

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA**



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MEDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE PEDIATRIA
CENTRO MEDICO NACIONAL DE OCCIDENTE**



Trabajo de Tesis

“Frecuencia de Polimorfismos de los genes *Receptor de Tacquicinina 1(rs3771863)* y *Óxido Nítrico Sintetasa Neuronal 1 (rs3782221)* en población pediátrica sin estreñimiento”

Presenta

Andrea Livier Barajas Castro

Residente de 2º año de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica

**Para obtener el diploma de:
ESPECIALIDAD EN GASTROENTEROLOGÍA Y NUTRICIÓN
PEDIÁTRICA**

Tutor de Tesis:
MNH Dr. Sergio Pacheco Sotelo

UMAЕ Hospital de Pediatría CMNO. Guadalajara, Jalisco México.
Febrero 2018



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

IDENTIFICACIÓN DE AUTORES

Andrea Livier Barajas Castro
Residente 2º año Gastroenterología y Nutrición pediátrica
UMAE Hospital de Pediatría
Centro Médico Nacional de Occidente
Instituto Mexicano del Seguro Social
(33)36170060 Ext. 37 727
Correo electrónico: alivierbarajasc@gmail.com

M en NH Sergio Pacheco Sotelo
JS de Gastroenterología y Nutrición pediátrica
UMAE Hospital de Pediatría
Centro Médico Nacional de Occidente
Instituto Mexicano del Seguro Social
(33)36170060 Ext. 37 727
Correo electrónico: pacheco_sotelo@yahoo.com.mx

ÍNDICE	Pag.
I. RESUMEN	5
II. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	6
- Introducción	6
- Definición de estreñimiento funcional	7
- Epidemiología	9
- Factores predisponentes	10
- Sistema nervioso entérico y sus neurotransmisores	17
- Genes y polimorfismos	24
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	31
V. JUSTIFICACIÓN	31
VI. HIPOTESIS	32
VII. OBJETIVOS	32
VIII. MATERIAL Y MÉTODOS	33
a) Clasificación del estudio	32
b) Universo de estudio	33
c) Criterios de inclusión	33
d) Criterios de no inclusión	33
e) Criterios de exclusión	34
f) Operacionalización de las variables	34
g) Cálculo de la muestra	35
h) Desarrollo del estudio	35
i) Análisis de datos	37
IX. ASPECTOS ÉTICOS	38
X. ORGANIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	38
a) Cronograma de actividades	38
b) Recursos materiales, humanos y de financiamiento	38
c) Experiencia del grupo	39
XI. RESULTADOS	39
XII. DISCUSIÓN	43
XIII. CONCLUSIONES	47
XIV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
XV. ANEXOS	52

ABREVIATURAS

ADN: Acido Desoxirribonucleico

cGMP: Guanilil monofosfato cíclico

CIC: Células intersticiales de Cajal

FISH: Fluorescence in situ hybridisation (Hibridacion por Fluorescencia in situ)

GABA: ácido gamma-aminobutírico

IC: intervalo de confianza

KIT: *c-KIT* Hardy – Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (Oncogén homólogo del sarcoma viral felino 4 *c-KIT* Hardy –Zuckerman)

NAIP: Neuronas aferentes intrínsecas primarias

NO-GC: Guanilil ciclasa sensible al oxido nítrico

NOS: Sintetasa de óxido nítrico

NOS1: Neuronal Nitric Oxide Synthase 1(Oxido Nitrico Sintetasa Neuronal 1)

ON: Óxido nítrico

OR: Odds Ratio (razón de momios)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction).

