



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

Determinación de la Expresión Génica de IRGM y
AGR2 en Pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica
Idiopática (CUCI).

T E S I S

Que para obtener el título de

Licenciada en Nutrición

P R E S E N T A

Ana Elena Peredo Escárcega

Bajo la Dirección de:

Dr. Jesús Kazuo Yamamoto Furusho



Pachuca, Hgo., a 10 septiembre del 2012



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**



De acuerdo con el artículo 134 del Reglamento de Control Escolar vigente, el jurado de examen recepcional designado, autoriza para su impresión la Tesis titulada

"Determinación de la Expresión Génica del IRGM y AGR2 en Pacientes con Colitis Ulcerosa Idiopática (CUCI)."

Que para obtener el Título de Licenciado de Nutrición sustentan la Pasante

C. Ana Elena Peredo Escárcega.

**ATENTAMENTE
Pachuca, Hidalgo, 10 de Septiembre del 2012
"Amor, Orden y Progreso"**

PRESIDENTE	M. EN N.H. AMANDA PEÑA IRECTA
SECRETARIO	M. EN H.H. ZULI CALDERÓN RAMOS
PRIMER VOCAL	DRA. RAQUEL CARIÑO CORTES
SEGUNDO VOCAL	DR. LUIS DELGADO OLIVARES
TERCER VOCAL	DR. JESÚS KAZUO YAMAMOTO FURUSHO
PRIMER SUPLENTE	DRA. GUADALUPE LÓPEZ RODRÍGUEZ
SEGUNDO SUPLENTE	QFB. ZURISADDAI BETANZOS CABRERA

Dedicatoria y Agradecimientos

A dios, porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar.

A mis padres, por estar siempre en los momentos importantes de mi vida, por ser el ejemplo para salir adelante y por los consejos que han sido de gran ayuda para mi vida y crecimiento. Es por ello que hoy les dedico este trabajo de tesis. Gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de culminar esta etapa de mi vida.

A mis abuelos, quienes participaron directa o indirectamente de mi formación, sin su apoyo e inspiración no habría sido posible.

A mis hermanos Raúl, Ricardo, Rodrigo y Mariana, que con su amor me han enseñado a salir adelante. Gracias por su paciencia, gracias por preocuparse por mí, gracias por compartir sus vidas, pero sobretodo, gracias por estar en otro momento importante en mi vida.

Al Dr. Kazuo Yamamoto, por aceptar ser mi director de tesis y jefe durante el servicio social, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua de este trabajo.

A la Dra. y amiga Gabriela Fonseca, con la que me encuentro en deuda por el ánimo infundido, las sugerencias a mi trabajo y confianza en mi depositada.

A mis amigos, Héctor B, Jorgito, Emmanuel, Karen, Ely, a los que he robado horas de compañía, gracias por estar ahí.

A mis catedráticos de la carrera por el tiempo invertido, por su paciencia, por los conocimientos transmitidos.

ÍNDICE

1. RESUMEN	6
2. MARCO TEÓRICO	11
2.1 ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	11
2.1.1 Definición	11
2.2 Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI)	12
2.2.1 Definición	12
2.2.2 Características Clínicas de la CUCI	12
2.2.3 Tratamiento.....	18
2.2.4 Complicaciones	17
2.2.5 Manifestaciones extraintestinales	17
2.2.6 Etiopatogenia	20
2.3 Estrés de retículo endoplásmico (RE)	26
2.3.1 AGR2 (Anterior Gradient 2)	27
2.4 Autofagia	31
2.4.1 IRGM (Immunity-related GTPase family, M)	33
3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	35
4. JUSTIFICACIÓN	36
5. OBJETIVO GENERAL	37
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	37
7. HIPÓTESIS.....	38
8. METODOLOGÍA.....	39
9. RESULTADOS	46
9.1 Características clínicas y demográficas	46
9.2 Integridad del ARN total.....	46
9.3 Niveles de expresión del gen de IL-6, como marcador de inflamación.....	48
9.4 Expresión del gen AGR2.	49
9.4.1 Asociación de expresión de AGR2 con características clínicas de la enfermedad.....	49
9.5 Expresión de IRGM.	52

9.5.1 Asociación de los niveles de expresión de IRGM con características clínicas de la enfermedad.	53
10. DISCUSIÓN.....	55
11. CONCLUSION	60
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
13. CRONOGRAMA.....	66
14. ANEXOS	67

LISTA DE ABREVIATURAS

1	ADN	Ácido desoxirribonucleico
2	AGR2	Anterior Gradient 2
3	AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
4	ANAs	Anticuerpos antinucleares
5	ARN	Ácido ribonucleico
6	ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
7	ATF6- α	Factor de transcripción de activación 6
8	ATG	Autofagia
9	ATG12	Miembro de la familia de autofagia-12
10	CCNY	Ciclina Y
11	CDH1	Caderina 1
12	CUCI	Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática
13	DAP	Proteína asociada a muerte
14	DSS	Dextran Sulfato de Sodio
15	EC	Enfermedad de Crohn
16	ECM1	Proteína de matriz extracelular
17	EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
18	ERK	Tirosina quinasa relación-elk
19	FOXA1	Forkhead box A1
20	FOXA2	Forkhead box A2
21	FOXA3	Forkhead box A3
22	GTPasa	Guanosina trifosfatasa
23	HNF4	Factor nuclear de hepatocito 4
24	IgA	Inmunoglobulina A
25	IgG	Inmunoglobulina G
26	IgM	Inmunoglobulina M
27	IL-10	Interleucina 10
28	IL-12	Interleucina 12
29	IL-12 β	Interleucina 12- β

30	IL-13	Interleucina 13
31	IL-13R	Receptor de Interleucina 13
32	IL-17R	Receptor de Interleucina 17
33	IL-1 β	Interleucina 1 β
34	IL-23	Interleucina 23
35	IL-5	Interleucina 5
36	IL-6	Interleucina 6
37	INF- γ	Interferón γ
38	IRE1- α	Requeridor de inositol1- α
39	IRES	Elementos de respuesta sensibles a interferón
40	IRF5	Factor regulador interferón 5
41	IRGM	Immunity-related GTPase family, M
42	kDa	Kilodalton
43	LAMB1	Laminin beta1
44	LC3	Light chain3
45	LPS	Lipopolisacárido
46	LRG47	Otro nombre con el que se conoce a IRGM
47	MAP1LC3	Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (o LC3)
48	MeV	Virus measles
49	MHC-II	Complejo principal de histocompatibilidad II
50	MTOR	Mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)
51	MUC2	Mucina 2
52	NKX2-3	NK2 factor de transcripción relacionado
53	NLR	Nod like receptor
54	p-ANCAS	anticuerpo antineutrófilo citoplasmático perinuclear
55	PCR-Tiempo real	Reacción de Cadena de la Polimerasa tiempo real
56	PDI	Proteindisulfuro isomerasa
57	PRR	Receptores de reconocimiento de patrón
58	PTPN2	Proteina tirosina fosfatasa, no receptor tipo2
59	RE	Retículo endoplásmico

60	RT-PCR	Retrotranscripción en Reacción de Cadena de la Polimerasa
61	SLC22A5	Miembro 5 de familia acarreadora de soluto 22
62	SNP	Single nucleotide Polymorphisms
63	SPEDF	SAM-pointed domain-containing Ets-like factor
64	STAT-3	Traductor de señales y activador de transcripción 3
65	TGF- β	Factor de crecimiento tumoral β
66	Th1	Células T cooperadoras 1
67	Th2	Células T cooperadoras 2
68	TLRs	Toll Like Receptors
69	TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral- α
70	TRAF2	Factor Asociado a Receptor de TNF
71	Treg	Células T reguladoras
72	UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
73	VHC	Virus de hepatitis C
74	VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
75	VSG	Velocidad de sedimentación globular
76	ZNF365	Zinc Finger Protein 365

1. RESUMEN

Antecedentes: Los factores genéticos juegan un papel importante en la patogénesis de la Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI). El gen AGR2 (Anterior Gradient 2) codifica para una disulfuro isomerasa, encargada del plegamiento de proteínas en retículo endoplásmico (RE). Por otro lado, IRGM (Immunity-related GTPase family, M) codifica una guanosina trifosfatasa, que regula el proceso de autofagia, la eliminación de microorganismos intracelulares y el reciclaje de organelos. Se han asociado algunas variantes genéticas de AGR2 e IRGM con incremento del riesgo de Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

Objetivo: Determinar los niveles de expresión génica de AGR2 e IRGM en pacientes con CUCI.

Metodología: Se incluyeron 60 pacientes con diagnóstico confirmado de CUCI (30 activos, 30 remisión) y 30 controles que no presentaran datos de ningún tipo de colitis (infecciosa, post radiación, isquémica). A partir de tejido intestinal se extrajo el ARN total, se obtuvo ADN de cadena complementaria mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la cuantificación relativa de la expresión se realizó a través de PCR en tiempo real. El análisis estadístico se realizó con la prueba t de Student para muestras independientes y la correlación de Pearson para la asociación de características clínicas de la enfermedad y la expresión del gen, con el programa SPSS versión 17.

Resultados: Se observó incremento de la expresión del gen AGR2 en mucosa rectal de pacientes con CUCI en actividad en comparación con controles ($p=0.002$) y remisión ($p=0.041$). La expresión del gen IRGM fue mayor en mucosa rectal de pacientes con CUCI en remisión, en comparación con controles sanos ($p=0.013$) y activos ($p=0.012$). Se encontró asociación de la expresión génica de IRGM con la respuesta al tratamiento médico convencional ($p=0.01$).

Conclusión: La expresión del gen de AGR2 está aumentada en pacientes con CUCI activo, por lo que podría estar involucrado en el estrés del retículo endoplásmico de células epiteliales colónicas. La expresión génica de IRGM está aumentada en pacientes CUCI en remisión, lo que sugiere que la autofagia confiere protección en la enfermedad.

Palabras clave: CUCI, AGR2, IRGM, autofagia, estrés RE.

ABSTRACT

Background: Genetic factors play an important role in the pathogenesis of Ulcerative Colitis (UC). The gene AGR2 (Anterior Gradient 2) encodes a protein disulfide isomerase, responsible for protein folding in the endoplasmic reticulum (ER). On the other hand, IRGM (Immunity-related GTPase family, M) encodes a guanosine triphosphatase that regulates the process of autophagy, the elimination of microorganisms and recycling of intracellular organelles. Have been associated some genetic variants of AGR2 and IRGM with increased risk of Inflammatory Bowel Disease.

Objective: To determine the expression levels of AGR2 and IRGM gene in patients with UC.

Methods: 60 patients with confirmed diagnosis of UC (30 active, 30 remission) and 30 controls who did not submit any colitis data (infectious, post radiation, ischemic). Was extracted total RNA from intestinal tissue, was obtained c-DNA by Reaction Chain Reaction (PCR) and relative quantification of expression was performed using real-time PCR. Statistical analysis was performed using the Student t test for independent samples and Pearson correlation for the association of clinical characteristics of the disease and gene expression, using SPSS version 17.

Results: Observed increased expression of the gene AGR2 in rectal mucosa of patients with UC in activity compared to controls ($p = 0.002$) and remission ($p = 0.041$). IRGM gene expression was higher in rectal mucosa of patients with UC in remission, compared with healthy controls ($p = 0.013$) and active ($p = 0.012$). There was an association of IRGM gene expression with response to conventional medical treatment ($p = 0.01$).

Conclusion: The AGR2 gene expression is increased in patients with active UC, so that might be involved in the endoplasmic reticulum stress in colonic epithelial cells. IRGM gene expression is increased in patients in remission UC, suggesting that autophagy confers protection in the disease.

Keywords: UC, AGR2, IRGM, autophagy, ER stress.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

2.1.1 Definición

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) incluye a la Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI) y la Enfermedad de Crohn (EC), son un conjunto de enfermedades de etiología desconocida y de origen multifactorial (factores genéticos, ambientales e inmunológicos) (1), diferenciadas por sus características endoscópicas, clínicas e histológicas (2).

El primer reporte de enfermedad inflamatoria granulomatosa intestinal fue publicado en octubre de 1932 en el *Journal of the American Medical Association*, en un artículo titulado "Regional ileítis". Los autores de este artículo fueron Burill B. Crohn, Leon Ginzburg y Gordon D. Oppenheimer, quienes trabajaban en el hospital Mount Sinai, en Nueva York (3, 4). En 1875, Wilks y Moxon describieron a la enfermedad de CUCI y en la década de 1920, ésta patología ya era conocida. En 1930 Bargen y Weber reportaron 23 casos de pacientes con lo que ellos denominaron colitis ulcerativa crónica regional migratoria; de la cual, 17 tenían el recto sano y tres tenían fístulas perianales, llamaron a dicha enfermedad colitis segmentaria. Esta información constituye quizá la primera descripción de colitis granulomatosa. En 1960 el artículo clásico de Lockhart-Mummery y Morson describió las diferencias entre la colitis granulomatosa y CUCI, y establecieron los criterios patológicos necesarios para el diagnóstico definitivo de cada una. Estos autores enunciaron: "Nunca hemos visto la Enfermedad de Crohn y la Colitis Ulcerosa en un mismo paciente" (3).

2.2 Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI)

2.2.1 Definición

La Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI) es una Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) de etiología desconocida, caracterizada por la inflamación difusa de la mucosa colónica(5).

2.2.2 Características Clínicas de la CUCI

2.2.2.1 Extensión

La CUCI puede clasificarse de acuerdo a su extensión en pancolitis cuando se encuentra afectado todo el colon, del recto a ciego (20% de los casos), colitis izquierda cuando se encuentra afectado desde el recto hasta ángulo esplénico (40% de los casos), colitis distal cuando se encuentra afectado del recto al sigmoides o solamente recto (40% de los casos) (5), como se observa en la **figura 1**.

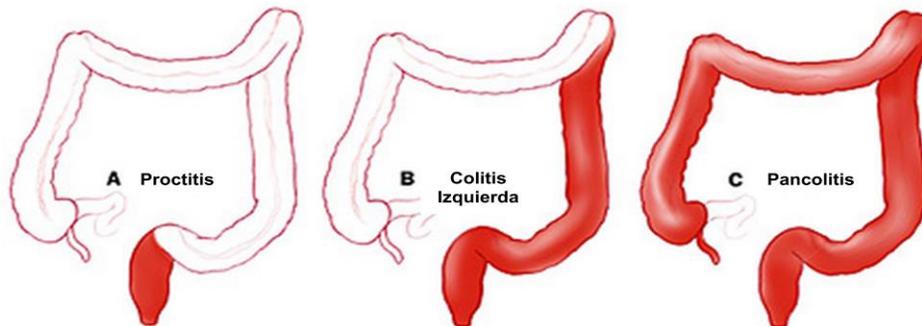


Figura 1. Extensión de la Colitis Ulcerativa Crónica Inespecífica

Modificada de: Hopkins J. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2011

La afectación ileal es infrecuente; sin embargo, se presenta por reflujo en pacientes con pancolitis (5).

