



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MIRNA-146A Y MIRNA-155 EN SUERO DE
SUJETOS CON DIABETES TIPO 2 TRATADOS CON METFORMINA
Y CON METFORMINA MÁS *LUPINUS MUTABILIS*

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

Profesor Guía

MD. PhD. Manuel Eduardo Baldeón Tixe

Autora

Diana Carolina Rendón Dávila

Año

2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el 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”

.....

Manuel Eduardo Baldeón Tixe

MD. PhD.

C.I. 1706483201

DECLARACIÓN 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”.

.....

Diana Carolina Rendón Dávila

C.I. 1713535126

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco al Dr. Manuel Baldeón, por el invaluable conocimiento y la guía compartidos. A la Ing. Erika Muñoz, por su colaboración y amistad. A la Dra. Lucy Baldeón y el Dr. Marco Fornasini por sus importantes aportes. A todos los miembros del CIT.

También agradezco a mis padres y a mis hermanos, que con su amor y con su apoyo me ayudaron a llegar aquí.

Y sobre todo doy gracias a Dios, por los logros conseguidos.

DEDICATORIA:

A mi hijo, Pablo Martín

RESUMEN

La obesidad y las dislipidemias constituyen un problema de salud actual en el Ecuador. En particular, la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) se asocia con índices de prevalencia y mortalidad elevados. Esta es una enfermedad crónica resultante de factores genéticos y ambientales. Estudios sugieren que la DMT2 se asocia con un cuadro de inflamación crónica que incluye características como el aumento de citocinas pro-inflamatorias circulantes, como IL-6, IL-1 β y TNF- α , fibrosis en los islotes pancreáticos, entre otros. Adicionalmente, se ha reportado que en la DMT2 existe disminución de miR-146a y miR-155. Los microRNAs son moléculas reguladoras de la expresión génica cuyo blanco es el RNA mensajero (RNAm). En la presente investigación se midieron las concentraciones séricas de miR-146a y miR-155, en sujetos con DMT2, tratados con metformina (G1) y con metformina más *Lupinus mutabilis* (G2) por 12 semanas. Además se determinaron las concentraciones de miR-146a y miR-155 en sujetos que no tenían diabetes. Para conseguirlo, se aisló el RNA total de muestras de suero y se realizó transcripción reversa. La cuantificación se realizó mediante PCR Cuantitativa (qPCR). Se encontró una tendencia a aumentar los niveles de miR-146a en el tratamiento con metformina más *L. mutabilis*, sin embargo, no se encontraron variaciones estadísticamente significativas dentro de los grupos de tratamiento. El coeficiente de correlación de Spearman entre miR-146a y miR-155 fue de 0,412 ($p=0,030$) al inicio del tratamiento y 0,446 ($p=0,017$) al final de las 12 semanas de tratamiento en sujetos con DMT2.

ABSTRACT

Obesity and dyslipidemia are current health problems in Ecuador. In particular, type 2 diabetes mellitus (T2DM) is associated with high prevalence and mortality rates. This is a chronic disease that results from genetic and environmental factors. Studies suggest that T2DM is associated with chronic inflammation, which include features such as increased circulating pro-inflammatory cytokines, i.e. IL-6, IL-1 β , TNF- α , and fibrosis in pancreatic islets, among others. Additionally, it has been reported the downregulation of miR-146a and miR-155 in T2DM. MicroRNAs are molecules that target messenger RNA (mRNA) to regulate gene expression. In the present investigation, serum concentration of miR-146a and miR-155 were measured in patients with T2DM, under treatment with metformin (G1) or metformin plus *L. mutabilis* for 12 weeks. In addition, serum concentrations of miR-146a and miR-155 in participants who didn't have diabetes were quantified. To achieve this, total RNA was isolated from serum samples and reverse transcription was performed. Quantification was performed by Quantitative PCR (qPCR). A tendency to increase levels of miR-146a in treatment with metformin and *L. mutabilis* was found, however, no statistically significant variations were found within the treatment group. The Spearman correlation coefficient between miR-146a and miR-155 was 0.412 ($p = 0.030$) at baseline and 0.446 ($p = 0.017$) at the end of the 12 weeks of treatment in patients with DMT2.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	4
Alcance	4
Justificación	4
Objetivos	5
Objetivo general.....	5
Objetivos específicos.....	5
1. Marco Teórico	6
1.1 Diabetes mellitus tipo 2.....	6
1.1.1 Epidemiología.....	6
1.1.2 DMT2 como enfermedad inflamatoria.....	7
1.1.3 Tratamientos.....	10
1.1.3.1 Metformina.....	10
1.1.3.2 Anti-inflamatorios aplicados al tratamiento de DMT2	11
1.2 Propiedades de Lupinus mutabilis	12
1.3 MicroRNAs.....	14
1.3.1 Biogénesis	14
1.3.1.1 Mecanismos de biogénesis	14
1.3.1.2 Regulación de biogénesis.....	15
1.3.2. Mecanismo de regulación génica.....	16
1.3.3 MicroRNAs circulantes en sangre.....	17
1.3.4 MiRNA-146a y miRNA-155	18
2. Materiales y metodología.....	21
2.1 Participantes.....	21
2.2 Tratamientos.....	22
2.3 Medidas antropométricas	22
2.4 Muestras.....	22

2.5 Determinación de las concentraciones en suero de miR-146a y miR-155.....	23
2.6 Análisis estadístico.....	25
3. Resultados	27
3.1 Datos antropométricos y sociodemográficos.....	27
3.2 Comparación de las concentraciones de miR-146a y miR-155.....	31
3.3 Correlaciones entre valores antropométricos, química sanguínea y miR-146, miR-155.....	31
3.4 Correlación entre miR-146a y miR-155.....	33
4. Discusión	34
5. Conclusiones y recomendaciones.....	39
5.1 Conclusiones.....	39
5.2 Recomendaciones	39
REFERENCIAS	41
ANEXOS	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia de diabetes en el Ecuador por grupos de edad.....	7
Figura 2. Desarrollo de la inflamación en la DMT2.....	8
Figura 3. Marcadores inflamatorios y factores de enfermedad específicos para cada etapa del desarrollo de DMT2	9
Figura 4. <i>Lupinus mutabilis</i> sweet	13
Figura 5. Cantidades de miR-146a y miR-155 en los grupos de tratamiento ...	32
Figura 6. Regresión lineal de miR-146a y miR-155.....	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos antropométricos y socio-demográficos.....	28
Tabla 2. Química sanguínea basal.....	30

INTRODUCCIÓN

La diabetes es una de las enfermedades no transmisibles con mayor prevalencia a nivel mundial (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2014). Alrededor del 8.8% de la población adulta la padece (415 millones de personas) y se estima que, de seguir la tendencia actual, la cifra alcanzará el 10.4% en el 2040 (Federación Internacional de Diabetes [FID], 2015). Aproximadamente el 90% de los casos corresponden a Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) (Organización Panamericana de la Salud [OPS/OMS], 2010). La problemática de la DMT2 incluye la afectación a la salud del paciente que requerirá de cuidados de por vida y puede derivar en complicaciones serias. Existe además una carga económica representativa a los sistemas de salud públicos y privados para el tratamiento de esta enfermedad y sus complicaciones (FID, 2015).

En el Ecuador existe una tendencia al incremento de los niveles de obesidad y diabetes. Se estima que un 62.8% de la población entre 20 a 60 años tiene sobrepeso u obesidad y un 10.3% de la población entre 50 a 59 años padecen de diabetes (Freire et al., 2013). De acuerdo a datos del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) la diabetes fue la principal causa de muerte en mujeres en el 2013 (INEC, 2013).

El desarrollo de la DMT2 se relaciona con factores genéticos y ambientales. Se conoce que la obesidad es uno de los factores de riesgo más importantes (Badawi et al., 2010). La relación entre la obesidad y la DMT2 no se conoce por completo, sin embargo, la evidencia sugiere que la inflamación es un conector importante (Bastard et al., 2002). La existencia de una condición inflamatoria se presenta desde el sobrepeso e incrementa paulatinamente en conjunto con el aumento de grasa corporal (Badawi et al., 2010). Estudios señalan que el tejido adiposo en la obesidad desarrolla un aumento importante de macrófagos, los cuales son en gran medida responsables de la variación de marcadores inflamatorios (Donath y Shoelson, 2011).

En la DMT2 se presenta un estado de inflamación crónica. Estudios indican que la actividad de marcadores de fase aguda podría tener implicaciones en la regulación de la insulina. En pruebas *in vivo* e *in vitro* se comprobó que IL-6 presenta una correlación negativa con la respuesta a la insulina (Bastard et al., 2002). La desregulación de marcadores inflamatorios se presenta desde etapas previas al padecimiento de la DMT2. En el estudio prospectivo de Hu y colaboradores se propuso a la proteína C Reactiva (PCR) como pronosticador del riesgo de desarrollar DMT2 los próximos 10 años (Hu et al. 2004).

Existen mecanismos de regulación génica asociados con la inflamación donde participan microRNAs. Los microRNAs son moléculas de aproximadamente 22 nucleótidos, que regulan la expresión de genes mediante su interacción con el RNA mensajero (RNAm) (Kim et al., 2009). Dependiendo del grado de complementariedad entre ambas moléculas, puede generarse la represión de la traducción o la ruptura del RNAm (Carthew y Sontheimer, 2009).

El microRNA-146a (miRNA-146a / miR-146a) y el microRNA-155 (miRNA-155 / miR-155) son moduladores de la inflamación. Se conoce por estudios previos que en condiciones en las que miR-146a se encuentra elevado los valores de los mediadores inflamatorios estarán bajos y viceversa. MiR-146a reduce la expresión de los genes de IRAK-1 (receptor asociado a la quinasa IL-1) y de TRAF-6 (factor asociado al receptor TNF) (Taganov, 2006). Por otra parte, en un estudio realizado en células dendríticas derivadas de monocitos humanos, se planteó que miR-155 podría modular negativamente la producción de la citocina IL-1 (Ceppi et al., 2009). Adicionalmente, estudios en células mononucleares de sangre periférica encontraron la disminución de miR-146a y miR-155 en pacientes con DMT2 (Corral-Fernández et al., 2013). Es más, en el suero de sujetos con DMT2 se reporta la disminución significativa de miR-146a en relación al grupo control y una buena correlación entre miR-146a y miR-155 ($r=0,478$; $p<0.001$) (Baldeón, L., et al., 2014).

El tratamiento convencional para la DMT2 utiliza fármacos como la metformina. Este compuesto reduce la producción hepática de glucosa y su absorción en el intestino (Islas y Lifshitz, 2009). Sin embargo, tiene efectos secundarios como molestias gastrointestinales (Islas y Lifshitz, 2009). En pocos casos, se puede presentar acidosis láctica, la cual es una complicación de alto riesgo que suele desarrollarse en pacientes que tienen un factor de predisposición (Kirpichnikov et al., 2002). Además del efecto hipoglicemiante, la metformina tiene un potencial anti-inflamatorio. Estudios en modelos animales indican que la metformina inhibe el factor nuclear kB (NFkB) y que existe un efecto indirecto en la inflamación causado por la disminución en los niveles de glicemia, la pérdida de peso y la mejoría del perfil lipídico (Saisho, 2015).

En la actualidad, se conoce del efecto hipoglicemiante de algunas variedades vegetales, entre estas, *Lupinus mutabilis*. Estudios clínicos de fase dos realizados en sujetos con hiperglicemia y con DMT2 demuestran la disminución significativa de los niveles de glucosa y de insulina (Baldeón, ME., et al., 2012; Fornasini et al., 2012). Adicionalmente, el consumo de la mitad de la dosis de metformina acompañada con un snack de *L. mutabilis* ha mostrado un efecto comparable con un tratamiento de metformina a dosis completa (Hidalgo, 2015).

Por otra parte, variedades del género *Lupinus* han mostrado tener efecto anti-inflamatorio. Esta propiedad ha sido comprobada *in vitro*, en extractos hidrolizados proteicos de *Lupinus angustifolius* L. (Millán-Linares et al., 2014). También se ha probado el efecto antiinflamatorio de semillas del género *Lupinus* mediante administración tópica en gel, en ratones albinos (Hamzah, 2011). Adicionalmente, un estudio realizado en la Universidad San Martín de Porres (USMP) del Perú indica que la administración oral de un extracto de *Lupinus mutabilis* sweet podría tener un efecto antiinflamatorio en ratones Swiss (Castañeda et al., 2002).

Hipótesis

El tratamiento con metformina a dosis completa y el tratamiento con la mitad de la dosis de metformina más un snack en base de *Lupinus mutabilis* aumentan las concentraciones en suero de miRNA-146a y miRNA-155 en pacientes con DMT2.

Alcance

En el presente trabajo de titulación se determinará la expresión de miR-146a y miR-155 en suero de sujetos con DMT2 tratados con metformina, metformina más *L. mutabilis* y sujetos control. Se extraerá RNA total de las muestras de suero. Posteriormente se realizará transcripción reversa. La cuantificación de micro-RNAs se realizará por PCR cuantitativa (qPCR). El proyecto se desarrollará en las instalaciones del Centro de Investigación Traslacional (CIT).

Justificación

El desarrollo de la DMT2 se asocia con un cuadro de inflamación crónica (Fernandez-Real y Pickup, 2008). Estudios sobre el efecto hipoglicemiante de *L. mutabilis* han demostrado un efecto positivo en el tratamiento de la DMT2 (Baldeón, ME., et al., 2012). Sin embargo, existen pocos estudios sobre el efecto anti-inflamatorio de *Lupinus spp.* (Millán-Linares et al., 2014). No existen estudios en los que se haya determinado los cambios séricos de miR-146a y miR-155 en pacientes con DMT2 tratados con metformina o con una combinación de metformina y *Lupinus spp.* Mediante la cuantificación de los marcadores inflamatorios, miR-146a y miR-155, se podrá comprobar el efecto anti-inflamatorio del tratamiento de 12 semanas de metformina y metformina más *L. mutabilis* en sujetos con DMT2.

Objetivos

Objetivo general

Determinar las concentraciones en suero de miRNA-146a y miRNA-155 en pacientes con DMT2 tratados con metformina a dosis completa y el tratamiento con la mitad de las dosis de metformina más un snack en base de *Lupinus mutabilis*.

Objetivos específicos

- Determinar las concentraciones de miRNA-146a y miRNA-155 en suero de pacientes con diabetes tipo 2 que siguen tratamientos con: metformina, metformina más *Lupinus mutabilis* y pacientes control.
- Determinar la relación entre los niveles de miRNA, los tratamientos y los parámetros clínicos de los pacientes.

CAPITULO I

1. Marco Teórico

1.1 Diabetes mellitus tipo 2

1.1.1 Epidemiología

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) las 4 enfermedades no transmisibles que causan más muertes a nivel mundial son la enfermedad cardiovascular, el cáncer, las enfermedades respiratorias y la diabetes (OMS, 2014). Se estima que alrededor de 415 millones de personas entre los 20 a 79 años padecen de algún tipo de diabetes a nivel mundial, o lo que equivale al 8.8% de la población adulta (FID, 2015).

En América Central y Sur América, el porcentaje de personas con diabetes sobrepasa la media mundial. Se estima que un 9.4% de la población tiene diabetes, es decir, un total de 29.6 millones de personas en edad adulta. Los niveles de personas sin diagnóstico son altos, se calcula que corresponde al 39.0% de la población con diabetes. De continuar la tendencia actual, se pronostica que en América Central y Sur América el número de personas con diabetes incrementará en un 65%, al 2040 (FID, 2015).

En el Ecuador, la diabetes fue la primera causa de muerte en mujeres en 2013. En hombres se identificó como la segunda causa de muerte. La enfermedad cardiovascular se ubicó en el segundo y tercer lugar, respectivamente (INEC, 2013). Las estadísticas de la ENSANUT-ECU, del 2013, señalan una prevalencia de la enfermedad de un 10,3% de la población de 50-59 años (Figura 1). Cabe mencionar que no se tomó en cuenta si las personas seguían algún tratamiento, por lo cual las personas con diabetes y niveles de glicemia normales no fueron identificadas (Freire et al., 2013).