PKG: cGMP dependiente de proteinkinasa

PubMed.gov (US National Library of Medicine National Institutes of Health)

RAR: Retención ano rectal

RFLP: Polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism)

SNE: sistema nervioso entérico

SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms (Polimorfismos de un solo nucleótido)

TAC1: Tacquicinina 1

TAC3: Tacquicinina 3

TACR1: receptor de tacquicinina 1

TACR2: receptor de tacquicinina 2

TACR3: receptor de tacquicinina 3

VIP: Péptido intestinal vasoactivo

I. RESUMEN

“Frecuencia de Polimorfismos de los genes Receptor de *Tacquinina* 1(*rs3771863*) y Óxido Nítrico Sintetasa Neuronal 1 (*rs3782221*) en población pediátrica sin estreñimiento”

Introducción; la agregación familiar es frecuente en los casos de estreñimiento funcional, pero los estudios genéticos en relación a este fenómeno no son concluyentes. Un estudio publicó la asociación de este padecimiento con 5 polimorfismos genéticos (*TACR1: rs3771863; TACR3: rs4580655 y rs11722288; KIT: rs4563545; NOS1: rs378222*) pero la relación no fue contundente.

Objetivo: determinar la frecuencia de Polimorfismos de los genes *TACR1* (*rs3771863*) y *NOS1* (*rs3782221*) en población pediátrica sin estreñimiento, para el estudio de un grupo control que, junto con un proyecto que corre en paralelo con el grupo de casos, apoyar la asociación entre polimorfismos genéticos y el estreñimiento funcional.

Material y métodos. Estudio transversal descriptivo, realizado en niños de 4 a 15 años, no estreñidos de acuerdo a criterios de Roma IV, que acuden al laboratorio del Hospital de Pediatría CMNO a toma de muestras sanguíneas por otros motivos y a quienes además se aplicó una encuesta para identificar antecedentes familiares de estreñimiento. Se obtuvieron frecuencias alélicas y genotípicas por medio de análisis genético-molecular.

Resultados: incluyó a 69 sujetos; La genotipificación del polimorfismo *NOS1* (*rs3782221*), está pendiente completarse por recursos económicos. Sobre el polimorfismo *TACR1* (*rs3771863*), el 7% fueron homocigotos, 38% heterocigotos y 55% homocigotos para el alelo silvestre. La frecuencia alélica para *TACR1* (*rs3771863*), fue del 26.1%. El 45% de los participantes fueron portadores del polimorfismo, de estos el 51% contaba con antecedente familiar de estreñimiento, similar al grupo de homocigotos para el alelo silvestre que fue del 50%.

Conclusiones: La frecuencia del polimorfismo *TACR1*(*rs3771863*), fue alta en nuestro grupo, pero su existencia no fue determinante para la presencia de estreñimiento. Se requiere comparación con el grupo de casos y población general para establecer una asociación significativa con estreñimiento funcional.

Frecuencia de Polimorfismos de los genes Receptor de *Taciquinina* 1(rs3771863) y Óxido Nítrico Sintetasa Neuronal 1 (rs3782221) en población pediátrica sin estreñimiento

II. MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES

Introducción

Los trastornos funcionales gastrointestinales, pertenecen al grupo de trastornos crónicos con alta prevalencia tanto en la población pediátrica como en adultos [1]. Entre ellos el estreñimiento, es un problema común y es una de las principales causas de consulta en la edad pediátrica, el diagnóstico se establece con una historia clínica completa y un examen físico general y sistemático, el tratamiento consiste en medidas educativas y manejo farmacológico a base de laxantes [2], sin embargo contrario a lo que se podría pensar, tiene serias implicaciones en la calidad de vida de los niños y sus familias debido a la falta de entendimiento respecto a los mecanismos fisiopatológicos subyacentes y la selección apropiada de las opciones terapéuticas [3].

La etiología y fisiopatología del estreñimiento sigue siendo un tema controversial, la teoría más aceptada es que se trata de una enfermedad cuyo origen es multifactorial, en la que la mayoría de los niños no presentan una condición médica subyacente responsable de las manifestaciones clínicas [4]. Los factores predisponentes identificados incluyen estrés, educación familiar, factores dietéticos, actividad física, obesidad, comorbilidades psicológicas y la predisposición familiar [3].

En este último rubro, existen diversos estudios que demuestran que la frecuencia de estreñimiento en padres o hermanos de pacientes pediátricos con estreñimiento funcional es mayor al compararla con padres o hermanos de sujetos controles sin estreñimiento, lo cual ha originado la realización de investigaciones con el objetivo de identificar alteraciones genéticas en relación con la etiología del estreñimiento [5].

