



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

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

**Expresión del Gen de Resistencia a Múltiples
Fármacos (MDR1) en Mucosa de Pacientes
con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática
(CUCI).**

T E S I S

**Que para obtener el título de
Licenciado en Nutrición**

P R E S E N T A

Marco Antonio Villeda Ramírez

Bajo la Dirección de:

Dr. Jesús Kazuo Yamamoto Furusho



Pachuca de Soto, Hgo., agosto de 2008



**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

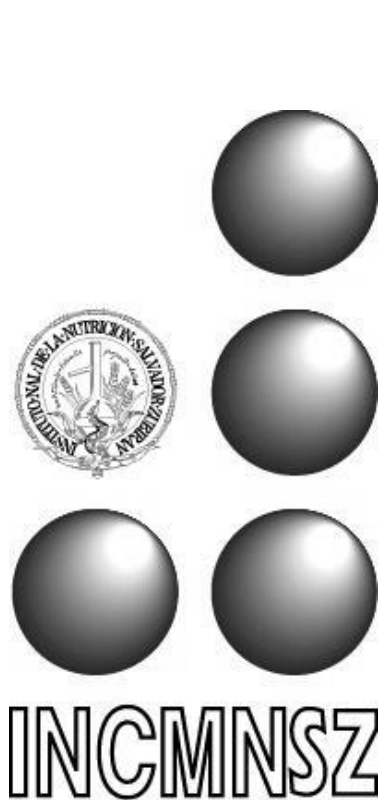
"Expresión del Gen de Resistencia a Múltiples Fármacos (MDR1) en Mucosa de Pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI) "

Que para obtener el Título de Licenciado de Nutrición sustenta el Pasante

C. Marco Antonio Villeda Ramírez

ATENTAMENTE
Pachuca, Hidalgo., 29 de Mayo del 2008
"Amor, Orden y Progreso"

PRESIDENTE DEL JURADO	DRA. YOLANDA SÁNCHEZ MONJARAZ
SECRETARIO DE JURADO	QFB. ZURISSADAI BETANZOS PALMEROS
1er. VOCAL DEL JURADO	DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA
2º VOCAL DEL JURADO	DR. JESÚS KAZUO YAMAMOTO FURUSHO
3er. VOCAL DEL JURADO	L. NUTR. ANA MARÍA GONZÁLEZ PONCE
SUPLENTE	L. NUTR. JORGE VÍCTOR CASTRO GUTIÉRREZ
SUPLENTE	DR. JUAN BERNARDO FLORES REPPER



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio del Departamento de Gastroenterología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, con el apoyo, dirección y supervisión de: Dr. Aarón Domínguez López, Dr. Jesús Kazuo Yamamoto Furusho, Mtro. Fausto Sánchez Muñoz Mtra. Sara Sixtos Alonso.

Dedicada con cariño a:

Mi mamá y hermanos.

Amigos y compañeros del laboratorio.

Agradecimientos:

A mi mamá y a mis hermanos que son lo que más quiero y a dios por ser piezas claves en mi vida, un agradecimiento a mi papá por su apoyo económico, pues sin este no podría haber concluido mis estudios hasta este nivel.

Al personal del departamento de gastroenterología del INCMNSZ por su amabilidad, ayuda y confianza en especial a: Dr. Aarón Domínguez López, Dr. J. Kazuo Yamamoto Furusho, Maestro Fausto Sánchez Muñoz, Maestra Sara Sixtos Alonso, Maestra Teresa Iglesias.

Al personal del departamento de endoscopia del INCMNSZ por las facilidades otorgadas para obtener las biopsias y muestras de sangre en especial a: A Gaby por ayudarme con el banco de biopsias y muestras de sangre, a las enfermeras Elia, Beatriz y Verónica, a los doctores endoscopistas y anestesiólogos.

A la plantilla de personal académico del Área Académica de Nutrición de la UAEH por haber sido parte fundamental en mi formación como profesional.

A los compañeros y amigos Sony, Ely, Pao, Nallely, Hugo y Rosalba, al IBD team Gaby, Lorena, Azucena y Fausto que formamos el grupo de estudiantes del laboratorio de Gastroenterología, gracias a la ayuda mutua y al trabajo en equipo cumplimos con nuestros objetivos.

Como seres humanos muchos de nosotros buscamos un desarrollo integral, esta pequeña investigación aporta a mi crecimiento como profesional, pero estas tres frases han influido determinadamente en mi crecimiento como persona en el pasado, en el presente y seguiré tomando en cuenta en el futuro.

*Mientras el tímido reflexiona,
el valiente va, triunfa y
vuelve.
Proverbio griego.*

*Más confío en el trabajo
Que en la suerte.
Proverbio latino.*

*Las grandes almas tienen
voluntades; las débiles tan
solo deseos.
Proverbio chino.*

Espero que este trabajo de sirva de motivación para que otros estudiantes, pasantes y Lic. En nutrición se interesen por el campo de la investigación ya que de ésta manera podemos contribuir al crecimiento de la Nutrición.

ABREVIATURAS

ADN c: Ácido desoxirribonucleico complementario.

ABC: ATP Binding Cassette Family. Proteínas de unión a ATP.

ARN m: Ácido ribonucleico mensajero.

CD: Crohn disease.

CUCI: Colitis ulcerosa crónica idiopática.

DEPC: Dietil-policarbonato.

EC: Enfermedad de Crohn.

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal.

IBD: Inflammatory bowel disease.

IL: Interleucina.

INF: Interferón.

INCMNSZ: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

MDR1: Multidrug resistant gene 1. Gen de resistencia a múltiples fármacos 1.

NBD: Nucleotide binding domain. Sitios de unión a nucleótidos.

PCR: Polymerase Chain reaction. Reacción en cadena de la polimerasa.

P-gp: Glycoprotein-P. Glucoproteína-P.

ROS: Especies reactivas del oxígeno.

RPLP0: Ribonucleoproteína larga humana P0.

SNPs: Single nucleotide polymorphisms. Polimorfismos de un solo nucleótido.

TBE: Tris Borato EDTA.

Th: T helper cells. Células colaboradoras T.

TLR: Toll like receptors. Receptores tipo toll.

TMD: Transmembranal domain. Dominios transmembranales.

TNF: Tumoral necrosis factor. Factor de necrosis tumoral.

UC: Ulcerative Colitis.

UV: Ultravioleta.

VHC: Virus de la hepatitis C.

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana.

ÍNDICE

I. Resumen	1
1.1 Abstract	2
II. Marco teórico	3
2.1 Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII)	3
2.2 Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI)	4
2.2.1 Epidemiología	4
2.2.2 Patogénesis	6
2.2.2.1 Factores ambientales	6
2.2.2.2 Factores inmunológicos	7
2.2.2.3 Factores genéticos	8
2.2.3 Tratamiento	9
2.3 Proteínas de Unión a ATP (ABC)	10
2.3.1 El gen de Resistencia a Múltiples Fármacos (MDR1)	11
2.3.2 La glicoproteína P (P-gp)	14
2.3.3 El fenómeno de resistencia a múltiples fármacos	16
2.3.4 Participación de los polimorfismos del gen MDR1 en CUCI	17
2.3.4.1 Polimorfismo C3435T	17
2.3.4.2 Polimorfismo G2722T	18
III. Planteamiento del problema	20
IV. Justificación	21
V. Objetivos	22
5.1 Objetivo general	22
5.2 Objetivos específicos	22
VI. Hipótesis	22
VII. Pacientes, materiales y métodos	23
7.1 Pacientes	24
7.2 Materiales	26
7.3 Métodos y técnicas	28

VIII. Resultados	33
8.1 Características clínicas y demográficas	33
8.2 Electroforesis en gel de agarosa	34
8.3 PCR tiempo real	35
8.4 Expresión del gen MDR1	36
8.5 Expresión de la IL-6	37
8.6 Correlación MDR1/IL-6	38
8.7 Correlación expresión MDR1/características clínicas	39
IX. Discusión	41
X. Conclusiones	45
XI. Bibliografía	46
XII. Anexos	52

I. RESUMEN

La Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI) es una Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) de etiología desconocida. Sin embargo, se ha asociado con la interacción de factores ambientales, inmunológicos y genéticos. Polimorfismos y una menor expresión del gen de Resistencia a Múltiples Fármacos 1 (MDR1) se ha asociado con el desarrollo de la CUCI y con la resistencia a fármacos empleados en el tratamiento de dicha enfermedad. La glucoproteína P (P-gp), el producto de MDR1 pertenece a la familia de las proteínas de unión a ATP (ABC), la cual, está compuesta de 1280 aminoácidos con 6 dominios transmembranales, se expresa en células como el hepatocito y enterocito. El objetivo de esta investigación es cuantificar la expresión de MDR1 y su relación con las variables clínicas en biopsia intestinal de pacientes con CUCI y controles normales. Se realizó un estudio de casos controles compuestos por 2 grupos: pacientes con CUCI dividido en pacientes con actividad (n=11) y pacientes en remisión (n=11) y un grupo control (n=12). Como grupo control se eligieron individuos que en el estudio de colonoscopia presentaban características normales de la mucosa sin datos de inflamación. Se tomó una biopsia para hacer la extracción de RNA total y posteriormente se realizó la síntesis del ADN c mediante transcripción reversa. El análisis de expresión del gen MDR1 e IL-6 se realizó por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) tiempo real. Los resultados se analizaron por pruebas de U de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis y correlación de Spearman, tomando como valor significativo un valor de $p < 0.05$. Se determinó que la expresión del gen MDR1 disminuye en pacientes con CUCI en actividad en relación al los grupos en remisión y control. Los niveles de expresión en pacientes en remisión también disminuyeron en relación al grupo control. Cuantificar los niveles de expresión del gen MDR1 puede ser un factor predictor de respuesta al tratamiento farmacológico y del curso clínico de pacientes con CUCI.

Palabras clave: Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática, expresión de MDR1, PCR tiempo real.

1.1 ABSTRACT

Ulcerative Colitis (UC) is and Inflammatory Bowel Disease (IBD) of Unknown etiology. However, it has been associated by interactions by environmental, immunological and genetic factors. Some polymorphisms and a low expression on Multidrug Resistant gene 1 has been associated in UC development and drug resistant of some drugs used in the UC treatment. The Glycoprotein-P (P-gp), it's the product of MDR1 gene and it's the first member of ATP Binding Cassette Family (ABC), witch is composed by 1280 aminoacids with 6 transmembranal domains, the P-gp express in normal cells such as hepatocyte and enterocyte. The aim of this work is to determinate the levels expression of MDR1 from biopsies of patients with UC and controls and to evaluate with UC clinical features. Case-control study was performed and composed by 2 groups: UC patients with active (n=11) and remission disease (n=11) and a control group (n=12). Subjects who have normal characteristics of the mucosa in colonoscopy study were considered as a control group. One biopsy was used for mRNA extraction, therefore was reversed-transcribed. The expression analysis of MDR1 gene and IL-6 was obtained by real time PCR. The results were analyzed by U Mann-Whitney, Kruskal-Wallis test and Spearman correlation, $p \leq 0.005$ value was consider as significant. The MDR1 gene expression decreased in patients with active UC in comparison to the remission patients as well as the control group. The MDR1 expression decreased en patients with remission UC compared with control group. Determinate MDR1 expression can be a predictor factor for response to medical treatment and clinical course in patients with UC.

Key Words: Ulcerative Colitis, MDR1 expression, Real Time PCR.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (EII)

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal es un proceso inflamatorio crónico del tracto gastrointestinal de etiología desconocida. Comprende 2 entidades patológicas: la Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI) que afecta una parte o la totalidad del colon y la Enfermedad de Crohn (EC) la cual puede afectar a todo el tracto gastrointestinal (García, 2003). Cada una presenta características clínicas diferentes como: la localización de la región intestinal afectada y las características de la inflamación (Anexo 1) (Braun y Wei, 2007).

Aunque actualmente se conocen mejor los diferentes aspectos de su fisiopatología, sigue sin aclararse la naturaleza etiológica de ambas entidades. Sin embargo, se apoya la hipótesis de que la predisposición genética individual junto con factores ambientales relacionados fundamentalmente con la higiene, la modernización y refinamiento de nuestra dieta, llevan a una pérdida de la tolerancia intestinal a la flora residente, quizás condicionada por episodios previos de infección intestinal, originando la puesta en marcha de mediadores proinflamatorios específicos y respuesta linfocitaria, que se perpetúa en el tiempo, condicionando el carácter crónico y recurrente de estos procesos (Bousoño y Ramos, 2006).

La EII ocurre en pacientes clínicamente inmunocompetentes que presentan signos y síntomas como dolor abdominal, diarrea, sangrado rectal, pérdida de peso, fiebre y fatiga. Esta inflamación es producida por la proliferación de citocinas que difieren entre EC y CUCI, la EC está asociada a la síntesis de citocinas como la interleucinas (IL) como la IL-12, IL-23, IL-17 e interferón (IFN) gama, presenta ulceraciones discontinuas e inflamación de la pared intestinal, mientras que la CUCI está caracterizada por la inflamación continua de la mucosa del colon producida por la liberación de IL-13 e IL-5 afectando principalmente el recto (Strober y col., 2007).

2.2 COLITIS ULCEROSA CRÓNICA IDIOPÁTICA (CUCI)

La CUCI está limitada al colon, es de naturaleza superficial, y se caracteriza por una agresión continua de la mucosa con ulceraciones, desestructuración de las criptas y depleción de células mucoides (Bousoño y Ramos, 2006).

La CUCI se reconoció por primera vez en 1859 por Samuel Wilks como una identidad separada de la disentería bacilar a la cual denominó “colitis idiopática simple “. Las características clínicas y la evolución natural fueron descritas por Hawkins en 1909, quien además identificó que el curso podría ser crónico o intermitente. El diagnóstico se determina con base en las características clínicas, endoscópicas e histológicas, los pacientes pueden presentar complicaciones en órganos extraintestinales como referentes de diagnóstico, repercutiendo considerablemente en el estado de salud en general de los pacientes (Anexo 1) (Yamamoto-Furusho, 2006).

Norman K. y col. en el 2006 en su estudio del efecto de las enfermedades gastrointestinales sobre la calidad de vida en el que se valoraron 69 pacientes con EII (46 con EC y 23 con CUCI) llegaron a la conclusión (evaluando diferentes parámetros) que ésta se ve severamente afectada en relación con otras patologías gastrointestinales (Norman y col., 2006). El retraso del crecimiento y la malnutrición son dos complicaciones de trascendencia en población pediátrica con CUCI que están condicionadas por déficit de aporte y anorexia, exceso de pérdidas energéticas y malabsorción intestinal (Bousoño y Ramos, 2006).

2.2.1 Epidemiología

La CUCI y la EC son trastornos inflamatorios que se encuentran ampliamente distribuidos en todo el mundo, la prevalencia e incidencia es variada y depende de múltiples factores. La prevalencia en población general es de 100 por cada 100,000 habitantes y 10,000 nuevos casos son reportados anualmente (Knigge, 2002).

Tanto la CUCI como la EC pueden presentarse a cualquier edad, aunque, la población de mayor prevalencia se encuentra entre los 15 y los 30 años de edad. Sin embargo, también se puede manifestar entre los 60 y 70 años, afectando en la misma proporción a hombres y mujeres (Díaz-Díaz, 2005). Además se ha observado en población pediátrica, un estudio realizado en Inglaterra estima una incidencia de 5.3 casos por cada 100,000 niños menores de los 16 años (Jenkins, 2001).

En México aún no se han determinado las tasas de incidencia de la CUCI, en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) se tiene un registro de 848 pacientes con diagnóstico de CUCI confirmado por histopatología y endoscopia, durante el periodo comprendido de enero de 1987 a diciembre de 2006. La media anual de casos nuevos de CUCI incrementó de 28.8 (1987 - 1996) a 76.1 (1997 a 2006), lo que representa un incremento de mas del doble de casos en el segundo periodo (Yamamoto-Furusho, 2008).

