



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR  
ZUBIRÁN**

TÍTULO:

**DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DE LA INTERLEUCINA 22 EN  
PACIENTES CON COLITIS ULCERATIVA CRÓNICA IDIOPÁTICA DE LA CLÍNICA DE  
ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL, INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS  
MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN**

MODALIDAD DE GRADUACIÓN:

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA

**David García Rangel**

TUTOR PRINCIPAL:

**Dr. Jesús Kazuo Yamamoto Furusho**

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

MEXICO, D.F. Marzo 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# ÍNDICE

<b>Resumen</b>	4
<b>Antecedentes</b>	
Perspectiva histórica	6
Definición	6
Epidemiología	7
Etiopatogenia	9
Manifestaciones clínicas	16
Diagnóstico	16
Interleucina 22	18
<b>Planteamiento del Problema</b>	24
<b>Justificación</b>	25
<b>Objetivos</b>	26
General	
Específicos	
Secundarios	
<b>Pregunta de investigación</b>	27
<b>Metodología</b>	27

Diseño del estudio	
Población	26
Tamaño de la muestra	27
Grupo de estudio	28
Criterios de inclusión	
Criterios de exclusión	
Procedimiento	33
Técnicas	34
Extracción de DNA	
Cuantificación de DNA	
PCR para discriminación alélica	
Discriminación alélica empleando sondas Taqman	
<b>Resultados</b>	<b>35</b>
<b>Discusión</b>	<b>38</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>40</b>
<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>41</b>
<b>Anexos</b>	<b>47</b>

## **DEDICATORIA**

**A ITZI, POR SU AMOR, APOYO Y PACIENCIA EN TODO MOMENTO**

**A MIS PADRES Y A MIS SUEGROS**

## **AGRADECIMIENTOS**

**AL DR JESÚS KAZUO YAMAMOTO FURUSHO**

## **Resumen:**

**Antecedentes.** La Colitis Ulcerativa Crónica Idiopática (CUCI) es una enfermedad inflamatoria intestinal crónica de etiología desconocida. La incidencia se encuentra entre 0.5 y 24.5 casos por cada 100,000 habitantes por año. Se ha postulado que existe una respuesta inmune aberrante relacionada a la exposición de flora bacteriana anormal en pacientes genéticamente susceptibles. La vía inflamatoria Th17 está involucrada en la patogénesis de la EII y se centra en el linaje de células Th17, las cuales producen varias citocinas tales como la interleucina 17 (IL-17) y la interleucina 22 (IL-22). La IL-22 estimula las células epiteliales para producir proteínas antimicrobianas, además de interferir en los mecanismos pro-inflamatorios de la mucosa intestinal. Se han estudiado diversos polimorfismos (SNPs) de IL-22 en otras enfermedades, algunos de ellos se han descrito como de riesgo para el desarrollo de las enfermedades estudiadas.

**Objetivo.** Determinar si los SNPs rs2227485, rs2227491 y rs2272478 de la IL-22 están asociados con la CUCI y evaluar si existe alguna asociación con las características de la enfermedad, tales como extensión, manifestaciones extra

intestinales, respuesta a tratamiento médico y necesidad de tratamiento quirúrgico en una población de pacientes mestizos mexicanos.

**Materiales y Métodos.** Estudio de casos y controles. Se estudiaron un total de 199 pacientes con diagnóstico definitivo de CUCI confirmado por histopatología y 697 individuos sanos mestizos mexicanos. Se analizaron tres polimorfismos del gen de la IL-22 (rs2227485, rs2227491 y 2272478) a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR). Se utilizó estadística descriptiva. El análisis de asociación de la frecuencia de cada alelo se realizó mediante tablas de contingencia de 2x2 y se utilizó las pruebas de Chi-cuadrada de Pearson.

**Resultados:** Se estudiaron 199 pacientes con CUCI (casos) y 697 individuos sanos (controles), 54% y 51% eran mujeres respectivamente, la edad promedio fue de  $31.5 \pm$  años para el grupo de pacientes con CUCI y de  $35 \pm 14$  años para los controles. No se observó diferencia significativa en la frecuencia de los tres polimorfismos genéticos entre los pacientes con CUCI y los controles sanos.

**Conclusiones:** Los polimorfismos rs2227485, rs2227491 y 2272478 no están asociados al desarrollo de la CUCI en nuestra población.

## **Antecedentes**

### **Perspectiva histórica**

La colitis ulcerativa crónica idiopática (CUCI) es una enfermedad inflamatoria intestinal que afecta la mucosa y submucosa del colon. En 1859 Samuel Wilks la describió como una “colitis idiopática” y la diferenció de la disentería bacilar <sup>1</sup>. En 1909 Hawkins describió la naturaleza recidivante de esta enfermedad <sup>1, 2</sup>. En ese mismo año, Sir Arthur Hurst dio una descripción más completa, incluyendo su apariencia <sup>2</sup>.

### **Definición**

La CUCI es la inflamación difusa y crónica del colon, con compromiso del recto y que se extiende de manera proximal, circunferencial y continua, localizándose el proceso inflamatorio en mucosa y submucosa colónica. La causa es desconocida pero se han encontrado numerosos factores genéticos, inmunológicos y ambientales asociados a la presencia de la enfermedad <sup>3</sup>.

Los síntomas y la gravedad de esta enfermedad dependerán de la extensión, grado de inflamación, y la actividad de las manifestaciones extraintestinales, aspectos que le confieren una heterogeneidad clínica significativa.



## **Epidemiología**

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

Entre los factores de riesgo responsables de la EII se encuentran los genéticos y los ambientales. La predisposición genética de ciertas poblaciones explica la diferencia en la distribución geográfica de la CUCI y la enfermedad de Crohn <sup>4</sup>.

La prevalencia de la EII varía desde el punto de vista geográfico y es mayor en el norte y el oeste de Europa, así como en el norte de América; las zonas geográficas de menor incidencia son África, América del Sur, este de Europa y Asia, incluida China. En diversos estudios se ha encontrado que la incidencia es mayor en los países desarrollados y más industrializados <sup>4</sup>.

En general, la incidencia de la CUCI en el mundo se encuentra entre 0.5 y 24.5 casos por cada 100,000 habitantes/año <sup>5</sup>.

En las últimas décadas se ha encontrado aumento en la incidencia de la EII en los países del este de Europa y Asia <sup>5</sup>. Lo anterior se atribuye a la occidentalización de los estilos de vida, los cambios en la dieta y los cambios

ambientales debidos a la industrialización y urbanización de las poblaciones. Las incidencias más altas de Asia se encuentran en la India, Japón, y Arabia Saudita <sup>4 5</sup>.

En Wisconsin Estados Unidos se encontró una incidencia de EC y CUCI de 4.5 y 2.1 casos por cada 100,000 habitantes por año respectivamente <sup>6</sup>.

Un estudio realizado en un hospital de tercer nivel de la Ciudad de México, se encontró un aumento en la incidencia de pacientes diagnosticados con CUCI en los últimos 10 años <sup>6,7</sup>.

La EC y la CUCI; se distribuyen de forma diferente de acuerdo con el grupo etario. Así, la EC es más frecuente en los pacientes jóvenes, mientras que la CUCI se presenta con mayor frecuencia en las personas de edad avanzada <sup>4</sup>.

El diagnóstico de la EC se encuentra entre los 33.4 y los 45 años de edad, mientras que la CUCI se diagnostica, en general, entre 5 y 10 años después <sup>8</sup>.

La edad promedio de diagnóstico en pacientes pediátricos es de 12 años y se ha observado que la EII aumenta su frecuencia después de la adolescencia. En un estudio belga, se encontró una mayor incidencia de la EII en un grupo de adultos mayores de 60 años de edad, en comparación con el grupo de edad pediátrica <sup>4</sup>.

En la CUCI se ha encontrado ligero predominio de la frecuencia en hombres <sup>4</sup>. Los estudios realizados en Asia demuestran que no hay diferencia entre géneros para desarrollar EII <sup>5,9</sup>.

En cuanto a las diferencias étnicas, se observó mayor frecuencia en las poblaciones caucásicas; sin embargo, algunos estudios en Baltimore muestran una disminución en las diferencias entre razas y cada vez es más similar la frecuencia de presentación de esta enfermedad <sup>5,10</sup>.

### **Etiopatogenia**

La etiología de la CUCI es desconocida, pero se ha propuesto que sea multifactorial, esto en base a los conocimientos más actuales de la enfermedad. La patogenia de la EII involucra tres grandes factores: la predisposición genética, la microbiota intestinal y las propiedades inmunológicas de la mucosa del tracto gastrointestinal <sup>11</sup>.

En cuanto a los factores genéticos, se ha observado desde hace muchos años la probabilidad de tener un familiar con EII entre los pacientes con CUCI es del 10 al 15% <sup>5</sup>. La asociación familiar generalmente ocurre entre familiares de primer grado y el riesgo relativo para tener la misma enfermedad entre hermanos es de 7 al 17 con base en estudios en poblaciones de Norte América y Europa <sup>7</sup>.

La asociación familiar es mayor en las personas de origen judío, una herencia conocida por tener una mayor incidencia de la EII.

La herencia no puede ser explicada por un modelo mendeliano, hasta la fecha se han descrito varias mutaciones genéticas asociadas con diversas características de la enfermedad.

Estudios de asociación genética han sugerido que existen genes de susceptibilidad en los cromosomas 1, 2, 3, 5, 6, 7, 10, 12 y 17. El locus IBD2 en ( cromosoma 12) ha demostrado tener una fuerte asociación con la CUCI <sup>8</sup>.

Una variedad de genes que codifican para las proteínas que intervienen en la regulación inmune se han postulado como posibles genes candidatos, varios estudios han informado de la asociación entre la CUCI y de algunos polimorfismos de los genes que se encuentran en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en el locus 6p21. Los genes del antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II son candidatos para un papel en la patogénesis de la CUCI, porque sus productos desempeñan un papel central en la respuesta inmune<sup>9 12</sup>.

Los estudios de asociación han demostrado que existen diversos alelos del HLA-DR que participan en la susceptibilidad genética en la CUCI, tales como HLA-DRB1\*0103, DRB1\*1502 y DRB1\*12 <sup>10, 8</sup>.

Un meta-análisis ha confirmado la presencia de 47 loci asociados con la EII, de los cuales 19 son específicos para la CUCI y 28 son compartidas con la EC <sup>11</sup>.

Se han identificado otros genes que tienen relación con la señalización de la IL-23 tanto en la CUCI como en la EC (IL23R, STAT3, JAK2, IL12B y PTPN2) y genes implicados en la diferenciación de las células T colaboradoras tipo 1 y 17 (Th1 y Th17) tales como IL10, IL7R, IL23R e IFN- $\gamma$ . La CUCI parece ser genéticamente tan heterogénea como la EC <sup>3</sup>.

Además de los factores genéticos que se acaban de comentar, se requiere de una respuesta inmune aberrante del hospedero que se desencadena por una interacción poco conocida con el microbioma y otros factores ambientales <sup>4</sup>.