Un estudio realizado en pacientes pediátricos con estreñimiento funcional con tránsito colónico lento, estudió genes que codifican para receptores de neurotransmisores y encontró la asociación de este padecimiento con 5 polimorfismos: uno localizado en el gen que codifica para el receptor de tacquicinina 1, dos en el del receptor de tacquicinina 3, uno en el *c-KIT* Hardy-Zuckerman 4 y uno más en el gen de la óxido nítrico sintetasa neural 1 [6].

Sin embargo la literatura es escasa al respecto para establecer contundentemente la asociación entre estos polimorfismos y el estreñimiento funcional, por lo que se requiere explorar más ampliamente este campo.

Esta investigación complementa un estudio de casos y controles en una población pediátrica mexicana cuyo objetivo es identificar asociación entre polimorfismos previamente comentados implicados en la motilidad colónica y la presencia de estreñimiento funcional.

El presente trabajo establece la frecuencia de los polimorfismos de los genes Receptor de *Tacquicinina 1(rs3771863)* y *Óxido Nítrico Sintetasa Neuronal 1(rs3782221)* en población pediátrica sin estreñimiento en un hospital de referencia de tercer nivel.

Definición de estreñimiento funcional

Hasta el momento la definición más aceptada de estreñimiento funcional corresponde a los criterios de Roma IV publicados en 2016, los cuales se dividen en 2 grupos de acuerdo a la edad del paciente y se muestran a continuación [7].

Para menores de 4 años deben estar presentes al menos 2 de los siguientes criterios por al menos un mes [7]:

- Dos o menos evacuaciones por semana
- Historia de retención fecal excesiva
- Historia de movimientos intestinales dolorosos o fuertes
- Historia de evacuaciones anchas
- Presencia de abundante materia fecal en el recto

En niños en entrenamiento para ir al baño los siguientes criterios adicionales pueden ser usados [7]:

- Al menos un episodio a la semana de incontinencia posterior a haber aprendido a ir a evacuar al baño
- Historia de evacuaciones anchas que pueden obstruir el baño.

Para mayores de 4 años de edad, al menos 2 de los siguientes criterios deben estar presentes al menos una vez por semana por al menos un mes [8]:

- Dos o menos evacuaciones en el baño por semana
- Al menos un episodio de incontinencia fecal por semana
- Historia de posturas retencionistas o retención voluntaria de las heces excesiva
- Historia de evacuaciones dolorosas
- Presencia de materia fecal abundante en el recto
- Historia de evacuaciones anchas de pueden obstruir el baño

Es requisito no cumplir con criterios diagnósticos de síndrome de intestino irritable y que la sintomatología no pueda ser explicada por otra condición médica posterior a una evaluación sistematizada [8].

El estreñimiento o constipación es un síntoma frecuente en pediatría que traduce la presencia de retención fecal, la cual es referida por los pacientes o sus familiares como disminución en la frecuencia de las evacuaciones, heces duras y en ocasiones con dolor, pujo excesivo, evacuación incompleta, tiempo prolongado para lograr la evacuación, imposibilidad para evacuar a pesar del esfuerzo y presencia de posturas de retención. Con base en su etiología el estreñimiento se clasifica en funcional o primario cuando no existe una enfermedad subyacente que lo genere, el cual representa el 90-95% de los casos, y en secundario, el cual representa 5% al 10% y se debe a alguna condición mórbida subyacente que lo condiciona [9].

Epidemiología

Es un problema común en los pacientes pediátricos, con una prevalencia estimada alrededor del mundo del 3%. En 17 al 40% de los niños, el estreñimiento inicia en el primer año de vida [4]. Constituyendo una de las 10 principales causas de la consulta pediátrica y el 25% de los motivos de consulta del gastroenterólogo pediatra [9].

Otras series reportan una prevalencia media y mediana en niños de 14% y 12% respectivamente. El amplio rango en las prevalencias reportadas puede ser debido al uso de diferentes criterios diagnósticos e influencias culturales alrededor del mundo. El pico de incidencia ocurre al momento que inicia el entrenamiento para el control de esfínteres sin diferencia de sexos. Se distribuye de manera equitativa entre las diferentes clases sociales sin tener relación con el tamaño familiar, posición ordinal del niño en cuanto a sus hermanos, o edad de los padres. Los niños con estreñimiento tienen mayor frecuencia de encopresis que las niñas [8].