2.2.2.2 Epidemiología

La EII representa un problema de salud pública importante, ya que afecta las actividades laborales, educativas y sociales, así como la calidad de vida de la población que la padece (6).

La incidencia de CUCI a nivel mundial es de 1.2 a 20.3 casos por 100,000 personas por año, y su prevalencia es de 7.6 a 246.0 casos por 100,000 por año. La mayor incidencia de EII se ve en poblaciones del norte de Europa y norte América (3, 6, 7) en rangos de 12 a 19/100,000 por año y de 5 a 29/100,000 por año respectivamente (7), y la menor en el continente asiático (3).

A pesar de que la EII se produce en todo el mundo, la incidencia más alta se da en la raza blanca, en particular población judía de Europa del este; recientemente han sido reportados el aumento de tasas de enfermedad en las regiones donde la incidencia de la CUCI se pensaba era baja, como Asia, África y América Latina como se muestra en la **figura 2**. La presencia de la CUCI afecta ambos sexos de manera similar, el pico de inicio de la enfermedad varía con la edad presentándose típicamente con una distribución bimodal entre los 15 a 25 o entre 55 y 65 años de edad (8).

En México se ha documentado que la incidencia de CUCI ha ido incrementando significativamente durante un periodo de 20 años (1987-2006), se observó aumento de nuevos casos de 28.8 en el primer periodo (1987-1996) a 76.1 en el segundo periodo (1997-2006) con una $p < 0.00008$, sin embargo no hubo diferencia significativa en el género, la edad de diagnóstico de entre 31.3 ± 12.3 años, se observó también que el 59.1% de los pacientes tenían pancolitis, 25.5% presentaban colitis izquierda y el 15.4% tuvieron proctitis, 41.5% de los pacientes tuvieron manifestaciones extraintestinales siendo artritis la más frecuente. Este aumento significativo en la incidencia de la CUCI puede ser desencadenado por una occidentalización de la dieta, tabaquismo y un correcto diagnóstico de la enfermedad (8).

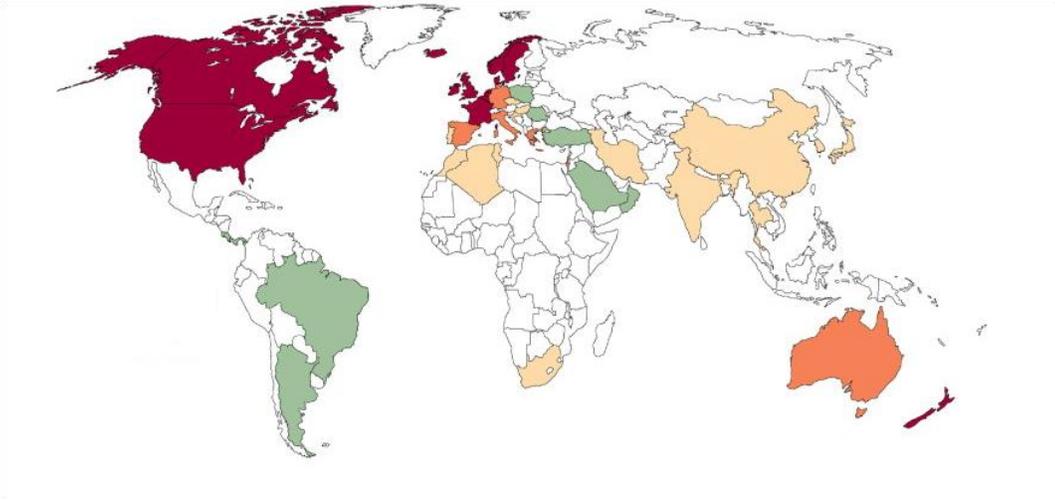


Figura 2: Distribución geográfica de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal: de color rojo se refiere a la incidencia anual superior a 10/105 habitantes, de color naranja a la incidencia de 5-10/105 habitantes, verde con la incidencia de menos de 4/105 habitantes, de color amarillo a la baja incidencia que se incrementa continuamente. La ausencia de color indica que no existen datos.

Tomada de: Jacques Cosnes, et al. Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases. 2011.

En un estudio demográfico se observó que los hispanos versus no hispanos tenían mayor frecuencia de colectomía y refractariedad al tratamiento en CUCI (9). Recientemente, se ha reportado incremento en la incidencia en EC y CUCI a nivel mundial en especial países como México, Australia, Hungría, Taiwán, Grecia y Finlandia (1).

2.2.2.3 Cuadro Clínico de la CUCI

El cuadro clínico de la CUCI, se caracteriza por evacuaciones líquidas sanguinolentas acompañadas con moco, pujo y tenesmo rectal con dolor abdominal al movimiento intestinal. Para diagnosticar CUCI deben integrarse los cuadros histológicos, endoscópicos y clínicos. El grado de correlación entre escalas clínicas y endoscópicas es escaso, sobre todo con respecto a las histológicas. El Consenso Europeo de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal ha propuesto la combinación de los criterios de Truelove y Witts con rectosigmoidoscopia como se muestra en la **tabla 1**, para confirmar la actividad de la enfermedad (5, 10). La escala de Truelove y Witts fue propuesta en 1955 después de los resultados de un estudio controlado por placebo con corticosteroides orales y fue ampliamente difundida para su uso en la práctica clínica (5).

Tabla 1. Criterios de Truelove y Witts

Grado de actividad	Leve	Moderada	Grave
Evacuación sanguinolenta	<4 x día	4 a 6 x día	> 6 x día
Frecuencia cardiaca	<90 x min	≤90 x min	>90 x min
Temperatura	<37.5 °C	≤37.8 °C	>37.8 °C
Hemoglobina	>11.5g/dL	≥ 10.5g/dL	<10.5g/dL
VSG (velocidad de sedimentación globular)	<20 mm/h	≤ 30 mm/h	>30 mm/h

Tomado de: Camacho Escobedo J.A., Yamamoto Furusho.J.K. Enfermedad Inflamatoria Intestinal. 2010

2.2.2.4 Marcadores bioquímicos

Existen marcadores serológicos para el diagnóstico de la CUCI. El anti-neutrófilo citoplasmático perinuclear (p-ANCAS) está presente en el suero de pacientes con CUCI en un 60% y puede ayudarnos a hacer el diagnóstico diferencial de la EC pues sólo lo presentan un 20% de estos (10) asimismo estos estuvieron presentes en mayor frecuencia en pacientes con CUCI que presentaban manifestaciones extraintestinales, como artropatía y mayor extensión de la enfermedad, los anticuerpos antinucleares (ANAs) están asociados con la presencia a dependencia de esteroides (1).

Las pruebas sanguíneas son de gran ayuda diagnóstica pues se toman en cuenta marcadores de inflamación aguda producidas bajo influencia de IL-6, IL-1 β y TNF- α , como proteína C reactiva ultrasensible, velocidad de sedimentación globular (VSG) y albúmina para observar problemas de absorción (5). Durante la actividad de la enfermedad puede observarse leucocitosis y trombocitosis (10).

Se ha reportado el empleo de marcadores de daño en la mucosa y/o disfunción de la barrera colónica, como son: Sangre oculta en heces y α 1- antitripsina son de baja especificidad y no se asocian con la intensidad de la inflamación de la CUCI. Existen también marcadores fecales como la calprotectina que predicen posibles recaídas en la CUCI pues miden las moléculas asociadas a la respuesta inmune innata (10).

2.2.2.5 Características endoscópicas

Los datos endoscópicos incipientes en la CUCI incluyen eritema, edema y un patrón anormal de la mucosa. Con la gravedad de la enfermedad existe el desarrollo de granularidad difusa, erosiones superficiales, úlceras rodeadas por mucosa inflamada de manera difusa, friabilidad espontánea y sangrado. La inflamación crónica de la CUCI se caracterizan por atrofia de la mucosa, hipertrófia muscular y pérdida de las haustras (saculaciones) normales, resultado del acortamiento del colon con disminución del diámetro de la luz. En casos de CUCI grave se presentan

pseudopólipos resultado de regeneración de la mucosa inflamada que rodea ulceraciones (11).

La escala de Mayo es una de las más utilizadas actualmente en los estudios clínicos controlados publicados; combina variables clínicas con endoscópicas (**Anexo 1**).

2.2.2.6 Características histológicas

Las características microscópicas se manifiestan por la infiltración de células inflamatorias en la mucosa como los neutrófilos, células plasmáticas, linfocitos granulocitos y macrófagos. Debido al proceso regenerativo las glándulas se ven compactas, existe una depleción de las células calciformes y por lo tanto una menor producción de moco. Los cambios reparativos en células epiteliales se caracterizan por nucleomegalia, hipercromatismo, nucléolo prominente, aumento en la mitosis. En etapas tardías las zonas ulceradas pueden tener tejido de granulación, aumento de eosinófilos, y además hay cúmulos de leucocitos polimorfonucleares en las criptas (11).

En la CUCI se ha reportado un aumento en la respuesta del sistema inmune que conduce a la producción de mediadores inflamatorios como citocinas y moléculas de adhesión que llevan a la destrucción celular. Por lo anterior, es importante considerar el papel que pueden desarrollar IL-6 y el TNF- α como citocinas proinflamatorias en las diferentes condiciones de la CUCI (actividad y remisión) , Fonseca-Camarillo y cols. en 2009 analizaron la relación entre la expresión génica de IL-6 y la actividad de la enfermedad (clínica e histológica) y encontraron que existe una correlación ($p=0.002$) entre la inflamación histológica con la expresión del ARNm de IL-6 de pacientes con CUCI y controles, por lo que es considerada como excelente marcador de inflamación (12).

2.2.3 Tratamiento

2.2.3.1 Ácido 5 aminosalicilatos

Los ácido 5-aminosalicilatos es un medicamento empleado para el control de CUCI o la EC en actividad de leve a moderada. Su mecanismo de acción es mediante el bloqueo de la producción de prostaglandinas y leucotrienos, inhibe péptidos bacterianos que inducen quimiotaxis de neutrófilos, induce la secreción de adenosina e inhibe la activación del Factor Nuclear- κ b (NF- κ b) (2).

2.2.3.2 Corticoesteroides

Son utilizados como tratamiento alternativo al ácido 5 aminosalicilato cuando resulta inadecuado para el manejo de la CUCI. Los corticoesteroides tópicos (enemas de hidrocortisona) se utilizan cuando es una proctitis o colitis distal. La prednisona y prednisolona se usan en actividad grave de la enfermedad, suelen tener efectos secundarios graves relacionados con la dosis y duración del tratamiento, como pueden ser osteoporosis e hipertensión (2).

2.2.3.3 Inmunomoduladores

Los inmunomoduladores son fármacos utilizados cuando el paciente con CUCI lleva un tiempo prolongado con corticoesteroides. La desventaja de la utilización de estos agentes es que ponen a los pacientes en riesgo de enfermedades oportunistas. Los agentes utilizados son azatioprina y 6 mercaptopurina, el mecanismo de acción permanece desconocido aunque se propone actúa suprimiendo la generación de células T de vida prolongada, por lo que para lograr la remisión se requiere de por lo menos seis meses (2).

2.2.3.4 Terapia biológica Anti-TNF- α

Infliximab es un agente cuyo mecanismo de acción permanece en estudio, sugiere ser efectivo por que TNF es un producto de la activación de macrófagos, tiene un papel fundamental en la expresión alterada de péptidos reguladores en la EII. Su acción se cree se debe a la capacidad de unirse a células precursoras de superficie de TNF, quizás conduciendo a la apoptosis de monocitos (2).

2.2.3.5 Tratamiento quirúrgico

Dentro de las indicaciones para cirugía se incluyen la falla de la terapia médica, colitis fulminante intratable, megacolon tóxico, perforación, sangrado descontrolado, displasia de alto grado o displasia asociada a masas, cáncer y retardo de crecimiento en niños (3). Se ha descrito que más de un tercio de los pacientes con CUCI extensa, requerirá colectomía en algún punto durante el curso de la enfermedad (10).

Las tasas de colectomía en CUCI tienen un rango de 5 a 20%. La cirugía puede ser curativa en pacientes con CUCI.

2.2.4 Complicaciones

Las complicaciones agudas como el sangrado grave y el megacolon tóxico, pueden ocurrir en pacientes con pancolitis o inflamación grave; otros problemas como displasia epitelial o cáncer pueden emerger en una fase crónica. Dentro de los factores de riesgo para cáncer se incluyen una larga duración de la enfermedad, sin importar la actividad clínica, extensión, diagnóstico a edad temprana, inflamación grave, presencia de colangitis esclerosante e historia familiar de cáncer colorrectal (3). En un estudio sueco se corroboró que los pacientes diagnosticados antes de los 15 años tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (9). Se ha documentado que la infección por *Clostridium difficile* y la gravedad de la enfermedad por endoscopia parecen estar asociadas con incremento en el riesgo de colectomía (13). Es por esto que deben realizarse como protocolo el escrutinio de cáncer por colonoscopia después de 8 a 10 años de evolución de la enfermedad, en pancolitis, la vigilancia debe realizarse en forma periódica cada 1 a 2 años (14).

2.2.5 Manifestaciones extraintestinales

Se tiene la hipótesis de que debido al perfil inmunológico de la enfermedad existen citocinas que afectarán órganos blanco incluyendo el músculo esquelético, la piel, el hígado, páncreas, riñones, ojo y pulmones, provocando lo que se conoce como manifestaciones extraintestinales, como se muestra en el **Anexo 2**, incluso en

algunos pacientes pueden aparecer primero las manifestaciones extraintestinales y posteriormente los síntomas gastrointestinales (15).

El 25% de los pacientes tienen por lo menos una manifestación extraintestinal lo que les confiere un riesgo incrementado de padecer otros síntomas extraintestinales, en el **Anexo 3** se señalan algunos de estos (15).

2.2.6 Etiopatogenia

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) es de etiología multifactorial, se ha descrito la interacción del sistema inmunológico con la presencia de factores ambientales en individuos genéticamente susceptibles. A continuación se describen cada uno de estos factores.

2.2.6.1 Factores ambientales:

Los componentes bacterianos, que interfieren con la función normal de las proteínas reguladoras de las vellosidades intestinales, o las uniones estrechas en células epiteliales pueden dañar la barrera intestinal y aumentar su permeabilidad.

En este apartado es de suma importancia mencionar el impacto de la nutrición en la EII y sobretodo en la CUCI, como factor de riesgo para su desarrollo pues se ha descrito que el consumo de una dieta occidentalizada que consiste en alto consumo de azúcares, grasa total, ácidos grasos omega 6 y carne está asociado con el incremento en el riesgo de la CUCI, y además que el bajo consumo de fibra y vegetales se encontraba como un factor protector contra el desarrollo de la enfermedad(16-18). Por otro lado los pacientes con diagnóstico de CUCI suelen presentar desnutrición energético-proteica en forma aguda, las diferentes causas son una combinación tanto de las características propias de la enfermedad, como los tratamientos empleados en esta patología, como se muestra en la **figura 3** (19).