En condiciones fisiológicas existe un equilibrio dinámico entre los microorganismos presentes en el lumen intestinal y los mecanismos de defensa del hospedero. Se postula que existe una "disbiosis" o un desequilibrio entre los componentes de protección y perjudiciales de la microbiota luminal en favor de esta última, desempeñando un papel crítico en la iniciación y perpetuación de la inflamación en la CUCI <sup>12,13</sup>.

Algunos componentes de la flora pueden actuar como agentes nocivos, mientras que otros (probióticos) parecen tener un efecto protector.

Además de los agentes infecciosos, se han encontrado numerosos factores ambientales, algunos de ellos ya han sido ampliamente estudiados. El factor ambiental probablemente más asociado a la CUCI es el tabaquismo. Numerosos estudios han demostrado consistentemente que la CUCI es más común entre los no fumadores que entre los fumadores actuales, con el riesgo relativo de la CUCI en los no fumadores de dos a seis <sup>14</sup>.

Esta relación se ha demostrado en estudios clínicos en los que los pacientes tratados con nicotina presentan una mejoría clínica, sin embargo parece estar limitada a los tratados con altas dosis <sup>15</sup>.

Varios mecanismos se han postulado para explicar el aparente efecto protector del tabaquismo activo en la CUCI. Estos incluyen la modulación de la inmunidad celular y humoral, los cambios en los niveles de citocinas, aumento de la generación de radicales libres de oxígeno, y la modificación de la inflamación mediada por eicosanoides. Otros estudios han sugerido una relación inversa entre la apendicectomía y el desarrollo de la CUCI <sup>16</sup>.

Se postula que la eliminación del tejido linfoide asociado al apéndice, anula ciertas alteraciones patológicas en las respuestas inmunitarias de las mucosas y por lo tanto evita la aparición de la CUCI <sup>17</sup>.

Otras anomalías reportadas en la CUCI son un defecto en la barrera epitelial y el deterioro en la expresión del receptor  $\gamma$  activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR- $\gamma$ ), un receptor nuclear que regula los genes inflamatorios<sup>18</sup>.

Las interacciones en el sistema inmune mucoso llevan a inflamación crónica descontrolada observada en la CUCI, a este respecto, mecanismos inmunológicos tanto humorales como celulares se encuentran involucrados.

La examinación histológica de la mucosa colónica inflamada demuestra incremento en las células plasmáticas, este incremento no es uniforme entre las células productoras de diferentes clases de inmunoglobulinas. La síntesis de IgG es la que se ha encontrado con el mayor potencial entre las diferentes clases de anticuerpos<sup>19</sup>.

La autoinmunidad puede representar un papel importante en la CUCI. Además de los p-ANCA, esta enfermedad se caracteriza por la circulación de anticuerpos IgG1 contra un antígeno epitelial colónico compartido con la piel, los ojos, las articulaciones y el epitelio biliar; y dado que éstos son los sitios de las manifestaciones extraintestinales de la CUCI, es posible que la reacción cruzada de los anticuerpos contra el colon causen daños órgano-específicos. La tropomiosina 5, una proteína estructural, es el auto-antígeno de los anticuerpos

IgG1, pero en la CUCI aún falta evidencia de la autoinmunidad mediada por los anticuerpos clásicos <sup>20, 21</sup>.

La inmunidad celular consiste en dos componentes la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. El sistema inmune innato el cual incluye a los monocitos, macrófagos, células dendríticas, consiste en una línea de defensa no específica y sin entrenamiento que actúa como defensa contra antígenos extraños, particularmente contra antígenos bacterianos. Las bacterias estimulan la respuesta inmune principalmente a través de los receptores de patrón de reconocimiento (PPR), que incluye a 11 receptores tipo Toll (TLR) y 23 receptores tipo dominio de oligomerización de nucleótido vinculante (NLRs). La activación de los TLRs y NLRs resultan en una regulación corriente abajo del factor nuclear  $\kappa\beta$  (NF-  $\kappa\beta$ ) el cual posteriormente estimula la transcripción de genes que codifican para varias citocinas pro inflamatorias (incluyendo TNF $\alpha$ , IL1, IL6, e IL8) quimiocinas, moléculas de adhesión y moléculas co-estimuladoras. Defectos en cualquier vía PRR puede llevar a procesamiento anormal bacteriano y al posible desarrollo de EII <sup>21</sup>.

La mayoría de los investigadores han encontrado una distribución similar de linfocitos T CD4 y CD8 de forma intraepitelial, la función de los linfocitos intraepiteliales no ha sido bien caracterizada pero se ha sugerido que son citotóxicos y posiblemente activos en la supresión de la respuesta inmune local.



La activación de los macrófagos, linfocitos y células epiteliales del colon lleva a la liberación de citocinas y mediadores inflamatorios que posteriormente amplifican la respuesta inmune e inflamatoria de la CUCI. Basado en la citocinas que se producen en estas condiciones, las células T CD4 han sido divididas en 3 principales fenotipos inmunes: T helper1 (Th1), T helper 2 (Th2) y T helper 17 (Th17) <sup>22</sup>.

La vía inflamatoria Th17 está involucrada en la patogénesis de la EII y se centra en el linaje de células Th17, las cuales producen varias citocinas tales como IL-17 e IL-22. Las células Th17 pueden causar graves enfermedades autoinmunes, sin embargo, tienen una función muy importante en la inmunidad anti-microbiana en las barreras epiteliales. Otras citocinas producidas por Th17 tales como IL-22 estimulan a las células epiteliales para producir proteínas antimicrobianas <sup>10, 23</sup>.

### **Manifestaciones clínicas**

El síntoma clínico predominante de la CUCI es la diarrea sanguinolenta, con o sin moco. Normalmente, el inicio es insidioso, a menudo seguido por períodos de remisiones espontáneas y recaídas. Otros síntomas comunes son pérdida de peso y debilidad generalizada. Suele haber manifestaciones extra intestinales, tales como la uveítis, epiescleritis, el eritema nodoso, pioderma gangrenoso y manifestaciones musculo-esqueléticas <sup>3</sup>.

El riesgo acumulado de cáncer colorrectal entre los pacientes con CUCI puede llegar a 20 a 30% en 30 años, pero la tasa de incidencia es mucho menor en algunas series publicadas (aproximadamente 2%)<sup>24, 25</sup>.

## **Diagnóstico**

Es frecuente la presencia de anemia e hipoalbuminemia. Los reactantes de fase aguda como VSG y Proteína C reactiva se encuentran elevados. Deberá descartarse la presencia de infecciones por medio de coprocultivos, examen coproparasitológico y búsqueda de toxina A y B para *C. difficile*<sup>26</sup>.

Una vez que se han descartado causas infecciosas, se deberá realizar una colonoscopia con biopsias de la mucosa colónica.

La colonoscopia muestra una mucosa con inflamación uniforme que comienza en el límite anorrectal y se extiende en sentido proximal, con una transición abrupta o gradual de la zona afectada a la mucosa normal.

La lesión histopatológica característica de la CUCI es la presencia de abscesos en las criptas, criptitis, alteración en la arquitectura de las criptas con un infiltrado inflamatorio de neutrófilos, células plasmáticas y eosinófilos en la lámina propia.

El diagnóstico definitivo se realiza con base en el cuadro clínico con un estudio de colonoscopia e histología de la mucosa colónica compatibles <sup>3</sup>.

### **Polimorfismos de Interleucinas en CUCI**

Una respuesta inmune aberrante lleva a la producción de citocinas que producen daño a la mucosa intestinal. La expresión de citocinas proinflamatorias está aumentada en las biopsias de pacientes con CUCI y el efecto de estas citocinas ha sido relacionada con daño tisular <sup>27</sup>.

Por otro lado se sabe que los polimorfismos genéticos de algunas interleucinas son capaces de alterar los niveles de producción de citocinas. Ya se han estudiado otros polimorfismos (SNPs) genéticos de interleucinas en la CUCI, tal es el caso de la IL15, una citocina que se encuentra relacionada con la activación de células inflamatorias, angiogénesis y la producción de otras citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , INF $\gamma$  e IL10. Recientemente se describió que el polimorfismo rs2254514 de la IL 15 se asocia significativamente con la disminución del riesgo de CUCI (RM de 0.62 P = 0.014) y el SNP rs2254514 genotipo CC se asoció a edad más temprana al diagnóstico (P= 0.03; RM 3.67) <sup>28</sup>. El SNP de la interleucina 1 $\beta$  (rs16944) se asoció a dependencia a esteroides (P = 0.008, RM=4.09) <sup>29</sup>. Otra interleucina estudiada

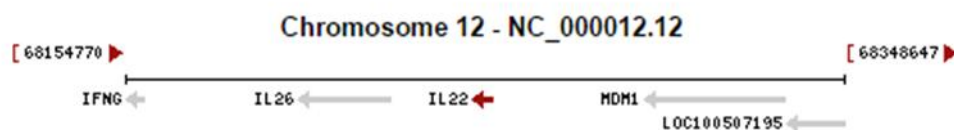
en población mexicana es la IL-20, la cual pertenece a la familia de la IL10, encontrado un descenso en la frecuencia de los siguientes genotipos GG (rs2981573) (RM=0.55 95% IC: 0.33-0.93) y GG (rs2232360) ( RM=0.55, 95% IC: 0.33-0.93) <sup>30</sup> .

### Interleucina 10 (IL10)

La interleucina 10 fue descrita en 1989 como una citocina pleiotrópica con habilidad para inhibir las funciones de las células Th1. IL10 es producida por leucocitos y ejerce una función de regulación inmune. Llevó casi 10 años darse cuenta que en realidad la interleucina 10 forma parte de un grupo grande de citocinas que comparten analogía estructural.

### Interleucina 22 (IL-22)

Se encuentra localizada en el brazo largo del cromosoma 12, situada rio arriba a aproximadamente 52kbp de la IL26, identificada por primera vez en el año 2000 <sup>31, 32</sup>. Tiene un peso molecular de 16.7kDa. **Figura 1**



**Figura 1.** Posición de la IL en el cromosoma 12.

La IL-22 es un miembro de la familia de la IL-10 que incluye además a la IL-19, IL-20, IL-24 y a la IL-26.

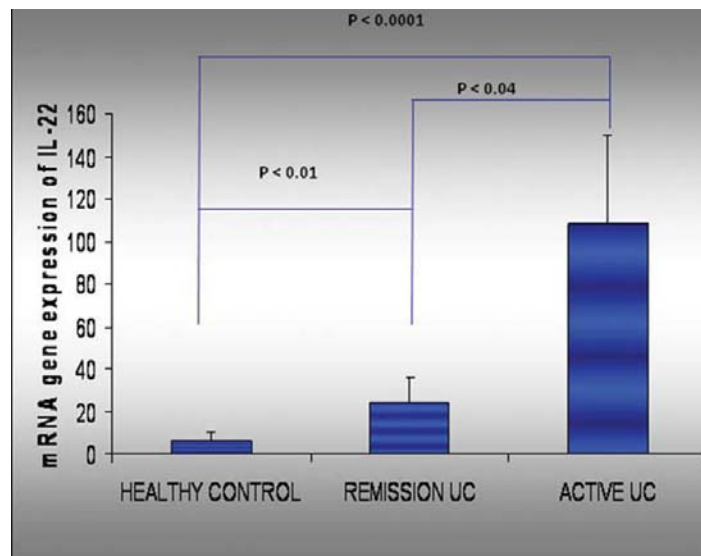
Es reconocida por un receptor heterodimérico que consiste en IL-22R1 e IL-10R2; la expresión de IL-22R1 se limita principalmente a las células epiteliales, proporcionando así la especificidad de señalización a los tejidos. Las principales células diana de la IL-22 incluyen queratinocitos, hepatocitos y células epiteliales de colon <sup>27</sup>.

