencionadas.

De igual modo, no se encontró relación significativa entre el consumo de alcohol y la percepción de sacarosa. Un estudio evidencia la relación entre la preferencia y percepción de sacarosa con la preferencia en el consumo de etanol, puesto que sus resultados implican a los receptores del gusto de la sacarosa como posibles candidatos para el etanol. Además sugieren que el sabor del alcohol y el azúcar son reconocidas de manera similar por la actividad gustativa en el Sistema Nervioso Central (Lemon, Brassler, y Smith, 2004, pp. 536-544). Mientras que otra investigación más reciente sugería que los individuos que percibían menos la sacarosa tenían mayor predisposición a ser dependientes del alcohol, sin embargo no reveló una relación significativa entre la dependencia hacia el alcohol y antecedentes familiares de alcoholismo con la percepción de la sacarosa a diferentes concentraciones (Tremblay, Bona y Kranzler, 2009, pp. 494-499). Por lo tanto, se sugiere que se amplíen las investigaciones con respecto al consumo de alcohol y la percepción de la sacarosa y otros compuestos dulces, ya que, los resultados aún no llegan a una conclusión clara.

El último hábito evaluado fue el consumo de drogas o medicinas y su relación con la percepción de sacarosa y los genotipos obtenidos. De igual forma, no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa. Existen pocos estudios que evidencien la influencia de ciertos medicamentos sobre la pérdida del sabor (Doty y Bromley, 2004, pp. 1229-1254; Naik, Shetty y Maben, 2010, pp. 240-243). Cabe mencionar que este estudio realizado en población ecuatoriana, tan solo el 20% mencionó estar tomando algún tipo de medicamento, por lo tanto, no ha sido posible concluir una relación significativa entre el uso de medicamentos y su influencia en la percepción del sabor.

Por otra parte, se evaluó las frecuencias de padecimientos de enfermedades y antecedentes familiares de enfermedades en los individuos de la población en estudio conjuntamente con los genotipos obtenidos para los polimorfismos rs307355 y rs35744813 y la percepción de sacarosa. En cuanto a las

frecuencias de individuos con antecedentes familiares de enfermedades, fueron más aquellos que aseguraron tener algún antecedente de enfermedad relevante dentro de su árbol familiar. Además, se obtuvo una relación estadísticamente significativa entre los individuos que aseguraron tener antecedentes familiares de enfermedades y su percepción de sacarosa a una determinada concentración (mas no con los genotipos obtenidos). Los principales antecedentes familiares mencionados fueron cáncer, diabetes e hipertensión (en ese orden de acuerdo a los porcentajes de sus frecuencias). En cuanto a la relación del consumo de azúcares y el riesgo de padecer cáncer existen muy pocos estudios que hayan reportado relaciones estadísticamente significativas entre antecedentes familiares de enfermedades(entre ellos cáncer) y la percepción de sacarosa (Asao, Miller, Arcori, Lumeng, Han-Markey Y Herman, 2015, pp. 7298-7311). Sin embargo, se pueden destacar ciertas investigaciones, por ejemplo una en la que se evaluó la relación entre el alto consumo de azúcares y el riesgo de desarrollar cáncer pancreático debido al incremento de los niveles de glucosa en la sangre (hiperglicemia) que puede causar estrés oxidativo y radicales libres, los cuales dañan a las células pancreáticas (Larsson, Bergkvist y Wolk, 2006, pp. 1171-1176). Este estudio también se basó en anteriores evidencias que demostraban la toxicidad de la glucosa que llevaba a la disfunción y muerte de las células beta, causando especial daño a las células pancreáticas (Robertson, 2004, pp. 1-4). Otro estudio muy relevante dilucidó que existe una relación entre el consumo de alimentos altos en azúcares, la ingesta de sacarosa y el riesgo de padecer cáncer endometrial. Ese trabajo recopiló información que detallaba la relación directa entre el cáncer endometrial en mujeres con la obesidad, la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia. Es evidente que, para este grupo de investigación también fue importante tomar en cuenta que el consumo elevado de azúcar causa hiperglicemia, con el consecuente aumento en la demanda hacia la insulina y la disminución en la sensibilidad de la misma (Friberg, Wallin y Wolk, 2011, pp. 1831-1837). Sus resultados fueron discutidos con respecto a la hiperinsulinemia, ya que, en estudios previos se demostró que esta estimula la división celular en el estroma endometrial uterino mediante la unión a los

receptores de la insulina en el endometrio. También que esta puede aumentar los niveles de estrógenos libres a través de disminución de las concentraciones circulantes de globulina fijadora de hormonas sexuales. El aumento de estrógenos, a su vez, ha demostrado que incrementa el riesgo de cáncer endometrial por estimular la proliferación de las células del endometrio (Graham y Clarke, 1997, pp. 502-519; Nagamani y Stuart, 1998, pp. 6-12; Kazer, 1995, pp. 403-406; Netsler *et al.*, 1991, pp. 83-89). Sin embargo, cabe recalcar que los antecedentes dentro del presente trabajo deberían ser evaluados con respecto a su nivel de heredabilidad.

Ahora bien, mencionados las investigaciones anteriores, queda claro que la posible relación entre la percepción de sacarosa y los antecedentes familiares de cáncer se encuentra en la elevada ingesta de azúcares y los posibles daños debido a su relación con los niveles de glucosa e insulina. Lo mismo ocurre con la diabetes mellitus tipo 2 que también fue mencionada por los individuos en estudio dentro de su historial familiar. En el capítulo I, se detallaron las posibles relaciones de la percepción del sabor dulce, la ingesta elevada de azúcares y los riesgos con respecto a la diabetes, específicamente con respecto a desórdenes en la absorción de la glucosa, lo que puede contribuir al riesgo de padecer esta enfermedad (Mace, Affleck, Pate y Kellett., 2007, pp. 379-392; Margolskee *et al.*, 2007, pp. 15075-15080; Breslin, 2013, pp. 409-428). Es importante indicar que este punto de la discusión se centra en la relación entre la diabetes y la percepción del sabor dulce, independientemente de sus variantes genéticas, puesto que, en dicho estudio no se encontró relación estadísticamente significativa de los polimorfismos rs307355 y rs35744813 con enfermedades o antecedentes mencionados por los individuos encuestados. Por lo tanto, se toman como referencia los estudios que respalden la relación entre el nivel de percepción de sacarosa con la diabetes. Uno de ellos demuestra que los individuos con Diabetes reconocen con menor sensibilidad la sacarosa (Wasalathanthri, Hettiarachchi y Prathapan, 2014, pp. 1-7) Esta investigación es complementada por otros estudios que incluyeron en su metodología la medición del grado hedónico (de placer o preferencia) al probar la sacarosa aparte de medir el grado de percepción de los individuos (Tepper,

Hartfie y Schneidert, 1996, pp. 13-18; Yeomans *et al.*, 2007, pp. 264-273). Por lo tanto, para confirmar la relación entre el alto consumo de azúcar, el padecimiento de enfermedades y los antecedentes de enfermedades, se sugiere realizar estudios que incluyan las variables: grado de percepción y grado de preferencia o grado hedónico (de placer) al probar el azúcar (Mennella, *et al.*, 2012, pp 1285-1291).

Además, incluir el historial clínico con sus respectivos niveles de glucosa e insulina que los respalden. También sería apropiado recoger datos sobre el índice de masa corporal (BMI), ya que, de esta manera se podrían establecer relaciones entre desórdenes nutricionales y los grados de percepción de los azúcares (Simchen *et al.*, 2006, pp. 698-705). De esta forma, se podría establecer cuáles son aquellos individuos propensos a desarrollar estos desórdenes por la ingesta de niveles elevados de azúcar y su preferencia hacia ello.