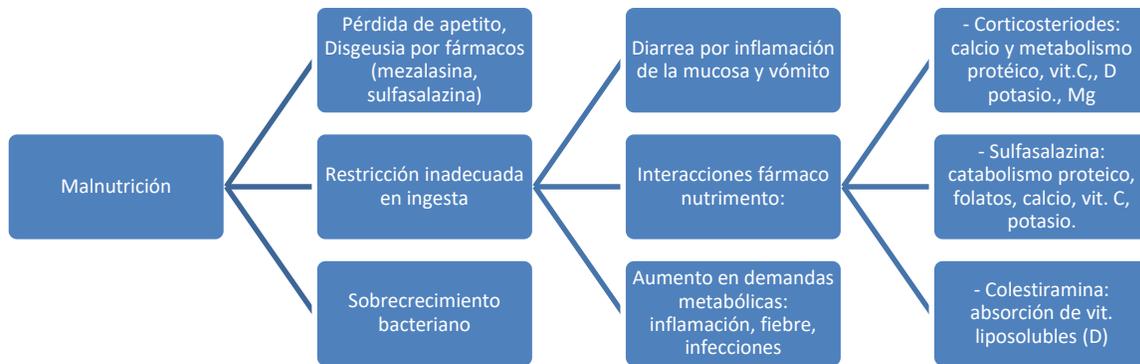


Figura 3. Causas de malnutrición en EII

Modificada de Ballesteros Pomar .M.D., Vidal Casariego .A., Calleja Fernández .A., et. al. Impact of nutritional treatment in the evolution of inflammatory bowel disease. 2010

Se ha postulado a la nutrición, como opción de tratamiento y/o coadyuvante en la enfermedad inflamatoria intestinal, ya que la disminución en la carga antigénica de la dieta, puede jugar un papel importante en la remisión de la enfermedad, es así como se habla también de prebióticos y ácidos grasos poliinsaturados como los ácidos grasos de cadena corta con actividad antiinflamatoria y de nutrientes para reparación de lesiones de mucosas como glutamina o vitaminas antioxidantes como E y C. En la CUCI se han realizado estudios sobre el efectos del aloe vera o la bromelina de la piña, ya que se han observado que poseen propiedades anti inflamatorias (19).

La hipótesis de la higiene, postula que una reducción de la exposición a microbios, debido a la mejora de las medidas de salud, ha contribuido a un desequilibrio inmunológico en el intestino y el aumento en la incidencia de enfermedades con perfil autoinmune como la EII (20).

Barclay y cols; (2009) reportan en un meta-análisis que la lactancia es un factor protector contra el desarrollo de EII en pacientes pediátricos con una Razón de

Momios (RM) igual a 0,69 (21), esto fue confirmado por el meta-análisis de Klement y cols; con un RM=0.77 en la lactancia materna como factor protector contra el desarrollo de CUCI (22).

Dentro de los factores ambientales de riesgo para el desarrollo de la CUCI encontramos el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) los cuales están relacionados posiblemente con la alteración de la barrera intestinal. También existen factores denominados protectores contra la CUCI como el hábito tabáquico (23), la apendicetomía disminuye el riesgo de desarrollar CUCI e incluso protege al paciente contra el desarrollo de enfermedad grave y reduce el riesgo de colectomía (9).

2.2.6.2 Factores inmunológicos:

El intestino se encuentra estéril al nacimiento y comienza su colonización en el primer contacto que tiene con la leche materna y otros factores ambientales, la colonización comienza con bacterias ácido lácticas, enterobacterias y estreptococos, formando la flora comensal con vida simbiótica en relación al huésped (24). El organismo humano tiene la capacidad de distinguir lo propio de lo extraño, mecanismo que se encuentra dañado en la EII a tres niveles; el desarrollo de inmunidad innata y adquirida, así como la pérdida de la estructura de la barrera epitelial mucosa (7).

La CUCI se caracteriza por una respuesta de linfocitos T cooperadores (Th2) diferenciado por la producción de TGF- β , IL-13 e IL-5 y por diferenciación de Th1 promovida por las IL-23 e IL-12 (2, 23). El “efecto barrera” está constituido por una serie de barreras físicas, químicas y biológicas que protegen el epitelio intestinal, lo conforman el moco producido por células calciformes disminuido en CUCI (25), las β -defensinas producidas por las células de Paneth (26), la función ciliar y la peristalsis que evitan el contacto de antígenos con epitelio intestinal, así como lactoferrina, sales biliares, ácido gástrico, lisozima que evitan el crecimiento de bacterias (24). En la inmunidad innata podemos incluir la expresión incrementada de distintos TLRs (Tool Like Receptors) que se encargan de censar los microorganismos y moléculas

de la luz intestinal, así también existe liberación de citocinas como en cualquier proceso inflamatorio dentro de las que incluimos IL-1 β , IL-6 y TNF- α (3). La ausencia de linfocitos T reguladores (Treg) contribuye al desarrollo de respuesta inmune contra la flora bacteriana normalmente tolerada (7). Existe disfunción en la permeabilidad del epitelio intestinal causada por las uniones estrechas formadas por proteínas Claudina y Ocludina (26).

Con el objeto de mantener la barrera epitelial e inmunidad innata funcional, se requiere de un segundo mecanismo llamado inmunidad adaptativa, la cual está constituida por células Natural killer, linfocitos, células presentadoras de antígeno como, células dendríticas y macrófagos, además se elevan los niveles de IgM, IgA, e IgG(3), como se muestra en la **figura 4**.

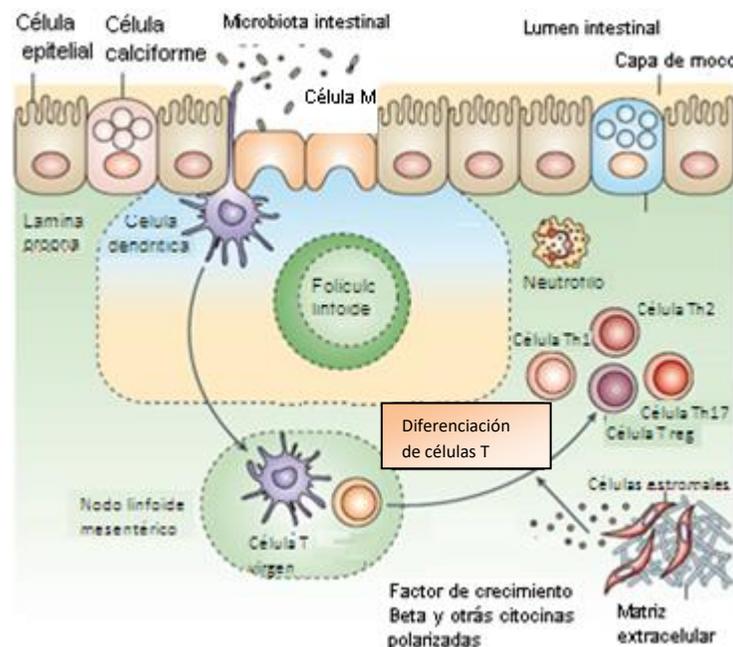


Figura 4. Elementos clave del sistema inmune intestinal: se observan células del epitelio intestinal encargadas de la defensa inmune del intestino dentro de las cuales encontramos células de Paneth, calciformes, células presentadoras de antígeno como las dendríticas que diferenciarán los linfocitos a T reguladores o Th2 para el caso de la CUCI.

2.2.6.3 Factores genéticos:

La EII se considera una enfermedad poligénica que pueden ser heredable de un 5-10% a un familiar en primera línea. Existen genes de susceptibilidad que se expresan en gemelos monocigotos con una concordancia fenotípica de 50-70% para presentar Crohn y de un 10-20% para CUCI comparado con la población general, lo que sugiere que la heredabilidad es menos importante en la CUCI, que la exposición ambiental relevante es menos común o que el número de variaciones y diferencias epigenéticas es más frecuente en gemelos; lo que limita la posibilidad de concordancia (2, 27).

En estudios de asociación del genoma se han identificado gran cantidad de loci de susceptibilidad para EC y CUCI o ambas, existen loci de riesgo relacionados con la disfunción de la barrera epitelial, como ECM1, HNF4, CDH1 y LAMB1; aquellos relacionados con apoptosis y autofagia como IRGM, DAP, ULK1 (1) y aquellos relacionados con defectos de la regulación transcripcional PRDM1, IRF5, y NKX2-3; además de genes envueltos en la diferenciación de células T (Th1 y Th17) como IL-10, IL-17R, IL-13R, INF- γ (3).

Como se muestra en la **tabla 2**, existen genes asociados únicamente con EC o CUCI y aquellas relacionadas con ambas enfermedades (28).

Tabla 2. Genes asociados con la EC y CUCI.

Cromosoma	Location (Mb)	Genes de interés	Asociados con EC	Asociados con CUCI
1p31	67	<i>IL23R</i>	Si	Si
3p21	49	Multiples, incluyendo <i>NKX2-3, CCNY, MTS1</i>	Si	Si
5q31	131	Multiple, incluyendo <i>SLC22A5</i>	Si	Incierto
5q33	150	Multiple, incluyendo <i>IRGM</i>	Si	Incierto
5q33	158	<i>IL12B</i> (P40)	Si	Si
10q21	64	<i>ZNF365</i>	Si	Incierto
10q24	101	<i>NKX2-3</i>	Si	Si
17q21	37	Multiple, incluyendo <i>STAT-3</i>	Si	Si
18p11	12	<i>PTPN2</i>	Si	Incierto

ATG16L1, proteína 1 relacionado a autofagia-16; *IL12B*, Interleucina-12 β ; *IL-23R*, receptor de interleucina-23; *IRGM*, familia GTPasa relacionada con inmunidad,M; *NKX2-3*, NK2 factor de transcripción relacionado; *PTPN2*, proteína tirosina fosfatasa, no receptor tipo2; *SLC22A5*, miembro 5 de familia acarreadora de soluto 22; *STAT3*, traductor de señales y activador de trascrición 3; *ZNF365*, proteína asociada zinc 365.

Modificado de Cho J.H. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. 2008.

Algunas anormalidades de la inmunidad innata están ligadas a variaciones en genes y sus productos como el gen IRGM que regula el reconocimiento microbial y autofagia (29), este gen tiene variaciones reportadas en EC pero aún no existen datos en CUCI (3). Este proceso puede ser detonado por varias causas como el estrés de retículo endoplasmico (ER) generado en respuesta a la falla de la maquinaria del plegamiento de proteínas, dirigida por varios genes como AGR2 (30).

2.3 Estrés de retículo endoplásmico (RE)

La síntesis de proteínas secretoras e integrales de membrana se realiza dentro del lumen de RE, donde tiene lugar el plegamiento y se ensamblan las mismas. Para asegurar que las proteínas que entran a este compartimiento hayan sido adecuadamente glicosiladas y covalentemente unidas por enlaces obteniendo estabilidad, el RE tiene un sistema de control de calidad de proteínas, con el cual logra la vigilancia del estado de plegamiento de las mismas. Cuando las proteínas son mal plegadas o inestables, existe un mecanismo de control de calidad de proteínas que se encarga de reconocer y retener estas proteínas en RE para su posterior transporte al citosol donde son degradadas a través de un sistema de ubiquitinación en proteosoma. Si se presenta un desequilibrio para eliminar las proteínas acumuladas en RE causan lo que se denomina estrés de RE, como se muestra en la **figura 5** (31, 32). El plegamiento de proteínas es fácilmente afectado por diferentes condiciones como son: estrés citotóxico, hipoxia e inflamación (32).

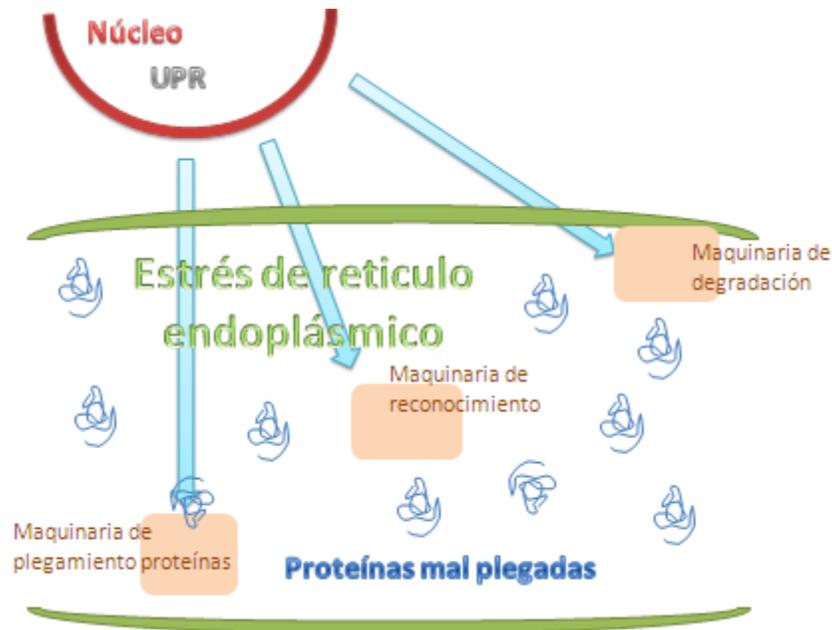


Figura 5. Estrés de Reticulo Endoplásmico

Modificado de: Morito D, Nagata K. ER Stress Proteins in Autoimmune and Inflammatory Diseases. 2012.

El estrés de RE es un proceso que conlleva la participación de varios elementos entre los que se encuentran la maquinaria de plegamiento de proteínas dentro de las cuales encontramos el gen AGR2.

2.3.1 AGR2 (Anterior Gradient 2)

El gradiente homólogo anterior 2 (AGR2), se caracterizó por primera vez en *Xenopus laevis*. En mamíferos se ha visto que estimula diversos procesos como son: la adhesión celular, proliferación e inhibe la apoptosis (30, 33). El modelo estructural de AGR2 se representa con una superficie hidrofóbica, además contiene residuos de cisteína que se encuentran cerca de la superficie de la molécula y son pieza clave en reacciones de óxido reducción, es por esto que es considerada miembro de la familia de las Protein Disulfido Isomerasas (PDI) (3).

2.3.1.1 Familia de las proteínas disulfuro isomerasas PDI

La familia de las Proteín Disulfido Isomerasas (PDI) constituyen un grupo de enzimas multifuncionales que forman parte de la familia de las tioredoxinas, esta cataliza reacciones de óxido-reducción e isomerización de enlaces disulfuro durante el plegamiento de proteínas de membrana en retículo endoplásmico (RE). Poseen dos dominios catalíticos y dos no catalíticos, el catalítico tiene un sitio activo con función enzimática con un contenido en residuos de cisteína, este sitio dará como resultado reacciones de óxido reducción y por lo tanto actúa como una tioldisulfido reductasa (34).