La interleucina 22 es una citocina asociada a células Th17 bi-funcional con efectos protectores y pro-inflamatorios sobre los tejidos dependiendo del contexto inflamatorio. A través de la activación de cascadas de señalización de STAT3, la citocina induce vías proliferativas y anti-apoptóticas, así como moléculas anti-microbianas que ayudan a prevenir el daño tisular y ayuda en su reparación <sup>27</sup>.

Zenewic y cols demostraron un efecto protector en ratones con enfermedad inflamatoria intestinal <sup>33</sup>. Un modelo útil para estudiar la enfermedad inflamatoria intestinal es el modelo de colitis inducido por sulfato de sodio dextrán (DSS). Después de la finalización del tratamiento DSS, la colitis aguda se recupera espontáneamente, con la regeneración células epiteliales colónicas, Sugimoto y cols observaron que durante la regeneración de las células, la IL22 se

normalizaba, y al administrar anticuerpos contra IL22 se retrasaba significativamente esta recuperación <sup>34</sup>.

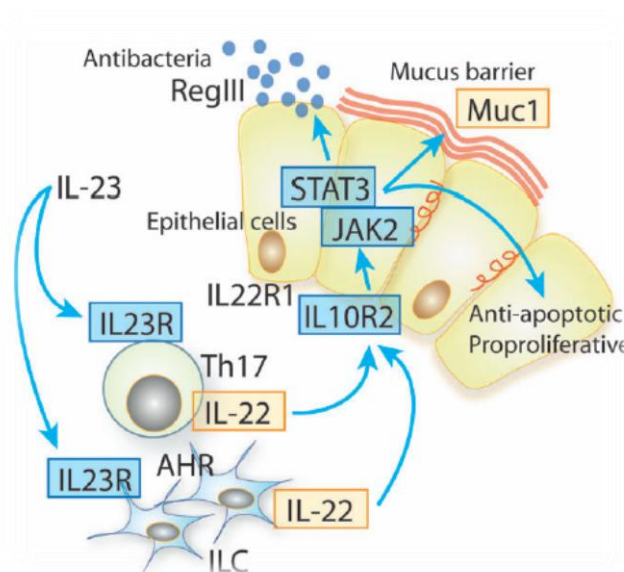
Yamamoto-Furusho y cols encontraron incrementada la expresión del gen de IL-22 en biopsias rectales de pacientes con CUCI (**Figura 2**) <sup>34, 35</sup>.



**Figura 2.** Expresión génica de IL-22 en la mucosa rectal de pacientes con CUCI (activo / remisión) y controles sanos

Se ha demostrado que la IL22 promueve la regeneración epitelial con células caliciformes en condiciones de inflamación intestinal, pero no tiene un papel claro en el epitelio colónico normal de personas sanas <sup>36</sup>.

Otra característica importante de la IL22 es su estrecha relación con genes de susceptibilidad de EII, tales son los casos de los genes IL23R, IL10R2, y el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) (**Figura 3**)<sup>37</sup>.



**Figura 3.** Relación de la IL22 con genes de susceptibilidad en la EII

Otra enfermedad con un contexto inflamatorio es la Psoriasis, la cual ocurre una respuesta inmune anormal en personas genéticamente susceptibles, la inflamación es dependiente de la activación exagerada de las células Th 1 y Th17, en este escenario la IL22 tiene un papel importante en la promoción de inflamación y en la reparación de tejidos en las superficies de barrera. La IL22 conduce a la activación de STAT3 en los queratinocitos, lo cual ha sido asociado como un punto clave en el desarrollo de lesiones psoriáticas.

Recientemente se han visto asociados algunos SNPs de la IL22 con el desarrollo de Psoriasis vulgaris (rs2227478; P = 0.0015; RM = 1.51, rs2046068; P = 0.020; RM = 1.42).

Con los antecedentes mencionados se hace más claro el papel potencialmente importante que tiene la IL 22 en pacientes con CUCI <sup>37</sup>.

Se seleccionaron los SNPs de IL-22 con ayuda de la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information) SNPs y la literatura publicada.

Varios polimorfismos de nucleótido único (SNP) de la IL22 han sido previamente identificados como SNPs de riesgo en otras enfermedades (rs2227485, rs2227491, rs1179251 y 2272478).

A continuación se muestran algunos los SNPs que han demostrado asociación con otras enfermedades.

El SNP rs2272478 se asoció a presencia de psoriasis vulgaris: RM de 1.51 <sup>38</sup>.

El SNP rs2227485 se asoció a infección por H pylori y riesgo de linfoma MALT RM 1.87 (1.23–2.84) <sup>39</sup>.



El SNP rs1179251 se asoció a falta de respuesta al tratamiento inicial en el VHC (RM= 2.28 95 % IC = 1.06–4.92 ) y un mayor riesgo de cáncer de colon (RM=1.52 95% IC 1.12-2.16)<sup>40 41 28</sup>.

Se desconoce si estos SNPs se encuentran asociados con la CUCI y si tienen alguna relación con las características clínicas de la enfermedad. Por tal motivo realizamos una búsqueda en la base de datos del NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) de las frecuencias de los SNPs que se acaban de comentar.

Se presentan a continuación las frecuencias y ubicación de los alelos de riesgo de los SNPs que estudiaremos, de acuerdo a los de datos del Hap Map Mex:

- rs2227485 (región promotora -485T)
  - Frecuencia para el alelo T de 0.44
- rs2272478 (región intrónica NM\_023071.3)
  - Frecuencia para el alelo G de 0.20
- rs2227491 (región intrónica NM\_020525.4)
  - Frecuencia para el alelo G de 0.47

## **Planteamiento del Problema**

La CUCI es una enfermedad heterogénea y compleja, donde factores genéticos, ambientales e inmunológicos juegan un papel importante para su desarrollo; sin embargo, a pesar del aumento en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares de la inflamación intestinal, la etiología continúa siendo desconocida.

La vía inflamatoria Th17 está involucrada en la patogénesis de la EII y se centra en el linaje de células Th17, las cuales producen varias citocinas tales como IL-17 e IL-22. Las células Th17 pueden causar graves enfermedades autoinmunes, sin embargo, tienen una función muy importante en la inmunidad antimicrobiana en las barreras epiteliales. La IL-22 puede funcionar como factor pro-inflamatorio o antiinflamatorio, dependiendo del blanco tisular. La IL-22 estimula a las células epiteliales para producir proteínas antimicrobianas. La expresión de la IL-22 en el intestino grueso de los ratones y humanos se presenta solo bajo condiciones de inflamación, distinguiéndola de otras citocinas.

Se han estudiado polimorfismos (SNPs) de la IL22 que han demostrado ser factores de riesgo en otras enfermedades que comparten vías en común con la CUCI. Se desconoce si existe una relación entre los SNP rs2227485, rs2227491 y 2272478 de la IL-22 con la presencia de CUCI.

## **Justificación**

La CUCI es la entidad más frecuente de EII en México, el promedio anual es de 76 casos nuevos de acuerdo a un centro de referencia. Entre 18 y 25% de los pacientes con CUCI presentarán un episodio de enfermedad aguda grave y requerirán hospitalización, de estos 20 a 40% serán sometidos a colectomía generando disminución en la calidad de vida y aumento en la morbilidad-mortalidad así como en los gastos al sistema de salud.

La CUCI es una enfermedad cuya etiología no se conoce pero se sabe que se encuentran involucradas una respuesta inmune anormal, en una persona genéticamente susceptible y precipitada por factores ambientales.

El estudio de los polimorfismos de la IL-22 es de gran interés, debido a que su expresión en el intestino grueso es única y es parte de la vía inflamatoria involucrada en la patogénesis de la CUCI, distinguiéndola de otras citocinas. No existen estudios acerca de los polimorfismos de IL-22 en CUCI, de encontrar relación entre los polimorfismos a estudiar y la presencia de CUCI será posible dirigir el tratamiento a nuevos blancos terapéuticos y por otro dar un pronóstico y seguimiento específico a los pacientes con esta enfermedad.

## **Objetivo General**

Determinar si los polimorfismos genéticos rs2227485, rs2227491 y 2272478 de la IL-22 están asociados con el desarrollo de CUCI en pacientes mestizos mexicanos.

## **Objetivos específicos**

Determinar la frecuencia de los polimorfismos genéticos rs2227485, rs2227491, y 2272478 de la IL-22 en pacientes con CUCI.

Determinar la frecuencia de los polimorfismos genéticos rs2227485, rs2227491, y 2272478 de la IL-22 en una población sana mestizo mexicana.

## **Objetivos secundarios:**

Evaluar si los polimorfismos genéticos r rs2227485, rs2227491, y 2272478 del gen de la IL-22 están asociados con las características de la enfermedad como: extensión, manifestaciones extra intestinales, respuesta a tratamiento médico y necesidad a tratamiento quirúrgico.

## **Pregunta de investigación**

¿Existe asociación entre los polimorfismos de IL22 rs2227485, rs2227491, y 2272478 y la presencia de la CUCI?

## **Hipótesis**

Los polimorfismos genéticos, rs2227485 y rs2227491, 2272478 de la IL-22 están asociados a CUCI.

## **Metodología**

### **Diseño del estudio**

Casos y controles.

### **Tamaño de la muestra**

El tamaño de la muestra se calculó, tomando en cuenta el valor de  $\alpha$  de 0.05, un poder de 80% y una diferencia entre ambos grupos de 10%.

Fórmulas:

De acuerdo a la base datos de HapMap de México-Americanos, el alelo con menor prevalencia es el G para el rs117951 el cual es de 0.20, por lo que se utilizó esta prevalencia para realizar el cálculo de número de pacientes.

Se estima que la frecuencia de los polimorfismos de la IL-22 en el grupo de pacientes con CUCI será del 20% más que en el grupo control.

Se tomaron las frecuencias en los dos grupos, con un poder del 80% y un valor de alfa de 0.05<sup>30</sup>

$$n = \frac{[ Z_{1-\alpha/2} \sqrt{2 p_2 (1-p_2)} + Z_{1-\beta} \sqrt{p_1 (1-p_1) + p_2 (1-p_2)} ]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

**RM = 2.0**  
**p2 = .20**  
**Z 1- $\alpha$ /2 = 1.96**  
**Z 1- $\beta$  = .84**

$$P_1 = \frac{(RM) P_2}{(RM)P_2 + (1-P_2)}$$

$$P_1 = \frac{(2) 0.20}{(2)0.20 + (1-0.20)} = 0.33$$

$$n = \frac{[ 1.96 \sqrt{2(0.20)(1-0.20)} + .84 \sqrt{0.33 (1-0.33) + 0.20 (1-0.20)} ]^2}{(0.20-0.33)^2}$$

n = 156

Después de realizar los procedimientos aritméticos correspondientes, se consideró un mínimo de 156 sujetos con CUCI y 468 controles para demostrar o refutar la asociación.