Muy aparte de los hábitos, en este estudio se evaluó la influencia de los factores genéticos (rs307355 y rs35744813) en el grado de percepción de la sacarosa. La frecuencia genotípica que prevaleció dentro de la población estudiada fue homocigoto normal C/C, seguido de heterocigoto C/T y por último homocigoto recesivo T/T. El primer polimorfismo evaluado (rs307355) obtuvo una menor frecuencia en cuanto a individuos con genotipo Homocigoto recesivo T/T, con respecto al segundo (rs35744813) y por consiguiente una menor frecuencia alélica para el alelo T. Es por ello que se pudo haber obtenido relación estadísticamente significativa solo para rs35744813 con el grado de percepción de la sacarosa (1 y 1,5% de concentración). Estos datos se pueden complementar con los de Fushan *et al.*, 2009, puesto que en ese estudio, a pesar de que ambos polimorfismos tuvieron relación significativa con el grado de percepción de sacarosa, el valor de p de rs35744813 ($p= 2 \times 10^{-5}$) fue mucho menor al obtenido con el polimorfismo rs307355 ($p= 1,08 \times 10^{-4}$) (Fushan *et al.*, 2009, p. 1288). Mientras menor sea el valor de p, el resultado será más significativo (Lang y Secic, 2006, p. 56). Sin embargo, ambos polimorfismos muestran resultados muy similares, ya que, en cuanto a

frecuencias genotípicas de homocigoto dominante C/C y alélicas (C), son más frecuentes en individuos que lograron percibir la sacarosa a la mayoría de concentraciones (0,34; 0,5; 1 y 1,5 %), resultados que se complementan con las frecuencias genotípicas de homocigoto recesivo T/T y alélicas (T) para RS35744813, las que prevalecieron en la frecuencia de individuos que no lograron percibir la sacarosa a ninguna de las concentraciones (0,05; 0,1; 0,34; 0,5; 1 y 1,5%). De esta manera, se ha encontrado resultados concluyentes con respecto a la primera investigación que demostró que la presencia de los alelos T de rs307355 y rs35744813 se asociaba con la disminución de la capacidad de los sujetos para realizar discriminaciones puntuales en la dulzura de la sacarosa, además con que los individuos portadores de los alelos T presentaron una disminución aproximada del 50% en la percepción de la misma (Fushan *et al.*, 2009, pp. 1288-1289). Por otra parte, de igual modo, las frecuencias genotípicas de heterocigoto C/T para ambos polimorfismos fueron bastante similares. Estas frecuencias arrojaron porcentajes en los que la mitad de individuos logró percibir la sacarosa en concentraciones parcialmente diluidas (0,34% y 0,5%), resultado que también se complementa con lo expuesto por Fushan *et al.*, 2009, pp. 1288, pues ellos afirmaron que los individuos portadores de los genotipos C/T presentaron una disminución aproximada del 25% en la percepción de la sacarosa. Para esto, es importante recordar que un individuo u organismo heterocigoto con respecto a un gen específico significa que los alelos que este gen posee en el mismo locus de los cromosomas homólogos son diferentes, es decir cada uno heredado de cada uno de los progenitores (Paz-y-Miño y López-Cortés, 2014, p.359). Por lo tanto, si el genotipo es heterocigoto en este caso C/T, cada alelo tendrá una influencia dentro de la percepción de la sacarosa, por ello la mitad de los individuos lograron percibir la sacarosa parcialmente diluida. Estos resultados se complementan además con la frecuencia obtenida en los haplotipos de ambos polimorfismos, puesto que CC resultó ser el más frecuente y TT el menos frecuente, siendo de esta manera consecuentes con las frecuencias genotípicas. Es importante también la relación estadísticamente significativa arrojada entre los haplotipos obtenidos de los polimorfismos rs307355 y

rs35744813 y la dosis umbral de sacarosa a 1,5%, percepción que también tuvo significancia con las frecuencias genotípicas. Por lo tanto, al ser polimorfismos del mismo locus estos se encuentran estadísticamente relacionados (Scitable by Nature education, 2015). En el presente trabajo también se realizó la estratificación de subgrupos por umbral de detección. Los resultados obtenidos para este punto también complementan lo anteriormente mencionado, pues el grupo de no catadores (aquellos individuos que lograron percibir la sacarosa solamente a las máximas concentraciones de 1% y 1,5%) fueron los que prevalecieron dentro del genotipo T/T. Sin embargo, el grupo de no catadores, es el que prevalece en toda la población y también dentro de cada grupo genotípico, lo que sugiere que la disminución en la percepción del sabor dulce no solamente se debe a estos dos polimorfismos (rs307355 y rs35744813). (Fushan, Simons, Slack, y Drayna, 2010, pp. 579-592)

Por último, se han comparado los resultados obtenidos con respecto a población mundial. Para esto se tomaron en cuenta tres investigaciones previamente realizadas en las que se incluyeron los polimorfismos rs307355 y rs35744813. En dos de los tres estudios analizados se nota claramente la influencia del haplotipo TT y por ende del alelo T en la influencia de la percepción de la sacarosa (Fushan *et al.*, 2009, pp. 1288-1293; Woong Bae *et al.*, 2011, pp. 412-416). La investigación de Woong Bae *et al.*, 2011, se enfoca hacia individuos que padecen desórdenes del gusto y su relación con la presencia del alelo recesivo. Mientras que otro estudio demostró la presencia del alelo T con una mayor preferencia al azúcar (Mennella, Finkbeiner y Reed, 2012, pp. 1285-1291). Esto puede complementarse con los datos obtenidos de los polimorfismos rs307355 y rs35744813 en individuos de población ecuatoriana, pues se sugiere realizar estudios que involucren las diferencias tanto en la percepción del azúcar como en la preferencia de las personas hacia él. De esta manera, se podría tener una base sólida sobre el exceso en el consumo de alimentos dulces tomando en cuenta los factores genéticos.

El estudio de Fushan *et al.*, 2009 determinó las frecuencias genotípicas, alélicas y de haplotipos relacionadas con la percepción de la sacarosa a

distintas concentraciones. Como se dijo en el capítulo III, según los datos obtenidos en dicha investigación, las frecuencias más similares a las obtenidas en individuos de población ecuatoriana fueron las europeas. Contrariamente, de las que más se varió fue de las obtenidas en individuos africanos. Según los reportado por Fushan *et al.*, 2009, el haplotipo CC predominó en todas las poblaciones a excepción de la africana. En contraste la población africana fue la que obtuvo mayor frecuencia del haplotipo TT. Además, los autores tuvieron la hipótesis de que estas frecuencias eran producto de las diferentes condiciones en las que se tuvo que desarrollar cada población a lo largo del tiempo y por consiguiente fueron obligados a adaptarse. De esta manera, los africanos presentan mayor frecuencia del haplotipo relacionado con la incapacidad de los individuos para percibir el sabor dulce. En las latitudes tropicales se logra producir el crecimiento de plantas ricas en azúcares como por ejemplo la caña de azúcar y la remolacha. Es decir, en esos lugares (como África), existen recursos ricos en azúcares, por lo tanto, sus habitantes se adaptaron de una manera en la que no fue necesaria la habilidad de percibir los azúcares en bajas concentraciones. Por el contrario, en los lugares donde predomina el frío (como Europa), esta habilidad debió ser necesaria para subsistir (Fushan *et al.*, 2009, p. 1292). Esto resulta complicado de comparar dentro de población ecuatoriana, pues el Ecuador presenta una diversidad de climas y por lo tanto no se puede llegar a la conclusión de cuáles habitantes dentro de cada región pudieron haber necesitado más recursos de azúcar para su supervivencia. Además, a pesar de que Ecuador se encuentra en el corazón de los trópicos, es claramente establecido que la altitud tiene mucha mayor influencia que la latitud dentro de la variedad de flora y fauna dentro del país (Rachowiecki y Thurber, 2008, p 53). Por lo tanto, se sugiere ampliar la muestra poblacional de este estudio hacia regiones que presenten mayor diversidad de condiciones ambientales y geográficas, para de esta manera observar la influencia de estas en la diversidad genética de dichos polimorfismos y la percepción del sabor dulce.