Al tomar en cuenta estos datos estadísticos es relevante considerar que, de acuerdo a datos de la OMS, entre el 90%-95% de casos de diabetes diagnosticados corresponden a DMT2 (OPS/OMS, 2010).

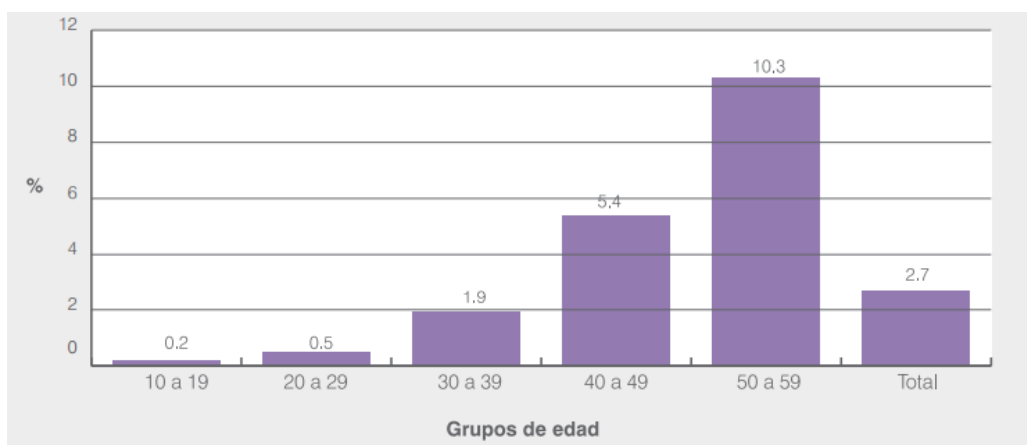


Figura 1. Prevalencia de diabetes en el Ecuador por grupos de edad.

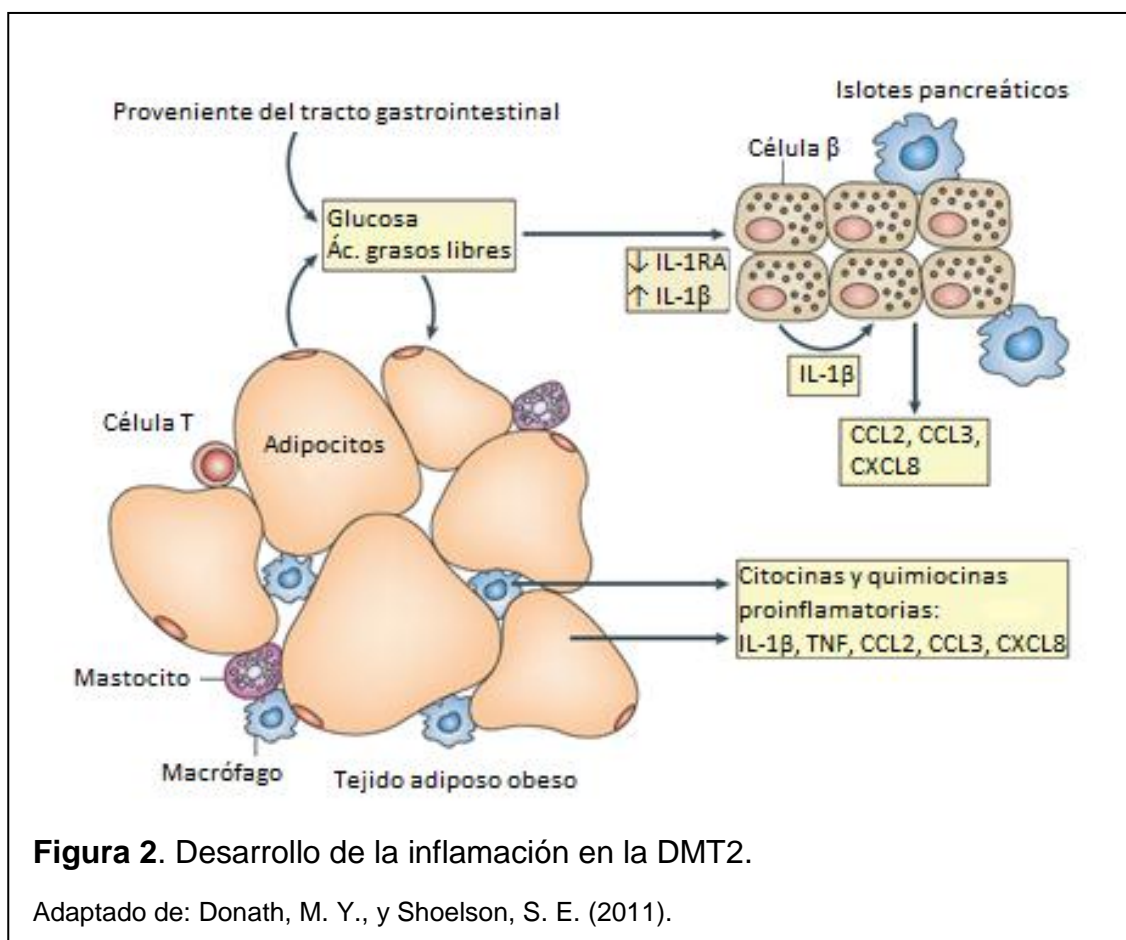
Tomado de: Freire et al., 2013.

1.1.2 DMT2 como enfermedad inflamatoria

En la actualidad, se considera que la patología de la DMT2 se relaciona con un cuadro de inflamación crónica, que se desarrolla desde etapas anteriores al diagnóstico de la enfermedad (Badawi, et al., 2010). En la figura 2 se presenta un modelo que explica el desarrollo de inflamación en la DMT2. En primer lugar, los niveles excesivos de nutrientes causan estrés en los islotes pancreáticos y en los tejidos sensibles a la insulina. A continuación, se estimula la producción local de citocinas y quimiocinas en el tejido adiposo y disminuye la producción del receptor antagonista de IL-1 β (IL-1RA) en las células pancreáticas. Posteriormente, la liberación de las citocinas y quimiocinas del tejido adiposo a la circulación promueve la inflamación de los islotes pancreáticos y de otros tejidos sensibles a la insulina (Donath y Shoelson, 2011).

La acción de las citocinas puede influir en la intensidad y duración de la inflamación. Se considera que las tres citocinas pro-inflamatorias más importantes son TNF- α , IL-1 e IL-6 (Rugeles et al., 2014, Pág. 67). Adicionalmente a la respuesta inflamatoria, se presenta la respuesta de fase aguda, caracterizada por el incremento de reactantes de fase aguda, por ejemplo, la Proteína C Reactiva (PCR). Estudios transversales y estudios

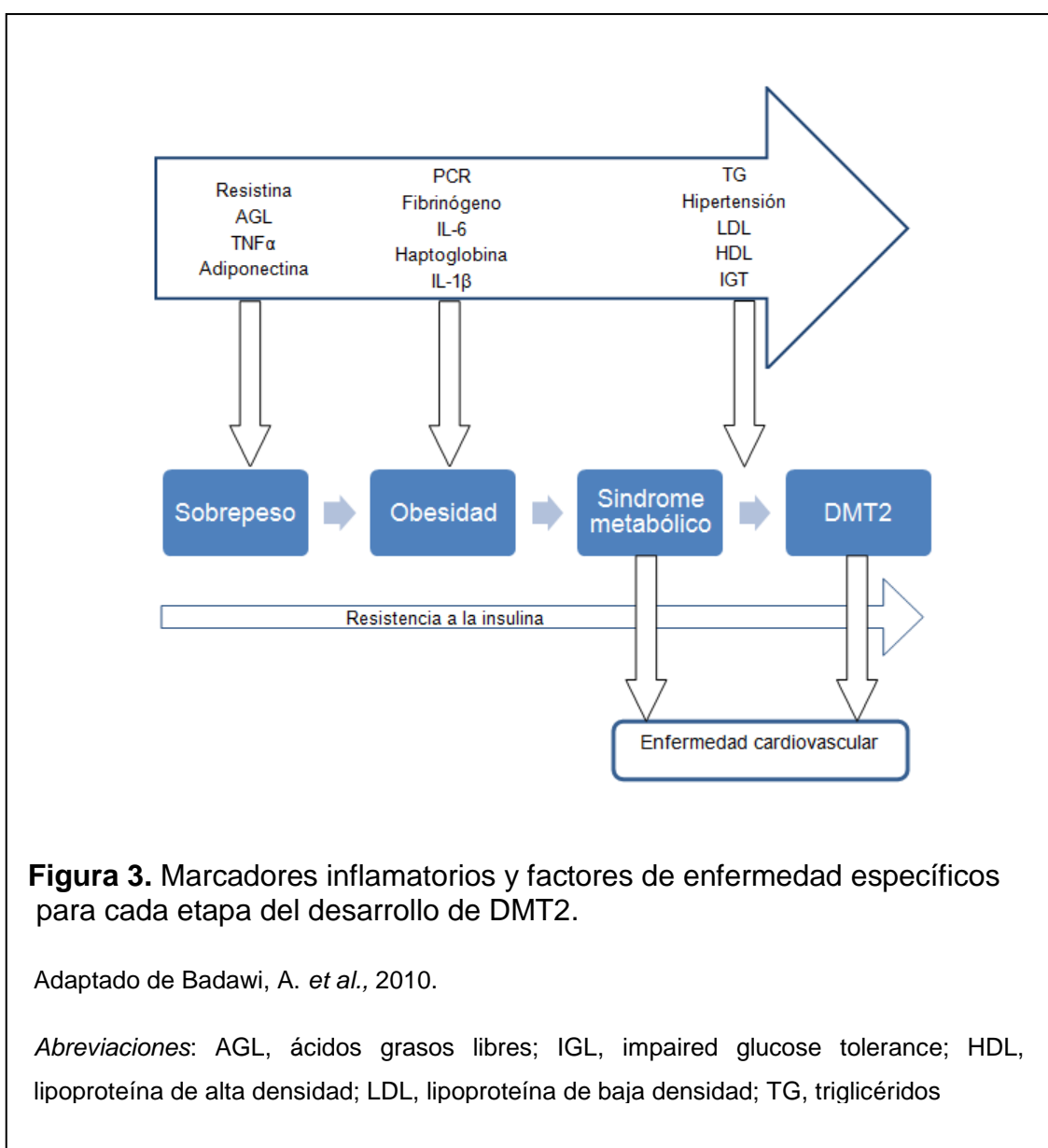
prospectivos señalan el incremento en la concentración sérica de citocinas y marcadores de fase aguda en la DMT2 (Donath y Shoelson, 2011).



En un estudio prospectivo con 32,826 mujeres se encontraron alteraciones en los niveles de TNF- α , IL-6 y PCR en los sujetos que desarrollaron DMT2. Este estudio propone que la PCR puede ser un pronosticador del riesgo de desarrollar DMT2 (Hu et al., 2004). En otro estudio prospectivo se encontró relación entre los niveles de las citocinas IL-6 e IL-1 β y el desarrollo de la DMT2 (Spranger et al., 2003).

Algunos estudios sugieren que las citocinas pueden inducir resistencia a la insulina. Por ejemplo, el aumento en la concentración de IL-6 tiene una correlación negativa significativa con la respuesta a la insulina medida *in vivo* e *in vitro* (Bastard et al., 2002). Por otra parte, también existe evidencia que sugiere que TNF- α puede generar resistencia a la insulina. En el estudio de

Hotamisligil y colaboradores se reportó el incremento de la expresión de TNF- α en el tejido adiposo de sujetos con obesidad. Además se encontró una correlación fuerte con la hiperinsulinemia (Hotamisligil et al., 1993). En la figura 3 se indican las citocinas y los factores de enfermedad alterados, específicos para cada fase del desarrollo, de la DMT2. Se puede observar que en el sobrepeso existe la desregulación de TNF- α , además del incremento de ácidos grasos libres, resistina y adiponectina. En la obesidad, se identifica el incremento en los niveles de PCR, IL-6 e IL-1 β (Badawi et al., 2010).



1.1.3 Tratamientos

1.1.3.1 Metformina

Los hipoglucemiantes orales utilizados con mayor frecuencia para el control de la DMT2 son las sulfonilureas y las biguanideas (Badawi et al., 2010). Adicionalmente, los pacientes con DMT2 podrían necesitar medicinas para controlar la presión sanguínea y el colesterol (FID, 2015). Glicazide (una sulfonilurea) y metformina (una biguanidea) se encuentran en la lista de medicamentos esenciales para la diabetes de la OMS (FID, 2015).

El origen de la metformina se relaciona con la planta *Galega officinalis*. A finales de 1800s se reportó que la planta es rica en guanidina y, en 1918, se demostró el efecto hipoglicemiante de este compuesto en modelos animales. Pruebas de toxicidad indicaron no podía ser empleado clínicamente, de modo que la investigación se enfocó en el estudio de las diguanidas y las biguanidas. Finalmente, en 1957 se publicó el primer estudio que reconocía los efectos clínicos de la metformina (Bailey y Day, 2004).

Actualmente, la metformina es uno de los fármacos de primera línea en el tratamiento de la DMT2. Esta biguanida mejora la concentración de varios metabolitos, productos del metabolismo de carbohidratos y grasa, sin generar hiperinsulinemia (Salazar Álvarez, 2011). Se conoce que la metformina actúa reduciendo la producción hepática de glucosa y su absorción en el intestino. También se indica que en algunos pacientes provoca la disminución del apetito, lo que secundariamente podría ayudar al control del peso (Islas y Lifshitz, 2009). La absorción de la metformina se da en el tracto gastrointestinal, con una vida media de 1 ½ a 3 horas (Salazar Álvarez, 2011). La excreción de esta biguanida se realiza vía renal, alcanzando un 90% en las siguientes 12 horas después de la toma (Islas y Lifshitz, 2009).

Los efectos secundarios principales del tratamiento con metformina son molestias gastrointestinales que suelen ser transitorias (Islas y Lifshitz, 2009). Con menor incidencia se presenta acidosis láctica, que se estima en un 0.03 casos por 1000 pacientes. Esta se considera una complicación de alto riesgo

con niveles de mortalidad del 30%-50% de los casos (Kirpichnikov, 2002). Generalmente, se reporta la existencia de alguna condición de predisposición. Entre las contraindicaciones para el uso de metformina se encuentra la insuficiencia hepática, alcoholismo, insuficiencia renal crónica, edad avanzada, tendencia a la hipoxemia y cualquier otro factor de predisposición a la acidosis láctica (Salazar Álvarez, 2011)

A pesar del largo tiempo del uso terapéutico de la metformina, los mecanismos moleculares por los cuales actúa no están completamente elucidados (Badawi et al., 2010). Varios estudios se enfocan en mecanismos de acción diferentes al metabolismo de la glucosa que incluyen un potencial efecto anti-inflamatorio sugiriendo, por ejemplo, que la metformina participa en la inhibición del factor nuclear kB (NFkB) (Saisho, 2015). Adicionalmente, se ha propuesto que otro mecanismo de acción anti-inflamatorio es la inhibición de la formación de productos avanzados de la glicosilación, los cuales incrementan la inflamación (Saisho, 2015).

En algunos pacientes, y con el progreso de la DMT2, la monoterapia podría ser insuficiente. Se ha comprobado la eficacia de la terapia combinada de metformina con insulina o con sulfonilureas. (Kirpichnikov, 2002).

1.1.3.2 Anti-inflamatorios aplicados al tratamiento de DMT2

Estudios actuales sugieren que el uso de salicilatos y otra clase de fármacos anti-inflamatorios podría ser útil en el control de la DMT2 (Goldfine et al., 2011). Basados en estudios clínicos, los tres enfoques que más se han estudiado en esta línea son: antagonismo de TNF- α , antagonismo de IL-1 β y el tratamiento con salsalato (Donath et al., 2008).

La inhibición de TNF- α es un mecanismo eficiente para la disminución de la inflamación en artritis reumatoide. Sin embargo, estudios enfocados en el efecto hipoglicemiante de este compuesto no demuestran ser significativos (Donath et al., 2008). Pruebas con antagonistas de IL-1 β indican mejores resultados. El receptor antagonista de la IL-1 (IL-1Ra) se produce de manera endógena. Los pacientes con DMT2 presentan reducción en las

concentraciones de IL-1Ra en los islotes pancreáticos (Goldfine et al., 2011). Los antagonistas de IL-1 β son moléculas de acción específica diseñadas para tener una complementariedad perfecta con IL-1 β . Se aplican mediante inyección y su efecto puede durar por varias semanas e inclusive meses (Donath et al., 2008).