### **Análisis estadístico**

Se utilizó estadística descriptiva para las variables demográficas. En cada grupo de estudio se evaluó el equilibrio de Hardy- Weinberg mediante la prueba de Chi cuadrada.

El análisis de asociación de la frecuencia de cada alelo se realizó mediante tablas de contingencia de 2x2 y se utilizó las pruebas de Chi-cuadrada de Pearson.

La fuerza de asociación se determinó por medio de una razón de momios  $>1$  la cual se consideró como positiva o de susceptibilidad y  $<1$  negativa o de protección. La significancia estadística se determinó con un valor de  $p < 0.05$ .

Para el análisis de las variables se utilizó el paquete estadístico EPI-INFO, versión 5.0.

### **Grupos de estudio**

**Casos:** Se estudiaron 199 pacientes consecutivos mestizos mexicanos con diagnóstico de CUCI confirmado por histopatología quienes pertenecen a la Clínica de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del Departamento de

Gastroenterología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Se les aplicó un cuestionario para conocer el tiempo de evolución de la enfermedad, la extensión, curso clínico y manifestaciones extra intestinales, así como el tipo de medicamentos usados. Se anexa la hoja de recolección de datos (**Anexo 1**).

**Controles:** Se estudiaron 697 individuos adultos sanos, nacidos en México al igual que sus dos últimas generaciones; cuyo origen y residencia sea el Distrito Federal y área metropolitana, sin la presencia de antecedentes heredofamiliares de enfermedades autoinmunes tales como tiroiditis autoinmune, diabetes mellitus tipo 1, artritis reumatoide, lupus eritematoso generalizado, escleroderma, síndrome de Sjögren y de enfermedad inflamatoria intestinal (CUCI y Enfermedad de Crohn), según criterios clínicos. Todos nuestros controles fueron captados en las instalaciones del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

### **Criterios de inclusión para pacientes con CUCI**

1. Pacientes adultos mayores de 18 años.
2. Diagnóstico de CUCI confirmado por histología caracterizado por infiltrado inflamatorio por neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas, macrófagos,



eosinófilos y mastocitos. Ulceración y aplanamiento de las células epiteliales, congestión vascular de la submucosa, así como edema de la lámina propia con dilatación y congestión de los capilares.

3. Que sean individuos nacidos en México y por lo menos con 2 generaciones previas nacidas también en México.

### **Criterios de exclusión para pacientes con CUCI**

1. Otro tipo de enfermedades inflamatorias intestinales tales como: Enfermedad de Crohn, Colitis Indeterminada, Colitis Infeciosa, Colitis microscópica.
2. Asociación con otras enfermedades autoinmunes tales como hepatitis autoinmune, anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica idiopática, DM tipo 1, tiroiditis autoinmune, miastenia gravis, psoriasis, lupus eritematoso generalizado, artritis reumatoide.
3. Que no deseen participar en el estudio.

### **Criterios de inclusión para controles sanos**

1. Pacientes adultos mayores de 18 años
2. Que sean individuos sanos nacidos en México y por lo menos con 2 generaciones previas nacidas también en México.

3. Sin la presencia de ninguna enfermedad ni tampoco ningún antecedente heredo familiar de enfermedad autoinmune.

**Criterios de exclusión para controles sanos**

1. Que al interrogatorio dirigido presente antecedentes de enfermedades gastrointestinales sugerentes de EII y o antecedentes familiares de EII o de tipo inmunológico.

## Procedimiento

- Una vez confirmados los hallazgos y características clínicas de la enfermedad, el paciente firmó la hoja de informe y se obtuvo el consentimiento informado para participar en el estudio (**Anexos 3 y 4**), según requerimientos del Comité de Ética e Investigación de Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y de acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki y con La ley General de Salud, Título Segundo. De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos Capítulo I, Disposiciones Comunes. Artículo 13 y 14.
- Los casos y controles fueron interrogados respecto a antecedentes heredo-familiares y personales de enfermedades autoinmunes según criterios clínicos establecidos para cada uno de ellos.
- Se tomó una muestra sanguínea venosa periférica de aproximadamente 3 mL de sangre, colocándose en un tubo con anticoagulante (EDTA al 2%), de la cual se extrajo y cuantificó el ADN para la determinación de los SNP correspondientes.

## **Técnicas**

### **Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó por un método no enzimático a partir de células mononucleares mediante la técnica descrita por Lahiri y Nurnberger <sup>28, 42</sup>

**(Anexo 2)**

Se realizó la verificación de DNA genómico en un gel de agarosa al 1% (1 gr de agarosa por 100 ml de TBE al 0.5).

### **Cuantificación de DNA**

La cuantificación del ADN se realizó con el equipo automatizado nanoDrop (ND-1000 spectrophotometer) a una longitud de onda de 280 nm.

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real para discriminación alélica**

A partir del ADN genómico, se estudiaron los siguientes sitios polimórficos, rs2227485, rs2227491, y 2272478 de la IL-22 utilizando sondas Taqman.

La discriminación alélica se efectuó en el equipo ABI PRISM 7900 HT Fast Real time PCR System

## Resultados

Se estudiaron 199 pacientes con CUCI (casos) y 697 individuos sanos (controles), 54% y 51% eran mujeres respectivamente, la edad promedio fue de  $31.5 \pm$  años para el grupo de pacientes con CUCI y de  $35 \pm 14$  años para los controles. No se observó diferencia estadísticamente significativa en el sexo y la edad.

Respecto a las características de los pacientes con CUCI, la duración promedio en años fue de 12.34 años, la extensión de la enfermedad fue de 67.8% de pancolitis y en 32.2% se observaron manifestaciones extra intestinales, el curso clínico de la enfermedad fue de activo y luego inactivo en 42% de los pacientes, 30% intermitente y 28% persistente, la respuesta favorable al tratamiento fue de 67.8%, dependiente de esteroides en el 20.6%, resistente a esteroides en el 7.5% y resistente a inmunomoduladores en 4%, por último al 15.1% se les realizó colectomía.

Las frecuencias de los alelos para el SNP rs2272478 fue de 0.89 para el alelo A en ambos grupos, en el caso del SNP rs2227485, la frecuencia para el alelo C fue de .50 y .46 para los casos y los controles respectivamente y en el caso del SNP rs2227491 la frecuencia del alelo A fue de .48 y .45 para casos y controles respectivamente. En ninguno de los casos se observó diferencia significativa, los resultados se muestran en las tablas 1 y 2.

**Tabla 1:** Características demográficas de los pacientes con CUCI y Controles

	Casos <i>n</i> = 199	Controles <i>n</i> = 697	<i>p</i>
Sexo, <i>n</i> (%)	Mujeres 108 (54)	Mujeres 348 (51)	NS
Edad en años, <i>DE</i>	31.5 ± 14	35 ± 14	NS
Duración de la enfermedad (años)	12.34		
Extensión de la enfermedad (%)			
Pancolitis	67.8		
Distal	32.2		
Extraintestinal manifestations (%)			
Present	32.6		
No	67.3		
Curso clínico de la enfermedad (%)			
Activo luego inactivo	42		
Actividad intermitente	30		
Actividad persistente	28		
Respuesta al tratamiento (%)			
Favorable	67.8		
Dependiente de esteroides	20.6		
Resistente a esteroides	7.5		
Resistente a inmunomoduladores	4		
Colectomía (%)			
Si	15.1		
No	84.9		

**NS = No significativo**

**Tabla 2.** Frecuencias de los SNPs de los pacientes con CUCI y Controles

SNP			CUCI <i>n</i> (%)	Controles <i>n</i> (%)	Valor de <i>P</i>
<b>rs2272478</b>	Alelos	A	355 (0.89)	1234 (0.89)	<i>p</i> = 0.81
		G	43 (0.11)	156 (0.11)	
	Genotipo	AA	156 (0.78)	546 (0.79)	<i>p</i> = 0.95
		AG	43 (0.22)	142 (0.20)	<i>p</i> = 0.95
GG		0(0.0)	7 (0.01)	<i>p</i> = 0.69	
<b>rs2227485</b>	Alelos	C	199 (0.5)	639 (0.46)	<i>p</i> = 0.15
		T	199 (0.5)	751 (0.54)	
	Genotipo	CC	45 (0.23)	135 (0.19)	<i>p</i> = 0.30
		CT	109 (0.55)	369 (0.53)	<i>p</i> = 0.62
TT		45 (0.22)	195 (0.28)	<i>p</i> = 0.13	
<b>rs2227491</b>	Alelos	A	192 (0.48)	619 (0.45)	<i>p</i> = 0.19
		G	206 (0.52)	771 (0.55)	
	Genotipo	AA	41(0.21)	126 (0.18)	<i>p</i> = 0.43
		AG	110 (0.55)	367 (0.53)	<i>p</i> = 0.53
GG		48 (0.24)	202 (0.19)	<i>p</i> = 0.17	

## Discusión

En el presente trabajo no se encontró asociación entre los polimorfismos genéticos de la IL-22 (rs2227485, rs2227491 y 2272478) en pacientes mestizo mexicanos con CUCI.

Los polimorfismos genéticos de otras citocinas en la población mestiza Mexicana se ha encontrado que son protectores para el desarrollo de la enfermedad y otros se han asociado a mayor riesgo. El polimorfismo rs2254514 de la IL 15 se asoció significativamente con la disminución del riesgo de CUCI (RM de 0.62 P = 0.014) y el SNP rs2254514 genotipo CC se asoció a edad más temprana al diagnóstico (P= 0.03; RM 3.67) <sup>28</sup>. El SNP de la interleucina 1 $\beta$  (rs16944) se asoció a la dependencia a esteroides (P=0.008, RM=4.09) <sup>29</sup>. Los polimorfismos genéticos de la IL20 también han sido evaluados en la población mestiza mexicana, encontrándose disminución en la frecuencia de los siguientes genotipos: GG (rs2981573) (RM=0.55 95% CI: 0.33-0.93) y GG (rs2232360) ( RM=0.55, 95% CI: 0.33-0.93) lo cual parece conferir un papel protector en contra del desarrollo de la CUCI <sup>30</sup>.

Las citocinas son una parte crucial de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa, ya que su expresión puede alterarse en gran parte de las enfermedades inmunitarias, inflamatorias e infecciosas. En la CUCI se ha demostrado una respuesta inmune aberrante en personas genéticamente



susceptibles. Anteriormente se han estudiado otras citocinas que han demostrado tener un papel importante en la patogénesis de la CUCI.

La IL22 es una citocina bifuncional con efectos pro y antiinflamatorios dependiendo del blanco terapéutico, con un papel importante en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal. Sugimoto K y cols describieron que la presencia de IL-22 en un modelo animal con colitis tenía un papel antiinflamatorio, al administrar una proteína anti IL22 demostraron que se retrasaba la recuperación del epitelio intestinal <sup>34</sup>. Yamamoto-Furusho JK y cols demostraron que la expresión del gen de la IL22 se encontró incrementada en las biopsias de pacientes con CUCI activo en comparación con CUCI en remisión y controles sanos <sup>35</sup>.