En Estados Unidos la prevalencia entre los adolescentes es del 10%. En Europa los rangos de prevalencia van del 0.7% en lactantes y niños pequeños en Italia, hasta el 15% en niños en Grecia. En Brasil, se han reportado tasas de prevalencia alarmantes que superan el 20% en niños de 1 a 10 años. La prevalencia en Ecuador, Colombia y el Salvador es de 11.8%, 13% y 10% respectivamente. En Tailandia un tercio de los niños en edad escolar, sufren de estreñimiento funcional. En Hong-Kong y en Corea del Sur se ha reportado una prevalencia del 12 hasta el 28% [3].

En México se realizó un estudio publicado en 2016 para evaluar la prevalencia de trastornos funcionales en niños de edad escolar, en Monterrey y Cuernavaca, se incluyeron 362 participantes de escuelas públicas y privadas desde el tercero de primaria hasta el segundo de secundaria. De esta población se encontró la presencia de algún trastorno gastrointestinal funcional en el 27%(99) de los participantes y 12.6% (46) (IC del 95% 9.28-16.12) del total de la muestra correspondía a estreñimiento funcional en base a criterios de Roma III, siendo el más común de los trastornos funcionales. Predominó en

el sexo masculino (56.3%) y las características más comunes en los sujetos diagnosticados eran heces duras en 26 (56%), evacuación dolorosa en 24 (52%), evacuación de heces grandes en 21 (46%) y una frecuencia menor de 2 evacuaciones por semana en 20 (44%) [1].

Existe literatura que considera al estreñimiento como un problema de salud pública emergente, dado el incremento de su prevalencia a nivel mundial en la población pediátrica, siendo mayor en el sur de Asia y de América que en cualquier otra parte del mundo. Existen estudios que sugieren que factores socioculturales y políticos rápidamente cambiantes como la urbanización, incremento en los niveles de estrés psicológico, pobre capacitación y educación de los padres y el maltrato infantil han resultado en un incremento de la frecuencia de estreñimiento en la edad pediátrica [3].

Las posibles repercusiones son alarmantes. Aunque no está relacionado directamente con mortalidad, el estreñimiento conlleva a una pobre calidad de vida, pobre desempeño escolar y consecuentemente deficiencias en la educación. La atención médica de estos niños no es óptima debido a la falta de conocimiento de los procesos fisiopatológicos subyacentes y a la inapropiada selección de las opciones terapéuticas. Los niños que reciben una atención inadecuada están en riesgo del desarrollo de complicaciones físicas y psicológicas lo que conlleva una pesada carga para los presupuestos de salud [3].

Factores predisponentes para estreñimiento funcional:

- Estrés

Algunas referencias apoyan que el estrés psicológico es una entidad que predispone a los niños al desarrollo de estreñimiento funcional. Situaciones como traumas físicos o psicológicos, hermanos enfermos, u otras enfermedades coexistentes en el mismo niño, entre otras situaciones como la competitividad escolar o familiar, circunstancias que obligan a los padres a dejar el cuidado de los niños con los abuelos, o niños que se encargan de las actividades domésticas o que permanecen mucho tiempo en guarderías, el invertir largos periodos de tiempo en las tareas escolares y falta de sueño, así

como situaciones de abuso u otras comorbilidades psicológicas, pueden tener un impacto negativo en el desarrollo de hábitos intestinales regulares, y buenas rutinas de defecación. Niños expuestos a condiciones políticas negativas como guerras, pobreza o hambre también tienen mayor frecuencia de trastornos gastrointestinales funcionales [3].

En un estudio realizado por Tam Yuk y colaboradores en Hong Kong en el que incluyeron a 282 niños estreñidos de 9 a 19 años, identificaron con una $P < 0.05$ que factores como vivir sin los padres, o no tener adecuada compañía de ellos en casa, pasar mucho tiempo haciendo tareas escolares, sueño inapropiado, menor ingesta de fibra y consumo frecuente de comida rápida, son significativamente más prevalentes en niños con estreñimiento funcional [10].