Por otra parte, el salicilato es una molécula de vida media corta que requiere de varias dosis al día (Donath et al., 2008). El salsalto es un profármaco del salicilato que ha demostrado buena tolerancia y seguridad por años en el tratamiento de artritis (Goldfine et al., 2013) Estudios en poblaciones pequeñas demuestran efectos positivos en el control de la DMT2. Se evidencia disminución de niveles de HbA1c y mejoría en las medidas metabólicas. Los efectos adversos incluyen molestias gastrointestinales leves y aumento en niveles de albúmina en orina (Goldfine et al., 2013).

1.2 Propiedades de *Lupinus mutabilis*

Lupinus es un género taxonómico que comprende una amplia diversidad de especies de plantas leguminosas. Tan solo en Bolivia, Ecuador y Perú se han clasificado 83 especies distintas (Jacobsen y Mujica, 2006). A nivel mundial, se cultivan principalmente cuatro especies de *Lupinus*: *L. luteus*, *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. mutabilis* (Carvajal-Larenas et al., 2016).

Lupinus mutabilis sweet es una variedad que se encuentra en Ecuador, en zonas de altitud entre los 2600m y 3400 m. (Caicedo et al., 2010). Se desarrolla de manera óptima en suelos de textura arenosa. En las primeras etapas de crecimiento es susceptible al frío, aunque en su etapa adulta puede resistir heladas (Caicedo et al., 2010).

El uso principal de esta leguminosa en el Ecuador es la alimentación humana. *L. mutabilis* es un producto de bajo costo, apreciado por su alto valor nutritivo, del que destaca su alto contenido de proteína y aceites (Carvajal-Larenas et al., 2016).



Figura 4. *Lupinus mutabilis* sweet

Tomado de: Rodríguez et al., 2013

Estudios clínicos de fase dos, realizados en el Ecuador, demuestran el efecto hipoglicemiante de esta leguminosa. En uno de esos estudios, se administró *L. mutabilis* crudo a dos grupos, el primer grupo conformado por jóvenes sin diabetes y con peso normal y el segundo grupo por voluntarios con una medición de glucosa basal ≥ 100 mg/dL. En cada grupo se incluyeron participantes control a quienes se les administró soya. El tratamiento con *L. mutabilis* produjo la disminución significativa de glucosa en suero, después de 60 y 90 minutos, y disminución significativa de insulina después de 90 minutos. Por otra parte, el grupo control no alcanzó ningún cambio significativo (Fornasini et al., 2012).

En otro estudio, se comparó el efecto de *L. mutabilis* cocinado con el efecto de un extracto de alcaloides. Se encontraron variaciones en los niveles séricos de insulina y glucosa en ambos grupos. El grupo tratado con *L. mutabilis* cocinado reportó una disminución significativa de glucosa a los 60 y 90 minutos después de la administración del tratamiento. El tratamiento con alcaloides derivó en una disminución significativa de glucosa a los 90 minutos. La concentración de insulina disminuyó en ambos grupos, aunque no alcanzó valores significativos (Baldeón, ME., et al., 2012).

En otro estudio, se comparó el efecto de metformina a dosis completa, con la mitad de la dosis más un snack de *L. mutabilis*. El grupo tratado con la mitad de la dosis consiguió una disminución significativa en los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c) y disminución en el índice de masa corporal (IMC). En general, el consumo de *L. mutabilis* demostró una eficacia similar a la dosis completa de metformina sin efectos adversos (Hidalgo, 2015).

Por otro lado, no existen muchos estudios en relación a las propiedades anti-inflamatorias de *L. mutabilis*. Sin embargo, se ha comprobado la capacidad anti-inflamatoria de extractos hidrolizados de proteína de *Lupinus angustifolius* L. (Millán-Linares et al., 2014). Adicionalmente, una investigación desarrollada en la Universidad San Martín de Porres (USMP) en Perú estudió el efecto antiinflamatorio de *L. mutabilis* sweet en modelos animales (Ratones Swiss Albinos). Se administró albúmina en suero fisiológico al 50% por vía subcutánea y después extracto acuoso de *L. mutabilis* sweet, diclofenaco R o agua bidestilada. El porcentaje de inhibición máxima de extracto de semillas de *L. mutabilis* fue 66%, a los 80 min después de administrar 2000 mg/Kg. El diclofenaco R alcanzó un efecto máximo de 100% a los 60 minutos con una dosis de 30 mg/Kg. El control negativo no mostró inhibición alguna de la inflamación según lo esperado (Castañeda et. al., 2002).

1.3 MicroRNAs

1.3.1 Biogénesis

1.3.1.1 Mecanismos de biogénesis

Anteriormente, se creía que la formación de miRNA seguía un proceso lineal y único. Sin embargo, en la actualidad se encuentran descritas varias vías de biogénesis, que incluyen la vía canónica y las vías no canónicas (Ghatak y Sen, 2015). La mayoría de miRNAs funcionales se forman por la vía canónica, mientras que los miRNAs de vías no canónicas tienen poca abundancia y están poco conservados (Ha y Kim, 2014). Cabe mencionar que la biogénesis en mamíferos difiere en modos importantes con la biogénesis en plantas (Carthew y Sontheimer, 2009). A continuación se detalla la biogénesis canónica en mamíferos.

La biogénesis de microRNA en células eucariotas sigue un proceso de varios pasos, que inician en el núcleo y finalizan en el citoplasma. De acuerdo a su ubicación, los genes que codifican microRNA se categorizan como intergénicos, intrónicos y exónicos (Hussain, 2012). Los genes son transcritos por RNAPol II en la mayoría de los casos, aunque estudios señalan que la transcripción de miRNA primario (pri-miRNA) también puede ser catalizada por RNAPol III en mamíferos (Carthew y Sontheimer, 2009) y virus (Ha y Kim, 2014).

El pri-miRNA generado por la transcripción se une al complejo microprocesador, la cual es una molécula conformada por Drosha (un tipo de RNAsa III) y su cofactor (la proteína DGCR8, DiGeorge síndrome critical región gene 8) (Ghatak y Sen, 2015). Después de ser procesado, se libera un miRNA precursor (pre-miRNA). El pre-miRNA debe salir al citoplasma para completar el proceso de maduración, donde se une a la proteína Exportin 5 (EXP5), dependiente de Ran-GTP (Ha y Kim, 2014). El GTP se hidroliza en el citoplasma de la célula, lo que deriva en la ruptura del complejo y así en la liberación del pre-miRNA en el citoplasma (Ha y Kim, 2014).

La endonucleasa Dicer corta cerca del terminal del bucle, liberando un dúplex de miRNA de 22 nucleótidos (Ghatak y Sen, 2015). El dúplex de RNA se une a una proteína AGO y luego es desenrollado para formar el RISC (RNA induced silencing complex) (Ghatak y Sen, 2015). Unir el RNA conlleva el uso de ATP, pero la liberación de la molécula es independiente de ATP (Ha y Kim, 2014). Una de las cadenas permanece en la proteína, como miRNA maduro y la otra es degradada por actividad enzimática endonucleótica (Ghatak y Sen, 2015).

1.3.1.2 Regulación de biogénesis

Estudios señalan que la expresión de microRNAs está asociada a fases del desarrollo y/o a señales específicas de tejidos. La regulación de la biogénesis de microRNAs puede suceder durante la transcripción o después de la misma (Kim et al., 2009). Durante la transcripción, son de especial importancia los factores de transcripción, por ejemplo el supresor de tumores, p53, que activa a la familia de microRNAs miR-34. Los factores de transcripción se han estudiado

sobre todo en cáncer, sin embargo hace falta más investigación sobre el tema (Ghatak y Sen, 2015).

A menudo, durante la regulación de biogénesis, se observan circuitos de retroalimentación negativa y doble-negativa. La primera suele generar la expresión estable de ambos componentes, mientras que la segunda resulta en una expresión mutuamente excluyente (Kim et al. 2009).

Un caso de retroalimentación negativa simple es la autorregulación de Drosha y DGCR8, el cual es un mecanismo muy eficiente (Kim et al. 2009). La expresión, actividad y especificidad de Drosha también se regula por otros medios y esto influirá en la abundancia de los microRNAs (Ha y Kim, 2014).

También se deben considerar los factores intrínsecos, que van a influir en la biogénesis (Ghatak y Sen, 2015). Polimorfismos de nucleótido simple (SNP) y mutaciones puntuales en el pri-miRNA pueden afectar el procesamiento de los microRNAs (Davis y Hata, 2009).

1.3.2. Mecanismo de regulación génica

Los microRNAs son moléculas de aproximadamente 22 nucleótidos, que actúan como reguladores génicos, cuyo blanco es el RNA mensajero (RNAm) (Kim et al., 2009).

En animales, se han propuesto tres vías por las cuales ocurre la represión: mediante la inhibición de la traducción en la fase de iniciación, inhibición durante etapas posteriores de la traducción y represión debida a deadenilación y/o degradación del RNAm (Hussain, 2012). El mecanismo de acción de los microRNAs dependerá en gran medida del grado de complementariedad que tengan con el RNAm. La unión imperfecta promueve la represión de la traducción. Por otro lado, la complementariedad perfecta en las bases produce la ruptura del RNAm, que es catalizada por proteínas Ago (Carthew y Sontheimer, 2009). Los detalles sobre el mecanismo de acción de miRNAs están poco esclarecidos debido a que estudios conducidos en diferentes sistemas y laboratorios son a veces contradictorios y es difícil generar un modelo exhaustivo (Filipowicz et al., 2008).

Sumado a esto, estudios indican que algunos microRNAs podrían activar la traducción de RNAm. Este es el caso, por ejemplo, de miR-122, el cual estimula la traducción de RNA del Virus de la Hepatitis C (HCV). (Hussain, 2012).

1.3.3 MicroRNAs circulantes en sangre

Los microRNAs se encuentran localizados en tejidos y libres en biofluidos, tales como orina, leche materna, fluido cerebroespinal, sangre, entre otros (Nair et al., 2014). El análisis de microRNAs en tejidos supone una opción poco práctica e invasiva, a diferencia de las muestras de sangre, que se extraen de manera rutinaria en laboratorios de análisis clínico (Moldovan et al., 2014) Actualmente, existe gran interés en el estudio de microRNAs circulantes y su relación con diversas patologías (Nair et al., 2014).

Algunos estudios se han enfocado en identificar el origen de los microRNAs circulantes. Una investigación que utilizó filtración y centrifugación diferencial indica que los miRNAs analizados (miR-629* y miR-660) no se localizan en las células contenidas en la sangre (Mitchell et al., 2008). En cambio, la evidencia señala que los microRNAs son liberados cuando existen daños en los tejidos. Los microRNAs son específicos al tejido y al tipo celular, de modo que pueden establecerse conexiones con su origen (Brase et al., 2010).

Los microRNAs libres se encuentran contenidos en exosomas, microvesículas o en cuerpos apoptóticos dependiendo de su tamaño y del modo en que sean liberados por las células (Creemers et al., 2012). La cubierta vesicular confiere alta estabilidad a los microRNAs circulantes. Adicionalmente, algunos microRNAs libres no se encuentran contenidos en vesículas, pero están asociados a proteínas AGO. Esta asociación también les confiere resistencia a la degradación (Grasedieck et al., 2013).

En el trabajo de Gilad y colaboradores, uno de los objetivos fue determinar la estabilidad de microRNAs en suero. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente por 4 horas. Se realizó cuantificación por qPCR. No se encontraron diferencias significativas entre la concentración inicial y final de los

microRNAs analizados. Después de dos ciclos de congelamiento y descongelamiento tampoco se encontraron variaciones (Gilad et al., 2008). Otro estudio, que analizó la estabilidad de microRNAs en plasma, encontró resultados similares. Después de incubar las muestras a temperatura ambiente por 24 horas, así como después de 8 ciclos de congelamiento y descongelamiento, no hubo cambios significativos (Mitchell et al., 2008). Estos estudios indican la resistencia de los microRNAs, de modo que son marcadores que podrían utilizarse en el análisis clínico.

En la actualidad, no existe un consenso general sobre el mecanismo de normalización de datos cuando se trabaja con microRNA circulante en fluidos (Kroh et al. 2010). El uso de RNA pequeño nucleolar (RNAsn), empleado para la normalización de muestras celulares, no es muy recomendable, ya que existen reportes que señalan una abundancia variable en fluidos (Kroh et al., 2010). Por otra parte, algunos estudios realizan la normalización de los resultados con microRNAs que no son variables, sin embargo, este es un enfoque solo pueden aplicarse en casos particulares (Nair et al., 2014). El uso de muestras spike-in es uno de los mecanismos de normalización más utilizados (Moldovan et al., 2014). Las muestras spike-in son secuencias de RNA de especies no humanas. Con frecuencia, se utiliza cel-miR-39, la cual es una secuencia correspondiente a *C. elegans*, que no tiene secuencias homólogas en la especie humana (Moldovan et al., 2014).

1.3.4 MiRNA-146a y miRNA-155

MiR-146a es un tipo de microRNA que se ha relacionado ampliamente con la inflamación. Varios estudios reportan que miR-146a regula negativamente la inflamación, por ejemplo, en pacientes con psoriasis, artritis reumatoide y sepsis, condición en la cual se ha propuesto como un marcador temprano (Williams et al., 2008). Este microRNA forma parte de la familia de miR-146, conformada por dos moléculas: miR-146a y miR-146b (Williams et al., 2008). En humanos, el gen que codifica para miR-146a se ubica en el cromosoma 5 mientras que el gen de miR-146b se ubica en el cromosoma 10 (Williams et al.,

2008). En su forma madura, estos microRNAs se diferencian en su estructura únicamente por dos nucleótidos (Taganov et al., 2006).

Por su parte, miR-155 es también multifuncional (Faraoni et al., 2009). Su relación con diversos procesos biológicos se ha comprobado, incluyendo hematopoiesis, inflamación e inmunidad (Faraoni et al., 2009). Varios estudios señalan que tiene un efecto pro-inflamatorio, aunque en la DMT2, que es una enfermedad inflamatoria, se produce la reducción en la expresión de este microRNA (Corral-Fernández et al., 2013). El gen que codifica para miR-155 se encuentra en el cromosoma 21 (Faraoni et al., 2009).

Existen estudios sobre la relación entre miR146-a y cáncer (Williams et al., 2008). Un caso interesante es el estudio de Li y colaboradores que señalan una relación inversa entre los niveles de miR-146a y el desarrollo de células con cáncer de páncreas. Los investigadores cuantificaron los niveles de miRNA tanto en células Colo357 y Panc-1, como en células normales, utilizando microarrays y validando sus resultados con qPCR. La re-expresión inducida de miR-146a, redujo los niveles del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) y reguló los niveles de NF-κB. También se estableció una posible relación entre compuestos de origen natural (genisteína y B-DIM) con el aumento en los niveles de miR-146a (Li et al., 2010). MiR-155 también ha sido asociado con cáncer y se ha propuesto que actúa como un oncomiR. Se conoce que miR-155 es un blanco de la proteína p53 mutante. La sobre-expresión de miR-155 promueve la transformación e invasión celular, a través de la inhibición de genes supresores de metástasis (Nielsen et al., 2013).

La asociación de miR-146a y miR-155 con la función inmune se evidencia, por ejemplo, en el estudio de Taganov y colaboradores, en el que se encontró que la producción de las formas maduras de miR-146a/b, miR-155 y miR-132 era inducida por LPS. Se analizó la expresión de 200 miRNAs con microarrays, después de exponer células THP-1 (human acute monocytic leukemia) a LPS. Además se concluyó que miR-146a y miR-146b pueden funcionar como moduladores negativos para equilibrar la respuesta inmune (Taganov et al. 2006).