Los polimorfismos genéticos de la IL22 en el presente trabajo no se encontraron asociados a ninguna de las características de la CUCI, sin embargo, aún deberán de estudiarse otros polimorfismos genéticos de la IL22 especialmente aquellos que se encuentren en regiones codificantes, y que se han asociado con otras enfermedades con una etiología inflamatoria. Saeki H y cols describieron en la Psoriasis vulgaris, una enfermedad inflamatoria crónica de la piel en donde los linfocitos T y las citocinas tienen un papel central en la patogénesis encontrando asociación significativa con el polimorfismo genético (rs2046068) de la IL22 y la presencia Psoriasis vulgaris, (RM = 1.42 P = 0.020)<sup>38</sup>.

Hennig BJ y cols encontraron que el polimorfismo genético rs1179251 de la IL22 se asoció a la falta de respuesta al tratamiento contra la hepatitis C y el rs1012356 se asoció a infección persistente <sup>41</sup>. Este último polimorfismo fue estudiado por Cheryl L y cols, quienes encontraron mayor frecuencia en pacientes con cáncer de colon (RM 1.46 95% IC 1.04-2.05) <sup>43</sup>. En pacientes con linfoma tipo MALT e infección por *Helicobacter pylori*. Liao F y cols describieron cinco polimorfismos genéticos de la IL22 (rs1179246, rs2227485, rs4913428, rs1026788 y el rs7314777) los cuales se encontraron asociados a susceptibilidad genética de la enfermedad <sup>39</sup>.

### **Conclusión**

Estos hallazgos demuestran que los polimorfismos genéticos de la IL22 estudiados en este trabajo no están involucrados en la susceptibilidad genética al desarrollo de la CUCI en población mestiza mexicana. Es importante recalcar que nuevos polimorfismos, especialmente aquellos que se encuentren en la región promotora del gen de la IL22 deberán estudiarse debido a su potencial papel en la fisiopatología de la CUCI.

## Referencias Bibliográficas

1. Wilks S. Morbid appearances in the intestines of Miss Bankes. . Med Times Gazette 1859;2:264-5.
2. Hurst A. Ulcerative colitis. Guy Hosp Rep 1909;71:26.
3. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. N Engl J Med 2011;365(18):1713-25.
4. Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. Gastroenterology 2004;126(6):1504-17.
5. Satsangi J, Jewell DP, Rosenberg WM, Bell JI. Genetics of inflammatory bowel disease. Gut 1994;35(5):696-700.
6. Yamamoto-Furusho JK. Clinical epidemiology of ulcerative colitis in Mexico: a single hospital-based study in a 20-year period (1987-2006). J Clin Gastroenterol 2009;43(3):221-4.
7. Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. Scand J Gastroenterol 2000;35(10):1075-81.
8. Yamamoto-Furusho JK. Genetic factors associated with the development of inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol 2007;13(42):5594-7.

9. Yamamoto-Furusho JK. [Immunogenetics of chronic ulcerative colitis]. *Rev Invest Clin* 2003;55(6):705-10.
10. Cho J. Update on inflammatory bowel disease genetics. *Curr Gastroenterol Rep* 2000;2(6):434-9.
11. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* 2011;43(3):246-52.
12. Tannock GW. The bowel microbiota and inflammatory bowel diseases. *Int J Inflam* 2010;2010:954051.
13. Morahan G, Morel L. Genetics of autoimmune diseases in humans and in animal models. *Curr Opin Immunol* 2002;14(6):803-11.
14. Boyko EJ, Perera DR, Koepsell TD, Keane EM, Inui TS. Effects of cigarette smoking on the clinical course of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 1988;23(9):1147-52.
15. Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Jarnerot G. Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut* 1988;29(3):352-7.
16. Rutgeerts P, D'Haens G, Hiele M, Geboes K, Vantrappen G. Appendectomy protects against ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994;106(5):1251-3.
17. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbom A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2001;344(11):808-14.

18. Shanahan F. Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. *Gastroenterology* 2001;120(3):622-35.
19. Kett K, Rognum TO, Brandtzaeg P. Mucosal subclass distribution of immunoglobulin G-producing cells is different in ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon. *Gastroenterology* 1987;93(5):919-24.
20. Das KM, Dasgupta A, Mandal A, Geng X. Autoimmunity to cytoskeletal protein tropomyosin. A clue to the pathogenetic mechanism for ulcerative colitis. *J Immunol* 1993;150(6):2487-93.
21. Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14(3):390-400.
22. Senju M, Wu KC, Mahida YR, Jewell DP. Two-color immunofluorescence and flow cytometric analysis of lamina propria lymphocyte subsets in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1991;36(10):1453-8.
23. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007;369(9573):1627-40.
24. Winther KV, Jess T, Langholz E, Munkholm P, Binder V. Long-term risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study from Copenhagen County. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2(12):1088-95.
25. Lukas M. Inflammatory bowel disease as a risk factor for colorectal cancer. *Dig Dis* 2010;28(4-5):619-24.

26. Linskens RK, Mallant-Hent RC, Groothuisink ZM, et al. Evaluation of serological markers to differentiate between ulcerative colitis and Crohn's disease: pANCA, ASCA and agglutinating antibodies to anaerobic coccoid rods. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14(9):1013-8.
27. Bamias G, Corridoni D, Pizarro TT, Cominelli F. New insights into the dichotomous role of innate cytokines in gut homeostasis and inflammation. *Cytokine* 2012;59(3):451-9.
28. Yamamoto-Furusho JK, De-Leon-Rendon JL, Alvarez-Leon E, Valdivia-Eziquio M, Obil-Chavarria C, Vargas-Alarcon G. Association of the interleukin 15 (IL-15) gene polymorphisms with the risk of developing ulcerative colitis in Mexican individuals. *Mol Biol Rep* 2014;41(4):2171-6.
29. Yamamoto-Furusho JK, Santiago-Hernandez JJ, Perez-Hernandez N, Ramirez-Fuentes S, Fragoso JM, Vargas-Alarcon G. Interleukin 1 beta (IL-1B) and IL-1 antagonist receptor (IL-1RN) gene polymorphisms are associated with the genetic susceptibility and steroid dependence in patients with ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol* 2011;45(6):531-5.
30. Yamamoto-Furusho JK, De-Leon-Rendon JL, de la Torre MG, Alvarez-Leon E, Vargas-Alarcon G. Genetic polymorphisms of interleukin 20 (IL-20) in patients with ulcerative colitis. *Immunol Lett* 2013;149(1-2):50-3.

31. Xie MH, Aggarwal S, Ho WH, et al. Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J Biol Chem* 2000;275(40):31335-9.
32. Wolk K, Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R. Biology of interleukin-22. *Semin Immunopathol* 2010;32(1):17-31.
33. Sen-Yo M, Kaino S, Suenaga S, et al. Utility of the Anterior Oblique-Viewing Endoscope and the Double-Balloon Enteroscope for Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography in Patients with Billroth II Gastrectomy. *Gastroenterol Res Pract* 2012;2012:389269.
34. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2008;118(2):534-44.
35. Yamamoto-Furusho JK, Miranda-Perez E, Fonseca-Camarillo G, Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Barreto-Zuniga R. Colonic epithelial upregulation of interleukin 22 (IL-22) in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16(11):1823.
36. Seiderer J, Brand S. IL-22: a two-headed cytokine in IBD? *Inflamm Bowel Dis* 2009;15(3):473-4.
37. Mizoguchi A. Healing of intestinal inflammation by IL-22. *Inflamm Bowel Dis* 2012;18(9):1777-84.

38. Saeki H, Hirota T, Nakagawa H, et al. Genetic polymorphisms in the IL22 gene are associated with psoriasis vulgaris in a Japanese population. *J Dermatol Sci* 2013;71(2):148-50.
39. Liao F, Hsu YC, Kuo SH, et al. Genetic polymorphisms and tissue expression of interleukin-22 associated with risk and therapeutic response of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Blood Cancer J* 2014;4:eXX.
40. Weger W, Hofer A, Wolf P, et al. Common polymorphisms in the interleukin-22 gene are not associated with chronic plaque psoriasis. *Exp Dermatol* 2009;18(9):796-8.
41. Hennig BJ, Frodsham AJ, Hellier S, et al. Influence of IL-10RA and IL-22 polymorphisms on outcome of hepatitis C virus infection. *Liver Int* 2007;27(8):1134-43.
42. Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991;19(19):5444.
43. Thompson CL, Plummer SJ, Tucker TC, Casey G, Li L. Interleukin-22 genetic polymorphisms and risk of colon cancer. *Cancer Causes Control* 2010;21(8):1165-70.



## Anexo 1

### INCMNSZ-DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGIA HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

Registro	Género	Edad	Lugar de nacimiento	Lugar de residencia	Peso	Talla	IMC

AHF	Tabaquismo	Autoinmunidad	Apendicetomía	Amigdalectomía	AINES
0. No	0. No	0. Ninguna	0. No	0. No	0. No
1. CUCI	1. Si	1. AR	1. Si	1. Si	1. Si
2. Crohn	2. Hx ( )	2. DM-1			
3. AR		3. LES			
4. DM-1		4. Sjögren			
5. LES		5. Vitiligo			
6. Sjögren		6. CEP			
7. Vitiligo		7. HAI			
8. CEP		8. CBP			
9. HAI		9. AR			
10. CBP		10. DM-1			
11. Otra		11. Otra			

Edad al dx	Dx Inicial	Extensión al dx	Extensión final	Curso clínico	Manif extraintestinales
	1. Crohn	1. Proctitis	1. Proctitis	1 Activo solo al inicio	1. Artritis
	2. CUCI	2. Proctosigmoiditis	2. Proctosigmoiditis	2. Intermitente	2. Artralgias
	3. Indeterminado	2. Colitis izquierda	3. Colitis izquierda	3. Continuo	3. Espondilitis
		3. Pancolitis	4. Pancolitis		4. Sacroileitis
					5. CEP
					6. Pioderma gangrenoso
					7. Eritema nodoso
					8. Uveítis

Tx Previo	Respuesta al tx	Tx quirúrgico	Motivo de tx qx	Pouchitis
1. 5 ASA	0. No	0. No	1. Perforación	0. No
2. Esteroide	1. Si	1. Si	2. Megacolon tóxico	1. Si
3. Tiopurina			3. Sangrado masivo	
4. Biológico			4. Falta de respuesta al tx	
			5. Displasia	
			6. Cáncer	
			7. Otro	

## Anexo 2

Técnica de extracción de ADN  
Debomy K. Lahir y John I Nurnberger.

### Preparación de Soluciones

Solución TKM1

- 10 mM Tris-HCL pH 7.6 10 mM KCL, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 2 mM EDTA.

Solución TKM2

- 10 mM Tris-HCL pH 7.6 10 mM KCL, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 M NaCl y 2 mM EDTA.