2.3.1.2 Estructura y localización de AGR2

El gen AGR2 consiste en ocho exones y nueve transcritos, de los cuales sólo 6 de ellos, AGR2 001, AGR2 005, AGR2 006, AGR2 007, AGR2 201, AGR2 202 codifican proteínas. Los genes que codifican para el AGR2 se localizan en el cromosoma 7p21.3

2.3.1.3 Expresión de AGR2

El gen de AGR2 se expresa principalmente en células epiteliales, dentro de las que se incluyen células calciformes, Paneth y células enteroendocrinas; así como en pulmón, estómago, próstata, colon e intestino delgado como se muestra en la **figura 6** (30, 33, 35).

Zheng y cols; (2006) demostraron que en células calciformes la expresión de AGR2 es regulada por los factores de transcripción FOXA1 y FOXA2 (21, 35).

En hígado, en células HepG2; Higa y cols; (2011) observaron que la expresión de AGR2 es inducida en respuesta al estrés de RE (31).

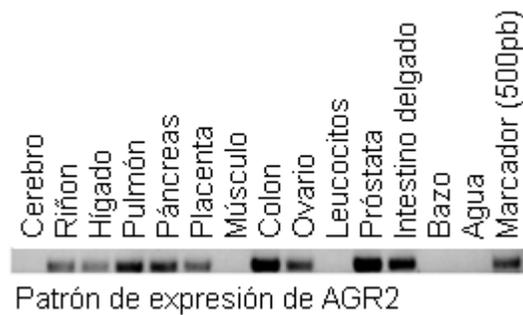


Figura 6. Expresión del gen AGR2 en humano.

Modificado de: Zheng W., Rosenstiel P., Huse K., et al. Evaluation of AGR2 and AGR3 as candidate genes for inflammatory bowel disease. 2006

2.3.1.4 Funciones de AGR2

La función biológica de AGR2 en mamíferos no es del todo comprendida, existen especulaciones derivadas a los homólogos de *Xenopus* XAG-1 y XAG2.

En ratones knock out (ratón transgénico que carece de un gen) de AGR2, se han reportado anomalías funcionales de las células calciformes y desarrollo de diarreas ante la exposición de DSS (Dextran Sulfato de Sodio) (33). Recientemente se observó que en células epiteliales intestinales AGR2 regula procesos de isomerización y adición de residuos de cisteínas de la mucina MUC2, es decir promueve el correcto ensamble de la proteína (30, 33).

En el modelo *in vitro* de Park y cols; (2009) observaron que en las células SU86.86 (Carcinoma Pancreático) existe una baja expresión de la proteína AGR2 y ante la exposición a tunicamicina (inhibidor de glucosilación de proteínas en RE), incrementa los niveles de proteína AGR2.

2.3.1.5 AGR2 en cáncer

Se ha documentado que AGR2 se sobreexpresa en varios tipos de cáncer dentro de los que se incluyen el de colon, esófago, hígado, próstata y mama, inhibiendo la

muerte celular durante periodos de estrés oxidativo caracterizados por hipoxia (30, 31, 33).

Higa y cols; (2011) demostraron que la ausencia del gen de AGR2 se encuentra involucrada con la alteración en la expresión de componentes asociados a la maquinaria de degradación en RE y reduce la habilidad de las células a hacer frente al estrés, por ello quizás sea relevante su participación en el desarrollo de cáncer (31).

2.3.1.6 AGR2 en asma.

Chen y cols; (2009) en un modelo *in vivo* de asma observaron que ante la exposición de un alérgeno pulmonar, las células epiteliales incrementan la expresión de genes como SPEDF, FOXA3, AGR2 y GNCT3, regulando la diferenciación de células calciformes y glucolisación de proteínas encargadas de la hiperproducción de moco asociado a enfermedades pulmonares crónicas (36).

2.3.1.7 Evidencia de AGR2 en Enfermedad Inflamatoria Intestinal

Debido a que no se ha caracterizado la expresión de AGR2 en humanos el único antecedente que se tiene es el modelo murino knock-out de AGR2 que se ha asociado con un fenotipo caracterizado por diarrea, pérdida de peso, sangrado intestinal, prolapso rectal y daño epitelial, disfunción de las células calciformes, infiltrado inflamatorio agudo y crónico, desde los folículos linfoides a la lámina propia intestinal con hiperplasia de criptas. El rápido desarrollo de colitis grave es inducido con DSS y por la deficiencia de la mucina MUC2, lo que conlleva a un incremento de la expresión de citocinas proinflamatorias (34).

Zhao y cols; (2010) demostraron en un modelo knock-out de AGR2 se altera la estabilidad de MUC2 y disminuye la producción de moco, provocando estrés de retículo endoplásmico, y alteración de la morfología normal de las células calciformes intestinales (30).

Heazlewood y cols; (2008) encontraron que existe asociación entre el estrés de RE con la inflamación, a través de la activación de NF- κ B debido a mayor exposición de microorganismos a los TLRs, como resultado del aumento de permeabilidad epitelial y pérdida de la barrera mucosa (25).

2.4 Autofagia

La autofagia mantiene la homeostasis celular, contribuye a la degradación a través de una vía lisosomal y el reciclaje de contenido citosólico como: agregados proteicos mal plegados, organelos defectuosos o dañados, así como a la resistencia contra infecciones y la remoción de microbios intracelulares (37, 38). Es activada por una variedad de condiciones, como la inanición, bajos niveles de oxígeno, estimulación hormonal, invasión microbial, estrés intracelular incluido el de RE e implica la formación de autofagosomas de doble membrana que se originan de RE y de síntesis de novo lipídica (39); este engloba contenido celular que más tarde se fusiona con lisosomas dando como resultado la formación de autofagolisosomas. El estrés de RE puede activar la autofagia a través de la capacidad de requeridor de inositol1 (IRE1) de asociarse con Factor Asociado a Receptor de TNF (TRAF2) y activar vías de señalización JNK (quinasas de la proteína c-Jun del N-terminal) a través de la inhibición de IF2 α mediada por ERK (quinasa reguladora de señales extracelulares) (27).

La autofagia impacta en el envejecimiento, neurodegeneración, miodegeneración, cáncer e inmunidad, además de eliminar patógenos intracelulares, la autofagia contribuye a la presentación de antígenos por el complejo mayor de histocompatibilidad-II (MHC-II), efectúa la polarización de Th1/Th2(29) y suprime la activación de IL-1 β (40, 41).

Durante estadios de maduración de la autofagia, es importante la activación de un complejo proteico, específicamente la subunidad Vps39 que actúa activando la guanosina trifosfatasa (GTPasa) permitiendo el reclutamiento de componentes lisosomales (29).

Durante la autofagia, la formación y aislamiento de la membrana del autofagosoma, inicia con el complejo fosfatidilinositol 3-quinasa clase III (PIK3C3)/Ciclina B1. La elongación de la membrana incluye dos sistemas de conjugación de ubiquitinas. En una de ellas, ATG12 se asocia con ATG para la formación de complejos moleculares ATG12-ATG5-ATG16L1 que se unen a la membrana externa del autofagosoma. Y la segunda de ellas, LC3 se acopla con fosfatidiletanolamina para generar LC3-II lipidado que se integra en la membrana tanto externa como interna del autofagosoma. Existe una tercera etapa que consiste en la fusión del autofagosoma a lisosomas citoplasmáticos, constituyendo los autofagolisosomas que se encargaran de la degradación de contenido celular como se muestra en la **figura 7**. La autofagia contribuye a la supervivencia inmune vía citoplasmática y la entrega de patógenos intracelulares o componentes de estos patógenos a endosomas y a compartimientos ricos en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)-II, promoviendo el reconocimiento de la inmunidad innata por receptores tipo Toll (TLR)(41).

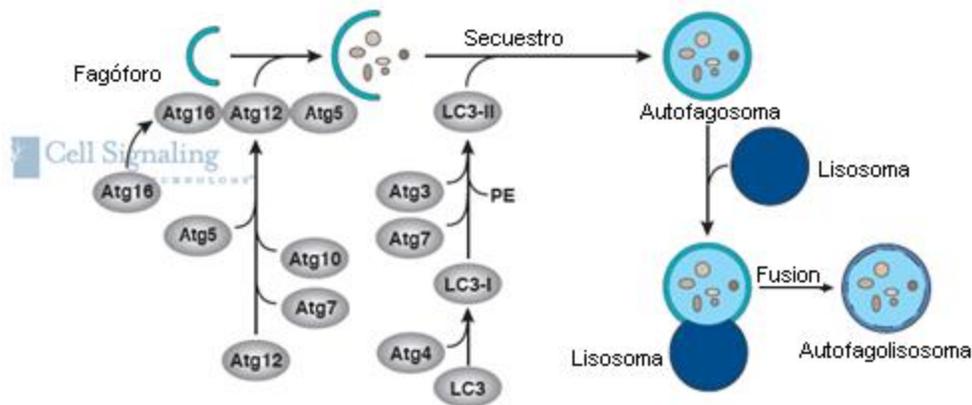


Figura 7. Formación del autofagolisosoma

Tomado de: New England BioLabs. Cell Signaling Technology. 2011

2.4.1 IRGM (Immunity-related GTPase family, M)

IRGM es una guanosina trifosfatasa, que juega un rol en la respuesta inmune innata a través de la formación del autofagosoma en respuesta a patógenos intracelulares u organelos viejos o dañados. Se expresa ubicuamente en el ser humano, y se localiza unido a la cardiolipina un lípido de la membrana interna mitocondrial (42, 43). El gen de IRGM codifica para una proteína de 20 kDa de 181 aminoácidos, se localiza en la región 33.1 en el brazo largo del cromosoma 5 (40).

Se observó a través de un estudio con células HeLa, que IRGM se co-localiza con otras proteínas involucradas en la maquinaria de autofagia como ATG10, ATG5, SH3GLB1 y MAP1LC3C (41).

IRGM demostró ser crucial en la autofagia inducida por señales fisiológicas (inanición), agonistas farmacológicos (rapamicina) o estimulación inmunológica (interferón- γ (IFN- γ), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)) (29), y a la restricción del crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en macrófagos infectados (42). Se demostró que durante infecciones por virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de hepatitis C (VHC) y virus del sarampión (MeV) la formación del autofagosoma es dependiente de la interacción con IRGM. Por lo tanto la disminución en la expresión de IRGM no modula significativamente la puesta en marcha de la autofagia en las células HeLa, pero altera la formación de autofagosomas inducidos por MeV, VIH y VHC (41).

La inhibición del factor de transcripción MTOR (mammalian target of rapamycin) permite que se lleven a cabo procesos catabólicos, incluyendo la autofagia. La muerte celular es un proceso detonado por el bloqueo de la autofagia, pues también es considerado como un factor de sobrevivencia. La autofagia puede ser detonada por citocinas y otras señales inmunológicas, como el TNF- α que induce la autofagia en células de sarcoma Edwing en ausencia de la activación de NF- $\kappa\beta$, mientras que en macrófagos y otras células, INF- γ una citocina clásica del perfil Th1 un mediador inmune antituberculosis, induce o aumenta la autofagia (44).

2.4.1.1 Evidencia de IRGM en Enfermedad Inflamatoria Intestinal

Se sabe que INF- γ provoca la activación de la autofagia a través de los miembros de la familia de GTPasas p47 relacionadas con inmunidad. En ratones, la inducción de la expresión de IRGM es controlada por INF-I a través de los elementos de respuesta sensibles a interferón (IRES), o por INF- γ controlada vía elementos de activación de INF- γ (GAS) (29).

En otro estudio, el modelo murino con un homólogo de IRGM, IRGM1 (LRG-47) controla patógenos intracelulares por autofagia inducida por INF- γ (19), consistentemente con esto el IRGM induce la autofagia y controla el desarrollo intracelular de *M. tuberculosis* en macrófagos humanos (40, 42).

El modelo murino LRG-47^{-/-}, mostró gran susceptibilidad a infecciones por *Toxoplasma gondii* y *Listeria monocytogenes* (40). Se ha encontrado que cambios de una sola base nitrogenada (SNPS por sus siglas en inglés Single nucleotide Polymorphisms) en el gen de IRGM es factor de riesgo para el desarrollo de la EC y de susceptibilidad al desarrollo de tuberculosis, pero aun no se ha investigado en la CUCI (42). Estas variantes genéticas causan la pérdida de función en las vías de autofagia (37, 38). Se sabe que IRGM localizada en la mitocondria, regula eventos de fisión mitocondrial, mediante la cual lleva a cabo el proceso de autofagia para el control de patógenos intracelulares (42).

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La CUCI es un subtipo de EII, la cual está distribuida en todo el mundo, y cuya distribución geográfica varía considerablemente. La mayor incidencia se encuentra en países industrializados ubicados en el norte y oeste de Europa, así como en Norteamérica (6, 7), mientras que las menores tasas se registraron en África, Sudamérica y Asia. La incidencia de la CUCI a nivel mundial es de 1.2 a 20.3 casos por 100,000 personas por año, y su prevalencia es de 7.6 a 246.0 casos por 100,000 por año (3). En el norte de Europa y América donde se reporta mayor incidencia, se describen rangos de 12 a 19/100,000 por año y de 5 a 29/100,000 por año respectivamente (6). En México se ha ido incrementando la incidencia significativamente durante un período de 20 años (1987-2006), sin haber diferencia significativa en el género, la edad de diagnóstico de entre 31.3 ± 12.3 años. La media anual de casos nuevos de CUCI incrementó de 28.8 (1987 - 1996) a 76.1 (1997 a 2006), que muestra un incremento potencial en el segundo período de estudio (3). El cáncer colorrectal es una complicación grave de la CUCI, generalmente ocurre cuando la enfermedad tiene varios años de evolución, se estima que después de 10 años de evolución existe un 2% de riesgo de desarrollar cáncer, 8% después de 20 años e incluso 18% después de 30 años en pacientes con pancolitis (14).

Dado que dentro de la CUCI es resultado de la interacción de factores ambientales, inmunológicos y genéticos, dentro de estos es importante resaltar que existen factores a nivel epitelial que desencadenan estrés en RE o que implican otros procesos como la autofagia, que aún no se han estudiado en la CUCI pero si en EC, por ello su estudio contribuye al conocimiento de la etiopatogénesis de la enfermedad. Resulta interesante hacer notar que se han encontrado SNPS de susceptibilidad genética como el de AGR2 e IRGM en enfermedad de CUCI y EC respectivamente (12), Además se encuentran relacionados con la promoción de la autofagia (6, 19) y estrés de RE (41), por lo que su estudio contribuye al conocimiento de la etiopatogénesis de la CUCI.