Estudios indican que dentro de la patología de la DMT2, existe la alteración de marcadores inflamatorios. Pruebas realizadas en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) indican la disminución significativa de miR-146a (Balasubramanyam et al., 2010) y de miR-155 (Corral-Fernández et al., 2013). En el estudio de Balasubramanyam y colaboradores se reporta la relación negativa entre miR-146a y TNF- α , así como niveles más bajos de IL-6 y mRNA de TRAF-6 y de NF κ B en sujetos con DMT2. (Balasubramanyam et al., 2010). En el estudio de Corral-Fernández y colaboradores, los sujetos con DMT2 tuvieron niveles más altos de IL-1 β y de IL-6. No se evaluó la expresión de mRNA (Corral-Fernández et al., 2013).

La cuantificación de estos microRNAs (miR-146a, miR-155) en suero presenta una tendencia similar. En el estudio de L. Baldeón y colaboradores, se analizaron las muestras de suero de 56 sujetos con DMT2 y de 40 controles sin diabetes. La técnica empleada de cuantificación fue PCR cuantitativa (qPCR). Los resultados indican que los niveles de miR-146a son significativamente más bajos en sujetos con DMT2. Por otra parte, los niveles de miR-155 no obtuvieron una variación estadísticamente significativa, pero la correlación que se encontró entre ambos microRNAs fue buena ($r=0,478$; $p<0.001$). En el estudio además se encontraron niveles más elevados de IL-8 y del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en sujetos con DMT2. Los niveles de IL-8 en el suero se correlacionan con los niveles de HbA1c y de TNF α . Además, miR-146a se correlaciona positivamente con los niveles del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI) (Baldeón, L., et. al., 2014).

CAPITULO II

2. Materiales y metodología

Para este proyecto de investigación se utilizaron muestras de suero de pacientes con diabetes tipo 2 (DMT2) que formaron parte de un estudio de no inferioridad, en el que se comparan los tratamientos: dosis completa de metformina (G1) y media dosis de metformina más un snack a base de *L. mutabilis* (G2) (Hidalgo, 2015). Adicionalmente, se incluyeron sujetos que no tenían diabetes. El proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de las Américas y se cuenta con el consentimiento informado de los participantes.

2.1 Participantes

Los participantes con DMT2 fueron reclutados en la Unidad Norte del Patronato Municipal San José de Quito. Se incluyeron a pacientes de ambos sexos, mayores de edad, que necesitaban un ajuste de su tratamiento, cuyos valores de hemoglobina glicosilada (HbA1c) estaban entre 7,5 % a 10 % y con niveles de glucosa en ayunas menores a 180 mg/dL.

Por otra parte, los participantes del grupo control fueron sujetos sin diabetes ni prediabetes, cuyas características de género y edad son similares a los grupos experimentales.

Criterios de exclusión

Se excluyó a pacientes con hipertensión arterial grado II, insuficiencia hepática y/o renal, infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), enfermedades mentales severas, historia de infarto agudo de miocardio (IAM), accidente cerebrovascular (ACV) y deficiencia de vitamina B12.

Seguimiento

Los pacientes con DMT2 acudieron a visitas de control cada 15 días, en las cuales se midió la glicemia capilar, talla, peso, presión arterial y se tomó

registro de posibles reacciones adversas. Se realizó química sanguínea basal y al final del tratamiento (ver siguientes párrafos).

2.2 Tratamientos

Grupos de tratamientos

Los sujetos elegibles fueron divididos en dos grupos: el primer grupo recibió la dosis completa de metformina, en el horario y conforme a las indicaciones del médico diabetólogo (G1) y el segundo recibió media dosis de metformina más un snack de *L. mutabilis* 30 minutos antes del almuerzo (G2). Los tratamientos fueron entregados cada dos semanas, por un total de 12 semanas.

Fuente de metformina y de *L. mutabilis*

La metformina fue proporcionada por un laboratorio local, en una presentación de 850 mg de clorhidrato de metformina. El *Lupinus mutabilis*, variedad 450, fue proporcionado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en forma de un snack crocante. El proceso de fabricación está en proceso de patentamiento, por lo cual no se incluyen más especificaciones del mismo.

Dosis de *L. mutabilis*

La dosis de *L. mutabilis* fue de 10 gramos, conforme a los resultados de estudios previos (Fornasini et al., 2012).

2.3 Medidas antropométricas

Para determinar la talla y el peso de los participantes se utilizó una balanza estandarizada. Los participantes debían utilizar ropa ligera y estar sin zapatos (Fornasini et al., 2012).

2.4 Muestras

Toma de muestras

Las muestras de sangre de los sujetos con DMT2 fueron colectadas en la mañana, después de un ayuno de aproximadamente 12 horas. Las muestras

se centrifugaron a 10.000 RPM por 10 minutos, máximo 2 horas después de la toma. Se procesaron inmediatamente, en un equipo Hitachi Roche – 917 (Roche - Diagnostics) para la determinación de HbA1c, glucosa, perfil lipídico, enzimas hepáticas y fosfatasa alcalina. Posteriormente, se congelaron a -80°C por aproximadamente 24 meses.

En cuanto a los pacientes control, la toma de muestra se realizó después de un ayuno de aproximadamente 12 horas, en sus lugares de trabajo y fueron transportadas en frío a NetLab. Fueron centrifugadas y procesadas entre 1 y 2 horas después de la toma. La centrifugación se realizó a 10.000 RPM por 10 minutos. La determinación de glucosa, HhbA1c y perfil lipídico se realizó de manera similar a la de los pacientes con DMT2. Las muestras se mantuvieron a -80°C por aproximadamente 12 meses.

Disponibilidad de muestras

Para la ejecución del presente proyecto se utilizaron las muestras congeladas tanto de pacientes con DMT2 como de los controles para la determinación de miRNA. Solamente se incluyeron muestras de pacientes que tenían la muestra basal y la muestra final disponibles. El total de pacientes con tratamiento de metformina fue de 17 (34 muestras) y 15 pacientes del grupo tratado con metformina más *L. mutabilis* (30 muestras). En cuanto al grupo control, se contó con 18 muestras.

2.5 Determinación de las concentraciones en suero de miR-146a y miR-155

Extracción de RNA total

Para la extracción de RNA total se utilizó el kit comercial miRNeasy Mini Kit (Qiagen®). Este es un sistema basado en columnas de silica, que utiliza fenol y cloroformo para realizar la separación del RNA de los otros componentes del suero.

Se añadió un RNA spike-in: miScript miRNA Mimic 39, que sirve como control de la extracción y como normalizador. miScript miRNA Mimic 39 es un segmento de RNA de *C. elegans*, doble cadena, que simula miRNA maduro

endógeno. Esta secuencia no tiene homología con ninguna secuencia humana (Moldovan et al., 2014).

Estandarización del protocolo de extracción

La estandarización del protocolo se realizó utilizando el suero de sujetos con DMT2, que se había conservado en las mismas condiciones que las muestras del presente proyecto.

El proceso de extracción tomó como base un volumen de suero de 300 μ L. En algunos pacientes que no se alcanzó este volumen, se trabajó con 200 μ L. El suero se colocó en dos tubos Eppendorf®, con 150 μ L en cada uno, o un tubo con 200 μ L según correspondiera. La primera modificación fue el aumento de QIAzol® Lysis Reagent (Qiagen®) a un volumen total de 1600 μ L para 300 μ L de suero o 1050 para 200 μ L de suero. El contenido de los tubos se homogenizó en el Vortex, por 15 segundos, a velocidad alta y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 5 μ L de RNA spike-in, para lo cual se pipeteó 2.5 μ L en cada tubo Eppendorf®. La adición de cloroformo y de etanol fue según las recomendaciones del fabricante. Luego, fue necesario pasar el contenido de los 2 tubos de muestra por la misma columna. Se añadió 700 μ L de muestra en la columna y se centrifugó a 8000 g por 20 segundos a 20°C. Se repitió hasta completar el volumen total de los dos tubos. Se realizó un lavado con Buffer RWT y dos lavados con Buffer RPE siguiendo el protocolo del fabricante.

Para la elución del RNA final, se dividió el volumen de agua (40 μ L) en dos eluciones. Después de la primera, se dejó incubar a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 8000 g por 1 minuto a 20°C. Finalmente, se realizó la segunda elución, se dejó reposar por 10 minutos y se centrifugó bajo las mismas condiciones. El tubo Eppendorf® contenía el RNA total extraído del suero, el cual se analizó mediante espectrofotometría para confirmar que la estandarización mejorara la concentración, además en las muestras se tomó en cuenta la absorbancia 260/280, que idealmente debía estar en el rango de 1.8 a 2.2.

Transcripción reversa

La transcripción del RNA total se realizó con el kit comercial TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™) según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron los primers TaqMan®: hsa-miR155, hsa-miR146a y cel-miR-39 concentración 5X. La programación del termociclador fue 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C.

PCR cuantitativa

Para determinar las concentraciones séricas de miR-146a y miR-155, se realizó la cuantificación por PCR cuantitativa (qPCR). Se utilizó el kit comercial TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG (Applied Biosystems™). Las sondas seleccionadas fueron Taqman®: hsa-miR155, hsa-miR-146a y cel-miR-39 concentración 20X. Se aplicaron las modificaciones del protocolo, previamente estandarizadas por L. Baldeón y colaboradores, de modo que se utilizó 5 µL de universal master mix, 0,5 µL de sonda, 9,5 µL de agua y 5 µL de cDNA (Baldeón, L., et al., 2014).

Las muestras se corrieron en un equipo marca BioRad®, modelo CFX 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System. Las condiciones de PCR fueron: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C.

El total de muestras (82) se dividió en 16 grupos, que se corrieron en fechas diferentes. Todas las muestras se corrieron en duplicado, incluyendo los controles negativos. Se procuró que los grupos tuvieran una muestra de cada tratamiento, con su respectiva toma inicial y final y un sujeto control sin diabetes.

2.6 Análisis estadístico

Los datos correspondientes a la cuantificación por qPCR fueron colectados y analizados por el Software CFX Manager (BioRad®). Los resultados de la cuantificación se consideraron utilizando los valores de $\Delta\Delta Cq$.

El análisis de datos se realizó utilizando el software SPSS 24 (IBM® Analytics). Se realizó el test de Grubb para determinar los valores atípicos. Para

determinar si existía una distribución normal de los datos, se utilizó el test de Shapiro-Wilk. El análisis de muestras relacionadas (por ejemplo, muestra basal y muestra final) se realizó con el test de Wilcoxon. Se determinó si existían diferencias significativas entre dos muestras de diferentes grupos utilizando la prueba no paramétrica U-mann Whitney. En las variables socio-demográficas se calculó el chi cuadrado. Para el cálculo del coeficiente de correlación se realizó la prueba de correlación de Spearman. Además, para establecer la relación entre dos variables, se realizaron regresiones lineales. Los gráficos se realizaron con el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software®).

CAPITULO III

3. Resultados

3.1 Datos antropométricos y sociodemográficos

En la Tabla 1 se indican los datos antropométricos y sociodemográficos de los tres grupos de estudio, Metformina (G1), Metformina más *L. mutabilis* (G2), y Control (G3).

Los datos demuestran que no hubo diferencias en edad, género, etnia, estado civil, educación, ocupación, ingresos mensuales, antecedentes familiares o IMC entre los G1 y G2. De manera similar, los datos sociodemográficos y antropométricos del grupo control fueron similares a los datos de los grupos de tratamiento.

En la Tabla 2 se comparan las concentraciones basales de varios metabolitos producto del metabolismo de carbohidratos y grasa; y del marcador inflamatorio PCR ultra-sensible. Los datos demuestran que no hubo diferencias en las concentraciones de los metabolitos indicados entre los grupos G1 y G2. Además los datos indicaron que las concentraciones de glucosa en ayunas, HbA1c y colesterol, LDL, HDL y triglicéridos fueron anormales para los G1 y G2. Los valores de PCR fueron normales para los G1 y G2. Adicionalmente, se indica que hubo diferencias estadísticamente significativas de las concentraciones de glucosa y triglicéridos entre el grupo control y los G1 y G2. Los valores de glicemia basal y triglicéridos estuvieron dentro del rango normal en el grupo control. Sin embargo, los valores de colesterol total, LDL y HDL fueron anormales en el grupo control. No se determinó las concentraciones de HbA1c ni de PCR en el grupo control porque clínicamente no era necesario.

Tabla 1. Datos antropométricos y socio-demográficos

	Metformina (G1)	Metformina + <i>L. mutabilis</i> (G2)	P (G1 Vs. G2)	Control (G3)	P (G1, G2 Vs. G3)
Tamaño de la muestra (n)	17	15	-	18	-
Género:					
Mujeres (n, %)	13 (76.47%)	13 (86.67%)	0,368	16 (88.89%)	0,572
Hombres (n, %)	4 (23.53%)	2 (13.33%)		2 (11.11%)	
Edad (años)	57	59	0,348	58	0,181
Talla (cm) ^(a)	152.6 ± 9.3	148.8 ± 7.0	0,170	154.4 ± 6.3	0,235
Peso (kg)	71.9 ± 11.7	65.9 ± 8.5	0,466	69.6 ± 7.0	0,389
IMC: (Kg/m ²)	30.9 ± 4.7	29.71 ± 2.9	0,448	29.23 ± 2.6	0,408
Normal (<25)	1 (5.8%)	1 (7.6%)		0 (0.0%)	
Sobrepeso (25-30)	9 (53.0%)	6 (46.2%)		11 (61.1%)	
Obesidad (≥30)	7 (41.2%)	6 (46.2%)		7 (38.9%)	
Etnia:					
Afro Ecuatoriano	1 (5.9%)	0	0,374	0	0,431
Mestizo	16 (94.1)	13 (86.7%)		15 (83.8%)	
Estado Civil:					
Soltero	2 (11.8%)	2 (13.3%)	0,328	1 (5.6%)	0,618
Casado/Unión libre	10 (58.8%)	9 (60%)		11 (61.6%)	
Divorciado/Separado/Viudo	5 (29.4%)	2 (13.3%)		3 (16.8%)	

Educación					
No acudió a la escuela	5 (29.4%)	1 (6.7%)	0,371	0 (0.0%)	0,260
Primaria completa /Incompleta	4 (23.5%)	6 (40.0%)		4 (22.2%)	
Secundaria Completa/Incompleta	6 (35.5%)	3 (20.0%)		8 (44.4%)	
Educación Superior Completa/Incompleta	2 (11.8%)	3 (20.0%)		3 (16.8%)	
Ocupación					
Empleado	7 (41.2%)	5 (33.3%)	0,462	9 (50.1%)	0,473
Desempleado	8 (47.1%)	3 (20.0%)		3 (16.7%)	
Cuidado del hogar	2 (11.8%)	4 (26.7%)		3 (16.7%)	
Ingresos mensuales					
Bajos (<400 dólares)	9 (52.9%)	6 (40,0%)	0,899	5 (27.8%)	0,722
Medio (400-1000 dólares)	8 (47.1%)	7 (46.7%)		9 (50.0%)	
Alto (>1000 dólares)	0 (0.0 %)	0 (0.0%)		1 (5.6%)	
Antecedentes Directos Familiares con Diabetes					
Sí	11 (64.7%)	7 (46.6%)	0,833	7 (38.89%)	0,349
No	6 (35.3%)	6 (40.0%)		11 (61.1 %)	

(a) Se presentan los resultados en forma de media \pm desviación estándar

(b) Todos los datos sociodemográficos se presentan como n(%)

Tabla 2. Química sanguínea basal (*)

	Metformina (G1)	Metformina + L. mutabilis (G2)	P	Control (G3)	P
Glucosa	174.4 ± 43.9	151.2 ± 23.2	0,117	89.2 ± 5.6	0,000
HbA1c	8.0 ± 0.7	7.9 ± 0.6	0,645	-	-
Colesterol total (mg/dL)	223.4 ± 38.6	220.0 ± 38.2	0,851	226.7 ± 43.1	0,157
LDL (mg/dL)	152.1 ± 16.0	149.7 ± 49.2	0,867	126.7 ± 33.3	0,216
HDL (mg/dL)	52.4 ± 16.0	49.8 ± 9.8	0,403	57.3 ± 12.9	0,138
Triglicéridos (mg/dL)	225.5 ± 114.9	175.0 ± 74.5	0,143	146.3 ± 77.2	0,031
PCR-as (mg/L)	2.3 ± 1.4	2.7 ± 2.9	0,751	-	-

(*) Se muestra el valor de la media ± la desviación estándar.