Las tasas de mayor incidencia se reportan en países industrializados del occidente de Europa y los Estados Unidos de Norteamérica (Tabla 1). Sin embargo, las tendencias indican un aumento de la prevalencia en países del Sur de América, África y Asia que anteriormente presentaban bajos índices, posiblemente a consecuencia de los actuales cambios en el estilo de vida, ya que la incidencia depende de estos últimos y múltiples factores (Lakatos, 2006).

Tabla 1: Incremento de la prevalencia de EII en comunidades Europeas.

<i>País (año)</i>	<i>EC</i>	<i>CUCI</i>
Francia (1988-199)	5.2/10 ⁵ - 6.4/ 10 ⁵	4.2/10 ⁵ - 3.5/10 ⁵
Norteamérica (1981-1994)	26.0/10 ⁵ – 198.5/10 ⁵	6.0/10 ⁵ – 13.3/10 ⁵
Dinamarca y Suecia (1980-2005)	4.9/10 ⁵ - 8.6/10 ⁵	9.2/10 ⁵ - 13.4/10 ⁵
Inglaterra (1990-2001)	3.9/10 ⁵ – 8.3/10 ⁵	10.0/10 ⁵ – 13.9/10 ⁵
Italia (1978-1992)	1.9/10 ⁵ – 3.4/10 ⁵	3.8/10 ⁵ – 9.6/10 ⁵

Fuente: Adaptado de Lakatos P.L. y col., 2006.

2.2.2 Patogénesis

La etiología de las EII resulta desconocida, aunque, hasta el momento se le atribuye a una interacción entre diferentes factores, de los cuales se ha hecho énfasis en 3: factores ambientales, factores inmunológicos y genéticos (Knigge, 2002).

2.2.2.1 Factores ambientales

Los elementos relacionados con cambios en el ambiente, el desarrollo del sistema inmune, la higiene en el consumo y preparación de alimentos y el estilo de vida, pueden repercutir en el desarrollo de CUCI (Ardizzone y Bianchi-Porro, 2002).

Estudios demuestran un efecto protector del hábito de fumar sobre el desarrollo y la evolución de la CUCI, sin embargo, aquellos pacientes que tienden a dejar el hábito, pueden desarrollar colitis extensa o severa (Hanauer, 2004). En modelos animales y celulares de CUCI la nicotina disminuye la expresión de citocinas proinflamatorias como la IL-8, efecto similar al observado en mucosa colónica de humanos donde la expresión de IL-8 e IL1 β se encuentran disminuidas (Karba y Eliakim, 2007).

Bernstein y col. en el 2006 realizaron un estudio en el cual evaluaron el estilo de vida y el efecto de la dieta sobre el desarrollo de EII, estos investigadores valoraron: historia familiar, el tipo de vivienda, el consumo de carne de cerdo y leche no pasteurizada, el hábito de fumar y antecedentes personales. Reforzaron el conocimiento de la influencia de la historia familiar como factor de riesgo para CUCI, así como la colectomía como factor protector (Bernstein y col., 2006).

La inflamación del intestino en los pacientes con CUCI implica una prolongada exposición de la mucosa a muchos componentes tóxicos, incluyendo las especies reactivas del oxígeno (ROS) producidos por el estrés oxidativo, atacando componentes intra y extracelulares (Kruidenier y Verspaget, 2002). Algunas observaciones sugieren que el estrés oxidativo a través del ciclo de daño

regeneración influye sobre la estructura del ADN contribuyendo al desarrollo de cáncer en el paciente con CUCI (Seril y col., 2003).

Se ha observado en modelos animales que se encuentran en ambientes libres de patógenos no desarrollan CUCI, por lo que las bacterias por si mismas pueden ser factor determinante en el desarrollo de la patología, aunque depende de factores específicos del huésped y de los microorganismos (Hanauer, 2004). Esto es comprobado en modelos experimentales de EII, ya que evidencian que las bacterias o sus componentes, influyen el desarrollo de la patología en sus diferentes procesos (Seksik y col., 2006).

Millones de microorganismos se encuentran a lo largo de tracto gastrointestinal como componentes normales de la flora bacteriana, un desequilibrio en el número de bacterias, está estrechamente ligado con la posible etiología CUCI (Gassull, 2006). Microorganismos como *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Cytomegalovirus*, *Saccharomyces cerevisiae*, entre otros, se mencionan como microorganismos candidatos (Danese y Fiocchi, 2006).

2.2.2.2 Factores inmunológicos

La reacción más común que el organismo presenta ante agentes extraños es la inflamación, el intestino es susceptible a la inflamación en respuesta a antígenos microbianos proporcionados principalmente por la dieta. En EII las células dendríticas se encuentran activadas, incrementado los niveles de expresión de los receptores para patrones moleculares asociados a patógenos tipo Toll (TLR) 2 y 4 (Danese y Fiocchi, 2006).

Se ha observado que las dos entidades de EII presentan distintas respuestas inmunológicas, en EC predomina una mayor síntesis de citocinas por células T (Th1), como el interferón gama (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), por otra

parte, en CUCI se observa una respuesta Th2 alterada, caracterizada por la liberación de citocinas como la IL-5 e IL-13 (Peluso y col., 2006).

2.2.2.3 Factores genéticos

Braun y Wei en el 2007 sugieren que la susceptibilidad genética como factor de riesgo a desarrollar EII, representa para CUCI el 10% y para EC el 50%, por lo que el factor genético es más determinante en el desarrollo de EC. Hasta el momento un total de 9 alteraciones cromosómicas se han relacionado en general para EII y 7 tanto para EII como para CUCI denominadas IBD locus (Lakatos y col., 2006).

Algunas de las regiones asociadas a CUCI, que se encuentran en los cromosomas 3, 7 y 12, se han relacionado con la extensión de la enfermedad y la respuesta a la terapia farmacológica. El gen MUC3 que codifica para mucinas intestinales está involucrado con la patogénesis, mientras que los polimorfismos de MDR1 con la respuesta al tratamiento farmacológico (Ardizzone y Bianchi-Porro, 2002).

La influencia de la expresión del gen MDR1 en el tracto gastrointestinal y en el desarrollo de CUCI, se observó cuando el ratón *knock-out* del gen MDR1 desarrolló colitis espontáneamente en un ambiente libre de patógenos (Ho y col., 2005).

Se han creado modelos animales para el estudio de la CUCI, Banner y col. en el 2004 describieron las características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas del ratón *knock-out* de MDR1 identificado por Panwala y sus colaboradores en 1998, observaron pérdida de peso, elevados niveles de IL-8, infiltración de células proinflamatorias en la lamina propia (principalmente macrófagos, linfocitos neutrofilos), las lesiones fueron predominantes en las regiones medias y distales de colon y en el recto, dado que las características de la inflamación son similares a los de humanos los hacen un modelo reproducible por el estudio de EII, en especial para EC (Banner y col., 2004). En el 2007 Chang y col. inducen CUCI en un ratón mediante la administración de dextran sulfato de sodio al 2% en agua y

administración intracolónica de de etanol al 30%, los datos histológicos mostraron infiltración de leucocitos, abscesos en criptas y displasia. Este modelo a diferencia del de Panwala, presentaba un curso clínico y características histológicas más similares a las de CUCI (Chen y col., 2007).

2.2.3 Tratamiento

Los nuevos descubrimientos sobre los posibles mecanismos causantes de esta enfermedad ha podido identificar recursos para el estudio de su tratamiento (Ardizzone y Bianchi-Porro, 2002). Aunque la terapia convencional hasta el momento es considerada la mejor opción. Los principales fármacos empleados en el tratamiento incluye aminosalicilatos, corticoesteroides e inmunosupresores como azatioprina, metotrexato y ciclosporina (Yamamoto-Furusho, 2007).

Los Compuestos basados en los 5-aminosalicilatos han resultado útiles para el tratamiento de aquellos pacientes con CUCI moderada, y puede ser efectiva para mantener al paciente en remisión. Sin embargo, su uso es cuestionado en EC (Podolsky, 2002). Fármacos como la sulfasalazina y mesalazina tiene altas tasa de respuesta (50-75%) en las primeras 4 a 8 semanas de tratamiento (Yamamoto-Furusho, 2006).

Liang y Ouyang en su estudio sobre el tratamiento combinado de Rosiglitazona y 5-aminosalicilatos en pacientes con CUCI en actividad leve y moderada observaron un mejor efecto terapéutico, ya que en su estudio el grupo de pacientes que se sometió al tratamiento combinado reportó mayor porcentaje de remisión (71.4%) que aquellos que solo recibían tratamiento con 5-aminosalicilatos (57.1%) (Liang y Ouyang, 2008).

Los corticoesteroides como la prednisona son comúnmente utilizados cuando los compuestos a base de 5-aminosalicilatos son inadecuados. Se utilizan como alternativas en pacientes con CUCI distal o proctitis y la administración intravenosa está indicada en pacientes que requieren hospitalización (Podolsky, 2002). Los

corticoesteroides son potentes inhibidores de la activación de células T y células proinflamatorias, la falla de respuesta al tratamiento es indicativo de cirugía en aproximadamente el 20% de pacientes con CUCI (Farell y Kelleher, 2003). Se ha postulado que el gen de MDR1 contribuye al fenómeno de resistencia a corticoesteroides en pacientes con EII (Ho y col., 2005).

La terapia biológica hace referencia a agentes designados como blancos a sitios específicos en las cascadas de reacción de citocinas y quimiocinas, como células o genes que pueden alterar la población celular, proteínas y péptidos recombinantes o anticuerpos (Ardizzone y Bianchi-Porro, 2002). El Infliximab se encuentra dentro de los anticuerpos monoclonales contra el TNF- α empleado para inducir remisión en pacientes refractarios a tratamientos con esteroides intravenosos (Yamamoto-Furusho, 2006).

2.3 PROTEÍNAS DE UNIÓN A ATP (ABC)

Las proteínas de unión a ATP (ABC por sus siglas en inglés ATP Binding Cassette) forman un total de 48 proteínas que funcionan como bombas de expulsión de diversas sustancias fuera de las células mediante un proceso dependiente de ATP y particularmente se localizan en tejidos permeables (Tabla 2) (Lescheziner y col., 2006).

Las proteínas ABC están integradas por 2 conjuntos de dominios transmembranales y 2 dominios de unión a ATP conformados por 3 dominios conservados: dominios Walker A y B localizados en todas las proteínas transportadoras y un motivo denominado C, que es específico para las proteínas ABC que las distingue de otras proteínas transportadoras, que son consideradas transportadores completos. Se consideran como transportadores intermedios a las que poseen alguno de los dominios y que se encuentran como homodímeros y heterodímeros para crear una proteína funcional (Dean y col., 2001). Los dominios de unión a ATP se encuentran localizados en el citoplasma y son los responsables de la especificidad de sustratos

(Dean y col., 2001). Las proteínas ABC se encuentran agrupado en clases estructurales o subfamilias, en base a la secuencia de sus aminoácidos y a la organización de los dominios (Sheps y col., 2004).

Tabla 2: Estructura de los transportadores ABC.

<i>Subfamilia</i>	<i>Miembros</i>
ABCA	ABCA1-ABCA10, ABCB12,ABCA13.
ABCB	ABCB1-ABCB11
ABCC	ABCC1-ABCC12
ABCD	ABCD1-ABCD4
ABCE	ABCE1
ABCF	ABCF1-ABCF3
ABCG	ABCG1,ABCG2.ABCG4,ABCG5,ABCG8

Fuente: Dean y col., 2001.

2.3.1 El Gen de Resistencia a Múltiples Drogas (MDR 1)

El gen de Resistencia a Múltiples drogas (MDR1), también conocido como ABCB1, es el primer miembro de la familia de transportadores ligados a ATP (ABC) en ser identificado en las membranas caniculares de los hepatocitos (Silverman y Schrenk, 1997). Fue el primero en ser aislado de un ovario de hámster y reconocido por conferir resistencia a múltiples fármacos (Annese y col., 2006).

Keld Dano descubrió en 1973 a las proteínas causantes de conferir resistencia a múltiples drogas. En 1976 Juliano y Ling descubrieron una glucoproteína tras observar reportes, en los cuales, células de cáncer de mama presentaban resistencia a fármacos (Chowbay y col., 2002). Sin embargo, fue hasta que Victor Ling y otros investigadores en 1983 dieron a conocer que el aumento en la expresión de la glucoproteína estaba implicado en la resistencia a fármacos (Paredes y col., 2006).

La familia del gen MDR1 en el humano consta de 4 transportadores completos y 7 transportadores intermedios: ABCB4 y ABCB11 se expresan en el hígado y están

involucrados en la secreción de ácidos biliares, ABCB2 y ABCB3 forman un heterodímero y transportan péptidos al retículo endoplasmático de la células, ABCB9 ha sido localizado en los lisosomas, mientras que ABCB6, ABCB7, ABCB8 y ABCB10 se expresan en la mitocondria (Dean y col., 2001). Estudios realizados en modelos animales, han identificado genes homólogos de resistencia a fármacos variables (Tabla 3) (Silverman y Schrenk, 1997).

Tabla 3: Clasificación del gen MDR1 en modelos de estudio

	Clase 1	Clase 2	Cromosoma
Humano	MDR 1		7
Rata	mdr1a, mdr1b	Mdr2	4
Ratón	mdr1a (mdr3), mdr1b (mdr1).	Mdr2	5

Fuente: adaptado de Silverman y Schrenk, 1997.

El gen MDR1 está localizado en el brazo largo del cromosoma número 7 en la región 21 en humanos, mientras que en ratones y ratas se localiza en el cromosoma número 5 y 4 respectivamente (Ishikawa y col., 2004). El tamaño total del gen ha variado conforme se ha estudiado, el último reporte establece una longitud 209 kilobases (kb), está compuesto por 29 exones, 32 intrones confirmados y el ARN m consiste de 4872 pares de bases (Figura 1) (Bodor y col., 2005).



Figura 1: Estructura del gen MDR1 que ilustra la longitud 209 kilobases (kb) los 29 exones y 32 intrones. (Fuente: tomado de Wang y Sadée, 2006)

Yagüe y su colaboradores determinaron que la vida media del mensajero de MDR1 es de 1 hora en células k562 (línea de celular de leucemia) dato que contrasta con otros estudios que reportan una vida media larga de 8 horas en células HepG2 (línea celular de hepatocarcinoma), sin embargo, observaron que la vida media incrementó entre 12 y 16h en líneas celulares de resistencia a fármacos y hasta 10h tras ser expuestas a fármacos (Yagüe y col., 2003).

El gen MDR1 pertenece a un grupo de genes que carecen de la caja TATA dentro de la región proximal del promotor. Por lo que la transcripción inicia en una secuencia Inr (secuencia iniciadora), al igual que otros genes carentes de caja TATA el promotor también está compuesto por una secuencia CCAAT (-82 a -73) y una región rica en GC (-56 a -43) que interactúan con los factores transcripcionales de la familia Sp (Scotto y Johnson, 2001).

La expresión del gen MDR1 puede ser influenciado por diversos factores, recientes estudios demuestran que estos estímulos convergen en la región promotora de MDR1 que incluye sitios de unión para los factores transcripcionales NFY y Sp (Figura 2) (Scotto y Johnson, 2001). Johnson y col. en el 2005 demostraron que la familia de factores transcripcionales p53 reprimen la transcripción de la P-gp a través de la unión directa a una región específica del ADN, posteriormente demostraron que p63 y p73 pertenecientes a la familia de p53 pueden activar la transcripción de MDR1 a través de una región de unión independiente a la de p53.

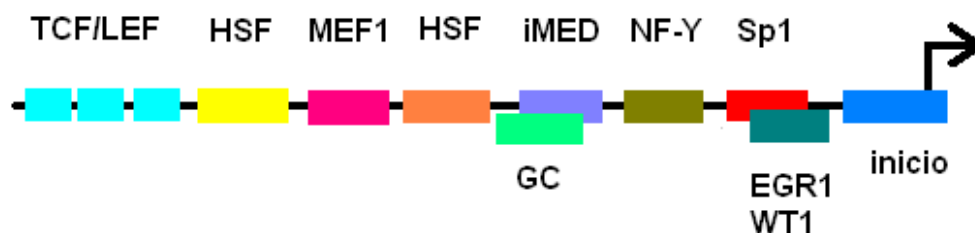


Figura 2: Estructura del promotor de MDR1 y factores de transcripción que promueven su expresión.
(Fuente: tomado de Scotto y Johnson, 2001)

2.3.2 La Glicoproteína-P

El gen MDR1 codifica a la glucoproteína- P (P-gp) perteneciente a la familia de las ABC, una familia de proteínas transmembranales que sirve como una barrera de protección para las células al transportar sustancias y toxinas fuera de las células, mediante un proceso dependiente de ATP (Loo y col., 2006).