4. JUSTIFICACIÓN

En la población mexicana se incrementó la incidencia de la CUCI, cuya etiología es multifactorial, se sabe que el consumo de dieta occidentalizada (alta en azúcares, grasas y proteína), la presencia de factores genéticos, y la alteración del sistema inmunológico, son factores de riesgo para padecer esta enfermedad, pero aún se requiere de mayor estudio en la fisiopatología de esta, para en un futuro poder ofrecer mejores alternativas de tratamiento con menor riesgo en el costo-beneficio.

Dentro del desequilibrio del sistema inmune, el gen IRGM promotor de la autofagia está asociado como gen de susceptibilidad en EC pero la información que la relaciona con la CUCI aún es nula, asimismo los variantes genéticos de AGR2 involucrados en el estrés de retículo endoplásmico de células calciformes, se han correlacionado con EII, por lo tanto se pretende conocer el papel de la autofagia y del estrés de retículo endoplásmico en la CUCI así como su correlación con variables clínicas de la enfermedad.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la expresión del ARNm de IRGM y AGR2 en biopsias de mucosa rectal de pacientes con CUCI, para evaluar su papel en la etiopatogenia de la enfermedad y con ello el incrementar el conocimiento de la misma.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar la expresión de los genes AGR2 e IRGM en las diferentes condiciones de la enfermedad (actividad y remisión) y en controles.
- Asociar la expresión de dichos genes con otras variables clínicas como edad al diagnóstico, extensión de la enfermedad, años de evolución de la enfermedad, manifestaciones extraintestinales, respuesta al tratamiento y curso clínico con la CUCI.

7. HIPÓTESIS

Si existe alteración en la expresión génica de AGR2 e IRGM, entonces podrían estar involucrados en el desarrollo de la CUCI.

8. METODOLOGÍA

a) Tipo de estudio

Experimental, transversal, observacional.

b) Lugar y tiempo

Pacientes con diagnóstico de CUCI confirmado por histopatología de la Clínica de Enfermedad Inflamatoria Intestinal, del departamento de Gastroenterología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” de agosto 2011 a junio 2012.

c) Tamaño de muestra

En este estudio se incluyeron 60 pacientes con CUCI (30 con actividad y 30 en remisión) y 30 controles sanos de la clínica de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. La población se tomó en base a que no tenemos determinación de la expresión de estos genes en la literatura. Dicho número se establece con número máximo de individuos que se han realizado previamente en estudios de cuantificación del ARN mensajero de genes en mucosa rectal de pacientes con CUCI e individuos sanos.

Pacientes

El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del INCMNSZ. El grado de actividad de la enfermedad se clasificó en estudios endoscópicos e histológicos, según la puntuación Mayo (5) e Índice de Riley (45) respectivamente. La toma de biopsias de recto se realizó con previo consentimiento de los pacientes (carta de consentimiento informado) y en base a los siguientes criterios:

Pacientes con CUCI

Criterios de inclusión:

- Nacidos en México.
- Pacientes con diagnóstico confirmado de histopatología de CUCI.
- Rango de edad de entre 18 y 70 años de edad.
- Cualquier género.

Criterios de exclusión:

- Pacientes con diagnóstico de colitis aguda autolimitada, colitis microscópica, colitis medicamentosa, colitis isquémica, enterocolitis postradiación, diverticulitis, apendicitis, enterocolitis neutropénica, síndrome de la úlcera rectal solitaria, cáncer y linfoma.
- Pacientes con patología autoinmune concomitante.
- Pacientes que no deseen participar en el estudio.

Controles

Criterios de inclusión:

- Nacidos en México.
- Pacientes con diagnóstico de anemia en estudio (para descartar sangrado de tubo digestivo bajo), pérdida de peso, o que lleguen a endoscopia por escrutinio.
- Rango de edad de entre 18 y 70 años de edad.
- Cualquier género.

Criterios de exclusión:

- Pacientes con diagnóstico de colitis aguda autolimitada, colitis microscópica, colitis medicamentosa, colitis isquémica, enterocolitis postradiación, diverticulitis, apendicitis, enterocolitis neutropénica, síndrome de la úlcera rectal solitaria, cáncer y linfoma.
- Pacientes con patología autoinmune concomitante.
- Pacientes que no deseen participar en el estudio.

Materiales

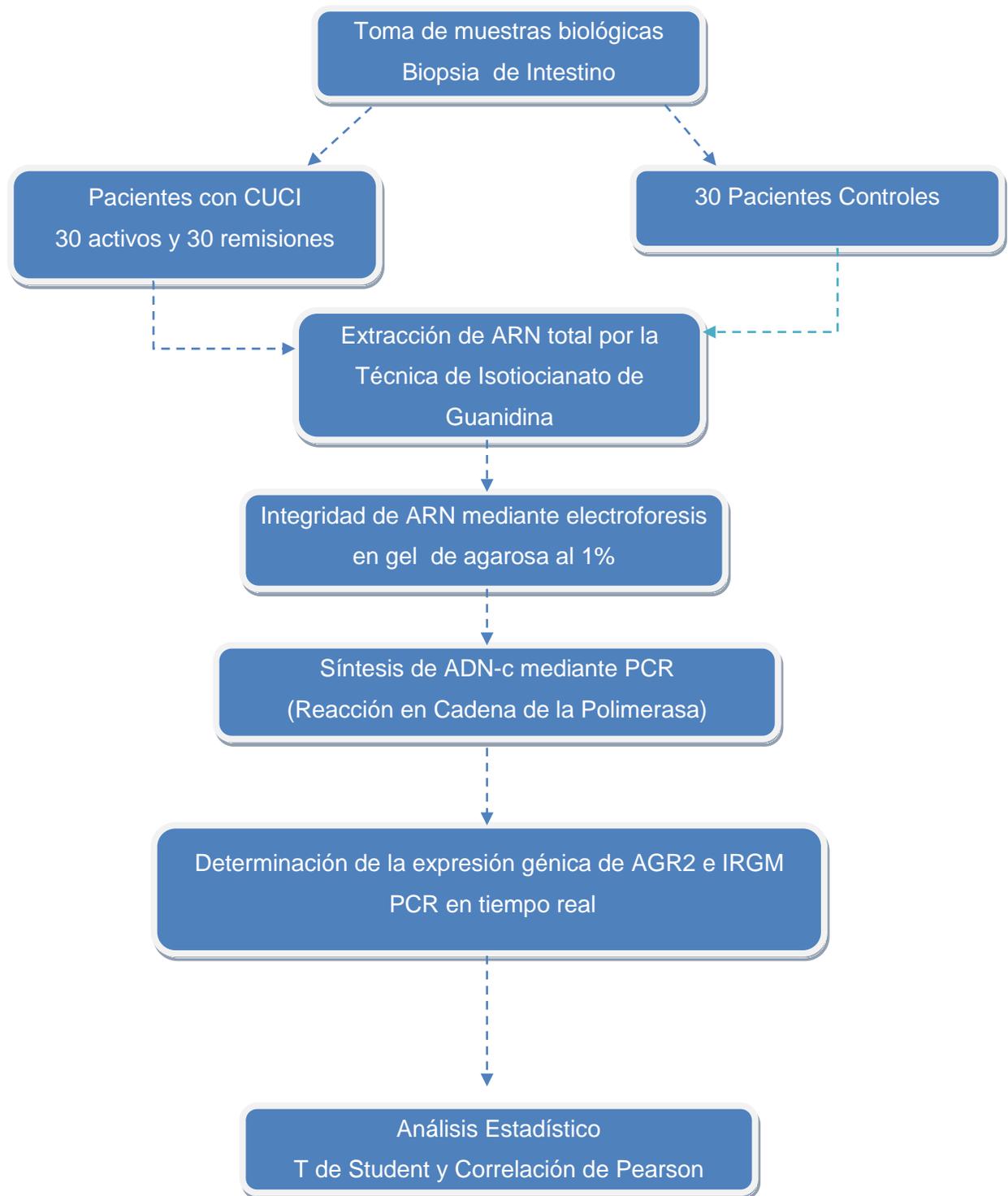
Reactivos

1. Kit de Extracción de ARN de tejido (High Pure ARN Tissue Kit de Roche®)
2. Reactivos para síntesis de ADN complementario (Transcriptor First Strand cDNA Síntesis Kit de Roche®)
3. Mezcla de reacción compatible con sondas TaqMan de Roche®
4. Sondas TaqMan (Universal Probe Library Set, Human No. 68 IL-6, 63 IRGM, 47 AGR2 y 60 GAPDH de Roche®)
5. Iniciadores para IL-6, IRGM, AGR2 y GAPDH de (Invitrogen Custom Primers)

Métodos

1. Se extrajo ARN-total a partir de biopsia de recto.
2. Se sintetizó ADN complementario, por retrotranscripción en PCR (RT-PCR).
3. Se realizó la cuantificación relativa de AGR2 e IRGM por PCR-Tiempo Real con iniciadores específicos y sondas TaqMan.

Metodología



Extracción de ARN total

El ARN total de las biopsias de recto se obtuvo empleando un kit de extracción (High Pure ARN Tissue Kit de Roche). Las biopsias se mezclaron usando el homogenizador durante 1 minuto con amortiguador de lisis, se lavó con etanol al 100%, empleando las columnas de purificación, se centrifugó la mezcla a 13,000 xg durante 15 segundos, se incubó con DNAsa por 15 segundos, se lavó con amortiguador de lavado a 13.000 xg durante 15 segundos, finalmente se agregaron 100 µl de elution buffer para eluir el ARN total.

Una alícuota de cada uno de los productos de ARN se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y fue visualizado por tinción con bromuro de etidio. Se documentó con un transiluminador con luz ultravioleta. Por otro lado, se cuantificó la concentración del ARN para la síntesis de c-DNA a una concentración final de 200 ng/µl.

Reacción de la Transcriptasa Reversa

La síntesis de ADN complementario se realizó por RT-PCR de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción:

- 2 µl de hexámeros random (50 µM).
- 4 µl de Buffer (5x).
- 0.5 µl de inhibidor de RNAsas (40 U/µl).
- 2 µl de mezcla de dNTPS (10 mM).
- 0.5 µl de transcriptasa reversa.
- 1 µl de Agua grado PCR.
- 10 µl de muestra de ARN aislado a una concentración final de 200mg/µl

La reacción se llevó a cabo en 20 µl de la siguiente forma: Preincubación: 25 °C X 10 minutos, Incubación: 55 °C x 30 minutos, seguida de la desnaturalización: 85 °C x 5 minutos en un termociclador (Perkin-Elmer 9600 Co. Norwalk, CT, EUA).

Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó empleando como sustrato el ADN complementario que resulta de la retrotranscripción. Para la amplificación de las regiones de interés, la reacción se llevó a cabo en 10 µl, y contenía:

- 2.5 µl de Agua grado PCR.
- 2.0 µl de Taqman Master MIX
- 0.2 µl de iniciadores sentido y antisentido de Amplio byosystem ®
- 0.1 µl de sonda para IL-6, ARG2, IGRM y GAPDH (Glíderaldehído fosfato deshidrogenasa, gen constitutivo) (Universal Probe Library Set, Human de Roche ®)

Para determinar la expresión relativa de los genes IL-6, AGR2, IRGM y GAPDH se utilizó el Termociclador Light Cyclor 2.0 Roche ®.

Los iniciadores y las sondas utilizadas para la expresión relativa de estos genes fueron los siguientes:

GEN	INICIADOR SENTIDO	INICIADOR ANTISENTIDO	SONDAS DE UNIVERSAL PROBE LIBRARY SET, DE ROCHE
IRGM	CCTTGAAAAAGAGCAGA GCATT	GGGCCCAACTGAAGTG AG	Sonda# 63
AGR2	GGTGGGTGAGGAAATC CAG	GTAGGAGAGGGCCACA AGG	Sonda# 47
IL-6	TCTGCTCCCACAATGAA ACAT	GATGCCCAGGGAAGAC AG	Sonda# 68
GAPDH	AGCCACATCGCTCAGAC AC	GCCCAATACGACCAAAT CC	Sonda # 60

Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos, 45 ciclos de amplificación (95 °C 10 segundos, alineación 60 °C 1 segundo, extensión 40 °C 30 segundos) y enfriamiento a 40 °C durante 30 segundos.

Análisis estadístico

La comparación de expresión del gen AGR2 e IRGM entre los grupos de CUCI en actividad, remisión y grupo control se realizó mediante el análisis la prueba t de Student para muestras independientes y la asociación entre la expresión del gen AGR2 e IRGM con las variables clínicas se utilizó la correlación de Pearson, considerándose como significativo un valor de $p \leq 0.05$, para ello se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 17.0

La asociación de la expresión del gen AGR2 e IRGM se realizó con determinadas características clínicas como la edad de diagnóstico mayor o menor a 40 años ya que se considera existen dos picos de edad en los cuales se presenta la enfermedad, la extensión de la enfermedad clasificada como colitis distal, colitis izquierda y pancolitis, manifestaciones extraintestinales, respuesta al tratamiento clasificado como con adecuada respuesta cuando utilizan 5 aminosalicilatos y tienen mejoría clínica, endoscópica e histológica y como no respuesta al tratamiento cuando los pacientes son dependientes de esteroides, intolerantes a estos o inmunomoduladores, el curso clínico se determinó en base al número de recaídas en un año, los años de evolución de la enfermedad son clasificados como menor o mayor a 3 años ya que la enfermedad mientras más años de evolución tenga, tiene más susceptibilidad al desarrollo de cáncer de colon.

9. RESULTADOS

9.1 Características clínicas y demográficas

Considerando los criterios de inclusión, exclusión y el cálculo del tamaño de la muestra, en nuestro estudio se incluyeron 90 pacientes de los cuales 60 fueron CUCI con una edad promedio de 41.4 años la mayoría de los sujetos fueron mujeres 36 contra 24 hombres. Analizamos 30 pacientes controles con un promedio de 50.4 años, predominó el género femenino 19 contra 11 del sexo masculino. Los pacientes con CUCI fueron más jóvenes que los pacientes controles con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.000$). Se revisaron los expedientes clínicos de los pacientes para obtener las características clínicas y demográficas, mostradas en la **Tabla 3**.

9.2 Integridad del ARN total

El análisis de la integridad del ARN extraído de biopsias de recto de pacientes con CUCI y controles, fue determinado a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (**Figura 10**).