Abreviación: HbA1c, hemoglobina glicosilada; HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; PCR-as, proteína C reactiva de alta sensibilidad.

3.2 Comparación de las concentraciones de miR-146a y miR-155

El efecto de los tratamientos de metformina y metformina más *L. mutabilis* en las concentraciones séricas de los marcadores inflamatorios miR-146a y miR-155, se midió por qPCR, así como también las concentraciones en el suero del grupo control. Los datos demostraron que al inicio de los tratamientos los valores basales de miR-146a fueron diferentes entre el grupo control y G1 y G2 (Figura 5). Sin embargo, las diferencias fueron significativas sólo entre el grupo control y los valores basales de G2 ($p=0,036$). Las concentraciones de miR-146a se incrementaron luego de 12 semanas de tratamiento en el G2, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. En el G1 no hubo cambios importantes después del tratamiento.

En cuanto a la concentración de miR-155, se observó que los niveles basales del G2 fueron menores que los del grupo control, aunque no fue una diferencia significativa. En cambio, la concentración del G1 fue similar al control. Después de los tratamientos, se observó una reducción en el G1 que no fue significativa. En el G2 no hubo variaciones importantes.

3.3 Correlaciones entre valores antropométricos, química sanguínea y miR-146, miR-155.

Se analizó la presencia de relaciones significativas en valores antropométricos (IMC), tiempo de evolución de la enfermedad, edad, perfil lipídico (Colesterol total, triglicéridos, LDL, HDL), estado de inflamación (PCR) y marcadores de glicemia (glucosa y hbA1c). No se pudo realizar la correlación con el género debido al bajo número de hombres en el estudio. No se encontraron correlaciones significativas.

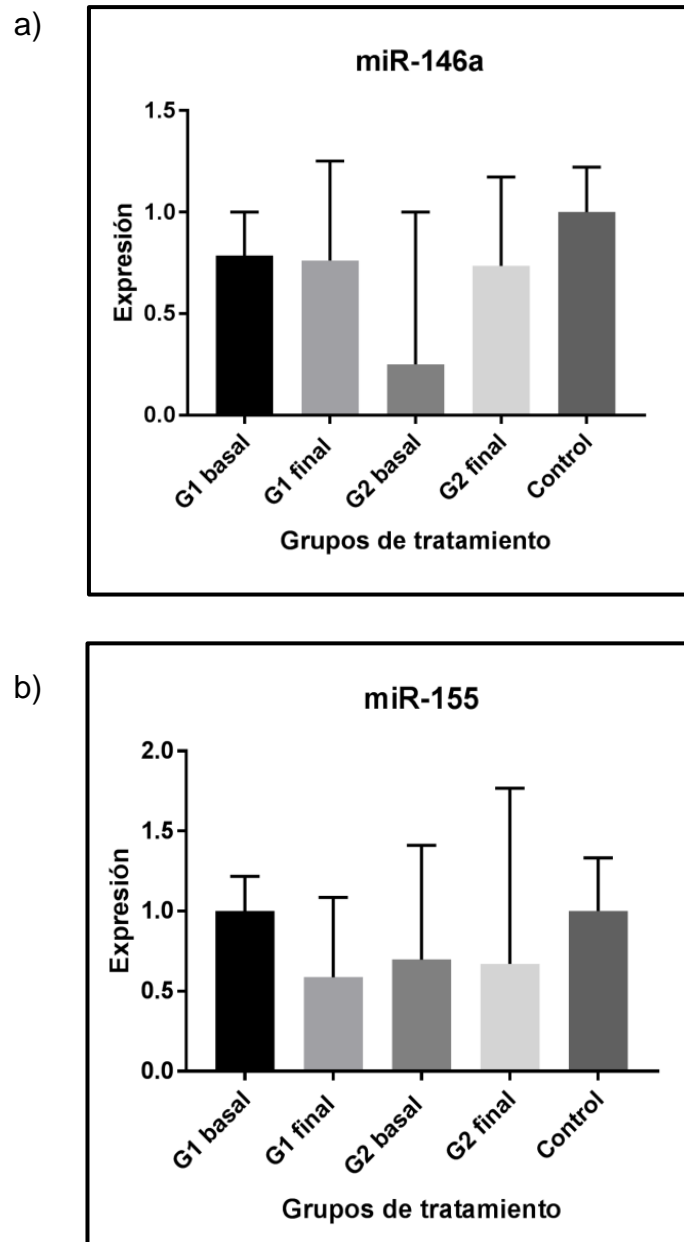


Figura 5. Cantidades de miR-146a y miR-155 en los grupos de tratamiento

a) miR-146a *

b) miR-155 *

(*) Se muestra la mediana \pm rango intercuartil

Abreviación: G1, Tratamiento con Metformina; G2, Tratamiento con Metformina más *L. mutabilis*.

3.4 Correlación entre miR-146a y miR-155

Se encontró una buena correlación entre los niveles de miR-146a y miR-155. El coeficiente de correlación entre los niveles basales de miR-146a y miR-155 en el G1 y G2 fue 0,412 ($p=0,030$) y la correlación entre los valores finales fue 0,446 ($p=0,017$) (Figura 6). Al segmentar el análisis por tratamiento, se encuentra que el G1 tiene un coeficiente de correlación basal alto con miR-146a, de 0,649 ($p=0,012$) y la correlación final tiene un coeficiente de 0,493 ($p=0,062$). Dentro del grupo control no existió correlación entre los microRNAs.

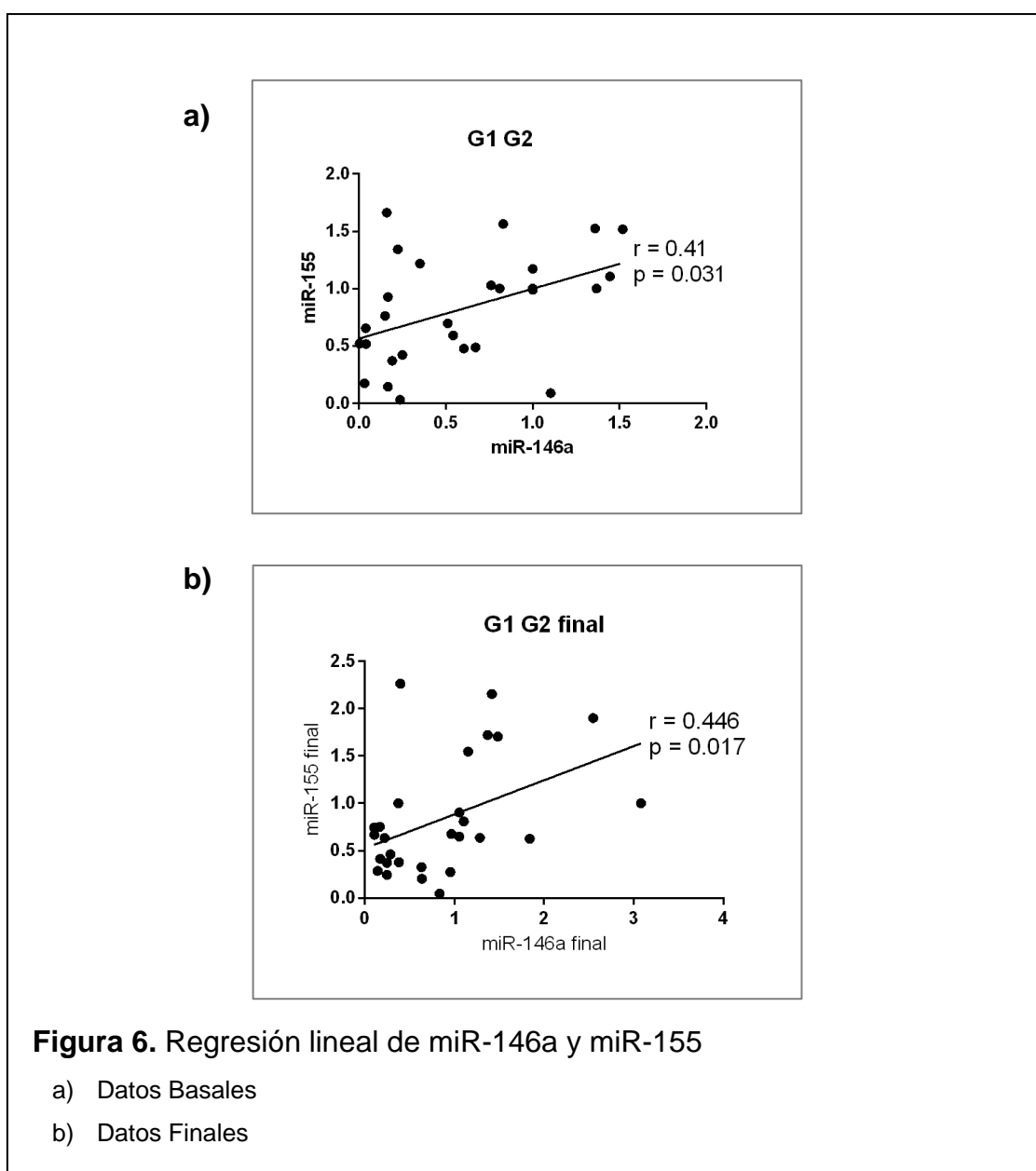


Figura 6. Regresión lineal de miR-146a y miR-155

- a) Datos Basales
- b) Datos Finales

CAPÍTULO IV

4. Discusión

Los datos del presente estudio señalan una tendencia al incremento de miR-146a con el tratamiento del G2. Los datos finales, después del tratamiento del G1, no indicaron cambios importantes. Después del tratamiento del G2, los niveles de miR-146a incrementaron y la diferencia con el grupo control dejó de ser significativa. No obstante, la variación dentro del grupo no alcanzó significancia estadística. Por otra parte, los niveles de miR-155 del grupo control fueron similares al G1, pero no al G2, aunque no fue una diferencia significativa. Después de los tratamientos, en el G1 se encontró una ligera disminución de miR-155 y el G2 no tuvo cambios importantes.

Estudios previos indican que PBMC y suero de sujetos con DMT2 tiene niveles más bajos de miR-146a que las muestras de sujetos sin DMT2 (Balasubramanyam et al., 2010; Corral-Fernández et al., 2013; Baldeón, L., et al., 2014). De manera similar, en este estudio se encontró que las muestras iniciales del G1 y G2 tenían menor concentración de miR-146a que el grupo control; esta diferencia fue estadísticamente significativa en el G2 ($p=0,036$). Al final de las 12 semanas de tratamiento con metformina más *L. mutabilis*, la diferencia con el grupo control dejó de ser significativa, lo que podría señalar la mejoría en las condiciones de este grupo.

En un estudio *in vitro*, se encontró que la metformina disminuye la expresión de miR-146a. Para la investigación, se utilizaron células humanas con cáncer de próstata (PC-3), que fueron tratadas con dosis de 1-5 mM de metformina. El análisis se realizó con microarrays y se encontró que la expresión era dependiente del tiempo y dosis de tratamiento (Avci et al., 2013). Sin embargo, en el presente estudio no se encontraron variaciones significativas de miR-146a después del tratamiento con metformina. Es relevante considerar que las concentraciones de microRNAs son menores en el suero que en las células.

Además, los microRNAs son dependientes del tipo celular. No se encontraron estudios que cuantifiquen miR-146a después del tratamiento de metformina, en tejidos sensibles a la insulina.

Por otra parte, en un estudio realizado en células con cáncer de páncreas, Colo357 y Panc-1, se encontraron niveles menores de miR-146a en comparación con células normales, HPDE. Se aplicaron tratamientos a las células con cáncer, de 25 $\mu\text{m/L}$ de B-DIM o de 25 $\mu\text{m/L}$ de G2535. DIM (3,3'-diindolilmetano) es un compuesto que se encuentra en vegetales crucíferos y se ha asociado a un menor riesgo de desarrollar cáncer, mientras que B-DIM es un compuesto comercial de DIM con mayor biodisponibilidad. G2535 correspondía a una mezcla de isoflavonas, por ejemplo, genisteína. Se reportó que ambos tratamientos incrementan los niveles de miR-146a (Li et al., 2010).

De modo que, del estudio se concluyó que la administración de productos de origen natural puede modificar la expresión de miR-146a. Las isoflavonas son compuestos abundantes en la soya, que también se han identificado en *L. mutabilis* (Li et al., 2010; Ranilla et al., 2009). Esto sugiere que ciertos componentes de *L. mutabilis* podrían incrementar la expresión de miR-146a.

Las leguminosas son ricas en compuestos con propiedades medicinales. Especies del género *Lupinus* tienen alta concentración de flavonoides, los cuales son compuestos con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Šibul et al., 2016). Algunos de los flavonoides más conocidos son las isoflavonas. Se ha reportado que variedades de *L. mutabilis* sweet tienen concentraciones altas de isoflavonas, principalmente genisteína, a diferencia de otras especies como *L. angustifolius* o *L. albus* que no tienen isoflavonas (Ranilla et al., 2009). *L. mutabilis* sweet también tiene en su composición tocoferoles. La suplementación con gama-tocoferol altera los marcadores inflamatorios en sujetos con síndrome metabólico (Devaraj et al. 2008). Esta variación no se registra con el uso de alfa-tocoferol (Devaraj et al. 2008). La concentración de gama-tocoferol en la variedad INIAP-450 es: crudo, $427,00 \pm 0,82$; desamargado, $392,95 \pm 0,86$ ppm (Pastor et al., 2013). Adicionalmente,

se ha reportado actividad antiinflamatoria de hidrolizados protéicos de *L. albus* en pruebas *in vitro* (Millán-Linares et al., 2014). Para el estudio, se aislaron dos hidrolizados proteicos (LPH + 15A y LPH 15A) con dos proteasas: Alcalase 2.4 e Izyme AL. Se incubaron macrófagos THP-1 con LPH + 15 A o LPH 15 A respectivamente, por 6 horas. Se encontró una inhibición significativa de la expresión de TNF. Además, se redujo la expresión de las quimiocinas CCR2 y CCL2 (Millán-Linares et al., 2014). La variedad *L. mutabilis* sweet tiene en su composición un alto contenido de proteína, que según datos del INIAP, se estima en un 45.02% (Caicedo et al., 2010). En la actualidad, se conoce de las propiedades hipoglicemiantes de la proteína gama-conglutina, presente en *L. mutabilis* y en otras especies del género *Lupinus*, pero no existen estudios sobre sus compuestos antiinflamatorios (Bodniza y Almeida, 2014). Los datos señalan que algunos compuestos de *L. mutabilis* sweet podrían ejercer un efecto antiinflamatorio, aunque se necesitan más estudios al respecto. En el presente estudio se encontró una tendencia al incremento de miR-146a en el tratamiento combinado de metformina más *L. mutabilis*. Es posible que este sea un mecanismo molecular que pueda aportar propiedades antiinflamatorias a esta leguminosa.

En lo que se refiere a las variaciones de miR-155, la diferencia entre los niveles basales no fue significativa en relación al grupo control. En un estudio previo se encontró la expresión normal de miR-155 en suero de sujetos con DMT2 (Baldeón, L., et al 2014). De manera diferente, estudios realizados en PBMC de sujetos con DMT2 encuentran una disminución importante de miR-155 (Corral-Fernández et al. 2013). Es posible que las características del grupo control no hayan sido óptimas y esto podría influir en la cuantificación de una diferencia significativa, se discutirá al respecto dentro de las limitaciones del estudio.

En el presente estudio se esperaba encontrar variaciones significativas de miR-155 después de los tratamientos. Sin embargo, en el grupo tratado con metformina se encontró una disminución que no alcanzó a ser significativa y en el grupo con tratamiento combinado no hubo variaciones importantes. Un estudio en el cual se identificaron variaciones de microRNAs después del

tratamiento con metformina por 12 semanas, en plasma de sujetos con DMT2, reporta la disminución significativa de miR-140-5p y miR-222 y el incremento de miR-192 (Ortega et al., 2014). El estudio no es óptimo para realizar una comparación con los resultados de miR-146a, ya que la normalización se realizó con la media geométrica de 4 microRNAs, entre ellos, miR-146a. Sin embargo, es interesante que el grupo de investigación tampoco encontrara diferencias significativas de miR-155.