Aunque no se entienden con exactitud los mecanismos fisiopatológicos subyacentes, es posible que el estrés produzca alteraciones tanto en el eje cerebro-intestino como en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal contribuyendo a defectos en la función colónica y rectal, lo que lleva al desarrollo de estreñimiento funcional y síndrome de intestino irritable [3].

-Factores dietéticos y actividad física

Algunos estudios sugieren que factores dietéticos predisponen a los niños al desarrollo de estreñimiento funcional, principalmente en relación con el consumo de fibra. Diversos estudios han mostrado una asociación entre las dietas bajas en fibra y el desarrollo de estreñimiento funcional [3].

El consumo de comida rápida con ingredientes fritos incluyendo carne y pescado se ha vuelto una práctica muy común. Se ha demostrado que la comida chatarra se encuentra asociada con estreñimiento. Un estudio chino demostró que los niños y adolescentes que consumen comida rápida tienen una mayor frecuencia de trastornos gastrointestinales funcionales [11].

Además, múltiples estudios han demostrado que la falta de actividad física y la obesidad se ha asociado con una menor frecuencia en el número de evacuaciones y estreñimiento funcional en población pediátrica [12,13].

- Agregación familiar

Existe literatura médica acerca de la agregación familiar en pacientes con estreñimiento. Un estudio publicado en 2015 comparó las familias de 37 niños menores de 18 años con estreñimiento funcional (grupo de casos) vs. familias de 37 niños sin estreñimiento (grupo control), 48.6% de las madres presentaban estreñimiento en el grupo de casos, significativamente mayor que en el grupo control 21.6% ($p= 0.015$). No hubo una diferencia significativa entre los padres de los 2 grupos ni entre los hermanos. Este estudio pudiera sugerir la participación de factores genéticos asociados con la etiología del estreñimiento modificado por factores ambientales influyentes como la dieta y actividad física [5].

En el 2010 Ostwani et al, comparó las familias de pacientes pediátricos con edades de 6 meses a 18 años, con estreñimiento funcional y sin esta condición. De 112, 37 cumplieron criterios para estreñimiento funcional y los 75 restantes pertenecieron al grupo control sin estreñimiento. Un total de 310 familiares fueron estudiados. Se reportó una frecuencia de estreñimiento del 30% en los hermanos de pacientes con estreñimiento versus con 7% en el grupo control ($p=0.009$ OR 5.6, IC 95% 4.20 [1.4-12.5]). Los padres de los casos tuvieron una mayor frecuencia de estreñimiento comparado con padres del grupo control (42% vs 9% respectivamente; $p<0.001$, OR 7.6, IC 95% 4.83 [2.7-8.7]). El 38% de los familiares de los casos cumplieron criterios para estreñimiento funcional, contra 8% en el grupo control ($p<0.0001$, OR 6.9, IC 95% 4.67 [2.8-7.8]). Se concluye la presencia de agregación familiar en esta patología, la fisiopatología subyacente a este fenómeno no está esclarecida, por lo que es necesaria mayor investigación en la búsqueda de una probable etiología genética, comportamientos familiares o la exposición a los mismos factores ambientales [14].

En 2007 Chan AO *et al* demostraron que existe mayor prevalencia de estreñimiento en familiares de pacientes adultos con estreñimiento al compararse con familiares de pacientes de un sujeto sin la enfermedad (16.4% vs 9.1%). En el grupo de casos, los hermanos del caso índice tenían una frecuencia de estreñimiento del 33.3%, mientras que en los padres, hijos y

esposa la prevalencia era 32.4, 27.9 y 6.3% respectivamente. Estos datos apoyan la posibilidad que los familiares en primera línea tienen mayor probabilidad de presentar estreñimiento. El antecedente familiar de estreñimiento se asocio con un incremento del riesgo de padecer la enfermedad, con un OR de 2.02 cuando un familiar estaba afectado y un OR de 3.99 cuando al menos 2 miembros de la familia estaban afectados [15].