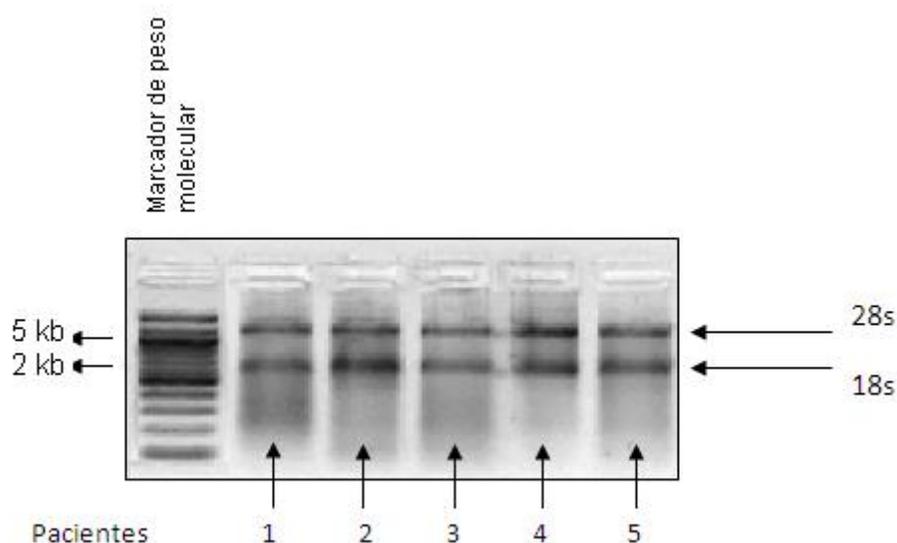


Figura 10. Determinación de la integridad del ARN total de mucosa rectal.

ARN ribosomal subunidad grande (28S); ARN subunidad menor (18S). Muestra de 5 pacientes

Tabla 3. Características clínicas y demográficas de pacientes con CUCI y controles

Género (M/F)	(24/36)
Rango de edad (años)	(23-70)
Años de evolución de la enfermedad (1-3/ >3 años)	(17/43)
Actividad de la enfermedad (activa/remisión)	(30/30)
Extensión de la enfermedad: colitis distal/ colitis izquierda /Pancolitis	(23/3/34)
Actividad Endoscópica (inactiva/leve/moderada/severa)	(15/21/12/12)
Actividad Histológica (inactiva/leve/moderada/severa)	(30/9/10/11)
Terapia médica: 5-aminosalicilatos/ 5-asa e inmunomoduladores/5-asa y Corticosteroides/5-asa, inmunomoduladores y corticoesteroides/ corticoesteroides/Otros	(37/4/10/7/1/1)
Manifestaciones Extra-intestinales (no/artralgias/otros)	(38/16/6)
 Controles sanos	
Género de los pacientes (M/F)	(11/19)
Rango de edad (años)	(19-70)

9.3 Niveles de expresión del gen de IL-6, como marcador de inflamación.

Se determinó la expresión génica de IL-6 en pacientes con CUCI activo remisión y controles con lo cual se confirmó el estado de inflamación de los pacientes en actividad así como la ausencia de la interleucina en pacientes remisión y controles en mucosa de rectal, se consideró una p estadísticamente significativa < de 0.05 (Figura 11).

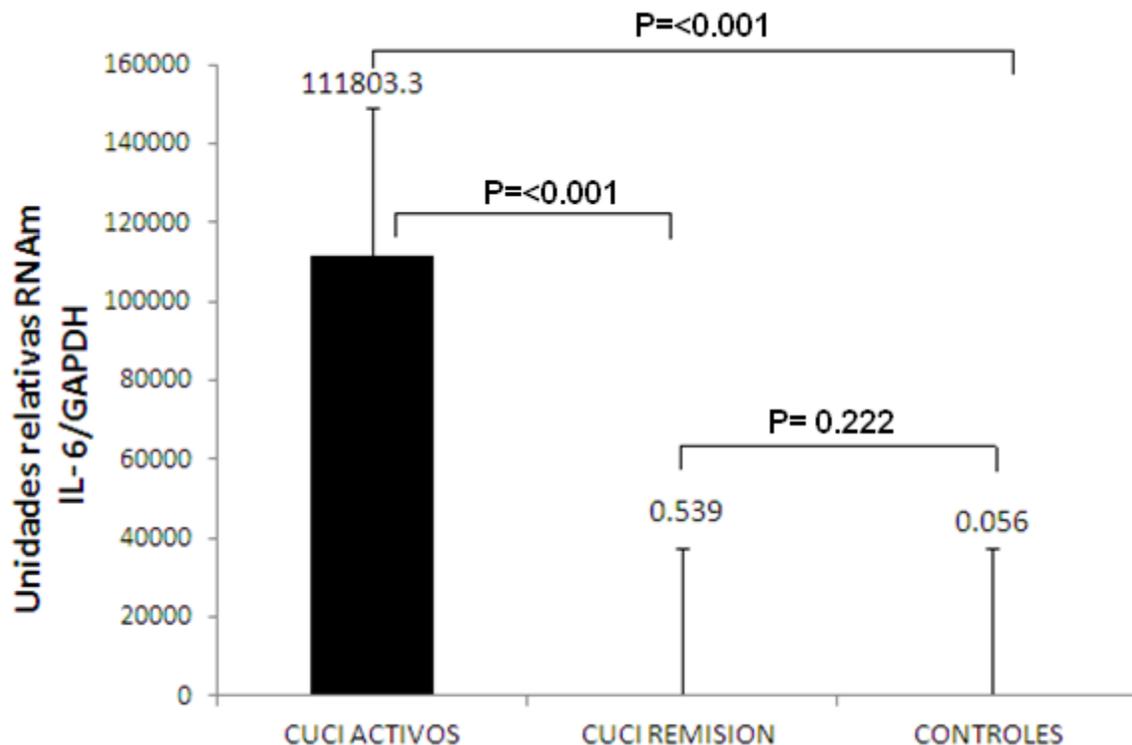


Figura 11. Expresión del ARNm de IL-6 en mucosa de recto de pacientes con CUCI: en la gráfica se observa aumento significativo en la expresión del ARNm del gen en pacientes con CUCI en actividad en relación con los pacientes en remisión y controles.

9.4 Expresión del gen AGR2.

Al determinar la expresión del ARNm del gen AGR2 se observó disminución significativa de la expresión de controles sanos y CUCI remisión con respecto a CUCI activos, sin embargo la diferencia entre pacientes CUCI remisión y controles sanos no tuvo significancia estadística (**Figura 12**).

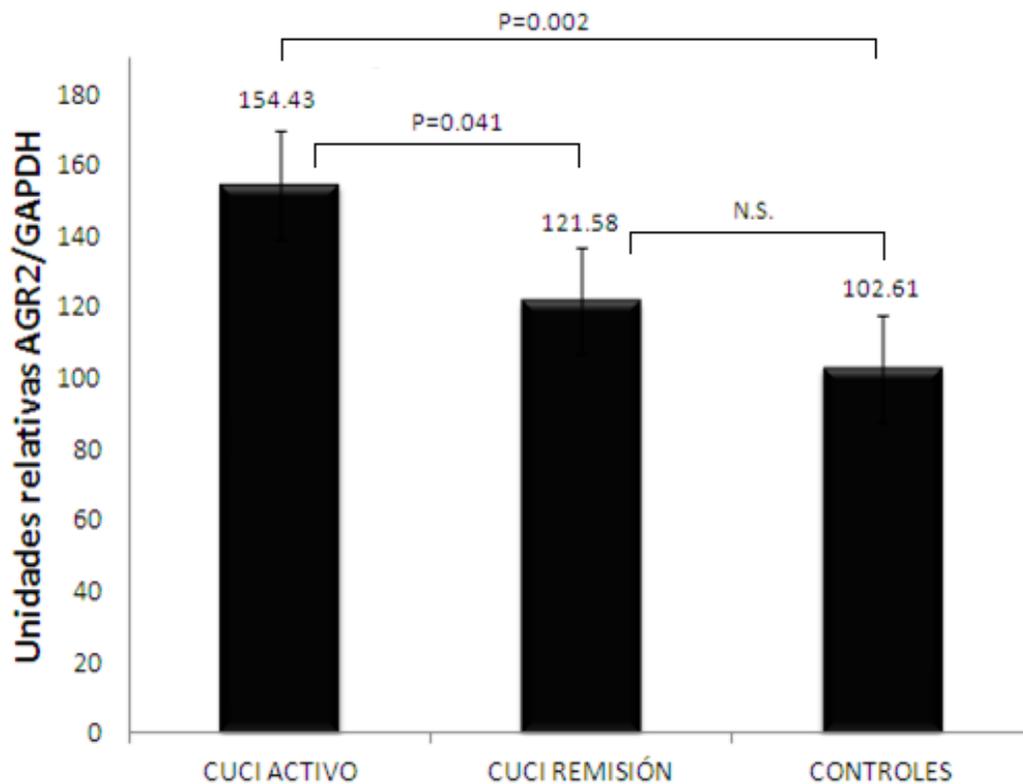


Figura12. Expresión de AGR2 en mucosa de recto de pacientes con CUCI: Se observa aumento en la expresión de AGR2 en CUCI en actividad en relación a los controles y a los pacientes en remisión. El valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo. NS= no significativo.

9.4.1 Asociación de expresión de AGR2 con características clínicas de la enfermedad.

No encontramos relación estadísticamente significativa entre la expresión de AGR2 con variables clínicas de la enfermedad como edad al diagnóstico, extensión de la enfermedad, años de evolución, manifestaciones extraintestinales, respuesta al tratamiento, y curso clínico (**Tabla 4**).

Tabla 4. Asociación de características clínicas y expresión de AGR2 en pacientes con CUCI (N=60)

Características clínicas	N	P
Edad al diagnóstico		
<40	48	0.469
>40	12	
Extensión de la enfermedad		
Pancolitis	34	0.831
Colitis distal	23	
Colitis izquierda	3	
Años de evolución de la enfermedad		
<3	12	0.304
>3	48	
Manifestaciones extraintestinales		
Presentes	23	0.902
Ausentes	37	
Respuesta al tratamiento		
Si	49	0.945
No	11	
Curso clínico de la enfermedad		
Cuadro inicial activo y después inactivo	29	0.220
Actividad leve	25	
Actividad persistente	6	

*P < 0.05 considerado estadísticamente significativo

9.5 Expresión de IRGM.

Los niveles de expresión del ARNm de IRGM aumentaron en pacientes CUCI remisión en comparación a los pacientes CUCI activos y controles sanos mostrando una diferencia significativa, así mismo entre pacientes CUCI activo y controles no se observaron diferencias significativas, se tomó una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa (**Figura 13**).

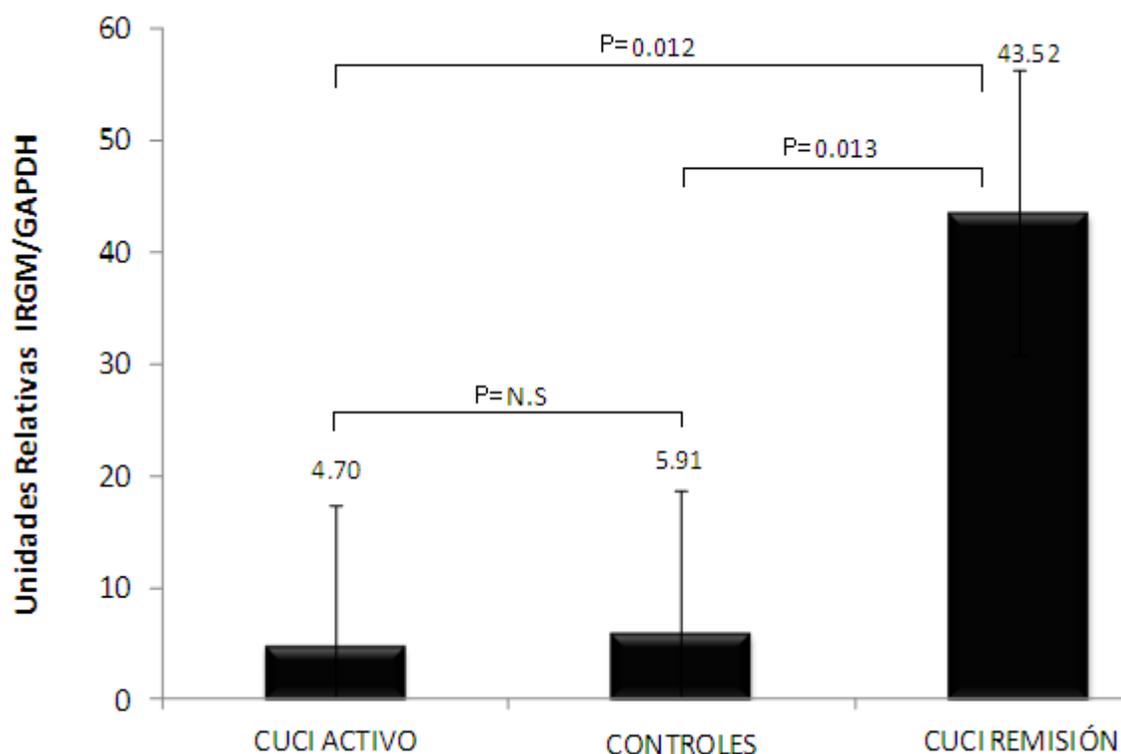


Figura 13. Expresión de IRGM en mucosa de recto de pacientes con CUCI: La expresión relativa del ARNm de IRGM aumentó en pacientes con CUCI remisión en comparación con activos ($p=0.012$) y controles sanos ($p=0.013$). Valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. NS= No significativo.

9.5.1 Asociación de los niveles de expresión de IRGM con características clínicas de la enfermedad.

Los niveles de expresión del gen IRGM estuvieron asociados con la respuesta al tratamiento de la enfermedad donde se observó significancia estadística ($p=0.01$). De acuerdo a los datos obtenidos de los pacientes que exhiben mayor expresión del gen IRGM presentan una adecuada respuesta al tratamiento, en comparación con aquellos con bajos niveles de expresión que manifiestan dependencia o intolerancia a esteroides e inmunomoduladores.

En otras variables clínicas como edad al diagnóstico, extensión de la enfermedad, años de evolución de la enfermedad, manifestaciones extraintestinales, curso clínico de la enfermedad no se encontraron diferencias significativas, al correlacionarlos con la expresión de IRGM (**Tabla 5**).

Tabla 5. Asociación de características clínicas y expresión de IRGM en pacientes con CUCI (N=60)

Características clínicas	N	P
Edad al diagnóstico		
<40	48	0.882
>40	12	
Extensión de la enfermedad		
Pancolitis	34	0.749
Colitis distal	23	
Colitis izquierda	3	
Años de evolución de la enfermedad		
<3	12	0.864
>3	48	
Manifestaciones extraintestinales		
Presentes	23	0.379
Ausentes	37	
Respuesta al tratamiento		
Si	49	0.001
No	11	
Curso clínico de la enfermedad		
Cuadro inicial activo y después inactivo	29	0.490
Actividad leve	25	
Actividad persistente	6	

*P < 0.05 considerado estadísticamente significativo

10. DISCUSIÓN

En el presente estudio evaluamos la expresión de los genes IRGM y AGR2 en biopsias de recto de pacientes con CUCI activo y en remisión así como en controles, y correlacionamos los niveles de expresión de estos genes con las características clínicas de la enfermedad.