La P-gp está constituida por 1280 residuos de aminoácidos, tiene un peso molecular de 170 kDa, está conformada por 2 cadenas homólogas y simétricas que constan de 6 dominios transmembranales, con una cadena N-terminal hidrofílica y una N-terminal hidrofóbica, seguidos de 2 dominios de unión a ATP (Figura 3) (Ishikawa y col., 2004). Los dominios de unión a ATP (NBD 1 y 2) son importantes para su función dado que pueden hidrolizar el ATP y la inhibición de estos sitios conlleva a la inhibición de la proteína. La unidad mínima funcional de la P-gp es como monómero (Loo y col., 2006).

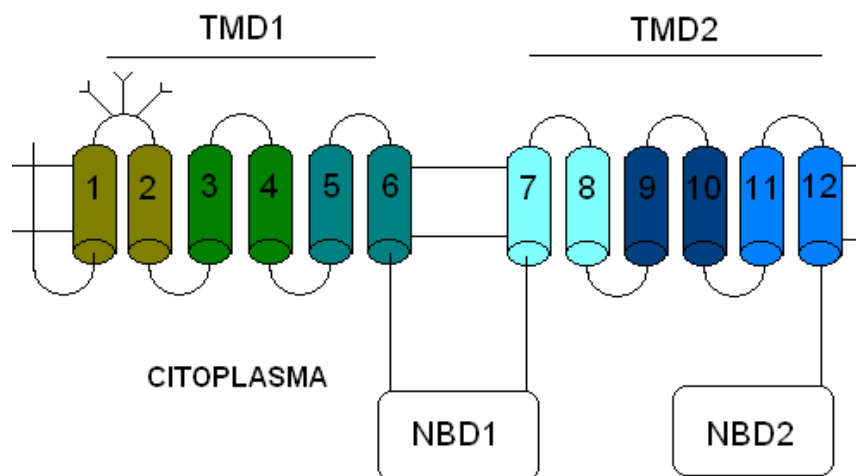


Figura 3: La P-gp 6 dominios transmembranales (1-12), y 2 dominios de unión a ATP (NBD 1,2) (Fuente: tomado de Loo y col., 2006).

Además, la P-gp presenta una cadena de carbohidratos, situada sobre la cadena exterior de aminoácidos que une los dos primeros segmentos transmembranales, cerca del extremo N-terminal de la proteína, que al menos 20 kDa de los 170 kDa de

la proteína son debidos a esta cadena de carbohidratos. Evidencias aseguran que la porción exterior de carbohidratos no interviene en el transporte de drogas o reconocimiento (Ruiz y col., 2002). La vida media promedio de la glucoproteína P es relativamente larga y oscila entre 14 a 16 horas (Wu y col., 2003).

La glucoproteína-P se encuentra como componente de la barrera hematoencefálica, placentaria, se expresa normalmente en el colon, el intestino delgado, las suprarrenales, el riñón, en células especializadas como hepatocitos y enterocito (Annese y col., 2006). Factores como quimioterapéuticos, citocinas, radiación por rayos X y UV, pueden influir en los niveles de expresión de la Pgp en diversos sistemas (Scotto y Jonson, 2001).

En el tracto gastrointestinal la P-gp se encuentra en altas concentraciones en la superficie de las células epiteliales del colon y en el intestino delgado varía su expresión en las distintas regiones, ya que expresa en mayor proporción en el íleon y disminuye gradualmente en el yeyuno hasta el estómago (Annese y col., 2006).

En sujetos sanos Zimmermann y col. en el 2005 determinaron la expresión de MDR1 y MRP1-5 en biopsias de diferentes regiones del intestino delgado y grueso de 10 sujetos (duodeno, íleon, colon ascendentes, transversos, descendentes y sigmoides), en las cuales determinaron niveles elevados de expresión del gen MDR1 en las distintas regiones en comparación a los niveles de expresión de los diferentes MRP.

La variación en la expresión de la P-gp en el intestino juega un papel importante en la farmacocinética de una amplia variedad de sustratos ya que se ha asociado con resistencia a fármacos y con la susceptibilidad a desarrollar EII (Ho y col., 2005). Algunos fármacos empleados en la terapia de la EII como los corticoesteroides (dexametasona y metilprednisona) e inmunosupresores (ciclosporina y metrotexato) son sustratos para la P-gp (Tabla 4) (Annese y col., 2006).

Tabla 4: Principales sustratos de la glucoproteína P.

Fármacos	Tipos
Antineoplásicos	Actinomicina D, daunorubicina, mitocina C, mitoxantrona, vinblastina, vincristina.
Antihipertensivos	Diltiazem y losartan
Antiarrítmicos	Digoxin, quinidina, verapamil
Corticoesteroides	Aldosterona, cortisol, metilprednisona
Inmunosupresores	Ciclosporina, metotrexato
Antibióticos	Eritromicina, levofloxacina, tetraciclina, rifampin

Fuente: Adaptado de Annese y col., 2006

2.3.3 El fenómeno de resistencia a múltiples drogas

La práctica clínica pone en evidencia que la mayoría de los tumores sólidos terminan siendo resistentes a múltiples fármacos empleados en el tratamiento (Paredes y col., 2006). En modelos celulares tumorales utilizados en el estudio del fenómeno de resistencia a múltiples drogas se ha observado que aquellos que muestran resistencia a un fármaco anti-tumoral utilizados en un tratamiento también presentan resistencia a otros fármacos antitumorales (Zhai y col., 2006).

En el estudio realizado por Zhai y col. en el 2006 se observó un comportamiento distinto en células tumorales *in vitro* e *in vivo* sometidas al tratamiento con distintos fármacos anti-tumores. En cuanto al crecimiento tumoral *in vivo* se mostró menos vulnerable a los fármacos que en las mismas células *in vitro* (Zhai y col., 2006).

Los mecanismos de resistencia a corticoesteroides han sido ya estudiados en condiciones de inflamación, particularmente en asma y artritis reumatoide aunque en EII el mecanismo aún no está bien establecido, una de las principales explicaciones es una disminución de las concentraciones citoplasmáticas de corticoesteroides secundario a la sobreexpresión de la P-gp (Farell y Kelleher, 2003).

2.3.4 Participación de los polimorfismos del gen MDR1 en CUCI

La variación en la secuencia del ADN causa estos cambios en el fenotipo, por múltiples mecanismos, por ejemplo, cambios en la secuencia de codificación de la proteína, traslocación y por cambios en el proceso de regulación del gen. Los factores genéticos juegan un papel importante en la variabilidad genotípica influyendo en la susceptibilidad a desarrollar enfermedades y la respuesta a terapias (Wang y Sadée, 2006).

Los SNPs podría producir la sustitución de un aminoácido que posiblemente afecta la farmacocinética de los fármacos, debido a que puede cambiar la estructura conformacional de la glucoproteína-P. El interés por el estudio del gen MDR1 y su interacción con fármacos ha permitido identificar numerosos polimorfismos (Honda y col., 2002). El gen MDR1 es altamente polimórfico, hasta el momento más de 50 polimorfismos tanto sinónimos como no sinónimos se han reportado (Kimchi-Sarfaty y col., 2007).

Específicamente el polimorfismo sinónimo C3435T y el polimorfismo G2677T/A del gen MDR1 se han relacionado con la expresión y actividad de la P-gp, mientras que el polimorfismo G2677T/A confiere un factor de riesgo en el desarrollo de EII (Ho y col., 2005).

2.3.4.1 Polimorfismo C3435T

El polimorfismo C3435T se encuentra en el exón 26 del gen MDR1, es el más estudiado y las variantes alélicas difieren entre los grupos étnicos. Chowbay y col. realizaron un estudio para determinar la variantes alélicas en población Hindú, China y Malawi, en la cual, observaron que la frecuencia de la variante TT para la población hindú fue superior al de la china y Malawi. La frecuencia del genotipo TT oscila entre 28-36% en naciones de Asia, mientras que en África es de 0-6% y 24% en población caucásica (Chowbay y col., 2002). En América Latina Wielandt y col. realizaron un

estudio en 3 grupos étnicos: Mestizo, Mapuche y Maorí, en las cuales, se observó que la población mapuche representó la mayor frecuencia genotípica del alelo TT que la Mestiza y la Maorí, al compararlas con las caucásicas, asiáticas y africanas, la población Mapuche presentaba una prevalencia similar a la de las caucásicas y asiáticas (Wielandt y col., 2004).

Además de la variabilidad étnica está involucrado con el cambio funcional de la proteína, la posible explicación es que las diferencias alelo-específicas influyen en los procesos de splicing (corte y empalme), proceso de regulación y traslocación del ARNm, lo que repercute en un cambio en la especificidad de sustratos (Kimchi-Sarfaty y col, 2007).

Dado que se ha observado una asociación con CUCI, Osuga *et al.* en su estudio realizado con 66 pacientes clasificados en 2 grupos de acuerdo a la edad de inicio de la enfermedad (a temprana edad y a tardía o avanzada edad) encontraron la asociación del polimorfismo C3435T del gen MDR1 en el desarrollo de CUCI en pacientes con inicio en etapas tardías de la enfermedad. Llegaron a la conclusión que C3435T es un fuerte factor de riesgo para el desarrollo de CUCI en edad avanzada, pues no se ha encontrado asociación con edades tempranas (Osuga y col, 2006).

Fischer y col. al estudiar población húngara no encontraron asociación del gen con la susceptibilidad ni con respuesta al tratamiento al evaluar una cohorte de 414 pacientes con EII, de los cuales 149 tenían diagnóstico de CUCI (Fischer y col, 2007).

2.3.4.2 Polimorfismo G2677T

Este polimorfismo localizado en el exón 21, fue inicialmente asociado con EII, dado que modelos animales de MDR1 desarrollaban EII. Un estudio realizado en una cohorte Norteamericana reveló 2 variantes G2627T (Ala893Ser/Thr) y C3435T. La

variante alélica Ala893 disminuye la actividad, en comparación con 893Ser, por lo que al igual que C3435T, se relaciona con variantes en la farmacocinética (Brant y col., 2003).

Daniel y col. en el 2007 determinaron que la variante alélica TT de G2627T está asociado con alto riesgo de falla al tratamiento con Ciclosporina A en pacientes con CUCI resistentes a esteroides (Daniel y col, 2007).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La EII es una de las enfermedades gastrointestinales que predomina en los países industrializados de Europa y los Estados Unidos de Norte América; Sin embargo, en la última década se ha observado un incremento en la prevalencia de esta enfermedad en países del Sur de Asia, América e inclusive en África (Lakatos, 2006).

.La incidencia de CUCI varía entre $0.5-24.5/10^5$ habitantes, mientras que la enfermedad de Crohn varía entre $0.1-16/10^5$, aunque en México no se tienen registros de incidencia sobre la enfermedad, en países como Puerto Rico tuvo un incremento de EII de $3.07/10^5$ a $7.747/10^5$ de 1996 a 2000, mientras que Argentina y Panamá reportaron una incidencia de CUCI de $2.2/10^5$ y $1.2/10^5$ respectivamente, lo cual supondría un aumento en países de América Latina como México (Lakatos, 2006).

Debido a que se trata de una enfermedad multifactorial su estudio depende de la interacción de factores ambientales, inmunológicos y genéticos. Este último factor determina la susceptibilidad a desarrollarla; en particular los polimorfismos del gen MDR1 se han asociado a la enfermedad de CUCI e influyen en el tratamiento farmacológico (Onnie y col., 2006)

IV. JUSTIFICACIÓN

En la última década la CUCI ha sido de las enfermedades gastrointestinales que se han incrementado en la población de América Latina, Asia y África. (Lakatos, 2006). Dicha enfermedad afecta tanto a hombres como mujeres en la misma proporción, y las tasas de incidencia en pacientes pediátricos se han incrementado. Los actuales cambios en el estilo de vida como la dieta, los cambios en la higiene y la susceptibilidad genética, incrementan el riesgo de desarrollarla. En México no existen datos de incidencia, sin embargo, se ha observado un aumento de la CUCI en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán ya que la media anual de nuevos casos de CUCI incrementó de 28.8 (1987 - 1996) a 76.1 (1997 a 2006), lo que representa un incremento de 43.7 casos nuevos (Yamamoto-Furusho, 2008). Dado que la CUCI es multifactorial, es importante el estudio de los factores que intervienen en su desarrollo. Dentro de los factores genéticos, el gen MDR1 está asociado con la etiología y la respuesta al tratamiento farmacológico, sobre todo hay que considerar que son pocos los estudios sobre la expresión del gen MDR1 en pacientes con CUCI.

V. OBJETIVOS

5. 1 Objetivo general:

- ❖ Cuantificar la expresión relativa del gen MDR1 en muestras de biopsia intestinal de pacientes con CUCI y normales.

5.2 Objetivos específicos:

- ❖ Comparar los niveles de expresión relativa del gen MDR1 e IL-6 de los pacientes con CUCI en actividad y remisión con el grupo control.
- ❖ Correlacionar los niveles de expresión relativa del gen MDR1 con los niveles de expresión de la IL-6.
- ❖ Correlacionar la expresión relativa del gen MDR1 de los pacientes con CUCI con las siguientes características clínicas: género, edad de diagnóstico, curso clínico respuesta al tratamiento farmacológico.

VI. HIPÓTESIS

Nula: La expresión del gen MDR1 en biopsias de colon de pacientes con CUCI no se encuentra alterada en comparación con los sujetos controles.

Alterna: La expresión del gen MDR1 en biopsias de colon de pacientes con CUCI se encuentra alterada en comparación con los sujetos controles.