Por otra parte, el estudio de Fushan *et al.*, 2009 tomó en cuenta una investigación previamente realizada en la que se analizó la distribución alélica

de algunos polimorfismos, incluidos rs307355 y rs35744813 a través de un proceso de genotipado de 938 individuos de 51 poblaciones distintas y que compartían 650,000 SNPs (Li *et al.*, 2008, pp. 1100-1104). El equipo de Li *et al.*, 2008 llegó a concluir que los alelos T eran más comunes en africanos, seguidos por euroasiáticos y por último en individuos del Oeste de Europa, lo cual fue concomitante con el estudio de Fushan *et al.*, 2009. Resulta interesante que el estudio de Li *et al.*, 2008 revela además que existe una ascendencia compartida de rusos (euroasiáticos) y yacutos (etnia del noroeste de Siberia) para individuos americanos, que se pudo haber debido a la teoría de que los nativos americanos cruzaron el estrecho de Bering (Li *et al.*, 2008, pp. 1100-1104; Salzano y Sans, 2014, pp. 151-170). Por lo tanto, el estudio realizado en individuos ecuatorianos es consistente con lo antes expuesto, pues como se ha mencionado, para los SNPs rs307355 y rs35744813, las frecuencias genotípicas y de Haplotipos son similares a europeos y asiáticos (en las frecuencias de los haplotipos CC). Además es interesante mencionar que los africanos pudieron haber presentado mayor frecuencia del alelo T para ambos polimorfismos porque se ha encontrado que desde el punto de vista evolutivo los individuos africanos presentan mayor número de SNPs en comparación a europeos y asiáticos en proporciones de 93 a 17 (Paz-y-Miño y Lopez-Cortés, 2014, p.113).

Además, se han realizado estudios involucrados en la mezcla interétnica de Latinoamericanos. Salzano y Sans, 2014 realizaron una revisión sobre el porcentaje de herencia de europeos, amerindios y africanos dentro de diferentes poblaciones de Latinoamérica. Estos aseguraron que la ascendencia europea es más marcada en América del sur que en América central. Además toma en cuenta que la existencia de locis polimórficos y el desequilibrio en el ligamiento pueden ser la base genética de ciertas características de interés. Este grupo de investigación planteó la conclusión de que conforme van apareciendo nuevas generaciones, los cromosomas de las personas van a presentar una mezcla de ascendencia más compleja, y esto dependerá de factores como: el número de generaciones de mezcla o las características de las personas involucradas en ellos (Salzano y Sans, 2014, pp. 151-170). De

esta manera, otro estudio desarrollado en Ecuador, basándose en microsatélites (STRs) encontró que la contribución genética en mestizos dentro del cromosoma Y fue de (70% europeos, 28% amerindios y 2% africanos), mientras que en cromosomas autosómicos fue (19% europeos, 73% amerindios y 8% africanos). Cabe mencionar que los mestizos resultan de la mezcla entre europeos (españoles en su mayoría) y nativos amerindios (González-Andrade, Sánchez, González-Solórzano, Gascón y Martínez-Jarreta, 2007, pp. 51-77). Entonces, es importante mencionar que los individuos muestreados dentro del presente estudio fueron considerados mestizos, por lo tanto para un gen autosómico como es *TAS1R3*, tendrá influencia genética de sus antecesores y de su ascendencia, sin embargo, esto variará, como se dijo por la tasa de mutación y recombinación (Salzano y Sans, 2014, pp. 151-170). Esto sugiere que en un futuro serán necesarios estudios que involucren la ancestría de los genes involucrados a la percepción de los sabores, distinguiendo además los diferentes grupos étnicos dentro de cada región.

Finalmente, este estudio realizado para evaluar la influencia genética dentro de la percepción del sabor dulce en individuos suramericanos, ecuatorianos, contribuye a la creciente evidencia de que los rasgos humanos están asociados a variantes que se encuentran fuera de las regiones codificantes y que pueden afectar la expresión de los genes y por lo tanto influir claramente en el fenotipo.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Hábitos como consumo de tabaco, consumo de alcohol, consumo de café, consumo de drogas o medicamentos no presentaron una relación estadísticamente significativa con el grado de percepción de sacarosa en los individuos de población ecuatoriana, lo que puede deberse a la negación de los participantes a hacerlo. Por otra parte, existe relación estadísticamente significativa entre la percepción de sacarosa y antecedentes familiares de enfermedades (cáncer y diabetes principalmente), más no con las variantes genéticas. Los antecedentes familiares de enfermedades se relacionan con el alto consumo de azúcares y por ende con los niveles de glucosa e insulina que desencadenan diversas afecciones. Además, la población ecuatoriana presenta los tres grupos genotípico: Homocigoto dominante (C/C), Heterocigoto (C/T) y Homocigoto recesivo (T/T) para los polimorfismos rs307355 y rs3574813. La frecuencia Genotípica que prevalece dentro de la población ecuatoriana es homocigoto dominante (C/C), seguida por heterocigoto (C/T) y la frecuencia genotípica menos prevalente fue la de homocigoto recesivo (T/T) para los polimorfismos rs307355 y rs3574813. La población ecuatoriana presenta los tres Haplotipos CC, CT y TT para los polimorfismos rs307355 y rs3574813. De esta manera, el haplotipo CC prevalece dentro de la población, seguido por CT y el menos prevalente fue TT. El alelo C fue el más frecuente para los polimorfismos rs307355 y rs3574813 en los individuos de población ecuatoriana. Las frecuencias del polimorfismo rs35744813 tuvieron una mayor relación estadísticamente significativa con el grado de percepción dulce en individuos de población ecuatoriana en comparación al polimorfismo rs307355, lo cual es similar a lo obtenido en una investigación anterior en poblaciones distintas. Los genotipos T/T, haplotipos TT y alelo T para los polimorfismos rs307355 y rs3574813 se ven involucrados en el grupo de la población ecuatoriana que no logró percibir la sacarosa a bajas concentraciones. Por lo tanto, la presencia de estos afecta la actividad del promotor, el nivel de m-RNA y la cantidad de moléculas de receptor *TAS1R3* dentro de las células receptoras del gusto.

En la estratificación de subgrupos por umbral de detección, prevaleció el grupo de no catadores dentro de todos los genotipos para los polimorfismos rs307355 y rs35744813. Por lo tanto, el grado de percepción de sacarosa puede verse afectada por otras variantes genéticas. Este estudio proporciona la primera evidencia de la relación de los polimorfismos rs307355 y rs3574813 del gen *TAS1R3* en el grado de percepción de sacarosa y la presencia del alelo T hacia una menor percepción en individuos latinoamericanos ecuatorianos. Al comparar las frecuencias obtenidas por individuos de población ecuatoriana con poblaciones al rededor del mundo, es evidente que las frecuencias varían y además se concluye que los europeos tienen mayor similitud con los ecuatorianos para ambos polimorfismos, lo que se puede deber a la influencia genética que han tenido dentro de los mestizos. Por último, al comprobar el efecto de los polimorfismos rs307355 y rs3574813 del gen *TAS1R3* en el grado de percepción de sacarosa, es claro que polimorfismos que no se encuentran en regiones codificantes también tienen gran influencia en la expresión del fenotipo.

5.2 Recomendaciones

Se propone realizar un estudio con mayor número de individuos, cuya variabilidad en cuanto a regiones del Ecuador sea mayor, pues aumentar los datos lleva a una mayor factibilidad estadística.

Se recomienda aumentar individuos con los hábitos considerados en este estudio con el objetivo de comparar con mayor veracidad los factores externos frente a los factores genéticos en el grado de percepción de los individuos.