1. Aplicar a las muestras solución TKM1 pH= 7.6 + TRITON (150 l)  
1 tubo de 3 ml de sangre aforar a 15 ml  
2 tubos de 3 ml de sangre aforar a 20 ml
2. Agitar por 10 minutos
3. Centrifugar a 3 000 rpm por 10 minutos
4. Lavados con solución TKM1 pH = 7.6, aforar el tubo a 15 mL. Centrifugar a 3 000 rpm hasta que quede un " botón blanco"
5. Pasar botón a tubo eppendorf, aplicar 800 l de solución TKM2 pH= 7.8 (primero el botón y posteriormente TKM2).
6. Agregar 45 l de SDS al 10%. Mezclar con vórtex.
7. Digestión: Dejar reposar por 10 minutos a 55°C. Debe quedar transparente ( que no se vea ninguna partícula suspendida) si no es así se deja incubar otros 5 minutos
8. Agregar 300 l de NaCL 6M: Mezclar con vórtex
9. Centrifugar a 12 000 rpm durante 10 minutos a 4°C
10. Dividir sobrenadante en 2 tubos eppendorf de aproximadamente 525 l cada uno.
11. Aplicar etanol absoluto (900 l aproximadamente) o hasta un poco antes de que se llene. Agitar por inversión. Observese las hebras de DNA suspendidas.
12. Centrifugar a 12 000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
13. Decantar el etanol absoluto (sobrenadante) sin desprender el botón.
14. Lavado: aplicar 700 l de etanol al 70% frío para eliminar el exceso de sales. Mezclar con vórtex.
15. Centrifugar a 14 000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
16. Decantar el sobrenadante sin desprender el botón y quitar el excedente sobre una gasa.
17. Colocar los tubos eppendorf en la Speed Vac durante 10 a 15 minutos.
18. Resuspender el DNA a 200-250 l de agua inyetable.
19. Dejar reposar 2-3 hrs a 65°C
20. Dejar en refrigeración.

### **ANEXO 3**

#### **CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO:**

#### **PACIENTES SANOS**

**(REF 1174)**

**Investigador principal:** Dr Jesús Kazuo Yamamoto Furusho

**Dirección del investigador:** 54870900 (2716)

**Teléfono de contacto del investigador (incluyendo uno para emergencias):**  
54870900 (2716)

**Investigadores participantes:** Dr David García Rangel

**Nombre del patrocinador del estudio:** No hay patrocinadores

#### **INTRODUCCIÓN:**

Por favor, tome todo el tiempo que sea necesario para leer este documento, pregunte al investigador sobre cualquier duda que tenga.

Este consentimiento informado cumple con los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud, la Declaración de Helsinki y a las Buenas Prácticas Clínicas emitidas por la Comisión Nacional de Bioética.

Para decidir si participa o no en este estudio, usted debe tener el conocimiento suficiente acerca de los riesgos y beneficios con el fin tomar una decisión informada. Este formato de consentimiento informado le dará información detallada acerca del estudio de investigación que podrá comentar con su médico tratante o con algún miembro del equipo de investigadores. Al final se le pedirá que forme parte del proyecto y de ser así, bajo ninguna presión o intimidación, se le invitará a firmar este consentimiento informado.

Procedimiento para dar su consentimiento: Usted tiene el derecho a decidir si quiere participar en esta investigación, y se puede solicitar todo el tiempo que requiera para considerar esta invitación. El investigador le explicará ampliamente los beneficios y riesgos del proyecto sin ningún tipo de presión y tendrá todo el tiempo que requiera para pensar solo o con quien usted decida consultarlo para decirle al investigador acerca de su decisión. Esta decisión no tendrá efecto alguno sobre su atención médica

en el Instituto. Al final de esta explicación, usted debe entender los puntos siguientes:

- I. La justificación y los objetivos de la investigación.
- II. Los procedimientos que se utilizarán y su propósito, incluyendo la identificación de que son procedimientos experimentales.
- III. Los riesgos o molestias previstos.
- IV. Los beneficios que se pueden observar.
- V. Los procedimientos alternativos que pudieran ser ventajosos para el sujeto.
- VI. Garantía para recibir respuestas a las preguntas y aclarar cualquier duda sobre los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento de la materia.
- VII. La libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello los prejuicios se cree que continuar con la atención y el tratamiento.
- VIII. La seguridad de que no va a identificar al sujeto y que se mantendrá la confidencialidad de la información relativa a su privacidad.
- IX. El compromiso de proporcionar información actualizada obtenida durante el estudio, aunque esto podría afectar a la disposición para continuar su participación.
- X. La disponibilidad de tratamiento médico y compensación a que legalmente tiene derecho, en el caso de que ocurran daños causados directamente por la investigación. Puede solicitar más tiempo o llevar a casa este formulario antes de dar una decisión final en los días futuros.

## **INVITACION A PARTICIPAR Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO**

Estimado Sr.(a)\_\_\_\_\_

El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición le invitan a participar en este estudio de investigación que tiene como objetivo: Determinar si los polimorfismos rs2227485 y rs2227491, 2272478 de la IL 22 están asociados a la enfermedad de Colitis Ulcerativa Crónica Idiopática (CUCI) en pacientes mestizos mexicanos.

La duración del estudio es: Un año

El número aproximado de participantes será. 200

Usted fue invitado al estudio debido a que tiene las siguientes características: Se encuentra sano y no tiene antecedentes de enfermedad inflamatoria intestinal o de otras enfermedades autoinmunes.

## **PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO**

Su participación en el estudio consiste en: permitir la toma de una muestra de sangre venosa de un brazo.

Los procedimientos del estudio incluyen la realización de:

- Se extraerá el DNA a partir de células mononucleares mediante la técnica de Salting Out.
- Se determinarán los polimorfismos genéticos de la IL-22 por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

## **RIESGOS E INCONVENIENTES**

El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, señala que la obtención de muestras biológicas representa un riesgo mínimo dentro de la investigación. Los riesgos de la toma de muestra sanguínea son: posibilidad de sangrado ligero o moretón en el sitio de la punción, mareo o sensación de desmayo y raramente puede producirse punción arterial. El personal que extraerá la muestra sanguínea está entrenado para ello, lo que minimizará los riesgos de complicaciones.

No existe riesgo de ningún tipo en la obtención de la muestra de sangre.

Los datos acerca de su identidad y su información médica no serán revelados en ningún momento como lo estipula la ley, por tanto, en la recolección de datos clínicos usted no enfrenta riesgos mayores a los relativos a la protección de la confidencialidad la cual será protegida mediante la codificación de las muestras y de su información.

## **BENEFICIOS POTENCIALES**

Este estudio no está diseñado para beneficiarle directamente. Sin embargo, la búsqueda de los polimorfismos de la IL-22 podría permitir desarrollar nuevos tratamientos para la enfermedad de CUCI y con esto hacer un tratamiento más personalizado de esta enfermedad. Además gracias a su participación altruista, su comunidad se puede beneficiar significativamente al encontrar nuevas formas de atender esta complicación médica.

## **CONSIDERACIONES ECONÓMICAS**

No se cobrará ninguna tarifa por participar en el estudio ni se le hará pago alguno.

## **COMPENSACION**

Si sufre lesiones como resultado de su participación en este estudio, nosotros le proporcionaremos el tratamiento inmediato y lo referiremos, en caso de ameritarlo, al especialista médico que requiera. No contamos con presupuesto para financiar compensaciones por lesiones. El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubiran no brinda ningún tipo adicional de compensación para cubrir el daño.

## **ALTERNATIVAS A SU PARTICIPACIÓN:**

Su participación es voluntaria. Usted puede elegir no participar en el estudio.

## **POSIBLES PRODUCTOS COMERCIALES DERIVABLES DEL ESTUDIO:**

Si un producto comercial es desarrollado como resultado del estudio, tal insumo será propiedad del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubiran (INCMNSZ) o quienes ellos designen. En tal caso, usted no recibirá un beneficio financiero.

## **ACCIONES A SEGUIR DESPUÉS DEL TÉRMINO DEL ESTUDIO:**

Usted puede solicitar los resultados de sus exámenes clínicos y de las conclusiones del estudio al Dr. Jesús Kazuo Yamamoto o al Dr. David García Rangel en el INCMNSZ (tel 54870900 (2716)). La investigación es un proceso largo y complejo. El obtener los resultados finales del proyecto puede tomar varios meses.

## **PARTICIPACIÓN Y RETIRO DEL ESTUDIO:**

Su participación es VOLUNTARIA. Si usted decide no participar, no se afectará su relación con el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubiran (INCMNSZ) o su derecho para recibir atención médica o cualquier servicio al que tenga derecho. Si decide participar, tiene la libertad para retirar su consentimiento e interrumpir su participación en cualquier momento sin perjudicar su atención en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubiran (INCMNSZ).

Los procedimientos que serán necesarios si usted termina su participación en el estudio son: Solo deberá notificarlo verbalmente al Dr Jesús Kazuo Yamamoto

## **CONFIDENCIALIDAD Y MANEJO DE SU INFORMACIÓN**

Su nombre no será usado en ninguno de los estudios. Las muestras biológicas obtenidas no contendrán ninguna información personal y se codificará con un número

de serie para evitar cualquier posibilidad de identificación. Por disposición legal las muestras biológicas, incluyendo la sangre, son catalogadas como residuos peligrosos biológico-infecciosos y por esta razón durante el curso de la investigación su muestra no podrá serle devuelta. Es posible que sus muestras biológicas así como su información médica y/o genética puedan ser usadas para otros proyectos de investigación análogos relacionados con la enfermedad en estudio. No podrán ser usados para estudios de investigación que no estén relacionados con condiciones distintas a las estudiadas en este proyecto. Sus muestras podrán ser almacenadas por los investigadores hasta por 5 años.

Los códigos que identifican su muestra estarán solo disponibles a los investigadores titulares, quienes están obligados por Ley a no divulgar su identidad. Estos códigos serán guardados en un archivero con llave. Solo los investigadores tendrán acceso. Existe la posibilidad de que su privacidad sea afectada como resultado de su participación en el estudio. Su confidencialidad será protegida como lo marca la ley. Será mantenida asignando códigos a su información. El código es un número de identificación que no incluye datos personales. Ninguna información sobre su persona será compartida con otros sin su autorización, excepto:

- Si es necesario para proteger sus derechos y bienestar (por ejemplo, si ha sufrido una lesión y requiere tratamiento de emergencia); o
- Es solicitado por la ley.

Monitores o auditores del estudio podrán tener acceso a la información de los participantes.

Si usted decide retirarse del estudio, podrá solicitar el retiro y destrucción de su material biológico y de su información. Todas las hojas de recolección de datos serán guardadas con las mismas medidas de confidencialidad, y solo los investigadores titulares tendrán acceso a los datos que tienen su nombre.

El Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición aprobó la realización de éste estudio. Dicho comité es quien revisa, aprueba y supervisa los estudios de investigación en humanos en el Instituto. En el futuro, si identificamos información que consideremos importante para su salud, consultaremos con el Comité de ética que supervisa este estudio para que decidamos la mejor forma de darle esta información a usted y a su médico. Además, le solicitamos que nos autorice re contactarlo, en caso de ser necesario, para solicitarle información que podría ser relevante para el desarrollo de este proyecto.