VII. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

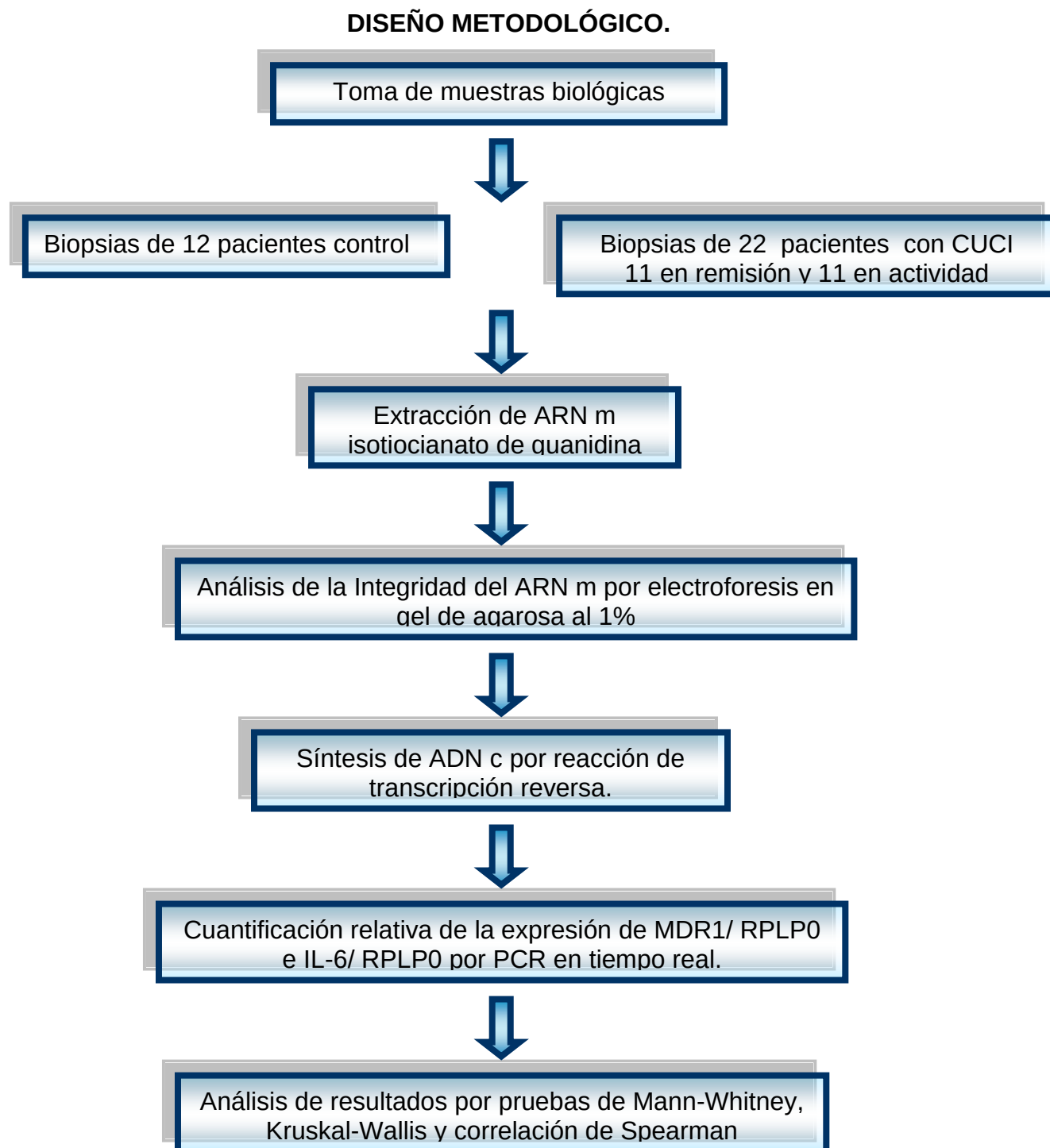


Figura 4: Actividades a realizar a partir de muestras biológicas (biopsias de recto de pacientes con CUCI y el grupo de pacientes control).

7.1 Pacientes:

- La toma de muestras biológicas se realizó con previo consentimiento de los pacientes (carta de conocimiento informado, ver anexo 2).
 - 22 pacientes con CUCI (11 con actividad y 11 sin actividad o en remisión).
 - 12 pacientes controles.
-
- ❖ Criterios de inclusión para los pacientes con CUCI.
 - ❖ Pacientes con expediente registrados en el INCMNSZ.
 - ❖ Pacientes con diagnóstico confirmado por histopatología de CUCI.
 - ❖ Cualquier género.
 - ❖ Nacidos en México.
 - ❖ Mayores de 18 años.
 - ❖ Criterios de exclusión para los pacientes con CUCI:
 - ❖ Diagnóstico de otro tipo de colitis: Indeterminada, isquémica, infecciosa, posradiación, pólipos, cáncer.
 - ❖ Pacientes con patología autoinmune concomitante.
 - ❖ Pacientes con CUCI que tomaban anticoagulantes o con restricción médica para la toma de biopsias.
 - ❖ Que no deseen participar en el estudio.
 - ❖ Criterio de inclusión para pacientes control:
 - ❖ Pacientes con diagnóstico de anemia, diarrea, sangrado de tubo digestivo y pérdida de peso que presentaron características de la mucosa del colon normal de acuerdo al estudio de colonoscopia y que no presentaran inflamación confirmado por patología.
 - ❖ Pacientes que no necesariamente estén registrados en el INCMNSZ.
 - ❖ Cualquier género.
 - ❖ Nacidos en México.
 - ❖ Mayores de 18 años.

- ❖ Criterios de exclusión de los pacientes control
 - ❖ Pacientes con diagnóstico de diarrea y sangrado de tubo digestivo que presentaran inflamación (confirmado por patología) .
 - ❖ Pacientes con VIH o VHC.
- ❖ Criterios de eliminación:
 - ❖ Falta o pérdida de las muestras biológicas.

Muestras biológicas:

- Biopsias de recto de 22 pacientes con CUCI.
- Biopsias de recto de 12 pacientes del grupo control.

7.2 Materiales:

Toma de biopsias:

- Tubos de polipropileno (Coring[®]) de 1 mL como contenedores de biopsias.
- Preservador de ácidos nucleicos (RNA later[®] de 100 ml).

Extracción de RNA:

- Homogenizador (Poli-trón PT 1300 D kinematica AG[®])
- Kit de extracción de ARN (High pure RNA tissue kit de Roche[®])
 - Solución amortiguadora de lisis (4.5 M guanidin-HCL, 100 mM fosfato de sodio Ph 6.6).
 - DNasa.
 - Amortiguador de incubación de DNasa (1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM MnCl₂, pH 7.0).
 - Amortiguador de lavado 1 (5 M guanidin-HCL, 20 mM Tris-HCl, pH 6.6).
 - Amortiguador de lavado 2 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5).
 - Solución amortiguadora de elusión
 - Tubos de polipropileno de colección y de filtro.
- Pipetas de 1000, 500, 100, 50, 20 y 10 µl (Gilson[®]).
- Tubos de polipropileno (eppendorf[®]) de 1.5 ml.
- Agua DEPC y etanol absoluto.

Determinación de la integridad de RNA:

- Preparación de gel: agarosa, TBE, bromuro de etidio, marcador.
- Cámara de electroforesis.
- Trasluminador (UVP TM-15[®]) y Cámara fotográfica (Kodak 290[®]).

Síntesis de ADN c por Transcripción reversa:

- Kit de ADN (Transcriptor First Standar cADN synthesis de Roche[®])
 - Transcriptasa reversa (200 mM de fosfato de potasio, 2 mM de ditiotritol, 0.2% triton X-100, 50 % glicerol, pH 7.2).

- Reacción amortiguadora de RT (250 mM Tris/HCl, 150 mM KCl, 40 mM MgCl₂ , pH 8.5.
- Inhibidor de RNasa (20 mM Hepes-KOH, 50 mM KCl, 8 mM ditioneitol, 50% glicerol, pH7.6.
- Mezcla de nucleótidos (10 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP).
- Oligo dT
- Termociclador de PCR convencional (9600 Perkinelmer[®]).
- Tubos de polipropileno (ependorf[®]) de .6 ml.

Análisis de la expresión relativa del gen MDR1 e IL-6 por PCR tiempo real:

- Reactivos para analizar el gen MDR1: Agua de PCR, mezcla de reacción tipo Taq man (FastStart DNA polimerasa, amortiguador, MgCl₂ y mezcla de nucleótidos), sonda # 18 de High probe Library de Roche[®] del genoma humano e iniciadores sentido y antisentido de Amplio byosystem[®] (Anexo 3).
- Reactivos para analizar el gen RPLP0: Agua de PCR, mezcla de reactivos tipo Taq man (FastStart DNA polimerasa, amortiguador, MgCl₂ y mezcla de nucleótidos), sonda # 68 de High probe Library de Roche[®] del genoma humano e iniciadores sentido y antisentido de Amplio byosystem[®] (Anexo 4).
- Reactivos para analizar el gen Il-6: Agua de PCR, mezcla de reactivos tipo Taq man (FastStart DNA polimerasa, amortiguador, MgCl₂ y mezcla de nucleótidos), sonda # 6 de High probe Library de Roche[®] del genoma humano e iniciadores sentido y antisentido de Amplio byosystem[®] (Anexo 5)
- Capilares para reacción de PCR en tiempo real de 20 µl de Roche[®].
- Centrifugas : MiniSpin y 5415 C de Eppendorf[®].
- Cooling block 1909312 para 32 capilares de Roche[®].
- Termociclador Light Cycler 2.0 Roche[®].

7.3 Métodos y técnicas:

Diseño y grupos de estudio

A partir de un grupo de 62 pacientes atendidos en el departamento de endoscopia del INCMNSZ remitidos por diagnóstico de CUCI o para descartar dicho diagnóstico, a los cuales se les tomó biopsia de mucosa de recto, se determinó de manera aleatoria una muestra de 34 pacientes, 22 de los cuales tenían diagnóstico de CUCI confirmado por histopatología, los restantes 12 fueron considerados como grupo control, ambos grupos cumplían con los criterios de inclusión y exclusión previamente mencionados. De los pacientes con CUCI 11 de ellos se encontraban en fase activa los, 11 presentaron datos endoscópicos e histológicos de remisión.

Pacientes y procesamiento de muestras biológicas

Las biopsias de recto de los pacientes con CUCI y controles se tomaron durante el estudio de colonoscopia con previo consentimiento de los pacientes (anexo 2), se colocaron en tubos crioviales con 1 mL de preservador de ácidos nucleicos (RNA later®), se mantuvieron a temperatura ambiente por un periodo de 6 a 8 horas y posteriormente se almacenaron a -70°C hasta el momento de la extracción del ARN.

Extracción y determinación de la integridad de ARN

Una vez descongelada la biopsia se tomó con una pinza lavada con alcohol etílico absoluto y agua DEPC, la biopsia se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 µl con 400 µl de solución de lisis y se mezcló con el homogenizador (PT 1300 D kinematica AG®), hasta obtener una mezcla homogénea, la extracción del ARNm se realizó de acuerdo al protocolo del Kit de extracción de ARN (High pure RNA tissue kit de Roche®), ya homogenizada la muestra se incubó con 100 µl de DNasa durante 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron 3 lavados con soluciones

amortiguadoras de lavado posteriores a la incubación, para finalmente adicionar 100 µl de amortiguador de elución, se centrifugo a 12000 rpm durante 2 minutos y el resultante se almacenó a – 70° C. Para determinar la integridad del ARN se preparó un gel de agarosa al 1% con 1.5 µl de bromuro de etidio en una cámara de electroforesis, se colocó una mezcla de 5 µl de muestras y 3 µl de colorante en cada pozo, ya colocadas las muestras se realizó la electroforesis en un periodo de 30 minutos a 60 volts. Terminado el ciclo el gel se colocó en el trasluminador (UVP TM-15[®]) y con la cámara fotográfica (Kodak 290[®]) que capturó la imagen (Anexo 6)

Síntesis de ADN c por Reacción de Transcripción reversa (RT-PCR)

Se realizó la mezcla de reactivos según el inserto para al síntesis de ADNc (kit Transcriptor First Standar ADNc synthesis de Roche[®]) (Tabla 5), ya mezclados se colocaron 10 µl de la muestra de ARN en un tubo polipropileno para PCR de pared delgada (ependorff[®]) de 0.2 ml y se le agregó 10 µl de la mezcla de reacción previamente preparada, para obtener el equivalente a 3 tubos de reacción por cada muestra, posteriormente se colocaron en el termociclador de PCR convencional (Gene Am PCR system 9600 Perkinelmer[®]), bajo el programa de preincubación a 25 °C durante 10 minutos, incubación a 55 °C durante 30 minutos y un ciclo de saturación de la enzima a 72 °C por 5 minutos, una vez terminado el ciclo los 3 tubos se mezclaron y se almacenaron a -20 °C hasta el análisis de expresión (Tabla 6)

Tabla 5: mezcla de reactivos empleados en la RT-PCR

Reactivos	1 X	15 X
Agua	1.0 µl	15.0 µl
Solución amortiguadora	4.0 µl	60.0 µl
Random	2.0 µl	30.0 µl
d NTP`s	2.0 µl	30.0 µl
Inhibidor de RNAsas	0.5 µl	7.5 µl
Reverso Transcriptasa	0.5 µl	7.5 µl

Tabla 6: ciclos del protocolo de RT-PCR.

<i>Segmentos</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura</i>
Preincubación	10 minutos	25 °C
Incubación	30 minutos	55 °C
Desnaturalización	5 minutos	85 °C

Análisis de la expresión relativa del gen MDR1 e IL-6 por PCR en tiempo real

Se realizó PCR en tiempo real para determinar la expresión del gen MDR1 como gen blanco y como gen constitutivo se tomó el de la ribonucleoproteína larga humana P0 (RPLP0). Se empleo RPLP0 como gen constitutivo, ya que previamente se había realizado PCR en tiempo real de biopsias de recto y ciego de un paciente con inflamación no característica de CUCI y se determinó que la expresión de RPLP0 no cambia en las diferentes regiones aún bajo inflamación. Para determinar la expresión de IL-6 como marcadores de inflamación nuevamente RPLP0 como gen de referencia, se empleó la IL-6 ya que se determinó la expresión de otra citocinas y no confirmaba el estado de remisión y actividad de los grupos de estudio determinado por patología. Se preparó la mezcla de reactivos de agua de PCR, mezcla de reactivos tipo Taq man, sonda número 18 para el gen MDR1 y la indicada para cada gen (para RPLP0 se empleo la sonda número 6 y para el gen de la IL-6 la sonda 38) de la librería de sondas “High probe Library de Roche ®” e iniciadores sentido y antisentido de Amplio byosystem ® (secuencia posteriormente descrita) (Tabla 7). Ya realizada la mezcla se tomaron 5 µl de la mezcla de reacción y 5 de la muestra (la muestra se trabajo con diluciones 1:5). La amplificación de cada gen se realizó en un equipo de PCR en tiempo real (Light Cycler 2.0 Roche ®) bajo 1 programa de desnaturalización ,45 ciclos de amplificación y 1 ciclo de enfriamiento (Tabla 8)

Tabla 7: Mezcla de reactivos empleados en la PCR – tiempo real.

Reactivos	1 X	33 X
Agua	2.5 µl	82.5 µl
Mezcla de reacción	2.0 µl	66.0 µl
Iniciador sentido	0.2 µl	6.6 µl
Iniciador antisentido	0.2µl	6.6 µl
Sonda # 18	0.1 µl	3.3 µl
Muestra	0.1 µl	3.3 µl

Tabla 8: Ciclo de la PCR en tiempo real.

	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	1	95 °C	10 min
Amplificación	45		
Desnaturalización		95 °C	10 seg
Extensión		10 °C	1 seg
Alineación		40 °C	30 seg
Enfriamiento	1	40 °C	30 seg.

La secuencia de los iniciadores empleados es la siguiente:

MDR1 sentido: acagaaagcgaagcatggt

antisentido: atggtggtccgaccttttc

IL-6 sentido: tctgctcccacaatgaaacat

antisentido: gatgcccagggaagacag

RPLP0 sentido: gaagctctatctcgctcca

antisentido: agcaggcaacaccaggag

Análisis de resultados

La comparación de la expresión del gen MDR1 e IL-6 entre los grupos de CUCI en actividad, remisión y el grupo control se realizó mediante el análisis con pruebas de Mann-Whitney. La correlación entre la expresión del gen MDR1 con IL-6 como marcador de inflamación se determinó mediante la correlación de Spearman. Para determinar la correlación de la expresión del gen MDR1 con las variables clínicas se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis.

La correlación de la expresión del gen MDR1 se realizó con determinadas características clínicas de la patología como las manifestaciones extraintestinales, la extensión de la inflamación que fue clasificada como distal o Pancolitis ya que los pacientes tienden a presentar estas 2 variantes, dentro de la respuesta al tratamiento se clasificó en pacientes con adecuada respuesta al tratamiento convencional a base de 5 aminosalicilatos y en aquéllos que presentan resistencia o son dependientes de determinados fármacos como los corticoesteroides e inmunosupresores, el curso clínico se determinó en base al número de recaídas, al estado de remisión o actividad de los pacientes, los grupos de edad de diagnóstico se clasificaron como menos de 40 y mayores de 40 años en base a los 2 rangos de edad en los que la CUCI se presenta.

VIII. RESULTADOS

8.1 Características clínicas y demográficas

Considerando los criterios de inclusión, exclusión y cálculo del tamaño de la cohorte, en nuestro estudio se incluyeron un total de 34 pacientes de los cuales 22 pacientes con CUCI que se subdividió en pacientes en remisión y pacientes en actividad, y 12 pacientes fueron considerados como grupo control. Se revisaron los expedientes de cada paciente para obtener los datos necesarios para determinar las características clínicas y demográficas mostradas en la tabla 5.