Con el fin de confirmar la relación entre el alto consumo de azúcar, el padecimiento de enfermedades y los antecedentes de enfermedades, se sugiere realizar estudios que incluyan las variables: grado de percepción y grado de preferencia al azúcar con los polimorfismos estudiados. Además es importante relacionar estas dos variables para obtener un mayor sustento científico que logre caracterizar a la población en cuanto al consumo de azúcares y de esta manera prevenir malos hábitos en la dieta que pueden desencadenar en problemas nutricionales y enfermedades.

Por último, se recomienda realizar estudios que relacionen la percepción de los diferentes sabores con el fin de mostrar la relación entre los diferentes receptores del gusto y los efectos que esto tenga, como por ejemplo propensión a desórdenes nutricionales y enfermedades como Diabetes tipo 2. Por lo tanto, se podrían evaluar los polimorfismos rs307355 y rs35744813 en personas que padezcan sobrepeso, obesidad y Diabetes tipo 2.

REFERENCIAS

- Asao, K., Miller, J., Arcori, L., Lumeng, J.C., Han-Markey, T y Herman, W.H. (2015). *Patterns of Sweet Taste Liking: A Pilot Study*. *Nutrients*. Recuperado el 22 de noviembre de 2015 de [10.3390/nu7095336](https://doi.org/10.3390/nu7095336)
- Bachmanov, A.A., Li, X., Reed, D.R., Ohmen, J.D., Li, S., Chen, Z., et al. (2001). *Positional cloning of the mouse saccharin preference (Sac) locus*. *Chem Senses*. Recuperado el 22 de noviembre de 2015 de [10.1093/chemse/26.7.925](https://doi.org/10.1093/chemse/26.7.925)
- Bachmanov, A y Beauchamp, G. (2007). *Taste Receptor Genes*. National Institute of health. Recuperado el 30 de noviembre de 2015 de [10.1146/annurev.nutr.26.061505.111329](https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.26.061505.111329)
- Bachmanov, A., Bosak, N., Floriano, W., Inoue, M., Li, X., Lin, C., Murovets, V., Reed, V., Zolotarev, V., y Beauchamp. (2011). *Genetics of sweet taste preferences*. *Flavour and fragrance journal*. Recuperado el 1 de diciembre de [10.1002/ffj.2074](https://doi.org/10.1002/ffj.2074)
- Bae, J-E., Kim, K-U., Kwon, T-H., Choi, S-J y Ye, M-K. (2011). *Polymorphisms of TAS1R3 and GNAT3 Genes Are Associated with Patients with Taste Disorder*. *Journal of Life Science*. Recuperado el 1 de diciembre de 2015 de [10.5353/JLS.2011.21.3.412](https://doi.org/10.5353/JLS.2011.21.3.412)
- Bartoshuk, L., Duffy, V., Hayes, J., Moskowitz, H., y Snyder, D. (2006). *Psychophysics of sweet and fat perception in obesity: problems, solutions and new perspectives*. *Philosophical transactions of the royal society*. Recuperado el 4 de diciembre de 2015 de [10.1098/rstb.2006.1853](https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1853)
- Behrens, M., Roudnitzky, N., Wolfgang, M., Nuthetal. (2013). *Taste and Nutrition: Effects of genetic disposition and environmental factors on taste perception*. *Special | Sensory Science*. Recuperado el 4 de diciembre de 2015 de [10.4455/eu.3013.035](https://doi.org/10.4455/eu.3013.035)
- Bigiani, A y Prandi, S. (2011). *Functional diversity of taste cells. A review*. *Flavour and fragrance journal*. Recuperado el 6 de diciembre de 2015 de [10.1002/ffj.2065](https://doi.org/10.1002/ffj.2065)

- Boyce, J y Shone, G. (2006). *Effects of ageing on smell and taste*. Postgrad Med: 82. Recuperado el 30 de diciembre de 2015 de [10.1136/pgmj.2005.039453](http://dx.doi.org/10.1136/pgmj.2005.039453)
- Breslin, P. (2013). *An Evolutionary Perspective on Food Review and Human Taste*. Current Biology. 23 (9):
- Chaudhari, N y Roper, S. (2010). *The cell biology of taste*. The Journal of Cell Biology. Recuperado el 4 de enero de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.010>
- Divan, A y Royds, J. (2013). *Tools and Techniques in Biomolecular Science*. U.S.A: Oxford
- Dotson, C., Vignes, S.,Steinle, N y Munger, S. (2010). *T1R and T2R receptors: The modulation of incretin hormones and potential targets for the treatment of type 2 diabetes mellitus*. Curr Opin Investig Drugs. Recuperado el 6 de enero de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4535793/>
- Doty, R y Bromley, SM. (2004). *Effects of drugs on olfaction and taste*. Otolaryngologic Clinics: Elsevier. Recuperado el 8 de enero de 2016 [10.1016/j.otc.2004.05.002](http://dx.doi.org/10.1016/j.otc.2004.05.002)
- Doty, R. (2012). *Gustation:Advanced review*Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science. Recuperado el 10 de enero de 2016 de [10.1002/wcs.156](http://dx.doi.org/10.1002/wcs.156)
- Drewnowski, A., Henderson, S., Shore, A y Barratt-Fornel, A. (1997). *Nontasters, Tasters, and Supertasters of 6-n-Propylthiouracil (PROP) and Hedonic Response to Sweet*. Elsevier: Physiology & Behavior. Recuperado el 20 de enero de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1086/302124>
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). (2012). [En Línea]. Recuperado el 10 de diciembre de 2015 de http://www.unicef.org/ecuador/ENSANUT_2011-2013_tomo_1.pdf
- Feeney, E., O'Brien, S., Scannell, A., Markey, A y Gibney, E. R. (2011). *Genetic variation in taste perception: does it have a role in healthy eating?*. Proceedings of the Nutrition Society. Recuperado el 31 de enero de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1017/S0029665110003976>

- Friberg, E., Wallin, A y Wolk, A. (2011). *Sucrose, High-Sugar Foods, and Risk of Endometrial Cancer—a Population-Based Cohort Study*. American Association for Cancer Research. Recuperado el 2 de febrero de 2016 de [10.1158/1055-9965.EPI-11-0402](https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-0402)
- Fuller, J. (1974). *Single locus control of saccharin preference in mice*. Journal of Heredity. Recuperado el 5 de febrero de 2016 de http://www.oxfordjournals.org/our_journals/jhered/freepdf/65-33.pdf
- Fushan, A., Simpson, C., Slack, J., Manichaikul, A. y Drayna, D. (2009). *Allelic Polymorphism within the TAS1R3 Promoter Is Associated with Human Taste Sensitivity to Sucrose*. Current Biology. Recuperado el 8 de febrero de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.015>
- Fushan, A., Simons, T., Slack, J., y Drayna, D. (2010). *Association between Common Variation in Genes Encoding Sweet Taste Signaling Components and Human Sucrose Perception*. Chem. Senses. Recuperado el 10 de febrero de 2016 de [10.1093/chemse/bjq063](https://doi.org/10.1093/chemse/bjq063)
- Garcia-Bailo, B., Toguri, C., Eny, K. y Ahmed El-Soheemy. (2009). *Genetic Variation in Taste and Its Influence on Food Selection*. OMICS A Journal of Integrative Biology. Recuperado el 11 de febrero de 2016 de [10.1089/omi.2008.0031](https://doi.org/10.1089/omi.2008.0031).
- González-Andrade, F., Sánchez, D., González-Solórzano, J., Gascon, S y Martínez-Jarreta, R (2007) *Sex-specific genetic admixture of Mestizos, Amerindian Kichwas, and Afro-Ecuadorans from Ecuador*. Hum Biol. Recuperado el 13 de febrero de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1353/hub.2007.0024>
- Graham, JD y Clarke CL. (1997). *Physiological action of progesterone in target tissues*. Endocr Rev. Recuperado el 15 de febrero de 2015 de <http://dx.doi.org/10.1210/edrv.18.4.0308#sthash.4ISoT6fS.dpuf>
- Green, B y Natchigal, D. (2012). *Somatosensory factors in taste perception: Effects of active tasting and solution temperatura*. Elsevier. Recuperado el 18 de febrero de 2016 de [10.1016/j.physbeh.2012.05.010](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.05.010)
- Grunberg, NE., Bowen, DJ y Winders, SE (1986) *Effects of nicotine on body weight and food consumption in female rats*. Psychopharmacology.