En México, hasta la fecha y hasta nuestro conocimiento el único estudio realizado en relación con el estreñimiento funcional y la agregación familiar, se llevo a cabo en la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional de Occidente en el 2009, en el cual se compararon 140 familias de pacientes pediátricos con estreñimiento funcional y 140 familias en un grupo control. Se reportó en el análisis ajustado que entre los casos, las madres, las hermanas y los hermanos tuvieron una frecuencia de estreñimiento de 1.7, 2 y 3.9 veces mayor respectivamente en comparación con los pacientes del grupo control [16]

- Genética

Aunque existe un número limitado de estudios sobre estreñimiento funcional y agregación familiar en población pediátrica, se ha demostrado que el estreñimiento funcional ocurre con más frecuencia en familiares de pacientes con estreñimiento que en los controles sanos. Por otro lado, el estreñimiento en la edad pediátrica se describe frecuentemente en pacientes a síndromes hereditarios (enfermedad de Alexander, MEN2B, adrenomiodistrofia, enfermedad de Fabry, Síndrome de Aicardi etc). Esto puede indicar una influencia sustancial de los factores genéticos en la etiología del estreñimiento funcional, tanto como un desorden Mendeliano o como una forma poligénica o multifactorial [17].

Los patrones de huellas digitales o dermatoglíficos se refiere a los patrones lineares específicos en el lado palmar de los dedos y palmas, los cuales son considerados únicos para cada individuo (excepto en gemelos idénticos), y genéticamente determinados. Muchas condiciones congénitas tienen patrones de huellas digitales específicos. Algunos estudios han sugerido que la

presencia de arcos simples en las puntas de los dedos es mayor en niños con estreñimiento [17].

Glottieb y colaboradores estudiaron las huellas digitales de 155 niños con estreñimiento de aparición temprana (antes de los 10 años de edad), niños con estreñimiento de aparición tardía (después de los 10 años de edad) y controles sanos. En estos individuos se encontró una prevalencia de dermatoglíficos con patrón de tipo arcos simples en el 53%, 13% y 11% respectivamente [18].

Resultados similares fueron reportados por Staiano et al, quien encontró arcos pequeños en las puntas de los dedos en 38% de un grupo de niños con estreñimiento comparado con 11% de los controles sanos [19]. Sin embargo los estudios realizados en este rubro de investigación son escasos y los grupos de participantes son pequeños y no permiten conclusiones firmes.

Hasta nuestro conocimiento y después de una búsqueda intencionada en PubMed, solo hay un estudio que investigó una serie de genes candidatos en familias de pacientes pediátricos con estreñimiento de tránsito colónico lento.

En 2007, García B et al, estudió a 35 familias de niños con estreñimiento definido con los criterios de Roma II, (67% hombres, edades comprendidas entre los 5.5 y los 19.7 años, con una media de 11.5 años). Se demostró la presencia de tránsito colónico lento en todos los casos mediante gamagrafía [6].

Treinta casos tenían uno o más familiares afectados. En los casos y sus padres se evaluaron los genes que codifican para neurotransmisores intestinales (TAC1 [Tacquicinina 1], TAC3 [Tacquicinina 3], VIP [Péptido intestinal vasoactivo]), los genes que codifican sus receptores (TACR1 [receptor de tacquicinina 1], TACR2 [receptor de tacquicinina 2], TACR3 [receptor de tacquicinina 3]) y los genes *KIT* [c-*KIT* Hardy – Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog] y *NOS1* [Neuronal nitric oxide synthase 1], mediante la investigación de 117 polimorfismos de un solo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphisms SNPs) distribuidos entre estos genes [6].

El gen *KIT* codifica para un receptor del factor de crecimiento tirosin kinasa que está presente en las células intersticiales de Cajal y es necesario para su desarrollo, y el gen *NOS1* juega un papel importante en la síntesis del neurotransmisor óxido nítrico en las neuronas entéricas. Los resultados se compararon con los datos genéticos obtenidos del proyecto HapMap basados en el análisis de 30 tríos (padres e hijos) de ascendencia europea. Cinco polimorfismos (SNPs) mostraron una asociación con el estreñimiento de tránsito colónico lento localizados en los genes *TACR1*, *TACR3*, *KIT* y *NOS1* [6]. Para comprender la relación entre estos genes y el rol que pudieran desempeñar en la fisiopatología y etiología del estreñimiento, es necesario describir a detalle la fisiología de la defecación.