En la presente investigación se calcularon las correlaciones de las variables antropométricas y de química sanguínea de pacientes recientemente diagnosticados con DMT2, y los microRNAs: miR-146a y miR-155. En el estudio de L. Baldeón y colaboradores también se calculó la correlación entre miR-146, miR-155 y variables clínicas, en pacientes que tenían DMT2 por largo tiempo (Baldeón, L., et. al., 2014). Se esperaba que el tiempo de diagnóstico fuera una variable que influyera en las correlaciones, sin embargo, tampoco se encontraron relaciones significativas. Por otra parte, en el estudio de L. Baldeón y colaboradores se encontró que la correlación entre miR-146a y miR-155 basal fue: $r=0.478$ ($p<0.001$) mientras que en este estudio se encontró: r basal = $0,412$ ($p=0,030$) y r final = $0,446$ ($p=0,017$). La similitud que existe en estos resultados podría indicar que los procedimientos del presente estudio se realizaron correctamente, lo cual genera resultados coherentes con investigaciones previas.

En el presente estudio se identificaron algunas limitaciones que pudieron influir en los resultados obtenidos. En primer lugar, el grupo control (personas sin diabetes) presentó, predominantemente, sobrepeso, además de la alteración de los niveles de colesterol total, LDL y HDL. El desarrollo de inflamación crónica se reporta en sujetos con sobrepeso, por lo cual es difícil realizar una comparación de los marcadores inflamatorios. Las características del grupo control corresponden con la población urbana ecuatoriana, que reporta prevalencia de obesidad y dislipidemia (Freire et al., 2013). Otra limitación fue

el bajo número de participantes, especialmente en el G2, con 15 participantes, de los cuales no se contaba con la química sanguínea de dos.

A partir de este estudio se encontró que el tratamiento con *L. mutabilis* en sujetos con DMT2 podría incrementar los niveles de miR-146a y en consecuencia, actuar como un antiinflamatorio. La normalización en la expresión de miR-146a podría ser una condición deseable en la DMT2, por lo cual sería interesante que estudios posteriores amplíen los resultados de este proyecto.

CAPITULO V

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

El tratamiento de 12 semanas con metformina más *L. mutabilis* indicó una tendencia a mejorar los niveles de miR-146a.

La concentración basal de miR-146a fue menor en sujetos con DMT2 que en el grupo de sujetos sin diabetes.

Si bien la administración de metformina y de metformina más *L. mutabilis* mostró un efecto en la cantidad de miR-146a y miR-155, respectivamente, estas no fueron variaciones significativas.

No se encontró correlación entre variables antropométricas, química sanguínea y los niveles de miR-146a y de miR-155. El análisis de correlación entre miR-146a y miR-155 indica que existe un grado de correlación bueno entre ambos.

5.2 Recomendaciones

En primer lugar, se recomienda en un futuro realizar las pruebas con una población de estudio más grande. También sería recomendable reemplazar el grupo control (sujetos que no tienen diabetes) por un grupo que consista en sujetos recientemente diagnosticados con diabetes, que aún no hayan iniciado un tratamiento farmacológico. El cambio en el grupo control y en la población de estudio podría ilustrar mejor cuál es el efecto anti-inflamatorio de *L. mutabilis*.

En un futuro, será importante incluir además los valores de citocinas inflamatorias en los sujetos de estudio para determinar una relación con las concentraciones de miR-146a.

Tomando en cuenta que en la DMT2 el aumento de la inflamación es progresivo y se evidencia desde etapas previas al desarrollo de la enfermedad, también sería interesante determinar si miR-146a podría actuar como un marcador que señale el riesgo de desarrollar diabetes. Además, se podría determinar en qué medida *Lupinus mutabilis* sweet ayudaría a revertir la inflamación en etapas iniciales, donde el proceso inflamatorio es menos intenso.

REFERENCIAS

- Avci, C. B., Harman, E., Dodurga, Y., Susluer, S. Y., y Gunduz, C. (2013). Therapeutic potential of an anti-diabetic drug, metformin: alteration of miRNA expression in prostate cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(2), 765-768.
- Badawi, A., Klip, A., Haddad, P., Cole, D. E., Bailo, B. G., El-Soheemy, A., y Karmali, M., (2010). Type 2 diabetes mellitus and inflammation: Prospects for biomarkers of risk and nutritional intervention. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 3, 173-186.
- Bailey, C. J., y Day, C. (2004). Metformin: its botanical background. *Practical Diabetes International*, 21(3), 115-117.
- Balasubramanyam, M., Aravind, S., Gokulakrishnan, K., Prabu, P., Sathishkumar, C., Ranjani, H., y Mohan, V. (2011). Impaired miR-146a expression links subclinical inflammation and insulin resistance in Type 2 diabetes. *Molecular and cellular biochemistry*, 351(1-2), 197-205.
- Baldeón, L., Weigelt, K., de Wit, H., Ozcan, B., van Oudenaren, A., Sempértegui, F., Sijbrands, E., Grosse, L., Freire, W., Drexhage, H. A., y Leenen, P. J. (2014). Decreased serum level of miR-146a as sign of chronic inflammation in type 2 diabetic patients. *PLoS One*, 9(12), e115209.
- Baldeón, M. E., Castro, J., Villacrés, E., Narváez, L., y Fornasini, M. (2012). Hypoglycemic effect of cooked lupinus mutabilis and its purified alkaloids in subjects with type-2 diabetes. *Nutr Hosp*, 27(4), 1261-1266.
- Bastard, J. P., Maachi, M., van Nhieu, J. T., Jardel, C., Bruckert, E., Grimaldi, A., ... y Hainque, B. (2002). Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo

and in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(5), 2084-2089.

Bodniza, E., y Almeida E. (2014). *Identificación de la Presencia, Determinación de Polimorfismos y Medición de la Expresión Relativa del Gen Gamma-Conglutina en Lupinus Mutabilis*. (Tesis de pregrado). Universidad de las Américas, Quito, Ecuador.

Brase, J. C., Wuttig, D., Kuner, R., y Sültmann, H. (2010). Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Molecular cancer*, 9(1), 1.

Caicedo V., C., Murillo I., A., Pinzon Z., J., Peralta I., E., y Rivera M., M. (2010). *INIAP-450 Andino: Variedad de chocho (Lupinus mutabilis Sweet)*. Recuperado el 21 de mayo del 2016 de <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2584>

Carthew, R. W., y Sontheimer, E. J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642-655.

Carvajal-Larenas, F. E., Linnemann, A. R., Nout, M. J. R., Koziol, M., y Van Boekel, M. A. J. S. (2016). Lupinus mutabilis: Composition, Uses, Toxicology, and Debittering. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(9), 1454-1487.

Castañeda, C. B., Manrique, M. R., Ibáñez, V. L., Gamarra, C. F., Galan, L. D., y Quispe, H. P. (2002). Evaluación del Efecto Antiinflamatorio del Extracto Acuoso de las Semillas de Lupinus mutabilis Sweet (Tarwi, Chocho), en Animales de Experimentación. *Revista Horizonte Médico*.

Ceppi, M., Pereira, P. M., Dunand-Sauthier, I., Barras, E., Reith, W., Santos, M. A., y Pierre, P. (2009). MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(8), 2735-2740.

- Corral-Fernández, N. E., Salgado-Bustamante, M., Martínez-Leija, M. E., Cortez-Espinosa, N., García-Hernández, M. H., Reynaga-Hernández, E., Quesada-Calvillo, R., y Portales-Perez, D. P. (2013). Dysregulated miR-155 expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with type 2 diabetes. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 121(06), 347-353.
- Creemers, E. E., Tijssen, A. J., y Pinto, Y. M. (2012). Circulating microRNAs novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease?. *Circulation research*, 110(3), 483-495
- Davis, B. N., y Hata, A. (2009). Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Communication and Signaling*, 7(1), 1.
- Devaraj, S., Leonard, S., Traber, M. G., y Jialal, I. (2008). Gamma-tocopherol supplementation alone and in combination with alpha-tocopherol alters biomarkers of oxidative stress and inflammation in subjects with metabolic syndrome. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(6), 1203-1208.
- Donath, M. Y., Schumann, D. M., Faulenbach, M., Ellingsgaard, H., Perren, A., y Ehse, J. A. (2008). Islet Inflammation in Type 2 Diabetes From metabolic stress to therapy. *Diabetes care*, 31(Supplement 2), S161-S164.
- Donath, M. Y., y Shoelson, S. E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(2), 98-107.
- Faraoni, I., Antonetti, F. R., Cardone, J., & Bonmassar, E. (2009). miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1792(6), 497-505.
- Fernandez-Real, J. M., y Pickup, J. C. (2008). Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 19(1), 10-16.

- Federación Internacional de la Diabetes (FID). (2015). IDF Diabetes Atlas, 7th edition. Recuperado el 2 de marzo del 2016 de <http://www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html>
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., y Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. *Nature Reviews Genetics*, 9(2), 102-114.
- Freire W.B., Ramirez MJ., Belmont P., Mendieta MJ., Silva MK., Romero N., Sáenz K., Piñeiros P., Gómez LF., y Monge R. (2013). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición Ecuador. ENSANUT_ECU 2011-2013*. Ministerio de Salud Pública/Instituto Nacional de Estadística y Censos. Recuperado de: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_Sociales/ENSANUT/MSP_ENSANUT-ECU_06-10-2014.pdf
- Fornasini, M., Castro, J., Villacrés, E., Narváez, L., Villamar, M., y Baldeón, M. E. (2012). Efecto hipoglicemiante de *Lupinus mutabilis* en voluntarios sanos y sujetos con disglucemia. *Nutrición Hospitalaria*, 27(2), 425-433.
- Ghatak S., y Sen CK. (2015) MicroRNA Biogenesis in Regenerative Medicine. Sen CK (Ed.), *MicroRNA in Regenerative Medicine* (pp. 3-46).
- Gilad, S., Meiri, E., Yogev, Y., Benjamin, S., Lebanony, D., Yerushalmi, N., ... y Bentwich, Z. (2008). Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PloS one*, 3(9), e3148.
- Goldfine, A. B., Fonseca, V., Jablonski, K. A., Chen, Y. D. I., Tipton, L., Staten, M. A., y Shoelson, S. E. (2013). Salicylate (salsalate) in patients with type 2 diabetes: a randomized trial. *Annals of internal medicine*, 159(1), 1-12.

- Goldfine, A. B., Fonseca, V., y Shoelson, S. E. (2011). Therapeutic approaches to target inflammation in type 2 diabetes. *Clinical chemistry*, 57(2), 162-167.
- Grasedieck, S., Sorrentino, A., Langer, C., Buske, C., Döhner, H., Mertens, D., y Kuchenbauer, F. (2013). Circulating microRNAs in hematological diseases: principles, challenges, and perspectives. *Blood*, 121(25), 4977-4984.
- Ha, M., y Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(8), 509-524.
- Hamzah, M. M. (2011). Evaluation of Topical Preparations Containing Curcuma, Acacia and Lupinus Extracts as an Anti-inflammatory Drugs. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 4(2), 19-23.
- Hidalgo, A. (2015). *Eficacia de la Adición de Lupinus Mutabilis Sweet al Tratamiento Convencional de Metformina en el Control de la Diabetes Mellitus Tipo 2*. (Tesis de pregrado). Universidad de las Américas, Quito, Ecuador.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., y Spiegelman, B. M. (1993). Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Science*, 259, 87-87.
- Hu, F. B., Meigs, J. B., Li, T. Y., Rifai, N., y Manson, J. E. (2004). Inflammatory markers and risk of developing type 2 diabetes in women. *Diabetes*, 53(3), 693-700.
- Hussain, M. U. (2012). Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. *Cell and tissue research*, 349(2), 405-413.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC). (2013). Diabetes y enfermedades hipertensivas entre las principales causas de muerte

en el 2013. Recuperado el 11 de noviembre del 2015 de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/diabetes-y-enfermedades-hipertensivas-entre-las-principales-causas-de-muerte-en-el-2013/>

- Islas A. S., y Lifshitz G. A. (2009) *Diabetes mellitus* (2^a. ed.). México, D.F., MX: McGraw-Hill Interamericana.
- Jacobsen, S. E., y Mujica, A. (2006). El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. *Botánica Económica de los andes centrales*, 28, 458-482.
- Kim, V. N., Han, J., y Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(2), 126-139.
- Kirpichnikov, D., McFarlane, S. I., y Sowers, J. R. (2002). Metformin: an update. *Annals of internal medicine*, 137(1), 25-33.
- Kroh, E. M., Parkin, R. K., Mitchell, P. S., & Tewari, M. (2010). Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*, 50(4), 298-301.
- Li, Y., VandenBoom, T. G., Wang, Z., Kong, D., Ali, S., Philip, P. A., y Sarkar, F. H. (2010). miR-146a suppresses invasion of pancreatic cancer cells. *Cancer research*, 70(4), 1486-1495.
- Millán-Linares, M. del Carmen., Bermúdez B. del Mar., Yust, M., Millán, F., y Pedroche, J. (2014). Anti-inflammatory activity of lupine (*Lupinus angustifolius* L.) protein hydrolysates in THP-1-derived macrophages. *Journal of Functional Foods*, 8, 224-233.
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., ... y Lin, D. W. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(30), 10513-10518.

- Moldovan, L., Batte, K. E., Trgovcich, J., Wisler, J., Marsh, C. B., y Piper, M. (2014). Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *Journal of cellular and molecular medicine*, 18(3), 371-390.
- Nair, V. S., Pritchard, C. C., Tewari, M., y Ioannidis, J. P. (2014). Design and analysis for studying microRNAs in human disease: a primer on-omic technologies. *American journal of epidemiology*, 180(2), 140-152.
- Neilsen, P. M., Noll, J. E., Mattiske, S., Bracken, C. P., Gregory, P. A., Schulz, R. B., ... y Callen, D. F. (2013). Mutant p53 drives invasion in breast tumors through up-regulation of miR-155. *Oncogene*, 32(24), 2992-3000.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2014) *Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles*. Recuperado el 6 de febrero del 2016 de <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/es/>
- Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS). (2010). *Estudio de prevalencia de la Diabetes tipo 2 y sus factores de riesgo. Reporte Técnico*. Recuperado el 1 de junio del 2016 de <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/168243/1/fep003172.pdf>
- Ortega, F. J., Mercader, J. M., Moreno-Navarrete, J. M., Rovira, O., Guerra, E., Esteve, E., ... y Rome, S. (2014). Profiling of circulating microRNAs reveals common microRNAs linked to type 2 diabetes that change with insulin sensitization. *Diabetes care*, 37(5), 1375-1383.
- Pastor, G., Quelal, M. B., Zambrano, I., Morales, S. H., y Villacrés, E. (2013). Effect of processing on the content of fatty acids, tocopherols and sterols in the oils of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), lupine (*Lupinus mutabilis* Sweet), amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) and

sangorache (*Amaranthus quitensis* L.). *Journal of Food Science and Technology*, 2(4), 44-53.

Ranilla, L. G., Genovese, M. I., y Lajolo, F. M. (2009). Isoflavones and antioxidant capacity of Peruvian and Brazilian lupin cultivars. *Journal of food composition and analysis*, 22(5), 397-404.

Rodríguez, D., Vega, L., Murillo, A., Peralta, E., (2013) Identificación de fuentes de resistencia a la antracnosis (*Colletotrichum acutatum*) del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) en el banco de germoplasma del INIAP. [diapositivas de power point]. Recuperado el 12 de julio del 2016 de <http://balcon.magap.gob.ec/mag01/magapaldia/2013/IV%20Congreso%20Mundial%20de%20la%20Quinoa/A.%20Salas%20tem%20E1tica/s/Sala%202%20Mejoramiento%20gen%20E9tico%20y%20semillas/Martes%209%20de%20julio%202013/20.%20Presentaci%20n%20de%20Diego%20Rodr%20guez%20-%20Ecuador.pdf>

Rugeles, M. T., Patiño, P. J., y Montolla, C. (Eds.) (2009). *Inmunología. Una ciencia activa*. 2°. Ed.). Recuperado el 4 de abril del 2016 de books.google.es/books?isbn=9587142306

Saisho, Y. (2015). Metformin and inflammation: Its potential beyond glucose-lowering effect. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 15(3), 196-205.