Recuperado el 25 de febrero de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3094051>

Gutierrez, R y Simon, S. *Chemosensory processing in the taste-reward pathway*. Flavour and fragrance journal. Recuperado el 28 de febrero de 2016 de [10.1002/ffj.2050](https://doi.org/10.1002/ffj.2050)

Hall, SM., McGee, R., Tunstall, C., Duffy, J y Benowitz, N. (1989). *Changes in food intake and activity after quitting smoking*. *J Consult.Clin Psychol*. Recuperado el 1 de diciembre de 2015 de <http://dx.doi.org/10.1037/0022-006X.57.1.81>

Herrera, V., Casas, J., Miranda, J., Perel, P., Pichardo, P., González, A., Sanchez, J., Ferreccio, C.,Aguilera, X., Silva, E.,Orostegui, M., Gómez⁹, LF., Chirinos¹, J., Medina-Lezama, J., Pérez, CM., Suárez, E., Ortiz¹, A., Rosero, L.,Schapochnik¹, N., Ortiz, Z., Ferrante, D., Diaz, M., y Bautista L. (2009). *Interethnic differences in the accuracy of anthropometric indicators of obesity in screening for high risk of coronary heart disease*. *International Journal of Obesity*. Recuperado el 3 de diciembre de 2015 de [10.1038/ijo.2009.35](https://doi.org/10.1038/ijo.2009.35)

Hoon, M., Adler, E., Lindemeier, J., Battey, J.F., Ryba, N.J.P y Zuker, C.S. (1999) *Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity*. *Cell*. Recuperado el 7 de enero de 2016 de [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80658-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80658-3)

Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC). (2013). *Anuario de estadísticas vitales: Nacimientos y Defunciones*. [En Línea]. Recuperado el 26 de noviembre de 2015 de http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Poblacion_y_Demografia/Nacimientos_Defunciones/Publicaciones/Anuario_Nacimientos_y_Defunciones_2013.pdf

Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC). (2011). *Encuesta nacional de salud y nutrición*. [En Línea]. Recuperado el 26 de noviembre de 2015 de http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_Sociales/ENSANUT/Presentacion%20de%20los%20principales%20resultados%20ENSANUT.pdf

- Kelly, T., Yang, W., Chen, C-S, Reynolds, K. y He, J. (2008). *Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030*. International Journal of Obesity. Recuperado el 2 de diciembre de 2015 de 10.1038/ijo.2008.102
- Kim, U., Wooding, S., Riaz, N., Jorde, L., y Drayna, D. (2006). *Variation in the Human TAS1R Taste Receptor Genes*. Chem. Senses. Recuperado el 26 de diciembre de 2015 de 10.1093/chemse/bjj065
- Kitagawa, M., Kusakabe, Y., Miura, H., Ninomiya, Y y Hino, A. (2001). *Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste*. Biochem Biophys Res Commun. Recuperado el 23 de noviembre de 2015 de doi:10.1006/bbrc.2001.4760
- Kiuchi, S., Yamada, T., Kiyokawa, N., Saito, T., Fujimoto, J., y Yasue, H. (2006). *Genomic structure of swine taste receptor family 1 member 3, TAS1R3 and its expression in tissues*. Cytogenet Genome Research. Recuperado el 14 de enero de 2016 de 10.1186/1471-2164-15-1057
- Kovacs, P y Hajnal, A. (2008). *Altered Pontine Taste Processing in a Rat Model of Obesity*. Journal of Neurophysiology. Recuperado el 15 de enero de 2016 de 10.1152/jn.01359.2007.
- Lang, T y Secic, M. (2006). *How to Report Statistics in Medicine* (2.^a ed.). USA: ACP Press.
- Larsson, S., Bergkvist, L y Wolk, A. (2006). *Consumption of sugar and sugar-sweetened foods and the risk of pancreatic cancer in a prospective study*. The American Journal of Clinical Nutrition. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <http://ajcn.nutrition.org/content/84/5/1171.full>
- Lemon, CH., Brassler, SM y Smith DV. (2005). *Alcohol Activates a Sucrose Responsive Gustatory Neural Pathway*. Journal of Neurophysiology. Recuperado el 12 de enero de 2016 de 10.1152/jn.00097.2004
- Li, J., Absher, D., Tang, H., Southwick, A., Casto, A., Ramachandran, S., Cann, H., Barsh, G., Feldman, M., Cavalli-Sforza, L y Myers, R. (2008). *Worldwide Human Relationships Inferred from Genome-Wide Patterns of Variation*. Science. Recuperado el 4 de febrero de 2016 de 0.1126/science.1153717.

- Ly, A y Drewnowski, A. (2001). *PROP (6-n-Propylthiouracil) Tasting and Sensory responses to Caffeine, Sucrose, Neohesperidin Dihydrochalcone and Chocolate*. Chem Senses. Recuperado el 14 de enero de 2016 de 10.1093/chemse/26.1.41
- Mace, O.J., Affleck, J., Patel, N., and Kellett, G.I. (2007). *Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2*. Journal of Physiology. Recuperado el 12 de enero de 2016 de 10.1113/jphysiol.2007.130906
- Maliphol, A., Garth, D., y Medler, K. (2013). *Diet-Induced Obesity Reduces the Responsiveness of the Peripheral Taste Receptor Cells*. PLoS ONE. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0079403>
- Margolskee, R.F., Dyer, J., Kokrashvili, Z., Salmon, K.S., Ilegems, E., Daly, K., et al. (2007). *T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1*. Proc Natl Acad Sci USA. Recuperado el 22 de febrero de 2016 de 10.1073/pnas.0706678104
- Masi, C., Dinnella, C., Monteleone, E y Prescott, J. (2015). *The impact of individual variations in taste sensitivity on coffee perceptions and preferences*. Elsevier: Physiology & Behavior. Recuperado el 27 de diciembre de 2015 de 10.1016/j.physbeh.2014.10.031
- McCaughey, S. (2008). *The taste of sugars*. Elsevier: Neuroscience and Biobehavioral Reviews. Recuperado el 10 de diciembre de 2015 de 10.1016/S0149-7634(97)00067-5
- Mennella, JA., Finkbeiner, S y Reed, DR. (2012). *The proof is in the pudding: children prefer lower fat but higher sugar than do mothers*. National Institute of Health. Recuperado el 15 de febrero de 2016 de 10.1038/ijo.2012.51
- Mojet, M., Heidema, J y Hazelhof. (2003). *Taste Perception with Age: Generic or Specific Losses in Supra-threshold Intensities of Five Taste Qualities?*. Chem. Senses. Recuperado el 12 de enero de 2016 de 10.1093/chemse/28.5.397