Es importante destacar que la población estudiada fue relativamente pequeña, y que el número de genes estudiado fue limitado. Hasta la fecha no se ha realizado algún otro estudio que replique estos resultados en población pediátrica [17], por lo que establecer una clara asociación entre estos polimorfismos genéticos y la presencia de estreñimiento funcional aun no es posible.

Incluso, algunos estudios realizados en adultos no han podido encontrar una relación entre genes candidatos y estreñimiento funcional. En un grupo de 16 pacientes adultos con tránsito colónico lento idiopático se investigó la presencia de mutaciones en el proto-oncogen *RET* y *GDNF* (dos genes que se sabe están asociados con la enfermedad de Hirschsprung) sin encontrar alguna mutación o polimorfismo [17].

De igual manera otras investigaciones en adultos se han enfocado a identificar mutaciones en los genes *NRTN* (Neurturina; alteraciones en este gen se han asociado en estudios en ratones con una disminución de la densidad del plexo nervioso entérico, disminución en la motilidad gastrointestinal y defectos autonómicos) [20], y en el proto-oncogen *c-KIT*, sin encontrar una asociación con el estreñimiento de tránsito colónico lento en ningún estudio [21].

En 2007, Rossi et al buscó anomalías cromosómicas en biopsias de colon de 22 adultos con estreñimiento intratable que requirieron tratamiento quirúrgico. Se utilizó hibridación por fluorescencia in situ (FISH por sus siglas en inglés Fluorescent in situ hybridation) para estudiar anomalías en los cromosomas 1, 18, 17, X y Y en las neuronas entéricas y células gliales. En 45% de los pacientes se encontraron únicamente anomalías numéricas del cromosoma 1 (aneusomía >10%), principalmente de las neuronas entéricas. Llegaron a la conclusión de que es posible que al menos en un subgrupo de pacientes con estreñimiento de tránsito colónico lento, este padecimiento pueda tener una base genética [22].

Por lo tanto, aunque se han publicado numerosos estudios que muestran que la etiología del estreñimiento es extremadamente heterogénea y a pesar de haberse identificado muchos mecanismos predisponentes, el proceso fisiopatológico subyacente todavía no es claro. Se sabe que los factores genéticos desempeñan un papel, pero los estudios de asociación y la secuenciación directa de genes, aún no han encontrado alteraciones específicas (mutaciones o polimorfismos) para establecer una relación contundente con el estreñimiento crónico funcional en la edad pediátrica [17].

Los 5 polimorfismos asociados a estreñimiento y tránsito colónico lento en población pediátrica, identificados en el estudio de García Barceló y colaboradores (2007), fueron localizados en los genes *TACR1*, *TACR3*, *KIT* y *NOS1* [6], los cuales desempeñan una función en el mecanismo de la defecación actuando a distintos niveles, por ejemplo en la síntesis de neurotransmisores excitatorios (tacquicinas) o inhibitorios (óxido nítrico), o de sus receptores, así como en el desarrollo y función de las células intersticiales de Cajal que funcionan como marcapasos eléctrico de la actividad motora del tubo digestivo humano [23]. A continuación se describirán los mecanismos nerviosos que intervienen en la motilidad intestinal con los cuales se intenta establecer una relación entre los polimorfismos previamente mencionados y la probable asociación con estreñimiento de origen funcional.

- Sistema nervioso entérico y sus neurotransmisores

La motilidad gastrointestinal es la propiedad de las paredes intestinales para contraerse y relajarse a fin de que el contenido del intestino vaya de un lugar a otro favoreciendo la absorción adecuada de nutrientes. Las estructuras involucradas para realizar esta función son: 1) El sistema nervioso entérico 2) Plexos nerviosos: submucoso (Meissner) y mientérico (Auerbach) 3) Las capas musculares (circular y longitudinal) 4) Células intersticiales de Cajal [24].