Tabla 9: Características clínicas y demográficas de los pacientes.

Características clínicas.	CUCI actividad	CUCI remisión	Grupo control
Edad promedio	37 años	37 años	39 años
Género			
Femenino	6	5	7
Masculino	5	6	5
Edad de diagnóstico			
< 40 años	8	10	
> 40 años	3	1	
Extensión			
Pancolitis	2	2	
Distal	9	9	
Curso Clínico			
Cuadro inicial activo y después inactivo	2	0	
Actividad intermitente leve < 1 recaída al año	3	9	
Actividad intermitente intensa > 1 recaída al año	4	1	
Actividad continua	2	1	
Manifestaciones extraintestinales			
Sin manifestaciones	4	7	
Artritis o artralgias	6	2	
Colangitis	0	1	
Pioderma gangrenoso	1	1	
Respuesta al tratamiento			
Con respuesta al tratamiento	6	10	
Esteroides dependiente (prednisona)	4	1	
Resistente a inmunomoduladores (azatioprina)	1	0	

8.2 Electroforesis en gel de azarosa

El análisis de la integridad del ARN total extraído (100 µl) a partir de biopsias de recto de pacientes con CUCI y pacientes control, se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (Figura 5).

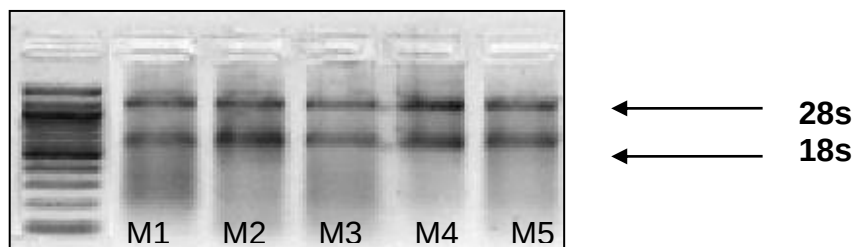


Figura 5: determinación de la integridad del RNA total. 28S= ARN ribosomal subunidad grande, 18S= ARN subunidad chica, muestras de 5 pacientes diferentes. M= muestra.

8.3 PCR en tiempo real

Se determinó la expresión génica del gen MDRD1 y RPLP0 como gen de referencia mediante PCR en tiempo real, a partir de biopsias de colon de recto de pacientes con CUCI y pacientes control (Figura 6).

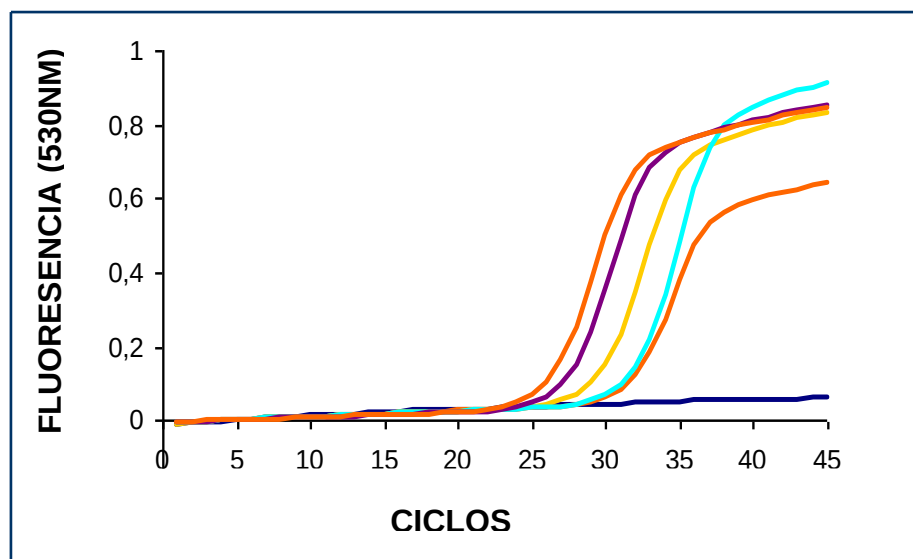


Figura 6 A: curvas de amplificación del gen MDR1 de 5 pacientes en un rango de 20 - 30 ciclos y un rango de detención de fluorescencia de 0 – 1 a 560nm, línea basal de inicio de amplificación a 0 nm.

Se determinó la expresión génica del gen IL-6 y RPLP0 mediante PCR en tiempo real, a partir de biopsias de colon de recto de pacientes con CUCI y pacientes control (Figura 7).

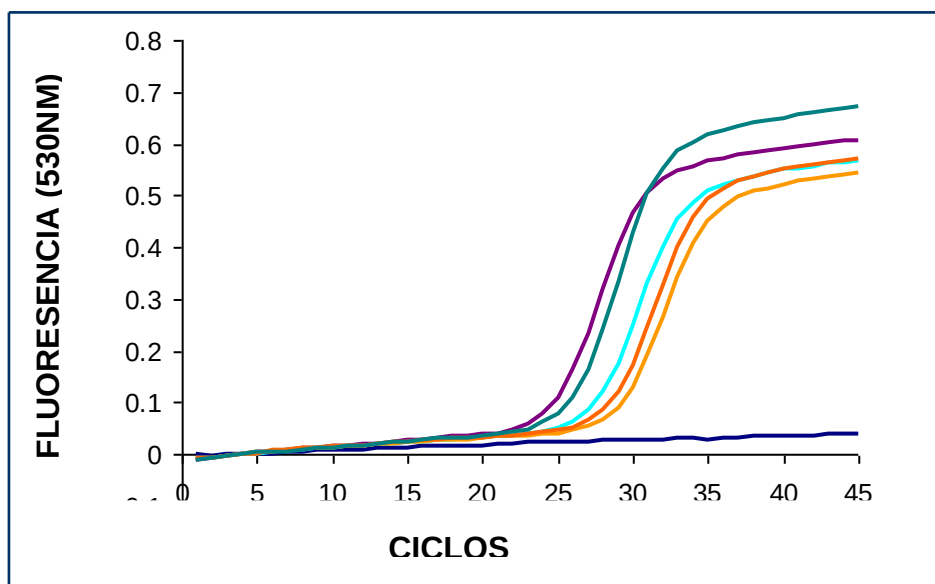


Figura 7: curvas de amplificación de la IL-6 de 5 pacientes en un rango de 20 - 30 ciclos y un rango de detención de fluorescencia de 0 – 0.8 a 560nm, línea basal de inicio de amplificación a 0.

8.4 Expresión del gen MDR1

Al determinar la expresión del mensajero del gen MDR1 se observó una disminución en pacientes con CUCI en actividad en comparación con los pacientes del grupo control y a los pacientes con CUCI en remisión. De igual manera la disminución significativa entre los niveles de expresión de MDR1 entre los pacientes control y pacientes en remisión, lo cual rectifica el papel de la carencia del gen MDR1 en el desarrollo de CUCI, previamente observado en ratones *knock-out* de MDR1.

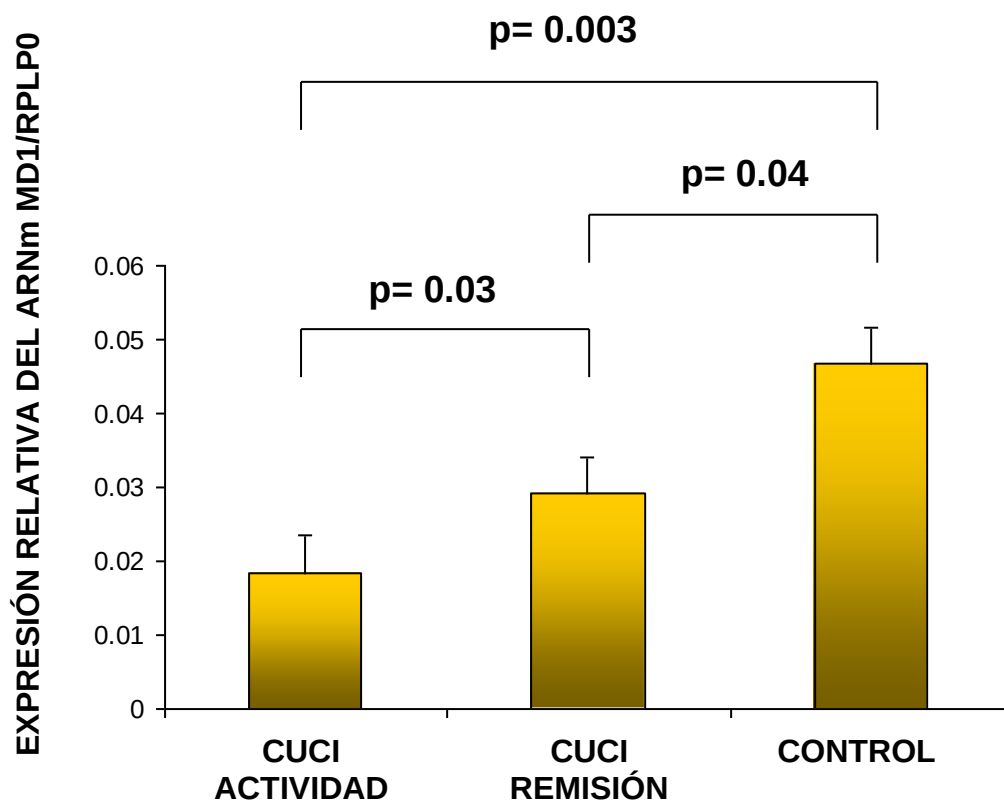


Figura 8: Se observa disminución en los niveles de expresión en pacientes con CUCI en actividad en comparación con los pacientes del grupo control ($p=0.003$). La diferencia significativa al comparar los niveles de expresión de MDR1 de los pacientes con CUCI en remisión con los pacientes con CUCI en actividad es de $p=0.03$, mientras que para el grupo control es de $p=0.04$.

8.5 Expresión de IL-6

Los niveles de expresión del mensajero de IL-6 aumentaron en pacientes con CUCI en actividad en comparación con los pacientes del grupo control y en remisión, por lo que fue considerada con excelente marcador de inflamación, ya que confirmó el diagnóstico de estado de remisión (dato proporcionado por patología) de los pacientes de dicho grupo. A diferencia de lo observado en la expresión de MDR1, no se encontró diferencia significativa al comparar la expresión de IL-6 en pacientes con CUCI en remisión con el grupo control.

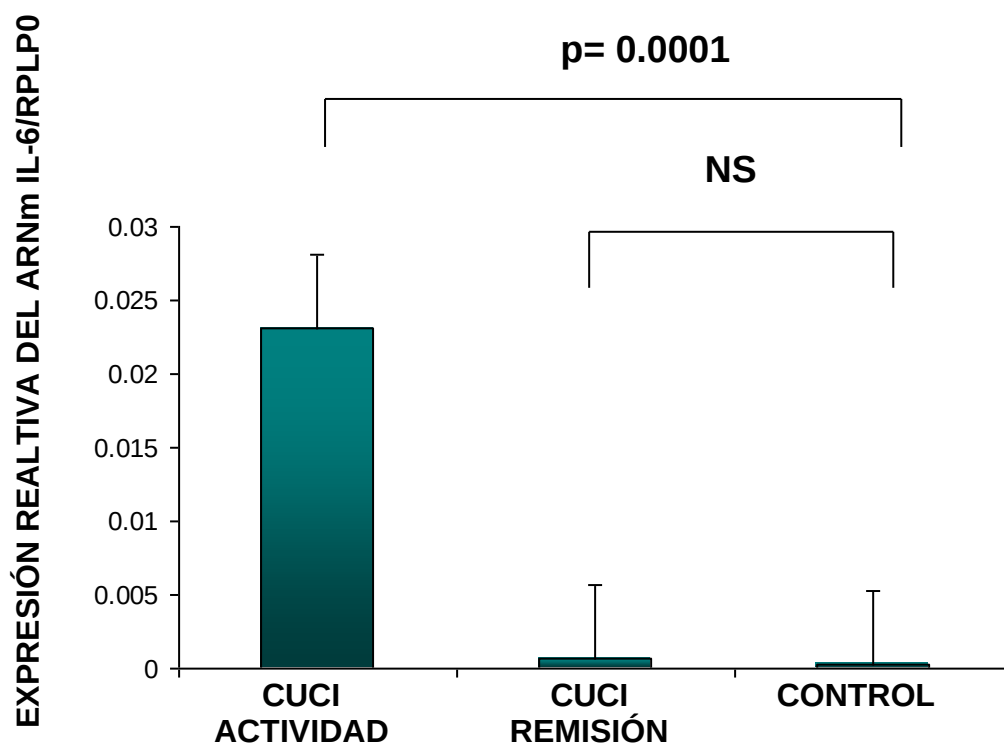


Figura 9: La expresión del mensajero de IL-6 aumentó en pacientes con CUCI en actividad en comparación con los pacientes del grupo control y en remisión ($p=0.0001$). NS= no significativo.

8.6 Correlación MDR1/IL-6

Se determinó la correlación del gen MDR1 con la IL-6 de los con CUCI en actividad y los pacientes en remisión en conjunto con los pacientes del grupo control. Se observó que en aquellos pacientes que reportaron menor expresión de MDR1 presentaban mayor nivel de expresión del mensajero de la IL-6

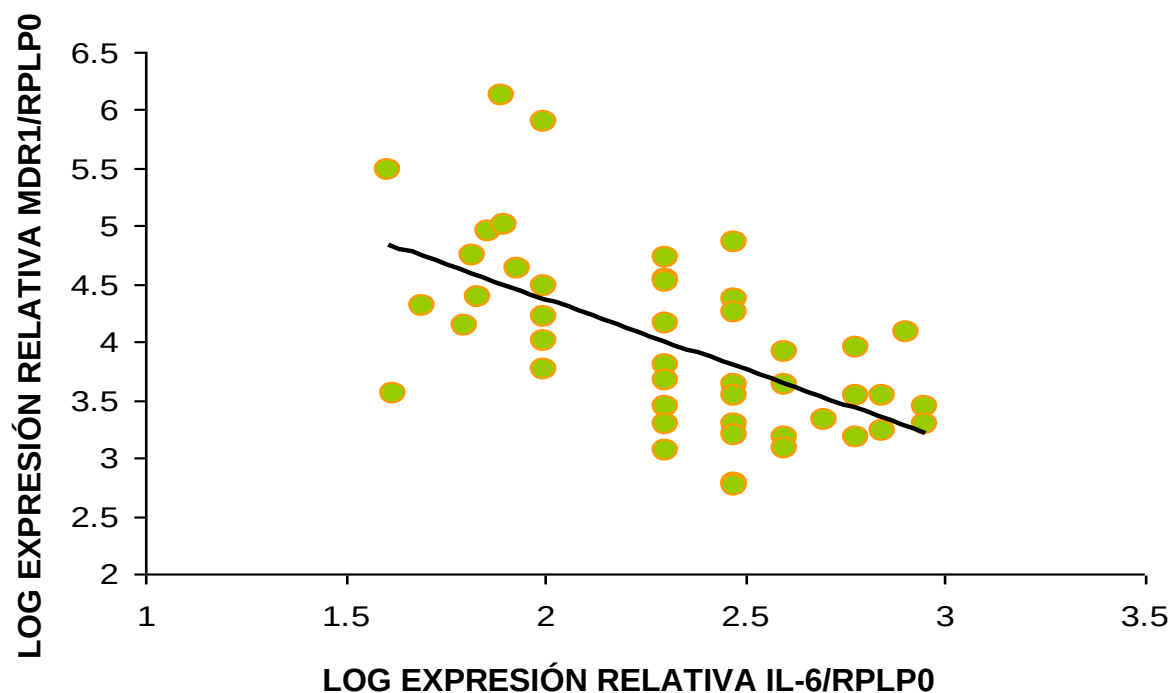


Figura 10: Se observa menor expresión del gen MDR1 en aquellos pacientes con mayor expresión de la IL-6. Por lo que la expresión de MDR1 es inversa a la expresión de la IL-6 ($p=0.002$).

8.7 Asociación de la expresión de MDR1 y las variables clínicas

Tabla 10: Características clínicas y demográficas de los pacientes.