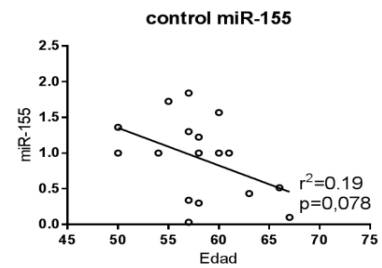
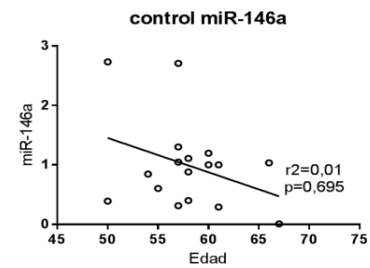
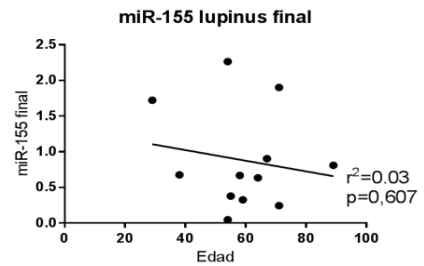
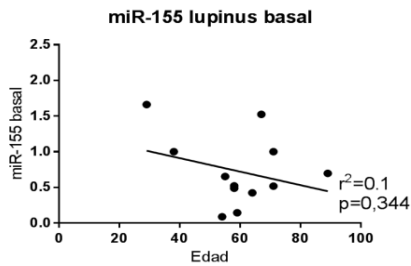
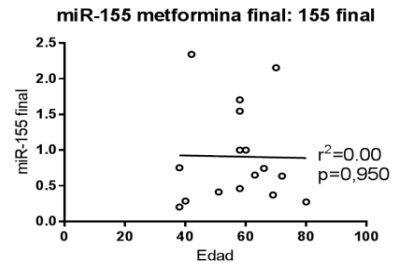
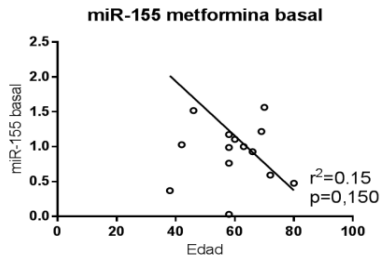
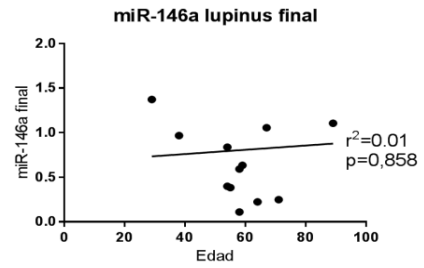
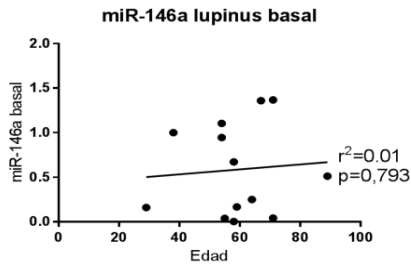
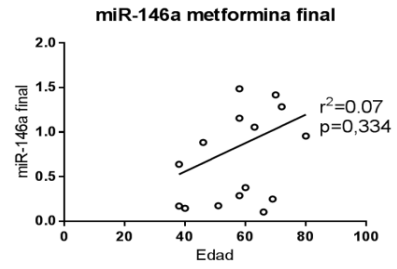
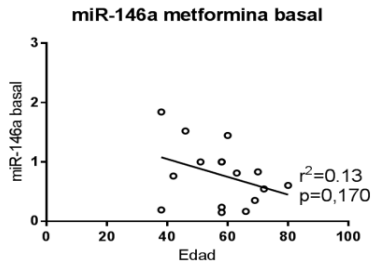
Salazar Álvarez, Y. (2011). Uso de la metformina en la diabetes mellitus tipo II. *Revista Cubana de Farmacia*, 45(1), 157-166.). Uso de la metformina en la diabetes mellitus tipo II. *Revista Cubana de Farmacia*, 45(1), 157-166.

Šibul, F., Orčić, D., Vasić, M., Anačkov, G., Nađpal, J., Savić, A., y Mimica-Dukić, N. (2016). Phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory potential of herb and root extracts of seven selected legumes. *Industrial Crops and Products*, 83, 641-653.

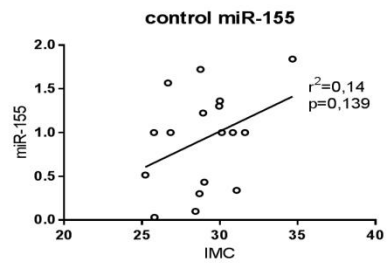
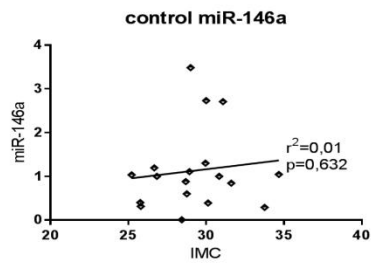
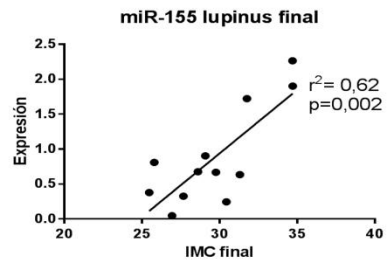
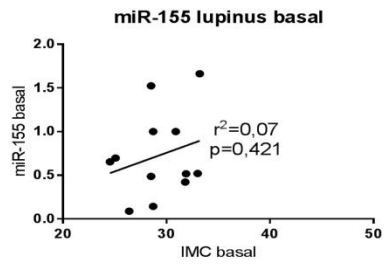
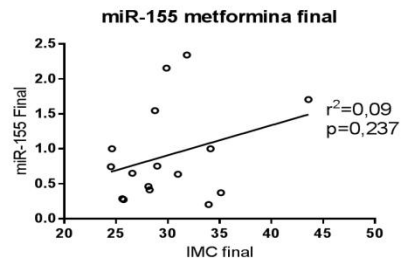
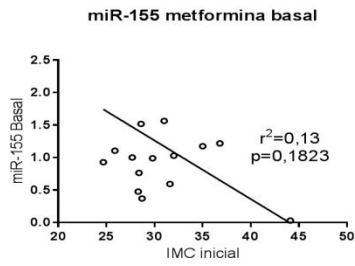
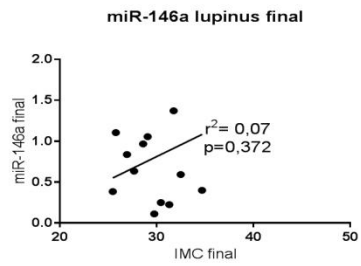
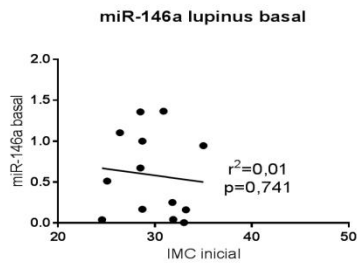
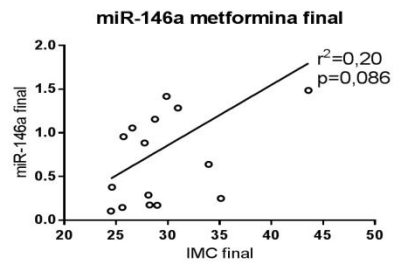
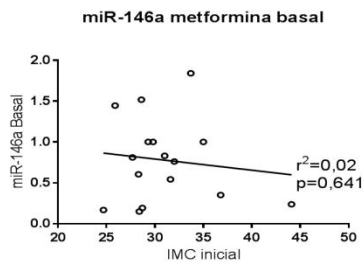
- Spranger, J., Kroke, A., Möhlig, M., Hoffmann, K., Bergmann, M. M., Ristow, M., ... y Pfeiffer, A. F. (2003). Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes*, 52(3), 812-817.
- Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J., y Baltimore, D. (2006). NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33), 12481-12486.
- Williams, A. E., Perry, M. M., Moschos, S. A., Lerner-Svensson, H. M., y Lindsay, M. A. (2008). Role of miRNA-146a in the regulation of the innate immune response and cancer. *Biochemical Society Transactions*, 36(6), 1211-1215.

ANEXOS

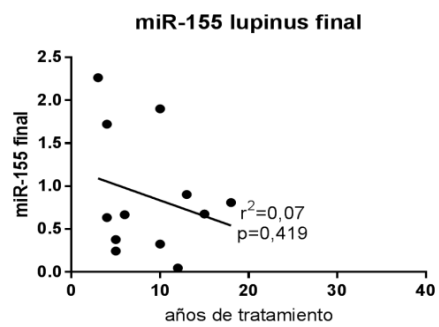
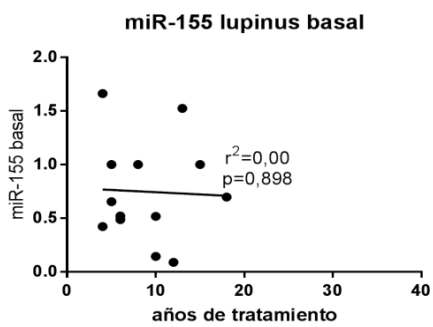
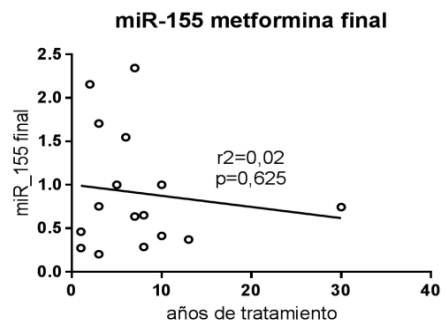
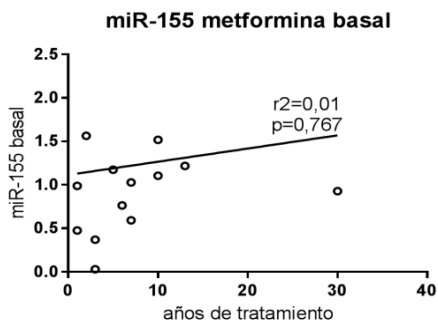
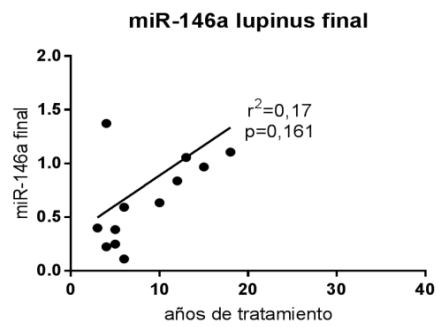
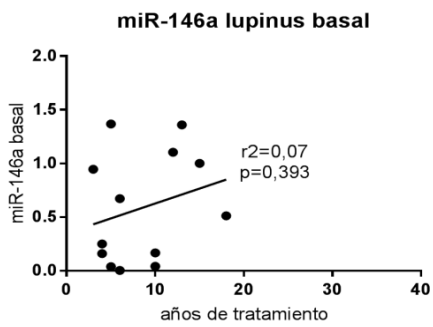
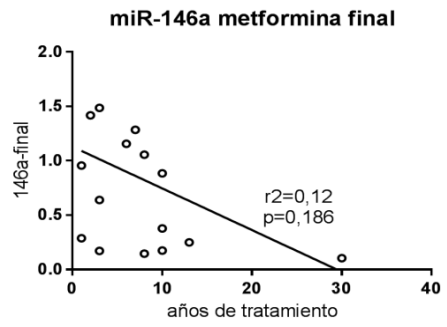
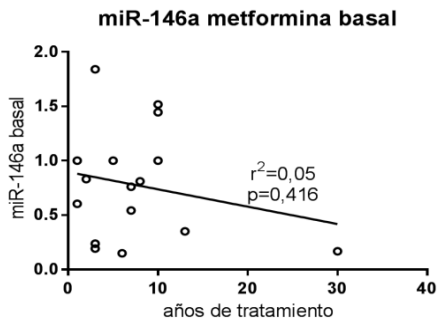
Relación con edad



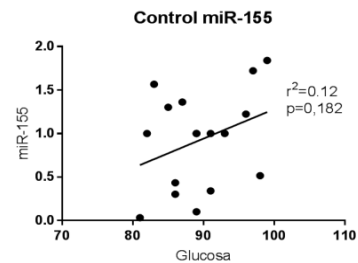
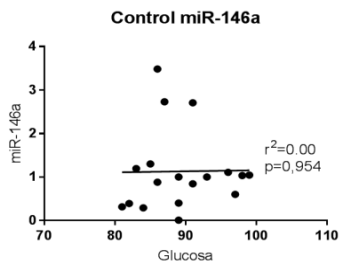
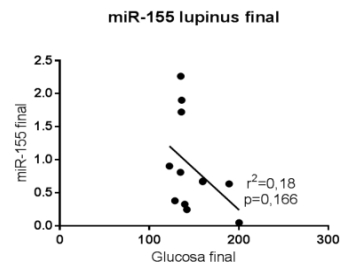
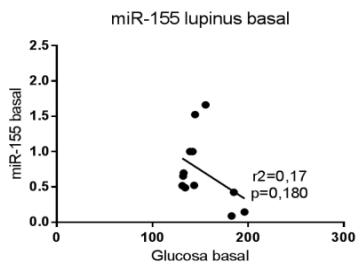
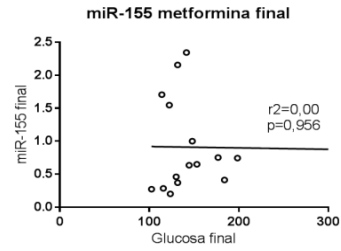
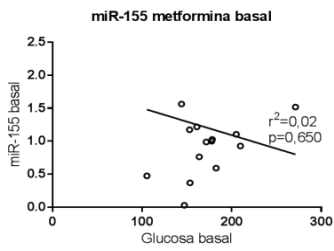
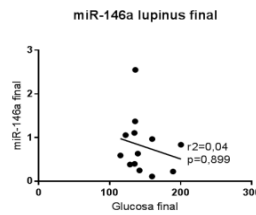
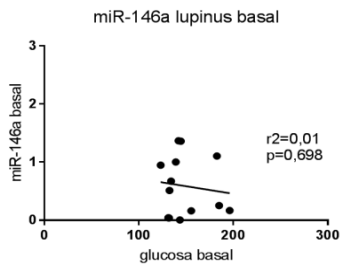
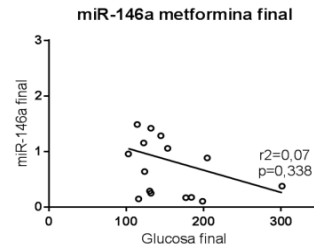
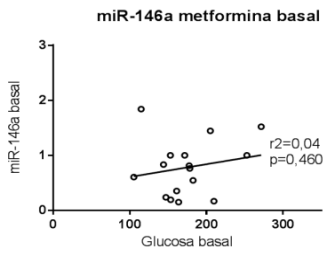
Relación con Índice de masa corporal (IMC)