Se han descrito algunas variantes génicas que disminuyen las tasas de expresión de AGR2, evento que se ha asociado a un riesgo incrementado de padecer alguna de las formas clínicas de EII (35). En un modelo murino realizado por Park y cols; 2009 se plantea que la supresión de la expresión del gen AGR2 reduce la síntesis de la proteína MUC2 a nivel intestinal induciendo colitis posterior a la exposición a DSS (46). En algunos estudios realizados en asma (patología con un perfil inmunológico Th2 similar a la CUCI), se ha observado una sobreexpresión de la proteína de AGR2 e hipersecreción de moco en respuesta a la exposición a un alérgeno a largo plazo (38). En un modelo *in vivo* realizado por Chen y cols; 2009 tras la exposición del alérgeno pulmonar ovoalbúmina, documentaron una sobreexpresión de los genes SPDEF, FOXA3, AGR2 y GNCT3, mismos que están involucrados en los procesos de diferenciación de células calciformes y glucosilación de proteínas que se encargan de la hiperproducción de moco (36). En nuestro estudio observamos un aumento significativo en la expresión del ARNm de AGR2 en pacientes con CUCI activo al compararlos con el grupo control y los pacientes con CUCI en remisión, lo cual sugiere que la expresión de AGR2 se ve incrementada en pacientes con CUCI activo como un mecanismo primario de protección, estimulando la producción de mucinas en respuesta a la inflamación de la mucosa colónica.

Se ha demostrado una relación directa entre la expresión de AGR2 y el estrés de retículo endoplásmico (RE), en un modelo *in vitro* realizado por Zhao y cols; 2010 señalan un incremento en los niveles de la proteína de AGR2 en respuesta a la exposición a tunicamicina, la cual desencadena estrés de RE al inhibir la glicosilación de proteínas (30). De acuerdo a los hallazgos encontrados en nuestro estudio

proponemos que el estrés de RE es un factor que ocasiona el aumento en los niveles de expresión génica de AGR2 en células epiteliales colónicas de pacientes con CUCI en actividad en respuesta al estrés de RE y a la presencia de inflamación local, lo cual está relacionado con estudios recientes que asocian el estrés de RE con la inhibición de la proliferación celular, estimulación de la apoptosis e inflamación tanto a nivel local y sistémico a través de la activación de NF- κ B, y la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , y TNF- α (25, 30). Por otro lado al analizar la relación entre la expresión de AGR2 y las variables clínicas de la enfermedad (edad al diagnóstico, extensión de la enfermedad, años de evolución, manifestaciones extraintestinales, respuesta al tratamiento, y curso clínico) no encontramos significancia estadística.

Inferimos que la sobreexpresión génica de AGR2 es directamente proporcional al estrés de RE, daño celular e inflamación encontrados en la mucosa colónica de pacientes con CUCI activo, a su vez, la presencia de AGR2 puede estar vinculada con la secreción de mucinas, mismas que fungen como la primera línea de defensa de la mucosa intestinal.

Nuestro estudio cobra relevancia porque es el primer reporte que caracteriza la expresión génica de IRGM en pacientes con CUCI. El gen IRGM se ha descrito como promotor de la autofagia en macrófagos. Existen reportes donde plantean que la autofagia actúa como un mecanismo antiinflamatorio impidiendo la formación de IL-1 β , esto lo hace a través de dos mecanismos, en primer lugar degrada fuentes endógenas agonistas del inflamosoma, y en segundo lugar inhibiendo la actividad de las proteínas NLRP3, y caspasa-1(47), esto puede explicar el hallazgo de nuestro estudio pues encontramos niveles elevados de la expresión de IRGM lo cual correlaciona con lo encontrado en nuestro estudio pues los pacientes en remisión mostraron un aumento en la expresión de IRGM (gen inductor de la autofagia) (29, 41, 42). Por lo tanto sugerimos que la autofagia es un proceso antiinflamatorio inducido en la enfermedad de CUCI por IRGM. Además, debido a que la autofagia es considerada un proceso caracterizado por el reciclaje de macromoléculas en sus

constituyentes básicos que promueven la generación de procesos anabólicos, Kaser y cols; proponen a la autofagia como un mecanismo de remodelación tisular (48), por ello planteamos que el aumento en la expresión génica del promotor de autofagia IRGM en pacientes con CUCI en remisión promueve un mecanismo de remodelación de tejido epitelial colónico.

La expresión del gen IRGM se asocia a una mejor respuesta al tratamiento ya que los pacientes que tenían niveles elevados de IRGM tuvieron significativamente menores requerimientos de fármacos inmunomoduladores (azatioprina) para el adecuado control de la enfermedad y este grupo no presentó resistencia esteroides, ni dependencia de los mismos ($p=0.001$).

Por otro lado, existen reportes que asocian los procesos de estrés de retículo endoplásmico con la autofagia como un proceso encargado de degradación de proteínas mal plegadas resultado de la ausencia de elementos relacionados con el mecanismo de degradación de proteínas mal plegadas durante el estrés de RE (31), en nuestro estudio se evaluó la expresión génica de AGR2, que inferimos es proporcional al estrés de RE en pacientes con CUCI donde se observó mayor expresión en actividad y por lo que proponemos que en este estadio existe estrés de RE en mucosa colónica pero que éste, no tiene relación con la autofagia, pues la expresión IRGM estuvo disminuida en pacientes con la enfermedad activa, debido a que prevalece el perfil inmunológico Th2.

En nuestro estudio se observó un aumento de la expresión del gen IL-6 en pacientes con CUCI activo lo cual se relaciona con lo reportado por Fonseca-Camarillo y cols; 2009 los cuales analizaron la expresión de IL-6 y su correlación con la actividad histológica de la enfermedad, lo cual confirma su utilidad como un marcador de inflamación (12).

Las limitaciones del presente estudio radican en que sólo pueden hacerse inferencias y no afirmaciones en cuanto a los procesos que se llevan a cabo en los pacientes con CUCI debido a que sólo contamos con la expresión del ARNm de AGR2 e IRMG, pero esta evidencia abre una brecha de investigación con el objeto de confirmar la presencia de los procesos de estrés de RE y autofagia en pacientes con CUCI, por lo que se pretende comprobar la presencia de AGR2 e IRGM a nivel proteína así como medir la expresión génica de elementos relacionados con el estrés de RE, y componentes de la maquinaria de control de calidad de proteínas a nivel de RE, así como evaluar la presencia del marcador de autofagia LC3 tanto en pacientes con CUCI en actividad y remisión para reunir evidencia que apoye nuestras hipótesis.

PERSPECTIVAS

En el modelo murino de Reiff y cols; 2009 suprimieron la expresión de IL-10 con el objeto de simular un ambiente proinflamatorio similar al de la CUCI y observaron que a la administración de el probiótico VSL#3 aumentaba la expresión del gen promotor de la autofagia IRGM, por lo que concluyeron que la autofagia es un proceso que debe ser adecuadamente regulado para evitar la inflamación excesiva (49), en nuestro estudio se observó una disminución significativa en la expresión génica IRGM en pacientes con CUCI en actividad en relación a los pacientes en remisión, por lo que proponemos como maniobra de intervención nutricia la administración de VSL#3 para promover la autofagia y disminuir el proceso inflamatorio característico de la CUCI. VSL#3 es un probiotico comercial de 4 cepas de lactobacilli (*Lactobacillus casei*, *L. plasntarum*, *L.acidophilus*, y *L. delbrueckii bulgaricus*), 3 cepas de bifidobacterias (*Bifidobacterium longum*, *B. breve*, y *B. infantis*) y *Streptococcus thermophilus* utilizado frecuentemente en el manejo de CUCI donde se ha visto remisión de los pacientes posterior a la administración del probiótico (50).

Varios mediadores de UPR pueden inducir directamente la formación del autofagosoma e iniciar el proceso de autofagia, IRE1- α (requeridor de inositol1- α) una quinasa y endoribonucleasa interactúa con TRAF2 (Factor asociado a receptor

de TNF- α) e induce la activación de la señalización de JNK en condiciones de estrés, JNK es capaz de inducir directamente la formación del autofagosoma, a través de LC3, por ello aun se requiere de mayor investigación para constatar que estos dos procesos (autofagia y estrés de RE) se lleven a cabo en la fisiopatología de la CUCI.

11. CONCLUSIONES

El presente estudio demuestra que el gen de AGR2 se encuentra sobre expresado en pacientes con CUCI activo en comparación a los controles, lo que nos indica de que existe aumento en el estrés de retículo endoplásmico de células epiteliales colónicas. El gen de IRGM se encuentra sobreexpresado en pacientes con CUCI en remisión lo que sugiere que el proceso de autofagia se lleva a cabo en células epiteliales colónicas confiriéndoles protección, estos hallazgos no habían sido descritos antes en pacientes con CUCI es por ello abre nuevas perspectivas para continuar con el estudio de los mecanismos de estrés de RE y autofagia en la fisiopatopatología de la CUCI, así como el manejo del paciente desde el punto de vista nutricional que modifique la expresión de genes que confieren protección de la enfermedad.

La expresión del gen IRGM se asocia a una respuesta favorable al tratamiento, el resto edad al diagnóstico, extensión de la enfermedad, años de evolución de la enfermedad, manifestaciones extraintestinales y curso clínico con la CUCI, no estuvieron relacionados con la expresión de IRGM ni con AGR2.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Yamamoto-Furusho, J.K. 2009. Enfermedad inflamatoria intestinal Rev Gastroenterol Mex. 74: Supl. 1.
2. Podolsky, D.K. 2002. Inflammatory bowel disease. N Engl J Med 347:417-429.
3. Danese, S., and Fiocchi, C. 2011. Ulcerative colitis. N Engl J Med 365:1713-1725.
4. Aufses, A.H., Jr. 2001. The history of Crohn's disease. Surg Clin North Am 81:1-11, vii.
5. Camacho, E., and Yamamoto-Furusho, J.K. 2010. Manifestaciones clínicas, diagnóstico y escalas de actividad en la enfermedad inflamatoria intestinal. En: Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Aspectos básicos y clínicos. (ed.) Dr. Jorge Aldrete Velasco. Alfil S.A. de C.V., México. pp: 37-42.
6. Lakatos, L., and Lakatos, P.L. 2006. Is the incidence and prevalence of inflammatory bowel diseases increasing in Eastern Europe? Postgrad Med J 82:332-337.
7. Matricon, J., Barnich, N., and Ardid, D. 2010. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. Self Nonself 1:299-309.
8. Yamamoto-Furusho, J.K. 2009. Clinical epidemiology of ulcerative colitis in Mexico: a single hospital-based study in a 20-year period (1987-2006). J Clin Gastroenterol 43:221-224.
9. Yarur, A.J., Strobel, S.G., Deshpande, A.R., and Abreu, M.T. 2011. Predictors of aggressive inflammatory bowel disease. Gastroenterol Hepatol (N Y) 7:652-659.
10. Vilela, E.G., Torres, H.O., Martins, F.P., Ferrari Mde, L., Andrade, M.M., and Cunha, A.S. 2012. Evaluation of inflammatory activity in Crohn's disease and ulcerative colitis. World J Gastroenterol 18:872-881.
11. Barreto-Zúñiga, R. 2010. Características endoscópicas de la enfermedad inflamatoria intestinal. En: Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Aspectos básicos y clínicos. (ed.) Dr. Jorge Aldrete Velasco. Alfil S.A. de C.V., México. pp: 63-74.

12. Fonseca-Camarillo, G., Villeda-Ramirez, M., Sanchez-Munoz, F., Barreto-Zuniga, R., Dominguez-Lopez, A., Uribe-Esquivel, M., and Yamamoto-Furusho, J. 2009. [IL-6 and TNF-a gene expression in the rectal mucosal of patients with chronic idiopathic ulcerative colitis and controls.]. *Rev Gastroenterol Mex* 74:334-340.
13. Navaneethan, U., Mukewar, S., Venkatesh, P.G., Lopez, R., and Shen, B. 2012. Clostridium difficile infection is associated with worse long term outcome in patients with ulcerative colitis. *J Crohns Colitis* 6:330-336.
14. Moshkowitz, M., Kariv, R., Half, B., Vilkin, A., Levi, Z., Niv, Y., and Dotan, I. 2011. [Surveillance of patients with inflammatory bowel diseases]. *Harefuah* 150:389-391, 417.
15. Levine, J., and Burakoff, R. 2011. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol & Hepatol.* 7:235-241.
16. Hansen, T.S., Jess, T., Vind, I., Elkjaer, M., Nielsen, M.F., Gomborg, M., and Munkholm, P. 2011. Environmental factors in inflammatory bowel disease: a case-control study based on a Danish inception cohort. *J Crohns Colitis* 5:577-584.
17. Cabre, E., and Domenech, E. 2012. Impact of environmental and dietary factors on the course of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 18:3814-3822.
18. Hou, J.K., Abraham, B., and El-Serag, H. 2011. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Gastroenterol* 106:563-573.
19. Ballesteros Pomar, M.D., Vidal Casariego, A., Calleja Fernandez, A., Lopez Gomez, J.J., Urioste Fondo, A., and Cano Rodriguez, I. 2010. [Impact of nutritional treatment in the evolution of inflammatory bowel disease]. *Nutr Hosp* 25:181-192.
20. Singhal, S., Dian, D., Keshavarzian, A., Fogg, L., Fields, J.Z., and Farhadi, A. 2011. The role of oral hygiene in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 56:170-175.

21. Barclay, A.R., Russell, R.K., Wilson, M.L., Gilmour, W.H., Satsangi, J., and Wilson, D.C. 2009. Systematic review: the role of breastfeeding in the development of pediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr* 155:421-426.
22. Klement, E., Cohen, R.V., Boxman, J., Joseph, A., and Reif, S. 2004. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 80:1342-1352.
23. Villeda, R., and Yamamoto, J. Etiopatogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal. En: *Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Aspectos básicos y clínicos.* (ed.) Dr. Jorge Aldrete Velasco. Alfil S.A. de C.V., México. pp: 11-16.
24. Richaud-Patin, Y., Soto-Vega, E., and Llorente, L. 2005. The gut: beyond immunology. *Reumatol Clin* 1:121-128.
25. Heazlewood, C.K., Cook, M.C., Eri, R., Price, G.R., Tauro, S.B., Taupin, D., Thornton, D.J., Png, C.W., Crockford, T.L., Cornell, R.J., et al. 2008. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med* 5:e54.
26. Sansonetti, P.J. 2008. War and peace at the intestinal epithelial surface: an integrated view of bacterial commensalism versus bacterial pathogenicity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 46 Suppl 1:E6-7.
27. Kaser, A., Zeissig, S., and Blumberg, R.S. 2010. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 28:573-621.
28. Cho, J.H. 2008. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 8:458-466.
29. Delgado, M., Singh, S., De Haro, S., Master, S., Ponpuak, M., Dinkins, C., Ornatowski, W., Vergne, I., and Deretic, V. 2009. Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity. *Immunol Rev* 227:189-202.
30. Zhao, F., Edwards, R., Dizon, D., Afrasiabi, K., Mastroianni, J.R., Geyfman, M., Ouellette, A.J., Andersen, B., and Lipkin, S.M. 2010. Disruption of Paneth and goblet cell homeostasis and increased endoplasmic reticulum stress in *Agr2*^{-/-} mice. *Dev Biol* 338:270-279.