- Mojet, M., Heidema, J y Hazelhof. (2005). *Taste perception with age: pleasantness and its relationships with threshold sensitivity and supra-threshold intensity of five taste qualities*. *Food Quality and Preference*. Elsevier: Recuperado el 10 de enero de 2016 de de 10.1073/pnas.0706678104
- Montmayeur, J.P., Liberles, S.D., Matsunami, H., and Buck, L.B. (2001). *A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus*. *Nat Neuroscience*. Recuperado el 2 de febrero de 10.1038/87440
- Morini, G., Bassoli, A., y Borgonovo, G. (2011). *Molecular modelling and models in the study of sweet and umami taste receptors. A review*. *Flavour and fragrance journal*. Recuperado el 10 de diciembre de 10.1002/ffj.2054
- Mullings, EL., Donaldson, LF., Melichas, JK., Munafò, MR. (2010). *Effects of acute abstinence and nicotine administration on taste perception in cigarette smokers*. *journal of Psychopharmacology*. Recuperado el 14 de noviembre de 10.1177/0269881109105395
- Nagamani, M y Stuart, CA. (1998). *Specific binding and growth-promoting activity of insulin in endometrial cancer cells in culture*. *Am J Obstet Gynecol*. Recuperado el 13 de enero de 2016 de 10.1016/S0002-9378(98)70244-3
- Naik, BS., Shetty, N y Maben EVS. (2010). *Drug-induced taste disorders*. *European Journal of Internal Medicine: Elsevier*. Recuperado el 12 de noviembre de 2015 de 10.1016/j.ejim.2010.01.017
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2015). *taste receptor type 1 member 3 precursor [Homo sapiens]*. Recuperado el 27 de abril de 2016 de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_689414.1
- Nestler, JE., Powers, LP., Matt, DW., Steingold, KA., Plymate, SR., Rittmaster RS. (1995). *A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome*. *J Clin Endocrinol Metab*. 72:83–9.
- Nakamura, Y., Sanematsu, K., Ohta, R., Shirotsaki, S., Koyano, K., Nonaka, k., Shigemura, N., y Ninomiya, Y. (2008). *Diurnal Variation of Human Sweet Taste Recognition Thresholds Is Correlated With Plasma Leptin Levels*. *Diabetes*. Recuperado el 12 de

- febrero de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1210/jcem-72-1-83#sthash.A3mbdLE5.dpuf>
- Nature.com subject áreas. (2015). Taste receptors. Recuperado el 26 de noviembre de 2015 de <http://www.nature.com/subjects/taste-receptors>
- Nelson, G., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N.J., y Zuker, C.S. (2001). *Mammalian sweet taste receptors*. Cell. Recuperado el 12 de enero de 2016 de [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00451-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00451-2)
- Organización Mundial de la Salud: OMS. (2015). *Sobrepeso y obesidad*. Recuperado el 26 de noviembre de 2015 de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- Organización Mundial de La Salud. (2006). Informe sobre la salud en el mundo. Recuperado el 01 de febrero de 2016 de http://www.who.int/whr/2006/whr06_es.pdf
- Paz-Y-Miño, C y López-Cortés, A. (2014). *Genética Molecular y Citogenética Humana. Fundamentos, aplicaciones e Investigaciones en el Ecuador*. (1.^a Ed.). Quito-Ecuador: Yachay EP.
- Pelt-Verkuil, E., Belkum, A., Hays, J. (2008). *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Springer.
- Pepino, MY y Mennella, J. (2007). *Effects of Cigarette Smoking and Family History of Alcoholism on Sweet Taste Perception and Food Cravings in Women*. *Alcohol Clin Exp Res*. Recuperado el 28 de enero de 2016 de [10.1111/j.1530-0277.2007.00519.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1530-0277.2007.00519.x)
- Prescott, J., Ripandelli, N y Wakeling, L. (2001). *Binary Taste Mixture Interactions in PROP Non-Tasters, Medium-Tasters and Super-Tasters*. *Chem Senses*. Recuperado el 14 de febrero de 2016 de doi: [10.1093/chemse/26.8.993](https://doi.org/10.1093/chemse/26.8.993)
- Rachowiecki, R y Thurber, M. (2008). Ecuador: Climbing and Hiking Guide (1.^a ed.). USA: Viva Publishing Networ.
- Raliou, M., Grauso, M., Hoffmann, B., Schlegel-Le-Poupon, C., Nespoulous, C., De'bat, H., Belloir, C., Wiencis, A., Sigoillot, M., Bano, S., Trotier, D., Pernollet, J., Montmayeur, J., Faurion, A., y Briand, L. (2011). *Human Genetic Polymorphisms in T1R1 and T1R3 Taste Receptor Subunits*

- Affect Their Function*. Chemical senses. Recuperado el 13 de noviembre de 2015 de [10.1093/chemse/bjr014](https://doi.org/10.1093/chemse/bjr014)
- Reed, D.R., Li, S., Li, X., Huang, L., Tordoff, M.G., Starling-Roney, R., Taniguchi, K., West, D.B., Ohmen, J.D., Beauchamp, G.K. y Bachmanov, A.A. (2004). *Polymorphisms in the taste receptor gene (Tas1r3) region are associated with saccharin preference in 30 mouse strains*. J. Neurosci. Recuperado el 15 de enero de 2016 de [10.1523/JNEUROSCI.1374-03.2004](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1374-03.2004):
- Robertson, RP. (2004). *Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes*. J Biol Chem. Recuperado el 29 de noviembre de 2016 de [10.1074/jbc.R400019200](https://doi.org/10.1074/jbc.R400019200)
- Sainz, E., Korley, J.N., Battey, J.F., and Sullivan, S.L. (2001). *Identification of a novel member of the T1R family of putative taste receptors*. J Neurochem. Recuperado el 22 de febrero de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006717>
- Salzano, F y Sans, M. (2014). *Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations*. *Genetics and Molecular Biology*. Recuperado el 23 de diciembre de 2015 de <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004572>
- Sato, K., Endo, S y Tomita, H. (2002) *Sensitivity of three loci on the tongue and soft palate to four basic tastes in smokers and nonsmokers*. *Acta Otolaryngol* Recuperado el 15 de enero de 2016 de [10.1080/00016480260046445](https://doi.org/10.1080/00016480260046445)
- Scitable by Nature education. *haplotype / haplotypes*. (2015). Recuperado el 1 de febrero de 2016 de <http://www.nature.com/scitable/definition/haplotype-haplotypes-142>
- Simchen, U., Koebnick1, C., Hoyer, S., Issanchou, S., y Zunft, H-JF. (2006). *Odour and taste sensitivity is associated with body weight and extent of misreporting of body weight*. Nature Publishing Group. 60. Recuperado el 21 de enero de 2016 de [10.1038/sj.ejcn.1602371](https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602371)
- Simons, CT., Boucher, Y., Carstens, MI y Carstens, E. (2006). *Nicotine suppression of gustatory responses of neurons in the nucleus of the*