Los datos científicos obtenidos como parte de este estudio podrían ser utilizados en publicaciones o presentaciones médicas. Su nombre y otra información personal serán eliminados antes de usar los datos.

Si usted lo solicita su médico de cabecera será informado sobre su participación en el estudio

Su material genético no será usado con fines distintos a los mencionados en este documento. Si el investigador desea usarlo con fines distintos deberá notificarlo y solicitarle su firma en un documento similar al que usted está leyendo.

Los resultados de estudios genéticos podría ser causa de discriminación para las personas que tengan alguna anomalía que los predisponga para sufrir una enfermedad. Tomaremos las acciones necesarias para evitar que su información sea conocida por terceros que pudieran tomar acciones discriminatorias contra usted.

#### **IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES:**

En caso de que usted sufra un daño relacionado al estudio, por favor póngase en contacto con Dr Jesús Kazuo Yamamoto Furusho o con el Dr David García Rangel en el INCMNSZ (teléfono: 54870900 (2716).

Si usted tiene preguntas sobre el estudio, puede ponerse en contacto con Dr David García Rangel en el INCMNSZ (teléfono: 54870900 (2716).

Si usted tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en el estudio, puede hablar con el Presidente del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ (Dr. Carlos Aguilar Salinas. Teléfono: 54870900 ext. 6101).

#### **DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO**

He leído con cuidado este consentimiento informado, he hecho todas las preguntas que he tenido y todas han sido respondidas satisfactoriamente. Para poder participar en el estudio, estoy de acuerdo con todos los siguientes puntos:

Estoy de acuerdo en participar en el estudio descrito anteriormente. Los objetivos generales, particulares del reclutamiento y los posibles daños e inconvenientes me han sido explicados a mi entera satisfacción.



Estoy de acuerdo en donar de forma voluntaria mis muestras biológicas de sangre para ser utilizadas en éste estudio. Así mismo, mi información médica y biológica podrá ser utilizada con los mismos fines.

Estoy de acuerdo, en caso de ser necesario, que se me contacte en el futuro si el proyecto requiere coleccionar información adicional o si encuentran información relevante para mi salud.

Mi firma también indica que he recibido un duplicado de este consentimiento informado.

Por favor responda las siguientes preguntas

	<b>SÍ</b> <b>(marque</b> <b>por</b> <b>favor)</b>	<b>NO</b> <b>(marque</b> <b>por</b> <b>favor)</b>
a. ¿Ha leído y entendido la forma de consentimiento informado, en su lenguaje materno?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b. ¿Ha tenido la oportunidad de hacer preguntas y de discutir este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c. ¿Ha recibido usted respuestas satisfactorias a todas sus preguntas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d. ¿Ha recibido suficiente información acerca del estudio y ha tenido el tiempo suficiente para tomar la decisión?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e. ¿Entiende usted que su participación es voluntaria y que es libre de suspender su participación en este estudio en cualquier momento sin tener que justificar su decisión y sin que esto afecte su atención médica o sin la pérdida de los beneficios a los que de otra forma tenga derecho?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
f. ¿Autoriza se dé acceso a sus registros médicos para este estudio de investigación y para propósitos regulatorios a _____, sus representantes, los auditores, oficinas regulatorias del estudio, otras agencias gubernamentales de la salud en México y posiblemente otras agencias gubernamentales de la salud en otros países en donde se pueda considerar al fármaco en estudio para la aprobación de su comercialización?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
g. ¿Entiende los posibles riesgos, algunos de los cuales son aún desconocidos, de participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
h. ¿Entiende que puede no recibir algún beneficio directo de participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	<b>SÍ (marque por favor)</b>	<b>NO (marque por favor)</b>
i. ¿Ha discutido usted otras opciones de tratamiento con el médico participante en el estudio y entiende usted que otras opciones de tratamiento están a su disposición?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
j. ¿Entiende que no está renunciando a ninguno de sus derechos legales a los que es acreedor de otra forma como sujeto en un estudio de investigación?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
k. ¿Entiende que el médico participante en el estudio puede retirarlo del mismo sin su consentimiento, ya sea debido a que Usted no siguió los requerimientos del estudio o si el médico participante en el estudio considera que médicamente su retiro es en su mejor interés?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
l. ¿Entiende que el estudio puede ser suspendido por el patrocinador del estudio en cualquier momento?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m. ¿Entiende que usted recibirá un original firmado y fechado de esta Forma de Consentimiento, para sus registros personales?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Declaración del paciente:**

Yo, \_\_\_\_\_ declaro que es mi decisión participar en el estudio. Mi participación es voluntaria. He sido informado que puedo negarme a participar o terminar mi participación en cualquier momento del estudio sin que sufra penalidad alguna o pérdida de beneficios. Yo puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos o beneficios potenciales derivados de mi participación en el estudio. Puedo obtener los resultados de mis exámenes clínicos si los solicito. Si usted tiene preguntas sobre el estudio, puede ponerse en contacto el Dr Jesús Kazuo Yamamoto Furusho o el Dr David García Rangel, teléfono: 54870900 (2716). Si usted tiene preguntas sobre sus derechos como participante en el estudio, problemas, preocupaciones o preguntas, obtener información, y ofrecer información que puede hablar con el coordinador del Comité de Ética de Investigación de INCMNSZ (Dr. Arturo Galindo Fraga Tel: 54870900. ext 6101). He leído y entendido toda la información que me han dado sobre mi participación en el estudio. He tenido la oportunidad para discutirlo y hacer preguntas. Todas las preguntas han sido respondidas a mi satisfacción. He entendido que recibiré una copia firmada de este consentimiento informado.

\_\_\_\_\_  
Nombre del Participante                      Firma del Participante                      Fecha

\_\_\_\_\_  
Coloque su huella digital si no sabe escribir

\_\_\_\_\_  
Nombre del representante legal      Firma del representante legal                      Fecha  
(si aplica)

\_\_\_\_\_  
Nombre del Investigador                      Firma del Investigador                      Fecha  
que explicó el documento

\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo 1                      Firma del Testigo 1                      Fecha

Relación con el participante:

\_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo 2                      Firma del Testigo 2                      Fecha

Dirección: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Relación que guarda con el participante: \_\_\_\_\_

Lugar y  
Fecha: \_\_\_\_\_

## **ANEXO 4**

### **CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO:**

#### **PACIENTES CON CUCI**

**( REF 1174)**

**Investigador principal:** Dr Jesús Kazuo Yamamoto Furusho

**Dirección del investigador:** 54870900 (2716)

**Teléfono de contacto del investigador (incluyendo uno para emergencias):**  
54870900 (2716)

**Investigadores participantes:** Dr David García Rangel

**Nombre del patrocinador del estudio:** No hay patrocinadores

#### **INTRODUCCIÓN:**

Por favor, tome todo el tiempo que sea necesario para leer este documento, pregunte al investigador sobre cualquier duda que tenga.

Este consentimiento informado cumple con los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud, la Declaración de Helsinki y a las Buenas Prácticas Clínicas emitidas por la Comisión Nacional de Bioética.

Para decidir si participa o no en este estudio, usted debe tener el conocimiento suficiente acerca de los riesgos y beneficios con el fin tomar una decisión informada. Este formato de consentimiento informado le dará información detallada acerca del estudio de investigación que podrá comentar con su médico tratante o con algún miembro del equipo de investigadores. Al final se le pedirá que forme parte del proyecto y de ser así, bajo ninguna presión o intimidación, se le invitará a firmar este consentimiento informado.

Procedimiento para dar su consentimiento: Usted tiene el derecho a decidir si quiere participar en esta investigación, y se puede solicitar todo el tiempo que requiera para considerar esta invitación. El investigador le explicará ampliamente los beneficios y riesgos del proyecto sin ningún tipo de presión y tendrá todo el tiempo que requiera

para pensar solo o con usted decida consultarlo para decirle al investigador acerca de su decisión. Esta decisión no tendrá efecto alguno sobre su atención médica en el Instituto. Al final de esta explicación, usted debe entender los puntos siguientes:

- I. La justificación y los objetivos de la investigación.
- II. Los procedimientos que se utilizarán y su propósito, incluyendo la identificación de que son procedimientos experimentales.
- III. Los riesgos o molestias previstos.
- IV. Los beneficios que se pueden observar.
- V. Los procedimientos alternativos que pudieran ser ventajosos para el sujeto.
- VI. Garantía para recibir respuestas a las preguntas y aclarar cualquier duda sobre los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento de la materia.
- VII. La libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello los prejuicios se cree que continuar con la atención y el tratamiento.
- VIII. La seguridad de que no va a identificar al sujeto y que se mantendrá la confidencialidad de la información relativa a su privacidad.
- IX. El compromiso de proporcionar información actualizada obtenida durante el estudio, aunque esto podría afectar a la disposición para continuar su participación.
- X. La disponibilidad de tratamiento médico y compensación a que legalmente tiene derecho, en el caso de que ocurran daños causados directamente por la investigación. Puede solicitar más tiempo o llevar a casa este formulario antes de dar una decisión final en los días futuros.

## **INVITACION A PARTICIPAR Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO**

Estimado Sr.(a)\_\_\_\_\_

El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición le invitan a participar en este estudio de investigación que tiene como objetivo: Determinar si los polimorfismos rs2227485, rs2227491 y 2272478 de la IL 22 están asociados a la enfermedad de Colitis Ulcerativa Crónica Idiopática (CUCI) en pacientes mestizos mexicanos.

La duración del estudio es: Un año

El número aproximado de participantes será. 200

Usted fue invitado al estudio debido a que tiene las siguientes características: Padece de Colitis Ulcerosa Crónica Inespecífica (CUCI).

## **PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO**

Su participación en el estudio consiste en: permitir la toma de una muestra de sangre venosa de un brazo.

Los procedimientos del estudio incluyen la realización de:

- Se extraerá el DNA a partir de células mononucleares mediante la técnica de Salting Out.
- Se determinarán los polimorfismos genéticos de la IL-22 por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

## **RIESGOS E INCONVENIENTES**

El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, señala que la obtención de muestras biológicas representa un riesgo mínimo dentro de la investigación. Los riesgos de la toma de muestra sanguínea son: posibilidad de sangrado ligero o moretón en el sitio de la punción, mareo o sensación de desmayo y raramente puede producirse punción arterial. El personal que extraerá la muestra sanguínea está entrenado para ello, lo que minimizará los riesgos de complicaciones.

No existe riesgo de ningún tipo en la obtención de la muestra de sangre.

Los datos acerca de su identidad y su información médica no serán revelados en ningún momento como lo estipula la ley, por tanto, en la recolección de datos clínicos usted no enfrenta riesgos mayores a los relativos a la protección de la confidencialidad la cual será protegida mediante la codificación de las muestras y de su información.

## **BENEFICIOS POTENCIALES**

Este estudio no está diseñado para beneficiarle directamente. Sin embargo, la búsqueda de los polimorfismos de la IL-22 podría permitir desarrollar nuevos blancos terapéuticos y con esto hacer un tratamiento más personalizado de esta enfermedad. Además gracias a su participación altruista, su comunidad se puede beneficiar significativamente al encontrar nuevas formas de atender esta complicación médica.