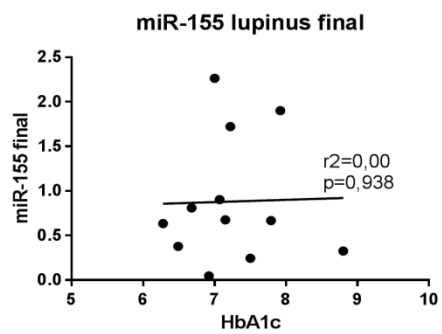
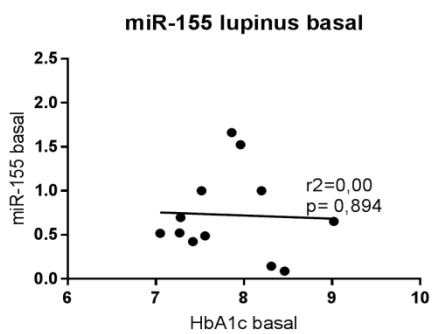
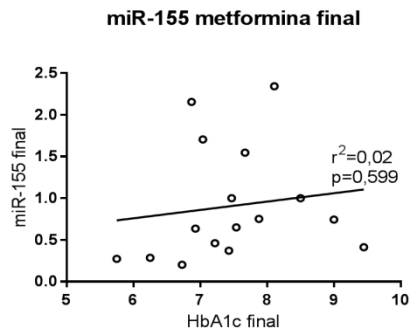
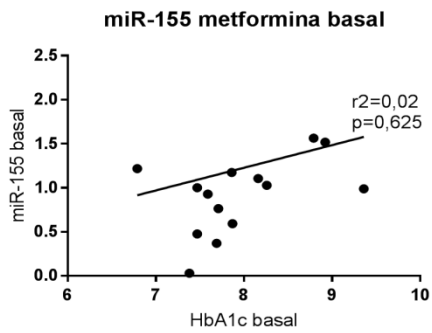
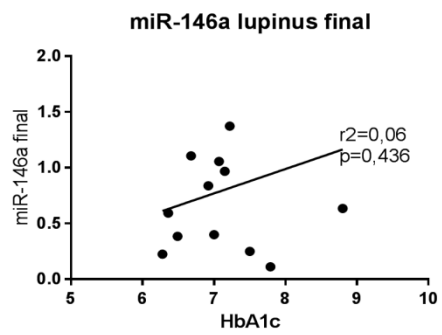
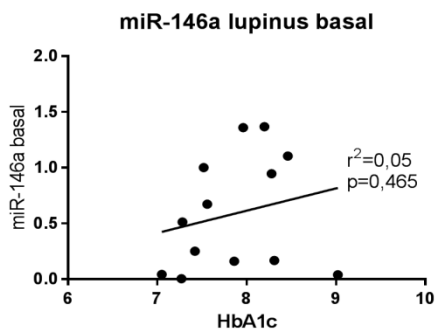
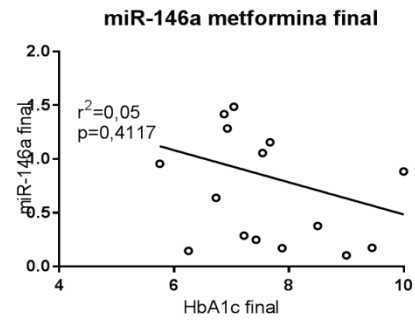
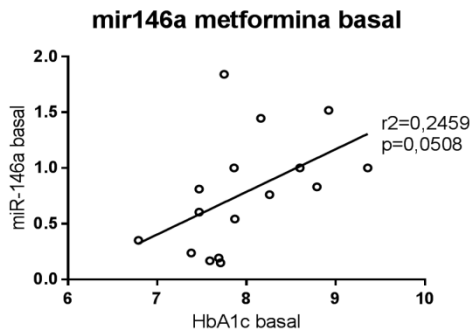
Relación con años de tratamiento



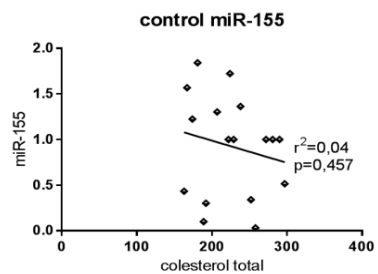
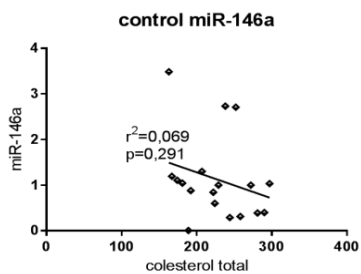
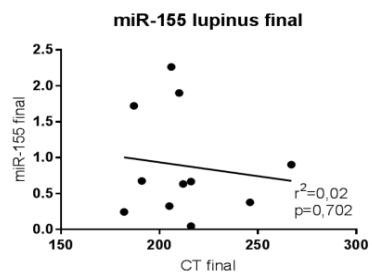
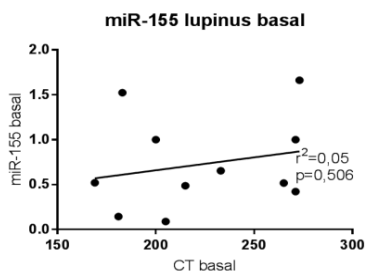
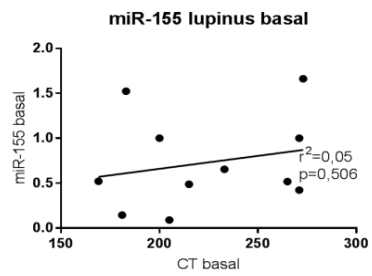
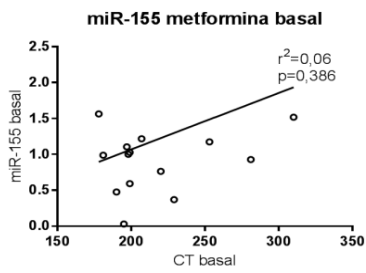
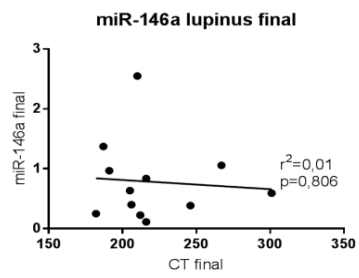
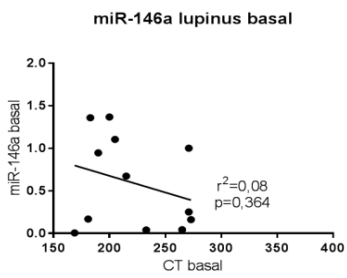
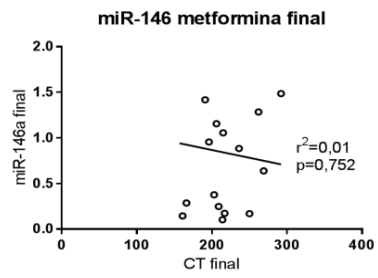
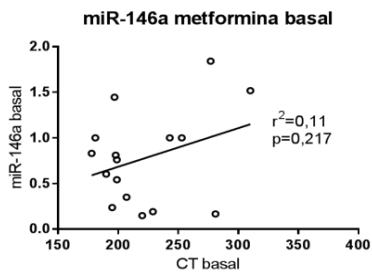
Relación con glucosa



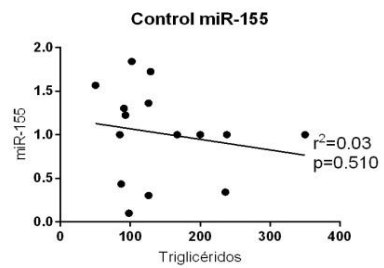
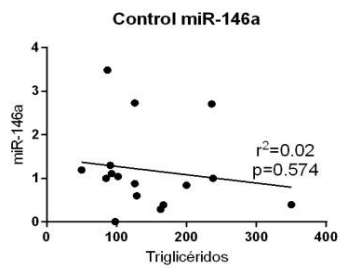
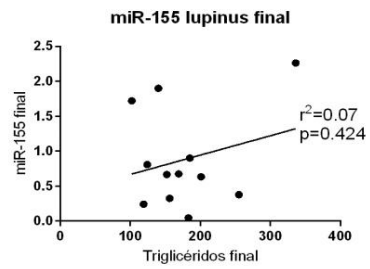
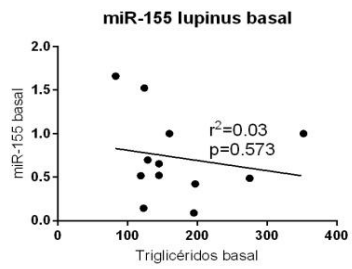
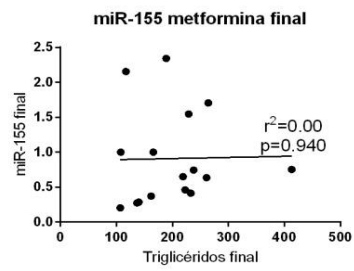
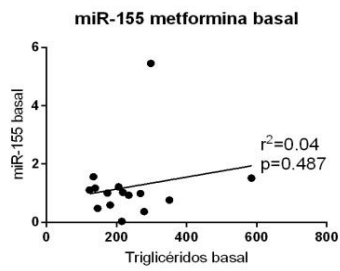
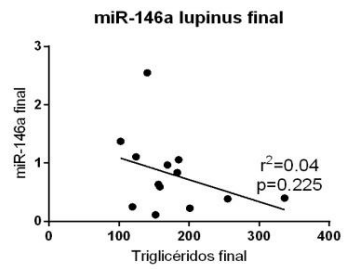
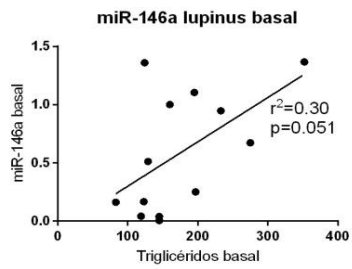
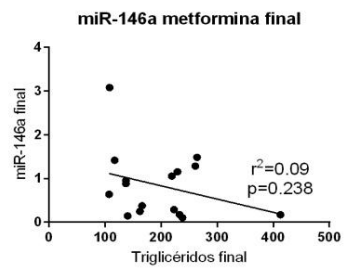
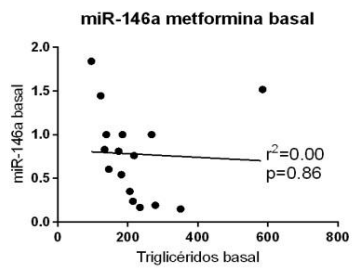
Relación con HbA1c



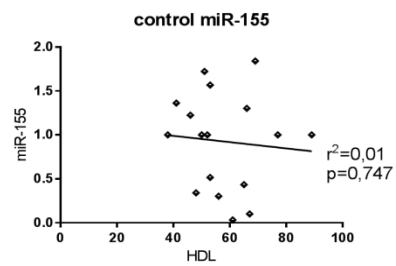
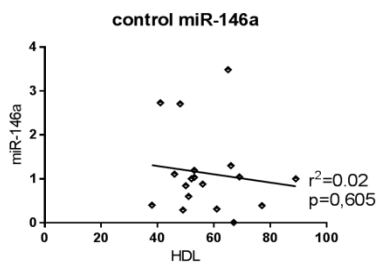
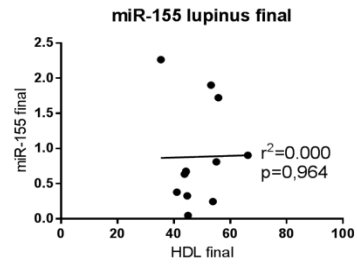
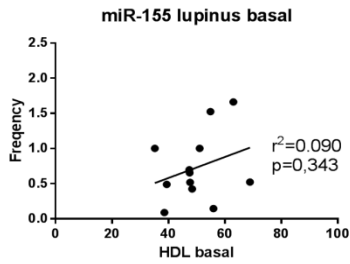
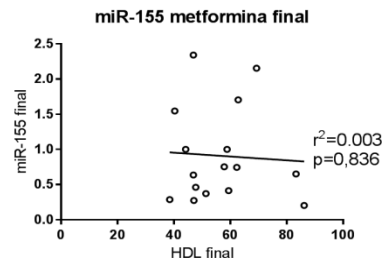
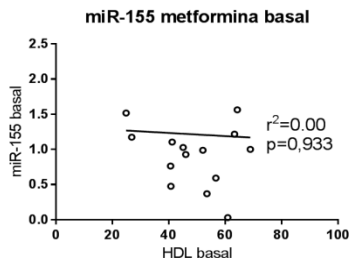
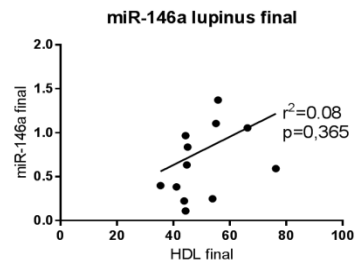
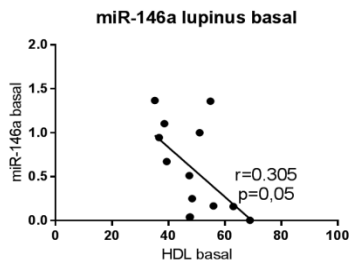
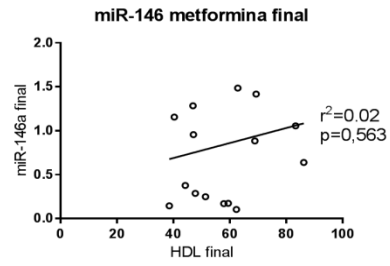
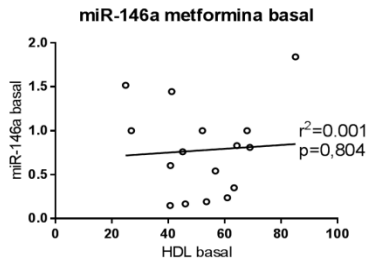
Relación con colesterol total (CT)



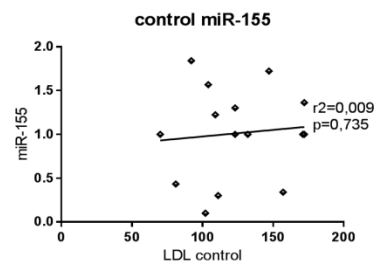
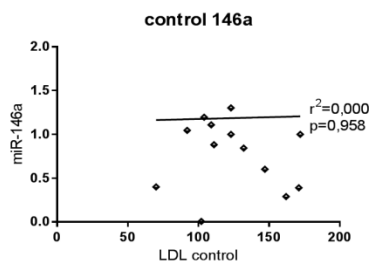
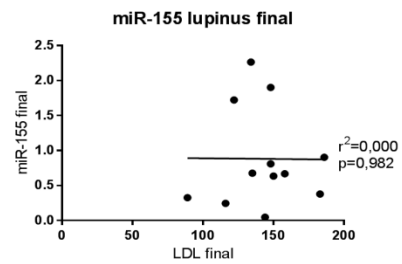
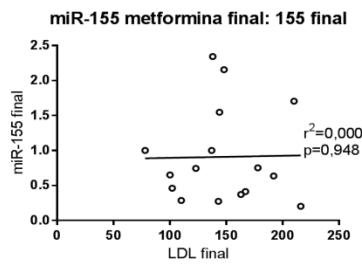
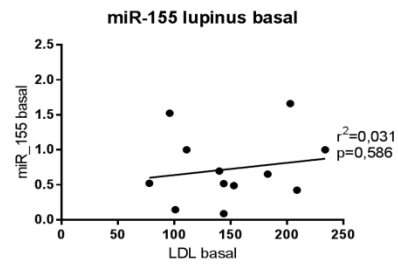
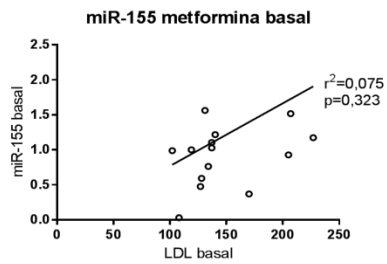
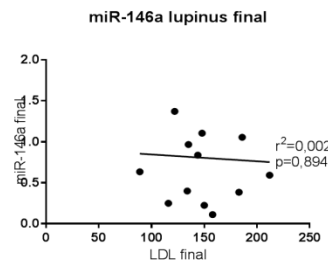
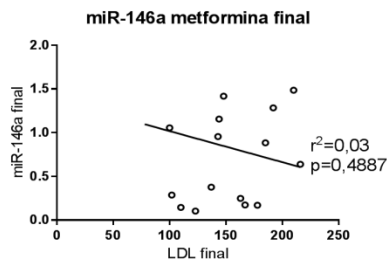
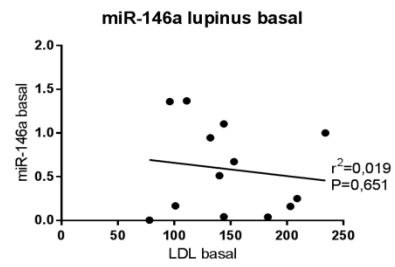
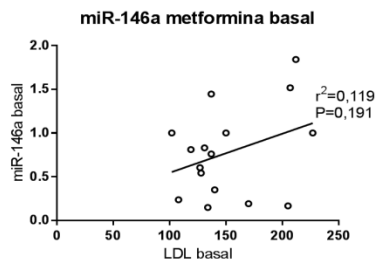
Relación con triglicéridos



Relación con HDL



Relación con LDL



Relación con proteína C reactiva (PCR)