- solitary tract*. J Neurophysiol. Recuperado el 23 de febrero de 2016 de [10.1152/jn.00345.2006](http://dx.doi.org/10.1152/jn.00345.2006)
- Sugita, M. (2006). Review: *Taste perception and coding in the periphery*. Cellular and Molecular Life Sciences. Recuperado el 28 de enero de 2016 de <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00018-006-6100-0>
- Toyono, T., Seta, Y., Kataoka, S., Toyoshima K. (2007). *CCAAT/Enhancer-binding protein β regulates expression of human T1R3 taste receptor gene in the bile duct carcinoma cell line, HuCCT1*. Elsevier: Biochimica et Biophysica Acta. Recuperado el 13 de febrero de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaexp.2007.08.003>
- Tepper, BJ., Hartfie, LM Y Schneider, SH. (1996). *Sweet Taste and Diet in Type II Diabetes*. Physiology & Behavior,; Elsevier. Recuperado el 13 de enero de 2016 de [10.1016/j.appet.2012.09.002](http://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2012.09.002)
- Tremblay, KA.,Bona, JM., y Kranzler HR. (2009). *Effects of a Diagnosis or Family History of Alcoholism on the Taste Intensity and Hedonic Value of Sucrose*. National Institute of Health. Recuperado el 28 de enero de 2016 de [10.3109/10550490903206023](http://dx.doi.org/10.3109/10550490903206023)
- Vaquero, P. (2008). *Genética, nutrición y enfermedad*. España: Editorial CSIC.
- Wasalathanthri, S., Hettiarachchi, P y Prathapan, S. (2014). *Sweet taste sensitivity in pre-diabetics, diabetics and normoglycemic controls: a comparative cross sectional study*. BMC Endocrine Disorders. Recuperado el 12 de noviembre de 2015 de [10.1186/1472-6823-14-67](http://dx.doi.org/10.1186/1472-6823-14-67)
- Yang, R., Tabata, S., Crowley, H., Margolskee, R., Kinnamon, J. (2000). *Ultrastructural localization of gustducin immunoreactivity in microvilli of type II taste cells in the rat*. Journal of Comparative Neurology. Recuperado el 30 de noviembre de 2015 de [10.1002/1096-9861\(20000911\)425:1<139::AID-CNE12>3.0.CO;2-#](http://dx.doi.org/10.1002/1096-9861(20000911)425:1<139::AID-CNE12>3.0.CO;2-#)
- Yeomans, MR., Tepper, BJ., Rietzschel, J y Prescott, J. (2007). *Human hedonic responses to sweetness: Role of taste genetics and anatomy*. Recuperado el 13 de enero de 2016 de [10.1016/j.physbeh.2007.03.011](http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.03.011)

ANEXOS

Anexo1. Encuesta de recolección de datos personales, hábitos influyentes en la percepción del sabor y umbral de detección ante la sacarosa

Código de laboratorio:

Fecha:

DATOS PERSONALES

Nombres y Apellidos:

Edad:

Sexo: M__ F__

Etnia (caucásica, afroamericana, indígena, mestiza)

HÁBITOS INFLUYENTES EN LA PERSECPCIÓN DEL SABOR

1. ¿Fuma?: SÍ__ NO__ Unidades por día__

2. ¿Toma café?: SÍ__ NO__ Cantidad y Frecuencia

3. ¿Consume Alcohol? SÍ__ NO__ Cantidad y Frecuencia

4. ¿Consume droga o medicamento? SÍ__ NO__

Especifique si lo hace con regularidad y qué tipo de droga o medicamento:

ENFERMEDADES Y ANTECEDENTES

Mencione enfermedad que padece o padeció

Mencione antecedentes familiares de enfermedades que tiene (incluyendo a la persona que se refiere)

Evaluación de Umbral de detección

1. Concentración de Sacarosa a 0,05%

¿Percibió? SI ___ NO ___

2. Concentración de Sacarosa a 0,10%

¿Percibió? SI ___ NO ___

3. Concentración de Sacarosa a 0,34%

¿Percibió? SI ___ NO ___

4. Concentración de Sacarosa a 0,5%

¿Percibió? SI ___ NO ___

5. Concentración de Sacarosa a 1%

¿Percibió? SI ___ NO ___

6. Concentración de Sacarosa a 1,5%

¿Percibió? SI ___ NO ___

Anexo 2. Consentimiento informado para toma de muestras y evaluación de umbral de detección.

Consentimiento Informado

Título de proyecto: *Estudio de variantes genéticas (polimorfismos) asociados a la percepción de los sabores dulce, umami, amargo, salado y ácido en el Ecuador*

PARTE A

Las preferencias y hábitos alimenticios dependen de varios factores, tales como: culturales, sociológicos, sociales y genéticos. Con respecto a los factores genéticos; estos se encuentran íntimamente relacionados con el grado de percepción de los sabores en las personas. La elección de consumir ciertos alimentos influye sobre el estado nutricional y de salud, así como en el riesgo de padecer enfermedades crónicas

Por lo tanto, la importancia de profundizar en el estudio del sistema gustativo radica en la constitución de un modelo que lleva a entender los mecanismos genéticos, moleculares, celulares, sistemáticos y su relación con respuestas sensoriales. Por otra parte, las variantes genéticas encontradas en los receptores del gusto, han despertado el interés de los investigadores al relacionarlas con los hábitos alimentarios de los individuos de diferentes poblaciones, es decir, realizar un estudio en el que se asocien patrones fenotípicos y variantes genéticas en cuanto a la percepción de los sabores. Por lo tanto, el aporte de este estudio es presentar uno de los factores fuertemente influyentes en los hábitos alimenticios de los ecuatorianos, con el fin de promover una alimentación saludable y así prevenir problemas nutricionales y enfermedades crónicas. Su colaboración es importante para este estudio; mediante una muestra de sangre (obtenida con una sola punción por una única vez), y la prueba de gusto de 1mL de soluciones de sustancias NO TÓXICAS como sacarosa, benzoato de sodio, ácido cítrico, cloruro de sodio y glutamato monosódico, con el fin de medir su percepción en una escala del 1 al 5, significando 1. Indetectable; 2. Débil; 3. Moderada; 4.fuerte y 5. Muy fuerte, podremos investigar factores importantes que lleven a caracterizar a la población en cuanto al grado de percepción de los diferentes sabores y su posible relación con los hábitos alimenticios y el posible desarrollo de desórdenes nutricionales y enfermedades crónicas a partir de estos.

Usted puede retirar su participación en este estudio en cualquier momento

1. Confirmando que he leído y comprendido la información, y he tenido la oportunidad de hacer preguntas; que estoy de acuerdo para no restringir el uso de los datos generados usando mis muestras. De igual forma, confirmo que he comprendido que toda mi información personal será tratada de manera confidencial y no podrá revelarse bajo ninguna circunstancia.
2. Estoy dispuesta/o a participar en este estudio, sobre la base de la información que me han dado y que puedo retirarme del estudio en cualquier momento.

Firma del voluntario: _____

Fecha : _____

Nombre del voluntario _____

Anexo 3. Datos recogidos: Datos personales, hábitos y antecedentes

CÓDIGO	EDAD	SEXO	FUMA		CAFÉ		ALCOHOL		ENFERMEDAD		ANT. FAM. CANCER		DROGA O MEDICINA		DETALLE
			SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	
S1	17	M		X		X	X			X		X		X	
S2	20	M	X			X	X		X			X		X	
S3	17	F	X			X	X			X		X		X	
S4	18	F		X	X		X		X		X		X		Omeprazol
S10	18	M		X		X	X			X	X			X	
S11	18	F		X	X			X	X			X		X	
S13	18	M		X		X		X		X		X		X	
S14	22	X		X		X		X		X		X		X	
S15	19	F		X	X			X		X		X	X		Zaldiar
S16	17	F		X	X			X		X		X		X	
S18	19	M	X			X	X		X			X		X	
S19	18	F		X		X		X	X		X			X	
S24	17	F		X		X		X		X	X			X	
S25	17	F		X		X		X	X		X			X	
S27	21	F		X	X			X	X		X			X	
S28	18	M		X		X	X			X		X		X	
S29	18	M		X		X		X		X		X		X	
S30	21	M		X		X		X	X			X		X	
S31	18	F		X	X			X	X		X			X	
S32	19	F		X	X			X		X	X			X	
S34	18	F	X		X		X			X	X			X	
S35	18	M		X		X	X			X		X		X	
S36	18	M		X		X	X		X		X			X	
S37	18	F		X		X		X	X			X		X	
S38	18	F	X		X		X		X		X		X		Anticonceptivos
S40	18	F		X		X		X	X		X		X		No dice.
S41	18	F	X		X		X			X	X			X	
S42	18	M		X		X	X			X	X			X	
S44	18	M		X	X		X			X		X		X	
S45	20	F		X		X		X		X	X			X	
S46	18	M	X			X	X		X		X		X		Flurinol
S47	18	F	X			X	X			X		X		X	
S48	18	M		X	X		X		X		X			X	
S51	18	F		X	X		X		X		X			X	
S52	18	M	X			X	X			X		X		X	
S53	20	M		X	X		X			X	X			X	
S54	17	F		X		X	X		X			X	X		Omeprazol
S55	20	M		X	X			X		X	X			X	
S58	20	M	X		X		X			X	X			X	
S59	18	M	X			X	X		X		X			X	