<i>Características clínicas.</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>DE</i>	<i>P</i>
Género				
Femenino	11	0.0155	0.0127	0.053
Masculino	11	0.0316	0.0224	
Edad de diagnóstico				
< 40 años	18	0.0220	0.0511	0.072
> 40 años	4	0.0316	0.0500	
Extensión				
Pancolitis	4	0.0241	0.0184	0.863
Distal	18	0.0237	0.0185	
Curso Clínico				
Cuadro inicial activo y después inactivo	2	0.0500	0.0141	0.020
Actividad intermitente leve < 1 recaída al año	12	0.0279	0.0208	
Actividad intermitente intensa > 1 recaída al año	5	0.0128	0.0070	
Actividad continua	3	0.0081	0.0355	
Manifestaciones extraintestinales				
Sin manifestaciones	11	0.0327	0.0238	0.431
Artritis o artralgiás	8	0.0218	0.0100	
Colangitis	1	0.0100	0.0000	
Pioderma gangrenoso	2	0.0100	0.0000	
Respuesta al tratamiento				
Con respuesta al tratamiento	16	0.0290	0.0205	0.009
Esteroides dependiente (prednisona)	5	0.0108	0.0057	
Resistente a inmunomoduladores (azatioprina)	1	0.0042	0.0000	

DE: desviación estándar.

La correlación de la expresión del gen MDR1 se realizó con determinadas características clínicas de la patología en las cuales los niveles de expresión del gen pueden estar involucrados, como la localización de la inflamación, la respuesta al tratamiento, curso clínico, la edad de diagnóstico y determinadas manifestaciones extraintestinales.

En variables clínicas como la extensión, género, edad de diagnóstico y las manifestaciones extraintestinales no se encontró diferencia significativa, al correlacionarlas con los niveles de expresión de MDR1.

Con respecto a la respuesta al tratamiento y al curso clínico si se observó diferencia significativa ($p=0.009$ y 0.020 respectivamente). De acuerdo a los datos obtenidos los pacientes que presentan mayores niveles de expresión del gen MDR1 presentan una adecuada respuesta al tratamiento farmacológico y menos recaídas dentro del curso clínico de pacientes con CUCI, en comparación a aquéllos con bajos niveles de expresión que presentan dependencia a corticoesteroides o resistencia a inmunomoduladores, con actividad de intermitente a continua de la enfermedad.

IX. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis se cuantificó la expresión del gen MDR1 en biopsias de recto en pacientes con CUCI en remisión, en actividad y un grupo control sin inflamación. Se compararon los niveles de expresión entre los grupos de estudio y su asociación con determinadas características clínicas, implicadas en la respuesta al tratamiento farmacológico y el desarrollo de la CUCI.

Los hallazgos obtenidos de la expresión del gen MDR1 en los grupos de estudio, muestran que la expresión de MDR1 en biopsias de recto en pacientes con CUCI se encuentra disminuída en aquellos que están en fase activa, comparados con los que están en remisión y con el grupo control. También, se observó disminución de los niveles de expresión del gen en pacientes en remisión en comparación con el grupo control. Por otro lado, al determinar la expresión de la IL-6 encontramos una mayor expresión en pacientes con CUCI en fase activa que aquellos en remisión y el grupo control, por lo que determinamos que la IL-6 es un buen indicador de inflamación ya que confirmó el estado de remisión en dicho grupo de estudio.

Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Englund y sus colaboradores en el 2007, quienes evaluaron los niveles de expresión de MDR1 y otros transportadores (MRP2 y ABCRG2) en biopsias de recto y sigmoides en una muestra conformada por 10 pacientes como grupo control 12 pacientes con CUCI en remisión y 11 pacientes en actividad (Englund y col., 2007). Determinaron una menor expresión de MDR1 tanto en tejido de recto como de sigmoides de los pacientes en actividad respecto al los pacientes en remisión y grupo control, dato que nuestra investigación también determinó. En contraste con nuestros hallazgos, ellos no encontraron diferencia significativa al comparar los niveles de expresión de los pacientes con CUCI en remisión y el grupo control. Con respecto a la determinación de la expresión de IL-6 como marcador de inflamación, obtuvieron como resultado niveles elevados de expresión en el grupo de pacientes en fase activa y una menor expresión en el grupo de pacientes con CUCI en remisión y en el grupo control, dato

obtenido en nuestro estudio. Al determinar la asociación de la expresión MDR1/IL-6 Eglund y nuestro grupo determinamos que los pacientes con altos niveles de IL-6 reportaban bajos niveles de MDR1. Algunas de las diferencias del trabajo de Eglund con respecto al nuestro, es que ellos determinaron la expresión de la proteína en el tejido mediante microscopia confocal y determinaron la expresión del mensajero de MDR1 en la región de sigmoides, aunque debemos recordar que el 100% de los pacientes con CUCI cuando se encuentran en la fase activa presentan inflamación en recto y sigmoides por lo que evaluar la expresión en ambas regiones no sería tan importante. Sin embargo, algunas de las diferencias que observamos con este trabajo es que nosotros encontramos diferencia significativa al comparar el grupo en remisión y el grupo control lo que corrobora el papel de MDR1 en el desarrollo de la CUCI, así como la correlación de los niveles de expresión de MDR1 con algunas variables clínicas de la enfermedad lo que hace innovador este trabajo.

Hasta el momento no se han realizado estudios que relacionen los niveles de expresión de MDR1 con características clínicas de la CUCI. En este trabajo no encontramos diferencia significativa al correlacionar la expresión de MDR1 con el género, la extensión del área inflamada, edad de diagnóstico y las manifestaciones extraintestinales, pero si se determinó asociación con el curso clínico, la respuesta al tratamiento farmacológico de la CUCI.

Los primeros estudios que asociaron la expresión del gen MDR1 con el desarrollo de la CUCI se determinaron al observar que ratones *knock-out* del gen MDR1 desarrollaban colitis de manera espontánea con características clínicas, macroscópicas y microscópicas similares a las que se presentan en humanos con EII (Banner y col., 2004).

La inflamación es una reacción del organismo que se presenta ante agentes infecciosos, bajo estas condiciones las células inmunes producen una variedad de citocinas con características inflamatorias. Markova y col. en el 2006 determinaron una disminución de los niveles de ARNm del gen MDR1 en células mononucleares

de sangre periférica en condiciones de inflamación aguda. Poreé y col., en el 2007 determinaron que la IL-6 inhibe al factor transcripcional Sp1 (factor que promueve la transcripción de MDR1) y su capacidad para unirse al promotor del gen COL2A1 (un marcador de cartílago). Por lo que el polimorfismo así como la IL-6 específicamente pueden ser los responsables de producir la disminución de la expresión de MDR1 en la fase de actividad de la CUCI. Wang y Sadée en el 2006 determinaron que el polimorfismo C3435T del gen MDR1 afecta la actividad y expresión del ARN m, y por lo tanto de la proteína. Tanto el gen MDR1 como el polimorfismo C3435T se han asociado como factores de susceptibilidad a desarrollar EII. Se ha observado que niveles elevados de expresión de MDR1 sugieren un papel protector ante xenobióticos y a productos de bacterias (Ho y col., 2005). Lo que posiblemente explica por que los niveles de expresión de MDR1 se encuentran disminuidos en pacientes con CUCI en remisión en comparación al grupo control y confirmaría que la disminución de la expresión de MDR1 como factor de riesgo para el desarrollo de CUCI.

El gen MDR1 ha sido ampliamente estudiado por conferir resistencia a determinados fármacos, en específico en EII la disminución de las concentraciones citoplasmáticas de corticoesteroides se deben a la sobreexpresión de MDR1 (Farell y Kelleher, 2003). Sin embargo, observamos que los pacientes con CUCI con mayores niveles de expresión de MDR1 son los que mejor respuesta presentan al tratamiento convencional ($p=0.009$). El curso clínico puede estar determinado por la respuesta al tratamiento, los pacientes que presentan un curso clínico más estable reportaron mayores niveles de expresión ($p=0.020$). Por lo que mayores niveles de expresión implican mejor respuesta al tratamiento convencional y por lo tanto el responder al tratamiento conlleva a los pacientes a mantenerse en estado de remisión y tener menores recaídas o periodos de inflamación.

Previamente se había mencionado que no se encontró diferencia significativa en los niveles de expresión del gen MDR1 con variables como el género ya los valores de expresión de MDR1 son similares en hombres como en mujeres, si tener bajos niveles

de expresión son un factor importante en el desarrollo de la CUCI y estos son similares podría explicar por que la CUCI afecta en la misma proporción a hombres ya mujeres. Otra de la variables con la que no se encontró diferencia fue la extensión del área inflamada, se podría pensar que la expresión de MDR1 difiere en las distintas regiones del colón de los pacientes con CUCI pues en personas normales se ha demostrado tener una expresión homogénea a lo largo del colon (Zimmermann y col., 2005). Esta posible diferencia de expresión en las distintas regiones del colon puede marcar la diferencia en que algunos pacientes desarrollen pancolitis y otros CUCI distal. En relación a las manifestaciones extraintestinales tampoco se encontró asociación con los niveles de expresión de MDR1 lo que indicaría que los niveles de expresión MDR1 en recto están asociados con el desarrollo de la CUCI pero que no tienen relación alguna con complicaciones que la CUCI produce en otros órganos.

Algunas de las limitantes de este trabajo es que no se determinó la expresión de la proteína en el tejido y solo se cuantificó el ARN m de recto, por lo que determinar la expresión en otras regiones del colon sería importante, así como determinar polimorfismo ya que hay trabajos que sugieren están implicados en la expresión de MDR1 y en el desarrollo de la CUCI. El gen MDR1 se caracteriza por conferir resistencia a corticoesteroides, en la cohorte no incluimos pacientes con esta característica, lo que implica la necesidad de ampliar el tamaño de la cohorte.

X. CONCLUSIONES

La expresión del mensajero del gen MDR1 se encuentra disminuída en biopsias de recto de pacientes con CUCI con actividad en relación al grupo de pacientes en remisión y al grupo control. Los niveles de expresión en pacientes en remisión también disminuyeron en relación al grupo control, lo que rectifica el papel de la carencia del gen MDR1 en el desarrollo de la CUCI, previamente observado en modelos animales. Se determinó una correlación inversamente proporcional de MDR1 con respecto a la IL-6, es decir aquellos pacientes que reportaron mayores niveles de expresión de la IL-6, presentaban menor expresión del gen MDR1.

Se observó que aquellos pacientes con niveles de expresión más elevados presentan mejor respuesta al tratamiento y un curso clínico más estable de la enfermedad en comparación con aquéllos que presentan bajos niveles.

De acuerdo a los datos obtenidos se puede concluir que, los niveles de expresión del gen MDR1 pueden tener un valor pronóstico ya que se determinó que a mayor expresión de MDR1, los pacientes con CUCI tienen mayor respuesta al tratamiento farmacológico y un mejor curso clínico de la enfermedad.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Annese, V., Valvano, M. R., Palmieri, O., Latiano, A., Bossa, F. y Andriulli, A. 2006. Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 12(23): 3636-3644.
- Ardizzone, S. y Bianchi Porro, G. 2002. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *Journal of Internal Medicine.* 252: 475-496.
- Banner, K. H., Cattaneo, C., Le Net, J-L., Popovic, A., Collins, D. y Gale, J. D. 2004. Macroscopic, microscopic and biochemical characterization of spontaneous colitis in a transgenic mouse, deficient in the multiple drug resistance 1a gene. *British Journal of Pharmacology* 143:590–598.
- Bernstein, C. N., Rawsthorne, P., Cheang, M., Math M. y Blanchard, J. F. 2006. A population-Based Case Control Study of Potential Risk Factors for IBD. *Am J Gastroenterol.* 101: 993-1002.
- Bodor, M., Kellyy, E. J. y Ho, R.J. 2005. Characterization of the Human MDR1 Gene. *The AAPS Journal.* 7(1): E1-E5.
- Bousoño, G. y Ramos P. E. 2006. Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Bol Pediatr* 46(1): 91-99.
- Brant, S. R., Panhuysen, C. I. M., Nicolae, D., Reddy, D.M., Bonen, D. K., Karaliukas, R., Zhang, L., Swanson E., Datta, L. W., Moran, T., Ravenhill G., Duerr, R. H., Achkar, J-P., Kraban, A. S. y Cho, J. H. 2003. MDR1 Ala893 Polymorphism Is Associated with Inflammatory Bowel Disease. *Am. J. Hum. Genet.* 73: 1282-1292.
- Braun, J. y Wei, B. 2007. Body Traffic: Ecology, Genetics and Immunity in Inflammatory Bowel Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2:401-429.
- Chen, Y., Si, J., Liu, W., Cai J., Du Q., Wang L. y Gao M. 2007. Induction of experimental acute ulcerative colitis in rats by administration of dextran sulfate sodium at low concentration followed by intracolonic administration of 30% ethanol. *J Zhejiang Univ Sci B.* 8(9):632-637.

- Chowbay, B., Sharma, A., Sivathanan, C. y Lee D. J. E. 2002. Frequency of C3435T single nucleotide MDR1 genetic polymorphism in Asian population: phenotypic correlates. *J Clin Pharmacol*. 56: 78-83.
- Danese, S. y Fiocchi, C. 2006. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 12(30): 4807-4812.
- Daniel, F., Lioriot, M. A., Seksik, P., Cosnes, J., Gornet, J. M., Léman. M., Fein, F., Vernier-Massouille, G., De Vos, M., Boureille, A., Treto, X., Flourie, B., Roblin, X., Louis, E., Zerbib, F., Beaune, P., Marteau P. y GETAID. 2007. Multidrug Resistance Gene-1 Polymorphisms and Resistance to Cyclosporine A in Patients with Steroid Resistant Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 13: 19-24
- Dean, M., Rzhetsky, A. y Allikmets R. 2001. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Res*. 11: 1156-1166.
- Dean, M., Hamon, Y. y Chimini G. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*. 42:1007-1017.
- Díaz-Díaz, J. L. 2005. EII: Colitis Ulcerosa. *Revisiónes en Medicina Interna basadas en evidencias*. 1-39.
- Englund G., Jacobson A., Rosean F., Artursson P., Kindmark A. y Rönnblom A. 2007. *Inflamm Bowel Dis*. 13:291-297.
- Farrel, R. J. y Kelleher D. 2003. Mechanism of steroid action and resistance in inflammation. *Journal of Endocrinology*. 178:339-346.
- Fischer, S., Lakatos, P., L. y Hungarian IBD Study Group. 2007. ATP-binding cassette transporter ABCG2(BCRP) and ABCB1 (MDR1) variants are not associated with disease susceptibility and disease phenotype in Hungarian patients with inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 41:1-7.
- García, B. R. 2003. Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Guías clínicas*. 3(12):1-6.
- Gassull, M., A. 2006. The intestinal lumen as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 24(3): 90-95.
- Hanauer, S. B. 2004. Update on the etiology, pathogenesis and diagnosis of ulcerative colitis. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* 1(1):26-31.