## **CONSIDERACIONES ECONÓMICAS**

No se cobrará ninguna tarifa por participar en el estudio ni se le hará pago alguno.

**COMPENSACION:**

Si sufre lesiones como resultado de su participación en este estudio, nosotros le proporcionaremos el tratamiento inmediato y lo referiremos, en caso de ameritarlo, al especialista médico que requiera. No contamos con presupuesto para financiar compensaciones por lesiones. El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán no brinda ningún tipo adicional de compensación para cubrir el daño.

**ALTERNATIVAS A SU PARTICIPACIÓN:**

Su participación es voluntaria. Usted puede elegir no participar en el estudio y seguirá recibiendo el tratamiento para su enfermedad.

**POSIBLES PRODUCTOS COMERCIALES DERIVABLES DEL ESTUDIO:**

Si un producto comercial es desarrollado como resultado del estudio, tal insumo será propiedad del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ) o quienes ellos designen. En tal caso, usted no recibirá un beneficio financiero.

**ACCIONES A SEGUIR DESPUÉS DEL TÉRMINO DEL ESTUDIO:**

Usted puede solicitar los resultados de sus exámenes clínicos y de las conclusiones del estudio al Dr. Jesús Kazuo Yamamoto o al Dr David García Rangel en el INCMNSZ (tel 54870900 (2716)). La investigación es un proceso largo y complejo. El obtener los resultados finales del proyecto puede tomar varios meses.

**PARTICIPACIÓN Y RETIRO DEL ESTUDIO:**

Su participación es VOLUNTARIA. Si usted decide no participar, no se afectará su relación con el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ) o su derecho para recibir atención médica o cualquier servicio al que tenga derecho. Si decide participar, tiene la libertad para retirar su consentimiento e interrumpir su participación en cualquier momento sin perjudicar su atención en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ). Se le informará a tiempo si nueva información es obtenida que pueda afectar su decisión para continuar en el estudio.

Los procedimientos que serán necesarios si usted termina su participación en el estudio son: Solo deberá notificarlo verbalmente al Dr Jesús Kazuo Yamamoto



## **CONFIDENCIALIDAD Y MANEJO DE SU INFORMACIÓN:**

Su nombre no será usado en ninguno de los estudios. Las muestras biológicas obtenidas no contendrán ninguna información personal y se codificará con un número de serie para evitar cualquier posibilidad de identificación. Por disposición legal las muestras biológicas, incluyendo la sangre, son catalogadas como residuos peligrosos biológico-infecciosos y por esta razón durante el curso de la investigación su muestra no podrá serle devuelta. Es posible que sus muestras biológicas así como su información médica y/o genética puedan ser usadas para otros proyectos de investigación análogos relacionados con la enfermedad en estudio. No podrán ser usados para estudios de investigación que no estén relacionados con condiciones distintas a las estudiadas en este proyecto. Sus muestras podrán ser almacenadas por los investigadores hasta por 5 años.

Los códigos que identifican su muestra estarán solo disponibles a los investigadores titulares, quienes están obligados por Ley a no divulgar su identidad. Estos códigos serán guardados en un archivero con llave. Solo los investigadores tendrán acceso. Existe la posibilidad de que su privacidad sea afectada como resultado de su participación en el estudio. Su confidencialidad será protegida como lo marca la ley. Será mantenida asignando códigos a su información. El código es un número de identificación que no incluye datos personales. Ninguna información sobre su persona será compartida con otros sin su autorización, excepto:

- Si es necesario para proteger sus derechos y bienestar (por ejemplo, si ha sufrido una lesión y requiere tratamiento de emergencia); o
- Es solicitado por la ley.

Monitores o auditores del estudio podrán tener acceso a la información de los participantes.

Si usted decide retirarse del estudio, podrá solicitar el retiro y destrucción de su material biológico y de su información. Todas las hojas de recolección de datos serán guardadas con las mismas medidas de confidencialidad, y solo los investigadores titulares tendrán acceso a los datos que tienen su nombre.

El Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición aprobó la realización de éste estudio. Dicho comité es quien revisa, aprueban y supervisa los estudios de investigación en humanos en el Instituto. En el

futuro, si identificamos información que consideremos importante para su salud, consultaremos con el Comité de ética que supervisa este estudio para que decidamos la mejor forma de darle esta información a usted y a su médico. Además, le solicitamos que nos autorice re contactarlo, en caso de ser necesario, para solicitarle información que podría ser relevante para el desarrollo de este proyecto.

Los datos científicos obtenidos como parte de este estudio podrían ser utilizados en publicaciones o presentaciones médicas. Su nombre y otra información personal serán eliminados antes de usar los datos.

Si usted lo solicita su médico de cabecera será informado sobre su participación en el estudio

Su material genético no será usado con fines distintos a los mencionados en este documento. Si el investigador desea usarlo con fines distintos deberá notificarlo y solicitarle su firma en un documento similar al que usted está leyendo.

Los resultados de los estudios genéticos no serán incluidos en su expediente del Instituto, a menos que tengan implicaciones para su tratamiento.

Los resultados de estudios genéticos podría ser causa de discriminación para las personas que tengan alguna anomalía que los predisponga para sufrir una enfermedad. Tomaremos las acciones necesarias para evitar que su información sea conocida por terceros que pudieran tomar acciones discriminatorias contra usted.

#### **IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES:**

En caso de que usted sufra un daño relacionado al estudio, por favor póngase en contacto con Dr Jesús Kazuo Yamamoto Furusho en el INCMNSZ (teléfono: 54870900 (2716)).

Si usted tiene preguntas sobre el estudio, puede ponerse en contacto con Dr David García Rangel en el INCMNSZ (teléfono: 54870900 (2716)).

Si usted tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en el estudio, puede hablar con el Presidente del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ (Dr. Carlos A. Aguilar Salinas. Teléfono: 54870900 ext. 6101).

#### **DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO**

He leído con cuidado este consentimiento informado, he hecho todas las preguntas que he tenido y todas han sido respondidas satisfactoriamente. Para poder participar

en el estudio, estoy de acuerdo con todos los siguientes puntos:

Estoy de acuerdo en participar en el estudio descrito anteriormente. Los objetivos generales, particulares del reclutamiento y los posibles daños e inconvenientes me han sido explicados a mi entera satisfacción.

Estoy de acuerdo en donar de forma voluntaria mis muestras biológicas de sangre para ser utilizadas en éste estudio. Así mismo, mi información médica y biológica podrá ser utilizada con los mismos fines.

Estoy de acuerdo, en caso de ser necesario, que se me contacte en el futuro si el proyecto requiere coleccionar información adicional o si encuentran información relevante para mi salud.

Mi firma también indica que he recibido un duplicado de este consentimiento informado.

Por favor responda las siguientes preguntas

	<b>SÍ</b> <b>(marque</b> <b>por</b> <b>favor)</b>	<b>NO</b> <b>(marque</b> <b>por</b> <b>favor)</b>
a. ¿Ha leído y entendido la forma de consentimiento informado, en su lenguaje materno?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b. ¿Ha tenido la oportunidad de hacer preguntas y de discutir este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c. ¿Ha recibido usted respuestas satisfactorias a todas sus preguntas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d. ¿Ha recibido suficiente información acerca del estudio y ha tenido el tiempo suficiente para tomar la decisión?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e. ¿Entiende usted que su participación es voluntaria y que es libre de suspender su participación en este estudio en cualquier momento sin tener que justificar su decisión y sin que esto afecte su atención médica o sin la pérdida de los beneficios a los que de otra forma tenga derecho?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
f. ¿Autoriza se dé acceso a sus registros médicos para este estudio de investigación y para propósitos regulatorios a _____, sus representantes, los auditores, oficinas regulatorias del estudio, otras agencias gubernamentales de la salud en México y posiblemente otras agencias gubernamentales de la salud en otros países en donde se pueda considerar al fármaco en estudio para la aprobación	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	<b>SÍ</b> (marque por favor)	<b>NO</b> (marque por favor)
de su comercialización?		
g. ¿Entiende los posibles riesgos, algunos de los cuales son aún desconocidos, de participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
h. ¿Entiende que puede no recibir algún beneficio directo de participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
i. ¿Ha discutido usted otras opciones de tratamiento con el médico participante en el estudio y entiende usted que otras opciones de tratamiento están a su disposición?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
j. ¿Entiende que no está renunciando a ninguno de sus derechos legales a los que es acreedor de otra forma como sujeto en un estudio de investigación?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
k. ¿Entiende que el médico participante en el estudio puede retirarlo del mismo sin su consentimiento, ya sea debido a que Usted no siguió los requerimientos del estudio o si el médico participante en el estudio considera que médicamente su retiro es en su mejor interés?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
l. ¿Entiende que el estudio puede ser suspendido por el patrocinador del estudio en cualquier momento?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m. ¿Entiende que usted recibirá un original firmado y fechado de esta Forma de Consentimiento, para sus registros personales?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Declaración del paciente:**

Yo, \_\_\_\_\_ declaro que es mi decisión participar en el estudio. Mi participación es voluntaria. He sido informado que puedo negarme a participar o terminar mi participación en cualquier momento del estudio sin que sufra penalidad alguna o pérdida de beneficios. Si suspendo mi participación, recibiré el tratamiento médico habitual al que tengo derecho en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ) y no sufriré perjuicio en mi atención médica o en futuros estudios de investigación. Yo puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos o beneficios potenciales derivados de mi participación en el estudio. Puedo obtener los resultados de mis exámenes clínicos si los solicito. Si usted tiene preguntas sobre el estudio, puede ponerse en contacto Dr Jesús Kazuo Yamamoto Furusho o el Dr David García Rangel en el INCMNSZ (teléfono: 54870900 (2716). Si usted tiene preguntas sobre sus derechos como participante en el estudio, problemas, preocupaciones o preguntas,

obtener información, y ofrecer información que puede hablar con el coordinador del Comité de Ética de Investigación de INCMNSZ (Dr. Arturo Galindo Fraga Tel: 54870900, ext 6101). He leído y entendido toda la información que me han dado sobre mi participación en el estudio. He tenido la oportunidad para discutirlo y hacer preguntas. Todas las preguntas han sido respondidas a mi satisfacción. He entendido que recibiré una copia firmada de este consentimiento informado.

\_\_\_\_\_  
Nombre del Participante                      Firma del Participante                      Fecha

\_\_\_\_\_  
Coloque su huella digital si no sabe escribir

\_\_\_\_\_  
Nombre del representante legal                      Firma del representante legal                      Fecha  
(si aplica)

\_\_\_\_\_  
Nombre del Investigador                      Firma del Investigador                      Fecha  
que explicó el documento

\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo 1                      Firma del Testigo 1                      Fecha

Relación con el  
participante: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Nombre del Testigo 2

\_\_\_\_\_

Firma del Testigo 2

\_\_\_\_\_

Fecha

Dirección: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Relación que guarda con el participante: \_\_\_\_\_

Lugar y fecha: \_\_\_\_\_