S60	24	F		X		X		X	X		X			X	
S61	18	F	X			X	X		X		X			X	
S62	18	F	X		X		X			X	X			X	
S63	18	M	X			X	X			X	X			X	
S64	18	M	X		X		X		X		X		X		Alercet todos los días.
S65	18	M		X		X	X			X	X			X	
S66	18	M	X		X		X			X	X			X	
S67	20	M		X	X		X			X	X			X	
S68	23	M	X		X		X			X		X		X	
S69	18	M		X	X			X	X			X		X	
S70	18	F		X	X			X	X			X		X	
S71	18	F		X		X		X		X		X		X	
S72	17	F	X			X	X			X		X		X	
S73	18	F		X	X			X	X		X			X	
S75	19	F		X		X	X			X	X			X	
S77	18	F		X		X		X	X		X			X	
S78	18	F		X	X			X		X		X		X	
S79	21	F	X		X		X			X	X			X	
S80	18	F		X	X			X		X		X		X	
S81	19	F		X	X			X	X			X	X		Provid 800, Azitromicina, Dolgenal rapid.
S82	20	M		X	X			X	X			X	X		Salbutamol, consumo esporadicamente.
S83	18	F		X	X			X	X			X	X		Loratadina.
S84	18	F		X	X			X		X	X			X	
S85	19	F		X	X			X		X		X		X	
S86	19	F		X	X		X			X		X		X	
S88	20	M	X		X		X			X		X		X	
S89	18	M		X	X			X	X			X		X	
S92	20	F		X	X			X		X	X			X	
S93	21	F		X		X		X		X		X		X	
S94	21	F		X		X		X	X		X		X		Neurontin 100 mg.
S96	19	F		X		X		X	X			X	X		Singular (para el asma)
S98	24	M		X		X	X		X			X		X	
S99	22	M	X			X	X		X			X		X	
S100	26	M	X		X		X		X		X			X	
S101	25	F		X		X		X		X	X			X	
S102	20	F		X	X			X		X		X		X	
S103	22	F		X		X		X	X			X		X	
S108	19	F	X		X			X	X		X		X		No dice.
S109	20	F		X	X		X		X		X		X		No dice.
S110	20	F		X	X			X	X			X	X		No dice.
S111	20	F		X	X			X		X	X			X	
S112	20	F		X		X		X	X		X			X	

S113	21	F		X		X		X	X			X	X		nasunex
S114	22	F	X			X	X			X		X		X	
S115	20	M	X			X	X			X		X		X	
S117	20	M	X		X		X			X		X	X		marihuana pasando un dia
S119	22	M	X		X		X			X		X		X	
S140	21	M		X	X			X		X		X		X	
s158	33	F		x	x			x		x	x			x	
s159	21	F		x	x			x		x	x			x	
s160	30	F		x	x			x		x		x		x	
s161	28	F		x	x			x		x	x			x	
s162	29	M	x		x			x		x	x			x	
s165	24	F		x	x			x		x	x			x	
s172	24	F		x	x			x	x		x			x	Solbutamol
s202	21	M	x			x	x			x	x			x	Loratadina
s203	19	F	x		x		x		x		x			x	Meformina,anticonceptivos yazz
s205	19	M		x		x		x		x	x			x	
s209	20	F		x		x		x		x	x			x	
s210	20	F		x	x			x		x	x			x	
s211	19	M		x		x		x		x	x			x	
s212	19	F	x			x		x		x	x			x	
s213	62	M		x	x			x	x		x			x	Betabloqueadores
s214	18	F		x		x		x	x		x			x	Alercet
s215	19	M		x		x		x		x	x			x	
s217	20	M		x		x	x			x	x			x	
s218	20	F		x	x			x		x	x			x	
s219	23	M	x		x			x		x	x			x	
s220	20	F		x		x		x		x	x			x	
s221	21	F	x		x		x			x	x			x	

Anexo 4. Concentración de ADN y umbral de detección ante la sacarosa de los individuos en estudio

CÓDIGO	Concentración de ADN ng/UI	Umbral de detección (%)					
		0,05	0,1	0,34	0,5	1	1,5
S1	100			x	x	x	x
S2	117,4	x	x	x	x	x	x
S3	114,3					x	x
S4	110,9				x	x	x
S10	145					x	x
S11	173,5						
S13	164,7						
S14	135,7						
S15	140,4		x	x	x	x	x
S16	138,6	x	x	x	x	x	x
S18	98,7						
S19	107,8				x	x	x
S24	99,3				x	x	x
S25	36,3					x	x
S27	46,2						
S28	36,6					x	x
S29	78,3			x	x	x	x
S30	97,8			x	x	x	x
S31	74,8					x	x
S32	42			x	x	x	x
S34	79,2					x	x
S35	81,8					x	x
S36	81,2			x	x	x	x
S37	80			x	x	x	x
S38	68,1				x	x	x
S40	59,8					x	x
S41	94,2				x	x	x
S42	87,5					x	
S44	138					x	x
S45	93,3					x	x
S46	131,1				x	x	x
S47	51,7					x	x
S48	185,6					x	x
S51	108,8			x	x	x	x
S52	195,3					x	x
S53	240					x	x
S54	75		x	x	x	x	x
S55	100,6		x	x	x	x	x
S58	222,8					x	x

S59	138,8				x	x	x
S60					x	x	x
S61	122,5			x	x	x	x
S62	84			x	x	x	x
S63					x	x	x
S64	41,6					x	x
S65	176,2					x	x
S66			x	x	x	x	x
S67	84,5					x	x
S68	48,2					x	x
S69	129			x	x	x	x
S70	128,5				x	x	x
S71	159,3					x	x
S72	70,5					x	x
S73	78,7			x	x	x	x
S75	140,3					x	x
S77	324,2						x
S78	532,1					x	x
S79	266,2					x	x
S80	155					x	x
S81	27,3					x	x
S82	197,8						x
S83	159,8					x	x
S84	112,3						x
S85	118,9					x	x
S86						x	x
S88	99,9					x	x
S89	230,6					x	x
S92	63,9				x	x	x
S93			x	x	x	x	x
S94	89,3	x	x	x	x	x	x
S96	342,1			x	x	x	x
S98	86,6					x	x
S99	259,9	x	x	x	x	x	x
S100	64,7	x	x	x	x	x	x
S101	103,3		x	x	x	x	x
S102							x
S103	107,9			x	x	x	x
S108	395,4					x	x
S109	92,5			x	x	x	x
S110	102,6			x	x	x	x
S111	113		x	x	x	x	x
S112	217,7		x	x	x	x	x

S113	145,5		x	x	x	x	x
S114	298,1						
S115	176,5			x	x	x	x
S117	155,9						
S119	238,9					x	x
S140	162,1				x	x	x
s158	55,7	x	x	x	x	x	x
s159	41,5						
s160	43	x	x	x	x	x	x
s161	45,7					x	x
s162	38,1	x	x	x	x	x	x
s165	45,3						x
s172	30,7	x	x	x	x	x	x
s202	35,9	x	x	x	x	x	x
s203	33,3		x	x	x	x	x
s205	39,6		x	x	x	x	x
s209	38,6				x	x	x
s210	33,4			x	x	x	x
s211	36,5				x	x	x
s212	46,8			x	x	x	x
s213	54,3					x	x
s214	75,5		x	x	x	x	x
s215	71,3	x	x	x	x	x	x
s217	36		x	x	x	x	x
s218	53,4					x	x
s219	46,3				x	x	x
s220	65,8			x	x	x	x
s221	44,9			x	x	x	x