- Ho, G-T., Gaya, D. R. y Satsangi, J. 2005. Multidrug Resistance (MDR1) Gene in Inflammatory Bowel Disease: A Key Player?. *Inflamm Bowel Dis.* 11(11):1013-1019.
- Honda, T., Dan, Y., Koyabu, N., Ieiri, I., Otsubo, K., Higuchi, S., Ohtani, H. y Sawada, Y. 2002. Polymorphismo of MDR1 in Healthy Japanese Subjects: A Novel SNP with an Amino Acid Substitution (Glu108Lys). *Drug. Metab. Pharmacokin.* 17(5): 479-481.
- Ishikawa, T., Hirano, H., Onishi, Y., Sakura, A. y Tarui, S. 2004. Functional Evaluation of ABCB1 (P-Glicoprotein) Polymorphisms: Hig-Speed Screening and Structure-Activity Relationship Analysis. *Drug Metab Pahrmacokin.* 19(1): 1-14.
- Jenkins, H. R. 2001. Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Arch Dis Child.* 85:435-437.
- Johnson, R., A., Shepard, E., M. y Scotto, K.W. 2005. Differential Regulation of MDR1 Transcription by the p53 Family Members. *The Journal Of Biological Chemistry.* 280(14): 13213–13219.
- Karba, A. y Eliakim, R. 2007. Effect of smoking on Inflammatory Bowel Disease: Is it a diseaseor organ specific? *World J Gastrol.* 13(15):2150-2152.
- Kimchi-Sarfaty, C., O,h M. J., In-Wha, K., Sauna, E. Z., Calcagno, A.M., Ambudkar, S. V. y Gottesmant, M. 2007. A “Silent” Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity. *Science.* 315: 525-528.
- Knigge, K.L. 2002. Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Cornerstone.* 4(4):49-60.
- Kruidenier, L. y Verspaget, H. W. 2002. Oxidative stress as a phatogenic factor in inflammatory bowel disease-radicals or ridiculous?. *Aliment Pharmacol Ther.* 16: 1997-20015.
- Lakatos, P. L. 2006. Recent trends in the epidemiology of inflamatory bowel diseases: UP or down?. *World J Gastroenterol.* 12(38): 6102-6108.
- Lakatos, P. L., Fischer, S., Lakatos, L., Gal, I. y Papp, J. 2006. Current concept on the patogénesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and microbial factors: Pathogenic bacteria and altered bacterial senseing or changes in mucosal integrity take “tall”?. *Worl J Gastroenterol.* 12(12): 1829-1841.

- Langan, R. C., Gotsch, P. B., Krafczyk, M. A. y Skillinge, D. 2007. Ulcerative Colitis: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician* 76:1323-1330.
- Leschziner, G., Zabaneh, D., Pirmohamed, M., Owen, A., Rogers, J., Coffey, A., Balding, D., Bentley, D. y Johnson, M. 2006. Exon sequencing and high resolution haplotype analysis of ABC transporter genes implicated in drug resistance. *Pharmacogenetics and Pharmacogenomics*. 16(6): 439-450.
- Liang, H.L., Ouyang, Q. 2008. A clinical trial of combined use of rosiglitazone and 5-aminosalicylate for ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 14(1): 114-119.
- Loo, T. W., Bartlett, M. C y Clarke D. M. 2006. Transmembrane segment 1 of human P-glycoprotein contributes to the drug-binding pocket. *Biochem. J.* 396: 537–545.
- Markova, S., Tsutomu, N., Toshiyuki, S., Hiroo, M., Hitoshi, U., Noboru, O. y Katsuhiko U. 2006. Genotype-dependent Down-regulation of gene expression and function of MDR1 in human peripheral blood mononuclear cells under acute inflammation. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 21(3)194-200.
- Norman, K., Kirchener, H. y Pririlch, M. 2006. Malnutrition affects quality of life in gastroenterology patients. *World J Gastroenterology*. 12(21): 3380-3385.
- Onnie, C. M., Fisher, S. A., BSc, R. P., Sanderson, J., Forbes, A., Lewis, C. M. y Mthew C. G. 2006. Associations of Allelic Variants of the Multidrug Resistance Gene (ABCB1 or MDR) and Inflammatory Bowel Disease and Their Effects on Disease Behavior: A Case-control and Meta-analysis study. *Inflamm Bowel Dis.* 12 (4): 263-272.
- Osuga, T., Sakaeda, T., Nakamura, T., Yamada, T., Koyama, T., Tamura, T., Aoyama, N., Okamura, N., Kasuga, M. y Okumura K. 2006. MDR1 C3435T Polymorphism Is Predictive of Later Onset of Ulcerative Colitis in Japanese. *Biol. Pharm. Bull.* 29(2): 324-329.
- Paredes, L. A., Blanco, J. L. y Echenique-Elizondo, M. 2006. Expresión de las proteínas relacionadas con resistencia a múltiples fármacos (MDR-proteínas) en tumores sólidos. *Cir Esp.* 79(4): 202-214.

- Peluso, I., Pallone, F. y Monteleone, G. 2006. Interleukin-12 and Th1 immune response in Crohn's disease: Pathogenetic relevance and therapeutic implication. *World J Gastroenterol*. 12(35): 5606-5610.
- Porée, B., Kypriotou, M., Chadjichristos, C., Beauchef, G., Renard, M., Legendre, F., Melin, M., Gueret, S., Hartmann, D. J., Malléin-Gerin, F., Pujol J. P., Boumediene, K y Galéra, P. 2007. Interleukin-6 (il-6) and/or soluble il-6 receptor down regulation of human type ii collagen gene expression in articular chondrocytes requires a decrease of sp1/sp3 *ratio* and of the binding activity of both factors to the *col2a1* promoter. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*
- Podolsky, D. K. 2002. Inflammatory Bowel Disease. *N England J Med*. 347(6): 417-429.
- Ruiz, G., M., J. Souviron, R., A. y Martínez, M.M. 2002. La glicoproteína-P una bomba de membrana que representa una barrera a la quimioterapia de los pacientes con cáncer. *AN.MED. INTERNA (Madrid)* 9(9): 477-485.
- Scotto, K. W. y Johnson, R. A. 2001. Transcription of the multidrug resistance Gene MDR1: Atherapeutic Target. *Molecular interventions*. 1(2): 117-125
- Seksik, P., Sokol H., Lepage, P., Vasquez, N., Mangin, I., Pochart, P., Dore, J. y Marteus, P. 2006. The role of bacteria in onset and pertuation of inflamntory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 24(3):11-18.
- Seril, D. N., Jie, L., Guang-Yu, Y. y Cheng, S. Yang. 2003. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in human and animal models. *Carcinogenesis*. 24(3): 353-362.
- Sheps, J. A., Ralph, S., Zhao, Z., Baillie, D. L. y Ling V. 2004. The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has muplications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biology* 5(3): R15.1-R15.17.
- Silverman, J. A. y Schrenk, D. 1997. Expresión of the multidrug rsistence genes in the liver. *The FASEB Journal* 11: 308-313.
- Strober, W., Fuss, I. y Mannon P. 2007. The fundamental basis of Inflammatory Bowel Disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 117(3): 514-521.

- Wang, D. y Sadée, W. 2006. Searching for polymorphisms that affect gene expresión and mRNA processing: Example ABCB1 (MDR1). *The AAPS Journal*. 8(3): E515-E520.
- Wielandt, N. A. M., Vollrath, R. V. y Chianale B. J. 2004. Polomorfismo del gen de resistencia a múltiples drogas (MDR1) en poblaciones chilenas: mapuches, mestiza y maorí. *Rev Méd Chile* 132: 1061-1068.
- Wu, H., Hait, W. N., y Yang J-M. 2003. Small Interfering RNA-induced Suppression of *MDR1* (P-Glycoprotein) Restores Sensitivity to Multidrug-resistant Cancer Cells1. *Cancer Research* 63:1515–1519.
- Yagüe, E., Artesilla A. L., Harrison, G., Elliott, J., Sardini, A., Higgins, C. F. y Raguz, S. 2003. P-glycoprotein (*MDR1*) Expression in Leukemic Cells Is Regulated at Two Distinct Steps, mRNA Stabilization and Translational Initiation. *The Journal Of Biological Chemistry*. 278(12):10344-10352.
- Yamamoto-Furusho, J. K. 2006. Colitis Ulcerosa Crónica Inespecífica. En: Gastroenterología. 5ta Edición. Villalobos P. J., Olivera M. M. y Valdovinos D. M. Mendez Editores. México D.F. 401-404.
- Yamamoto-Furusho, J.K. 2007. Innovative therapeutics for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 13(13): 1893-1896.
- Yamamoto-Furuso, J. K. 2008. Clinical Epidemiology of Ulcerative Colitis in Mexico. *J Clin Gastroenterol*. In press.
- Zhai, B. J., Shao, Z. Y., Zhao, C. L., Hu, K. y Wu, F. 2006. Development and characterization of multidrug resistance human hepatocarcinoma cell line in nude mice. *World J Gastroenterol*. 12(41): 6614-6619.
- Zimmermann, C., Gutmann, H., Hruz, P., Gutzwiller, J.P., Beglinger, C. y Drewe, J. 2005. Mapping Of Multidrug Resistance Gene 1 And Multidrug Resistanceassociated Protein Isoform 1 To 5 Mrna Expression Along The Human Intestinal Tract. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 33(2):219-224.
- www.ncbi.nlm.nih.gov/
- www.roche-applied-science.com/

XII. ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 11: Diagnóstico diferencial entre CUCI y EC

<i>CUCI</i>		<i>EC</i>
Pancolitis 60 %	Distribución	Ileocólica 70 %
Colitis izquierda 25 %		Ileal 20 %
Recto 15 %		Cólica 10 %
Afección continua y difusa Eritema, edema, friabilidad y exudado Úlceras únicas o múltiples Pseudopólipos	Endoscopía	Afección discontinua y segmentaria Eritema focal no friable Aftas y ulceraciones lineales Estenosis y fístulas
Úlceras superficiales Inflamación difusa Abscesos de criptas Depleción de células mucoides	Anatomía patológica	Ulceraciones profundas Fisuras Inflamación parcheada transmural Granulomas

Fuente: Bousoño y Ramos, 2006.

Tabla 12: Criterios de Truelove-Witts para evaluar el grado de actividad de la CUCI

<i>Características</i>	<i>Leve</i>	<i>Moderada</i>	<i>Grave</i>
Número de evacuaciones	< 40.0	4 a 5	≥ 6
Temperatura (°C)	< 37.5	<37.5	≥ 37.5
Frecuencia cardíaca (x min)	< 90.0	< 90.0	≥ 90.0
Hemoglobina	>10 - 12	7.6 a 10	≤ 7.5
Velocidad de sedimentación globular	normal	23 - 30	> 30

Fuente: Yamamoto-Furusho, 2006.

Tabla 13: Determinación de la extensión

Denominación	Características
Pancolitis	Se encuentra afectando todo el colon incluyendo el recto.
Colitis extensa	La mucosa afectada rebasa el ángulo esplénico sin necesidad de afectar todo el recto.
Colitis izquierda	Afecta el colon descendente sin pasar por el ángulo esplénico.
Colitis distal	Afecta sólo el sigmoides y recto.

Fuente: Yamamoto-Furusho, 2006.

Tabla 14: Principales manifestaciones extraintestinales de la CUCI.

Manifestación	Porcentaje
Osteoporosis	15
Ulceraciones	10
Artritis reumatoide	5 -10
Colangitis esclerosante	3
Uveítis	.5 - 3
Pioderma gangrenoso	.5 -2

Fuente: Langan y col. 2007

ANEXO 2

Carta de consentimiento informado.

Determinación de la expresión del gen de Resistencia a Múltiples Fármacos (MDR1) 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.

Testigo

Hoja de informe al paciente para participar en el estudio.

La Colitis Ulcerosa Crónica Inespecífica (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 título es estudio de una parte del material genético que produce una proteína que interviene en la defensa para el desarrollo de la colitis ulcerosa crónica inespecífica.

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.

ANEXO 3

Tabla 15: Secuencia del gen MDR1

<i>Iniciador</i>	<i>Tamaño</i>	<i>Posición</i>	<i>Tm</i>	<i>%GC</i>	<i>Secuencia</i>
Sentido	20	2105-2124	60	50	acagaaagcgaagcatggt
Antisentido	19	21-48-2166	59	53	atggtggctccgaccttttc
Amplicón (62nt)					

No. De acceso NM_000927.3 (Fuente: www.ncbi.nlm.nih.gov/).

tattcagatatattctccagattcctaagattagagatcatttctcattctcctaggagtactc
acttcaggaagcaaccagataaaaagagaggtgcaacggaagccagaacattcctcctggaaat
tcaacctgtttcgcagtttctcgaggaatcagcattcagtcattccggggccgggagcagtc
ctgtgggtgaggctgattggctgggcaggaacagcgccggggcgtgggctgagcacagccgctt
cgctctctttgccacaggaagcctgagctcattcgagtagcggtctctccaagctcaagaag
cagaggccgctgtttcgtttccttttaggtcctttccactaaagtcggagtatcttcttccaaaat
ttcacgtcttggtggccgttccaaggagcgcgaggtcgggaatggatcttgaaggggaccgcaa
tggaggagcaaagaagaagaacttttttaaaactgaacaataaaaagtgaaaaagataagaagga
aaagaaaccaactgtcagtgatattttcaatgtttcgctattcaaattggcttgacaagttgta
tatggtgggtgggaactttggctgccatcatccatggggctggacttcctctcatgatgctggt
gtttggagaaatgacagatatctttgcaaatgcaggaaatttagaagatctgatgtcaaacat
cactaatagaagtgatataatgatacaggggttcttcatgaatctggaggaagacatgaccag
gtatgcctattattacagtggaattgggtgctgggggtgctggttgctgcttacattcaggtttc
attttggtgcctggcagctggaagacaaatacacaaaattagaaaacagttttttcatgctat
aatgcgacaggagataggctggtttgatgtgcacgatgttggggagcttaacacccgacttac
agatgatgtctccaagattaatgaaggaattgggtgacaaaattggaatgttctttcagtcatt
ggcaacatttttctactgggtttatagtaggatttacacgtggttggaagctaacccttgat
tttggccatcagtcctgttcttggactgtcagctgctgtctgggcaaagatactatcttcatt
tactgataaagaactcttagcgtatgcaaaagctggagcagtagctgaagaggtcttggcagc
aattagaactgtgattgcatttggaggacaaaagaaagaacttgaaaggtacaacaaaaattt
agaagaagctaaaagaattgggataaagaagctattacagccaatatcttataggtgctgc
tttctgctgatctatgcattcttatgctctggccttctggtatgggaccaccttggctcctc
aggggaatattctattggacaagtactcactgtattcttttctgtattaattggggcttttag
tggtggacaggcatctccaagcattgaagcatttgcaaatgcaagaggagcagcttatgaaat
cttcaagataattgataataagccaagtattgacagctattcgaagagtgggcacaaaccaga
taatattaagggaaatttgggaattcagaaatgttccattcagttacccatctcgaaaagaagt
taagatcttgaagggctgaacctgaaggtgcagagtgggcagacggtggccctgggttgga
cagtggtgctgtgggaagagcacacagtcagctgatgcagaggctctatgacccacagaggg
gatggtcagtggtgatggacaggatattaggaccataaatgtaagggttctacgggaaatcat
tggtgtggtgagtcaggaacctgtattgtttgccaccacgatagctgaaaacattcgctatgg
ccgtgaaaatgtcaccatggatgagattgagaaagctgtcaaggaagccaatgcctatgactt
tatcatgaaactgcctcataaatttgacaccctgggttgagagagagggggccagttgagtgg
tgggcagaagcagaggatcgccattgcacgtgccctgggttcgcaaccccaagatcctcctgct
ggatgaggccacgtcagccttggaac→acagaaagcgaagcagtggt←tcaggtggctctgga