31. Higa, A., Mulot, A., Delom, F., Bouche-careilh, M., Nguyen, D.T., Boismenu, D., Wise, M.J., and Chevet, E. 2011. Role of pro-oncogenic protein disulfide isomerase (PDI) family member anterior gradient 2 (AGR2) in the control of endoplasmic reticulum homeostasis. *J Biol Chem* 286:44855-44868.
32. Morito, D., and Nagata, K. 2012. ER Stress Proteins in Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Front Immunol* 3:48.
33. Brychtova, V., Vojtesek, B., and Hrstka, R. 2011. Anterior gradient 2: a novel player in tumor cell biology. *Cancer Lett* 304:1-7.
34. Ellgaard, L., and Ruddock, L.W. 2005. The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep* 6:28-32.
35. Zheng, W., Rosenstiel, P., Huse, K., Sina, C., Valentonyte, R., Mah, N., Zeitlmann, L., Grosse, J., Ruf, N., Nurnberg, P., et al. 2006. Evaluation of AGR2 and AGR3 as candidate genes for inflammatory bowel disease. *Genes Immun* 7:11-18.
36. Chen, G., Korfhagen, T.R., Xu, Y., Kitzmiller, J., Wert, S.E., Maeda, Y., Gregorieff, A., Clevers, H., and Whitsett, J.A. 2009. SPDEF is required for mouse pulmonary goblet cell differentiation and regulates a network of genes associated with mucus production. *J Clin Invest* 119:2914-2924.
37. Khor, B., Gardet, A., and Xavier, R.J. 2011. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474:307-317.
38. Abraham, C., and Medzhitov, R. 2011. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 140:1729-1737.
39. Simonsen, A., and Stenmark, H. 2008. Self-eating from an ER-associated cup. *J Cell Biol* 182:621-622.
40. Parkes, M., Barrett, J.C., Prescott, N.J., Tremelling, M., Anderson, C.A., Fisher, S.A., Roberts, R.G., Nimmo, E.R., Cummings, F.R., Soars, D., et al. 2007. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other

replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* 39:830-832.

41. Gregoire, I.P., Richetta, C., Meyniel-Schicklin, L., Borel, S., Pradezynski, F., Diaz, O., Deloire, A., Azocar, O., Baguet, J., Le Breton, M., et al. 2011. IRGM is a common target of RNA viruses that subvert the autophagy network. *PLoS Pathog* 7:e1002422.
42. Arnoult, D., Soares, F., Tattoli, I., and Girardin, S.E. 2011. Mitochondria in innate immunity. *EMBO Rep* 12:901-910.
43. Singh, S.B., Ornatowski, W., Vergne, I., Naylor, J., Delgado, M., Roberts, E., Ponpuak, M., Master, S., Pilli, M., White, E., et al. 2010. Human IRGM regulates autophagy and cell-autonomous immunity functions through mitochondria. *Nat Cell Biol* 12:1154-1165.
44. Harris, J., De Haro, S.A., Master, S.S., Keane, J., Roberts, E.A., Delgado, M., and Deretic, V. 2007. T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity* 27:505-517.
45. Riley, S.A., Mani, V., Goodman, M.J., Herd, M.E., Dutt, S., and Turnberg, L.A. 1988. Comparison of delayed-release 5-aminosalicylic acid (mesalazine) and sulfasalazine as maintenance treatment for patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 94:1383-1389.
46. Park, S.W., Zhen, G., Verhaeghe, C., Nakagami, Y., Nguyenvu, L.T., Barczak, A.J., Killeen, N., and Erle, D.J. 2009. The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:6950-6955.
47. Deretic, V., Jiang, S., and Dupont, N. 2012. Autophagy intersections with conventional and unconventional secretion in tissue development, remodeling and inflammation. *Trends Cell Biol* 22:397-406.
48. Kaser, A., and Blumberg, R.S. 2011. Autophagy, microbial sensing, endoplasmic reticulum stress, and epithelial function in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 140:1738-1747.

49. Reiff, C., Delday, M., Rucklidge, G., Reid, M., Duncan, G., Wohlgemuth, S., Hormannsperger, G., Loh, G., Blaut, M., Collie-Duguid, E., et al. 2009. Balancing inflammatory, lipid, and xenobiotic signaling pathways by VSL#3, a biotherapeutic agent, in the treatment of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 15:1721-1736.
50. Jonkers, D., Penders, J., Masclee, A., and Pierik, M. 2012. Probiotics in the management of inflammatory bowel disease: a systematic review of intervention studies in adult patients. *Drugs* 72:803-823.
51. Cosnes J., Gower-Rousseau C., Seksik P., Cortot A. 2011. Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases *Gastroenterology* 140:1785-1794.e4.
52. Johns Hopkins medicine. gastroenterology and hepatology. Dirección: http://www.hopkins-gi.org/GDL_Disease.aspx?CurrentUDV=31&GDL_Disease_ID=2A4995B2-DFA5-4954-B770-F1F5BAFED033&GDL_DC_ID=D03119D7-57A3-4890-A717-CF1E7426C8BA Acceso: 20 /02/12

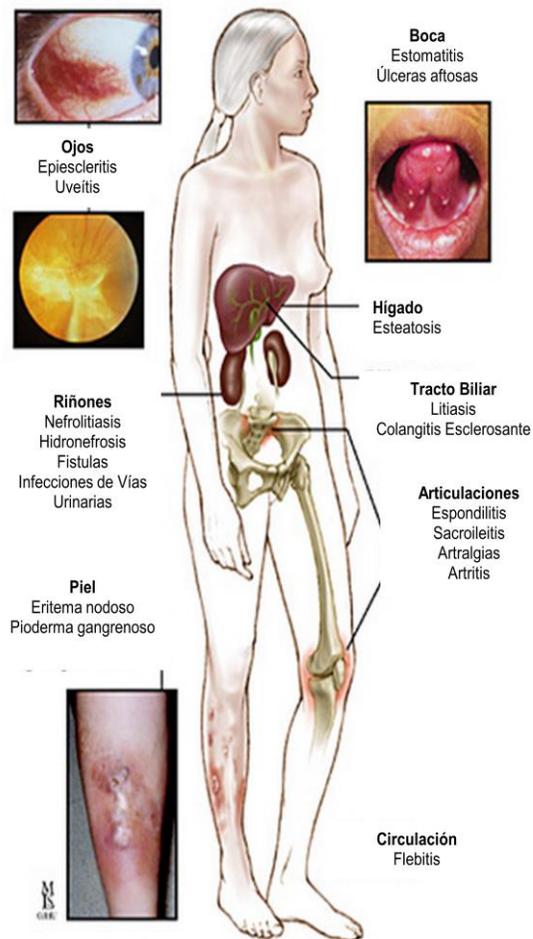
13. ANEXOS

Anexo 1: Escala de Mayo

	0	1	2	3
Frecuencia de las evacuaciones	Normal	1 o 2 x día >de lo normal	3 o 4 x día >de lo normal	5 por día >de lo normal
Sangrado rectal	Ninguno	Estrías	Obvio	Abundante
Mucosa (endoscópica)	Normal	Leve friabilidad	Moderada friabilidad	Sangrado espontáneo
Estado global según el médico	Inactivo	Actividad leve	Actividad moderada	Actividad grave

Tomado de: Camacho Escobedo J.A., Yamamoto F.J.K Enfermedad Inflamatoria Intestinal. 2010

Anexo 2: Manifestaciones extraintestinales en la EII



Manifestaciones extraintestinales en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal

Tomada y modificada de: Johns Hopkins/Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2011

Anexo 3: Manifestaciones extraintestinales

Sitios	Manifestación extraintestinal
Sistema musculoesquelético	<ul style="list-style-type: none">• Artritis: en espina, articulación sacroiliaca, articulaciones periféricas y espondilitis anquilosante,• Osteoartropatía hipertrófica: periostitis• Manifestaciones misceláneas: osteoporosis, poliomiostosis, necrosis aséptica.
Sistema dermatológico y oral	<ul style="list-style-type: none">• Lesiones reactivas: eritema nodoso, pioderma gangrenoso, estomatitis aftosa, vasculitis necrosante, dermatitis inflamatoria aguda• Lesiones específicas: fisuras, fístulas.• Deficiencias nutricionales: acrodermatitis enteropática, purpura, glositis, pérdida de cabello• Enfermedades asociadas: vitiligo, psoriasis, amiloidosis.
Sistema hepatopancreatobiliar	<ul style="list-style-type: none">• Colangitis esclerosante primaria, carcinoma del ducto biliar• Inflamaciones asociadas: hepatitis autoinmune, pericolangitis, fibrosis portal, cirrosis, enfermedad granulomatosa.• Manifestaciones metabólicas: hígado graso.
Sistema ocular	<ul style="list-style-type: none">• Uveítis/iritis, episcleritis, escleromalacia, úlcera corneal, enfermedad vascular retinal.
Sistema metabólico	<ul style="list-style-type: none">• Retraso del crecimiento de niños y adolescentes, retraso en la maduración sexual
Sistema renal	<ul style="list-style-type: none">• Cálculos de oxalato y calcio

Tomado de: Levine J., and Burakoff R. 2011. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol & Hepatol.* 7(4):235-241

Anexo 4: Expresión de Agr2 en tejidos normales (derivado del atlas de proteínas humanas)

Tejidos normales ¹	Tipo celular	Expresión de proteína
Apéndice	Células glandulares	Fuerte
Mama	Células glandulares	Débil
Bronquios	Células del epitelio respiratorio	Fuerte
Cortex cerebral	Células neuronales	Moderado
Cuello uterino	Células glandulares	Fuerte
Colon	Células glandulares	Fuerte
Cuerpo uterino	Células glandulares	Fuerte
Duodeno	Células glandulares	Fuerte
Epidídimo	Células glandulares	Fuerte
Trompas de Falopio	Células glandulares	Fuerte
Vesícula biliar	Células glandulares	Fuerte
Riñón	Células en túbulos	Moderado
Pulmón	Células alveolares	Moderado
Nasofaringe	Células de epitelio respiratorio	Fuerte
Páncreas	Células glandulares exocrinas	Moderado
Placenta	Células trofoblásticas	Moderado
Próstata	Células glandulares	Fuerte
Recto	Células glandulares	Fuerte
Vesícula seminal	Células glandulares	Fuerte
Intestino delgado	Células glandulares	Fuerte
Estómago	Células glandulares	Fuerte
Amígdala	Células de epitelio escamoso	Moderado
Vejiga	Células uroteliales	Fuerte

1 Tinción inmunohistoquímica

Tomada de Brychtova V, Vojtesek B, Hrstka R. 2011. Anterior gradient 2: A novel player in tumor cell biology. *Cancer Lett.* 304:1-7

Anexo 5: Carta de consentimiento informado.

Determinación de la expresión de los genes AGR2 e IRGM en pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Inespecífica (CUCI).

1. Estoy enterado y de acuerdo en participar de manera voluntaria en un estudio clínico cuyo objetivo es estudiar el mecanismo por el cual se produce la CUCI e investigar si existen factores a nivel genético para el desarrollo de la enfermedad que padece, mi participación sólo consiste en permitir la obtención de una biopsia de mi intestino.
2. Para llevar a cabo el estudio es necesario tomar una muestra de sangre de aproximadamente 4ml con el objeto de extraer el material genético (ADN) a partir de las células sanguíneas periféricas así como biopsias de mi intestino grueso.
3. Los resultados serán comunicados a la brevedad posible y serán totalmente confidenciales.
4. El material genético y biopsias obtenidas no será sometidas a ningún tipo de manipulación. La información obtenida solamente será con fines de investigación.
5. Este tipo de estudio no conlleva ningún tipo de riesgo a mi persona a excepción del riesgo de perforación del intestino grueso en menos del 0.001% de los casos y en el caso de la muestra sanguínea sólo consistirá en molestia durante la toma.
6. La decisión es voluntaria y mi no participación en el estudio no afectará el tratamiento y atención clínica en el Instituto.
7. El costo del estudio genético y colonoscópico será cubierto por fines de investigación.
8. El estudio se realizará en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

Nombre y firma del paciente.

Nombre del investigador.

Testigo I

Testigo II

Hoja de informe al paciente para participar en el estudio.

La Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI) es una enfermedad que consiste en la inflamación de la capa en el interior del intestino grueso o colon, se desconoce la causa que lo produce, pero se han realizado diversos estudios en lo que se ha encontrado que existen algunas porciones de material genético que producen ciertas proteínas que atacan a la capa interna del intestino.

El estudio de una parte del material genético que produce una proteína que interviene en la defensa para el desarrollo de la Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática.

Existen pocos estudios a nivel del mundo que han estudiado esto, sin embargo, fueron realizados en otras poblaciones diferentes a la nuestra, por lo tanto, en México y en toda América Latina no hay estudios de este tipo.

El objetivo de este estudio consiste en la determinación de una parte del material genético produce una proteína que influye en el desarrollo mi enfermedad así como ver si se correlaciona con la expresión de la misma en tejido de colon así como con manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Ello ayudará al mejor entendimiento de la enfermedad y a poder en un futuro el desarrollo de nuevos tratamientos enfocados al control de la actividad de dicha enfermedad.

El único potencial riesgo es la perforación de mi colon durante el estudio, el cual se presenta en menos del 0.001% de los casos. En el caso de la toma de sangre, no existe riesgo alguno y sólo la molestia de la toma de sangre, la cual será utilizada para obtener el material genético, el sólo será utilizado para esta investigación y el resto será desechado.

Todas las dudas y aclaraciones serán resueltas por el investigador a cargo. El estudio no tendrá ningún costo y los resultados serán informados a la brevedad posible de manera confidencial.

No existirá compensación de ningún tipo incluyendo la económica y la participación es totalmente voluntaria, en caso, de que no desee participar en el estudio, ello no modificará la calidad de atención ni penalización alguna.

Se anexa carta de consentimiento informado por escrito.

Dr. Jesús Kazuo Yamamoto Furusho.

Investigador Principal.

Tel: 54 87 09 00 Ext: 2716.