taaggcca→gaaaagggtcggaccaccatt←gtgatagctcatcgtttgtctacagttcgtaa
tgctgacgtcatcgctggtttcgatgatggagtcattgtggagaaaggaaatcatgatgaact
catgaaagagaaaggcatttacttcaaacttgtcacaaatgcagacagcaggaaatgaagttga
attagaaatgcagctgatgaatccaaaagtgaattgatgccttggaatgtcttcaaatga
ttcaagatccagtctaataagaaaaagatcaactcgtaggagtgtccgtggatcacaaagccca
agacagaaagcttagtaccaaagaggctctggatgaaagtatacctccagtttccttttggag
gattatgaagctaaatttaactgaatggccttattttgttgttggtgtattttgtgccattat
aatggaggcctgcaaccagcatttgcataaatattttcaaagattataggggtttttacaag
aattgatgatcctgaaacaaaacgcagagaatagtaacttgttttcactattgtttctagccct
tggaattattttcttttattacatttttcttcagggtttcacatttggcaaagctggagagat
cctcaccaagcggctccgatacatgggttttccgatccatgctcagacaggatgtgagttgggt
tgatgaccctaaaaacaccactggagcattgactaccaggctcgccaatgatgctgctcaagt
taaaggggctataggttccaggcttgctgtaattaccagaatatagcaaacttgggacag
aataattatatccttcatctatgggttggaactaacactgttactcttagcaattgtacccat
cattgcaatagcaggagttgttgaaatgaaaatgttgtctggacaagcactgaaagataagaa
agaactagaaggttctgggaagatcgctactgaagcaatagaaaacttccgaaccgttgtttc
tttgactcaggagcagaagtttgaacatatgtatgctcagagtttgcaggtaccatacagaaa
ctctttgaggaaagcacacatctttggaattacattttccttcaccaggcaatgatgtattt
ttcctatgctggatgtttccggtttgagcctacttgggtggcacataaactcatgagctttga
ggatgttctgttagtattttcagctgttgtctttgggtgccatggccgtggggcaagtcagttc
atttgcctcctgactatgccaaagccaaaatatcagcagcccacatcatcatgatcattgaaaa
aaccctttgattgacagctacagcacggaaggcctaatgccgaacacattggaaggaaatgt
cacatttgggtgaagttgtattcaactatcccaccgcagccgacatcccagtgttccagggact
gagcctggagggtgaagaagggccagacgctggctctggtgggcagcagtggtgtgggaagag
cacagtgggtccagctcctggagcgggttctacgacccttggcagggaaagtgtgcttgatgg
caaagaaataaagcagctgaatgttcagtggctccgagcacacctgggcatcgtgtcccagga
gcccacctgtttgactgcagcattgctgagaacattgcctatggagacaacagccgggtggt
gtcacaggaagagatttgtgagggcagcaaaggaggccaacatacatgccttcatcgagtcact
gcctaataaatatagcactaaagttaggagacaaaggaaactcagctctctgggtggccagaaaca
acgcattgccatagctcgtgcccttgttagacagcctcatattttgcttttgatgaagccac
gtcagctctggatacagaaagtgaaggggttgcacaagaagccctggacaaagccagagaagg
ccgcacctgcattgtgattgctcaccgcctgtccaccatccagaatgcagacttaatagtgg
gtttcagaatggcagagtcaggagcatggcacgcatcagcagctgctggcacagaaaggcat
ctatttttcaatgggtcagtgtccaggctggaacaaagcgccagtgaactctgactgtatgaga
tgtaaataactttttaataatttgttttagatatgacatttattcaaagttaaaagcaaacactt
acagaattatgaagaggtatctgtttaacatttccctcagtcagttcagagttcctcagagact
tcgtaattaaaggaacagagtgagagacatcatcaagtggagagaaatcatagtttaaaactgc
attataaattttataacagaattaaagttagatttttaaaagataaaatgtgtaattttgtttat
attttccatttggactgtaactgactgccttgctaaaagattatagaagtagcaaaaagtat
tgaaatgtttgcataaagtgtctataataaaactaaactttcatgtgactggagtcattcttgt
ccaaactgcctgtgaatatatcttctctcaattggaatattgtagataacttctgctttaaaa
aagttttctttaaatatacctactcattttttgtgggaatgggttaagcagtttaataaattcct
gttgatataatgtctattcacattgggtcttacagaaccatctggcttcattcttcttggacttg
atcctgctgattcttgcatttccacat

(Fuente: www.roche-applied-science.com)

ANEXO 4

Tabla 16: Secuencia de IL-6

<i>Iniciador</i>	<i>Tamaño</i>	<i>Posición</i>	<i>Tm</i>	<i>%GC</i>	<i>Secuencia</i>
Sentido	20	32-51	59	55	gaagctctatctcgctcca
Antisentido	18	21-48-2166	59	61	agcaggcaacaccaggag
Amplicón (103nt)					

No.- de acceso NM_000600.1(Fuente: www.ncbi.nlm.nih.gov)

ttctgccctcgagcccaccgggaacgaaaga→gaagctctatctcgctcca←ggagcccag
ctatgaactccttctccacaagcgcccttcgggtccagttgccttctccctggggctg→ctcct
ggtggttgctgct←gccttccctgccccagtagccccaggagaagattccaaagatgtagcc
gccccacacagacagccactcacctcttcagaacgaattgacaaacaaattcggtacatcctc
gacggcatctcagccctgagaaaggagacatgtaacaagagtaacatgtgtgaaagcagcaaa
gaggcactggcagaaaacaacctgaaccttccaaagatggctgaaaaagatggatgcttccaa
tctggattcaatgaggagacttgccctgggtgaaaatcatcactgggtcttttgagtttgaggta
tacctagagtacctccagaacagatttgagagtagtaggaacaagccagagctgtgcagatga
gtacaaaagtcctgatccagttcctgcagaaaaaggcaaagaatctagatgcaataaccaccc
ctgacccaaccacaaatgccagcctgctgacgaagctgcaggcacagaaccagtggtgagga
catgacaactcatctcattctgctgcagctttaaggagttcctgcagtccagcctgagggctct
tcggcaaagttagcatgggcacctcagattggttggtgtaaatgggcattccttcttctggtca
gaaacctgtccactgggcacagaacttatgttgctctatggagaactaaaagtatgagcgttag
gacactattttaattatttttaatttattaatatttaaatatgtgaagctgagttaattatgt
aagtcataatttatatttttaagaagtaccacttgaaacattttatgtattagttttgaaataa
taatggaaagtggctatgcgtttgaatatcctttgttttcagagccagatcatttcttgaaag
tgtaggcttacctcaaataaatggctaacttatacatattttaagaaatatttatattgtat
ttatataatgtataaatggtttttataccaataaatggcatttttaaaaaattc

(Fuente: www.roche-applied-science.com)

ANEXO 5

Tabla 17: Secuencia de RPLP0

<i>Iniciador</i>	<i>Tamaño</i>	<i>Posición</i>	<i>Tm</i>	<i>%GC</i>	<i>Secuencia</i>
Sentido	18	177-194	59	61	gatgcccaggggaagacag
Antisentido	21	255-275	60	43	tctgctcccacaatgaaacat
Amplicón (99nt)					

No. NM_001002.3 (Fuente: www.ncbi.nlm.nih.gov)

gtctgacgggcgatggcgagccaatagacaggagcgctatccgcgggtttctgattggctact
 ttgttcgcattataaaaggcacgcgcgggcgagggccttctctcgccaggcgctcctcggtg
 aagtgacatcgtctttaaacctgctggtggaatccctgacgcaccgcccgt→gatgcccaggg
aagacag←ggcgacctggaagtccaactacttccttaagatcatccaactattggatgatta
tccgaa→atgtttcattgtgggagcaga←caatgtggggtccaagcagatgcagcagatccg
 catgtcccttcgcgggaagggtgtggtgctgatgggcaagaacacccatgatgcgcaaggccat
 ccgagggcacctggaaaacaaccagctctggagaaactgctgcctcatatccgggggaatgt
 gggctttgtgttcaccaaggaggacctcactgagatcagggacatggtgctggccaataaggt
 gccagctgctgcccgtgctggtgccattgccccatgtgaagtcactgtgccagcccagaacac
 tggctctcgggcccagagaagacctcctttttccaggcttttaggtatcaccactaaaatctccag
 gggcaccattgaaatcctgagtgatgtgcagctgatcaagactggagacaaagtgggagccag
 cgaagccacgctgctgaacatgctcaacatctcccccttctcctttgggctggtcatccagca
 ggtgttcgacaatggcagcatctacaaccctgaagtgttgatatcacagaggaaactctgca
 ttctcgcttcctggagggtgtccgcaatgttgccagtgctgtctgctgcagattggctaccaac
 tgttgcatcagtagccattctatcatcaacgggtacaaacgagtcctggccttgtctgtgga
 gacggattacaccttcccacttgctgaaaagggtcaaggccttcttggtgatccatctgcctt
 tgtggctgctgcccctgtggctgctgccaccacagctgctcctgctgctgctgcagccccagc
 taagggtgaaagcaaggaagagtcggaggagtcggacgaggatatgggatttggtctctttga
 ctaatcacaaaaagcaaccaacttagccagttttatttgcaaaacaaggaaataaaggctta
 cttcttttaaaaagtaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

(Fuente: www.roche-applied-science.com)

GLOSARIO

Álelos: formas alternativas que puede tener un gen, por ejemplo: un gen para cada grupo sanguíneo puede tener el alelo A, B u O.

Aminoácido: molécula orgánica que contiene un grupo amino ($-NH_2$), un grupo carboxilo ($-COOH$), y una cadena lateral variable que los identifica a cada uno. Se vinculan entre si mediante uniones entre el grupo $-COOH$ de uno de los del grupo $-NH_2$ del otro (unión peptídica), y constituyen así las unidades de las proteínas (que se denomina peptidos cuando contiene sólo unos pocos aminoácidos). Son 20 los diferentes aminoácidos que forman parte de la mayoría de las proteínas.

ARN mensajero: molécula de RNA que porta información genética desde el gen hasta los ribosomas, en los cuales se lleva a cabo la traducción a proteína.

Base Nitrogenada: molécula orgánica que, junto con el fosfato y un azúcar (ribosa o desoxirribosa) constituyen un nucleótido, unidad básica de los ácidos nucleicos. Hay cuatro bases diferentes en el ADN: adenina, citosina, guanina y timina. En el RNA el uracilo sustituye a la timina. La formación genética está dada por la secuencia de estas cuatro bases.

Caja TATA: secuencia de seis bp localizada en casi todos los sitios promotores de genes eucariontes: TATXAX, donde X puede ser A o T. Se supone que corresponde al sitio promotor de la RNA polimerasa II situada a -20 o -30 bp en el extremo 5' del sitio de iniciación de la transcripción de genes eucariontes.

Cromosomas: segmento de ADN del genoma de un organismo con lo necesario para replicarse de una generación a otra y repartirse en dos células hijas. El número de cromosomas y el contenido de la información en cada uno de ellos es característico de cada especie. Los seres humanos tienen 46 cromosomas; en el núcleo de cada célula hay 23 pares de cromosomas. La otra parte del ADN que contienen las células humanas se encuentra en las mitocondrias, las cuales tienen genes importantes en su propia hebra de ADN.

Dependencia a esteroides: incapacidad para disminuir las dosis de prednisona por debajo de 15 mg/día ya que se observa exacerbación de la actividad de la enfermedad.

Domino: porción de una proteína con función o característica estructural propia. También se aplica a regiones cromosómicas o cromatina con cierta autonomía funcional o estructural.

Electroforesis: método de separación de moléculas a partir de una disolución, según su capacidad de desplazarse en el seno de un campo eléctrico.

Exón: porción del ADN que codifica ARNm maduro. Estas son las regiones de un gen que contribuyen al RNA transcrito primario, que, después del proceso de corte y empalme, forman las especies maduras del ARNm, las cuales codifican las secuencias de los polipéptidos.

Expresión genética: proceso en el que la información por un gen se convierte en las estructuras constituyentes y funcionales de la célula. Un gen se expresa tanto si se transcribe a RNA como producto final, como es el caso de los rRNA o tRNA, y después se traduce a proteína.

Farmacogenómica: es el análisis de la genómica en particular la variación genética (polimorfismos) en respuesta a las drogas o fármacos. Esta práctica puede en principio ayudar a la medicina a generar tratamientos más adecuados.

Fenotipo: las características visibles de un individuo, como estatura, color de ojos, grupo sanguíneo o presencia de alguna enfermedad. Puede deberse a factores genéticos, ambientales o a una interacción entre ambos.

Gen: Su concepto ha cambiado con los avances de la genética. Por lo general se considera un segmento del ADN con información para sintetizar una proteína o, más específicamente, un polipéptido. De forma más amplia, es un segmento de ADN con información para formar un ácido ribonucleico, RNA.

Genética: ciencia que se ocupa de la herencia y variabilidad de rasgos fenotípicos específicos, y de los genes asociados a ellos.

Genotipo: es la especificación de los dos alelos (paterno y materno) correspondientes a un cierto gen en un individuo dado, como el genotipo de una persona para el grupo sanguíneo podría ser AB, mientras que para otra, AO.

Haplotipo: combinación de alelos, uno de origen paterno y uno de origen materno, en un determinado *locus* génico.

Heterocigoto: cuando el genotipo de un eucarionte para cierto gen contiene dos alelos diferentes, por ejemplo, si un individuo con grupo sanguíneo A recibió el alelo A de uno de sus progenitores y el alelo O de otro, será heterocigoto.

Homocigoto: cuando el genotipo de un eucariote para cierto gen contiene dos alelos iguales; por ejemplo, el grupo sanguíneo AA, será homocigoto.

***in vitro*:** fuera de un organismo vivo.

Intrón: secuencia de ADN que se transcribe, pero que se elimina o escinde del transcrito primario en un proceso de maduración a ARNm y que por lo tanto no tiene información codificante para una proteína o un péptido. Sin embargo, en algunos casos contiene información reguladora.

Kb: kilobases; múltiplo de la unidad de longitud del ADN equivalente a 1000 bases.

Locus: sitio de un cromosoma que ocupa un alelo de un gen. Es un vocablo latino, cuyo plural es *loci* (sitios).

Motivo: unidad estructural que exhibe una arquitectura tridimensional particular y que se encuentra en diversas proteínas, por lo general asociadas a una función particular.

Nucleótidos: moléculas que constituyen los “eslabones” de los ácidos nucleicos. Cada nucleótido tiene un azúcar (distintos en el ADN-desoxirribosa- y en el RNA – ribosa-), un fosfato y una base nitrogenada, o simplemente “base”. Hay cuatro tipos de nucleótidos en el ADN, según las bases que contengan: adenina (A), guanina (G), timina (T) y citosina (C). En el RNA, en vez de timina hay uracilo (U).

Polimerasa: enzima que favorece la asociación de nucleótidos de ADN o RNA.

Polimorfismo: se dice que un locus génico es polimórfico cuando, en una determinada población, tiene cuando menos dos alelos con frecuencias mayores de 1%. Presencia de dos o más alelos de cualquier sistema en una población en la que la frecuencia del más raro de ellos no puede explicarse por mutación recurrente.

Polimorfismo no sinónimo: polimorfismo en el cual la sustitución se presenta en la región codificante alterando el codón, tal que resulta en el reemplazo de un aminoácido en la cadena polipeptídica.

Polimorfismo sinónimo: la sustitución se encuentra en las regiones codificantes, pero no causa cambios aminoacídicos

Promotor: secuencia mínima necesaria de ADN para lograr la transcripción basal de un gen. Región del ADN adyacente a un gen a la cual se une la enzima RNA polimerasa para iniciar la transcripción de dicho gen.

Proteína: pueden ser polipéptidos naturales o sintéticos con peso moleculares mayores a 10 mil. Son polímeros de aminoácidos formados por uniones peptídicas. La secuencia de los aminoácidos determina la secuencia y la función de la proteína.

Regiones reguladoras: secuencias de nucleótidos que determinan el momento en que se expresa un gen y regulan la expresión genética.

Reacción en Cadena de la Polimerasa: amplificación exponencial *in vitro* de moléculas de ADN a través de múltiples ciclos de desnaturalización, hibridación de oligonucleótidos y síntesis de ADN.

Respuesta al tratamiento médico: se observa respuesta clínica al disminuir la actividad de la CUCI con dosis de 3-4.5 g/día de 5-ASA; 0.5-0.7 mg/kg/día de prednisona y 2-2.5 mg/kg/día de azatioprina.

Resistencia a inmunomoduladores: persistencia de la actividad de CUCI en pacientes con azatioprina a dosis de 2 a 2.5 mg/kg/día al menos con 6 meses de haber iniciado el tratamiento y que no ha permitido discontinuar el uso de esteroides.

Secuencia de ADN: orden relativo de bases, ya sea de un fragmento de ADN, de un gen, de un cromosoma entero o de todo un genoma completo.

Sonda: según la genética molecular es la secuencia marcada de ADN o RNA con que se detecta la presencia de una secuencia complementaria mediante hibridación molecular.

Triplete: conjunto de tres nucleótidos que presentan a un aminoácido o a una señal de término en el contexto del código genético. Los tripletes también se denominan codones, y constituyen la unidad de información del código.