La motilidad gastrointestinal se debe a la interacción especializada de varios elementos, integrados como sistema nervioso entérico (SNE). Esta es la parte más compleja del sistema nervioso periférico que se origina en las células de la cresta neural y tiene 2 componentes principales, el plexo submucoso o de Meissner y el plexo mientérico o de Auerbach [24].

El plexo submucoso o de Meissner, situado entre la capa interna de la capa muscular y la submucosa, su función principal es la regulación de funciones de digestión y absorción a nivel de la mucosa y de los vasos sanguíneos, de acuerdo a la estimulación producida por los nutrientes [24].

El segundo es el plexo mientérico o de Auerbach, situado entre las capas musculares circular y longitudinal, a lo largo de todo el tubo digestivo, su función principal es la coordinación de la actividad de las capas musculares [24].

Las neuronas que conforman el sistema nervioso entérico son:

Neuronas aferentes intrínsecas primarias (NAIP): se encuentran en ambos plexos nerviosos y son neuronas colinérgicas. Responden a estímulos mecánicos y químicos y regulan las funciones fisiológicas del sistema digestivo, transmitiendo la información a otras neuronas [24].

Interneuronas: Son las encargadas de integrar la información generada por las NAIP y de enviar la información a las neuronas motoras [24].

Neuronas intestinofugas: Sus cuerpos celulares se hallan en el plexo mientérico; envían prolongaciones fuera del tubo digestivo y forma sinapsis con los ganglios mesentérico superior e inferior y con el ganglio celiaco, formando el ganglio prevertebral. Conducen señales eferentes y funcionan como mecanorreceptores que detectan cambios en el volumen intestinal [24].

Neuronas motoras: Estas neuronas inervan las capas musculares del tubo digestivo, vasos sanguíneos y las glándulas. Los cuerpos celulares se encuentran en los ganglios mientéricos, pero puede haber algunos en los ganglios submucosos [24].

De acuerdo a su función, las neuronas motoras pueden dividirse en excitatorias e inhibitorias. Los principales neurotransmisores relacionados con las neuronas excitatorias cuya acción es facilitar la contracción muscular del intestino son: acetilcolina, tacquicininas (sustancia P y neuroquininas). Las neuronas inhibitorias que facilitan la relajación muscular del intestino, utilizan un espectro más amplio de de transmisores: óxido nítrico, péptido intestinal vasoactivo (VIP), ácido gamma-aminobutírico (GABA) y monóxido de carbono. Hay un subgrupo de estas células encargadas de regular la secreción de agua y electrolitos (neuronas secretomotoras) y del flujo sanguíneo (vasomotoras) [24].

-Tacquicininas: constituyen una de las familias más grandes de péptidos en el mundo. Las tacquicininas son llamadas así porque evocan una rápida contracción del musculo liso intestinal, están ampliamente distribuidas en el sistema nervioso central de los mamíferos y en el tejido periférico. El tracto gastrointestinal contiene la mayor densidad de tacquicininas entre los órganos periféricos en el humano [25].

Existen 3 tipos de tacquicininas en los mamíferos conocidas como sustancia P o tacquicinina 1; neuroquinina A o tacquicinina 2 y neuroquinina B o tacquicinina 3. Para efectos de este trabajo las nombraremos como TAC1, TAC2 y TAC3 respectivamente. Estas tacquicininas juegan un papel importante como neurotransmisores / neuromoduladores a través de la estimulación de al

menos tres distintos grupos de receptores acoplados a proteína G, llamados receptor de tacquicinina 1 (TACR1), receptor de tacquicinina 2 (TACR2) y receptor de tacquicinina 3 (TACR3) [25].

Las tacquicininas pueden ser liberadas del estómago en respuesta a un estímulo eléctrico del nervio vago. En el intestino delgado TAC1 y TAC2 se encuentran en la mucosa, submucosa y en la capa externa del musculo liso, mientras que los niveles de TAC3 son muy bajos. Las fibras que liberan TAC1 se encuentran en los plexos mientérico y submucoso, en las capas musculares circular y longitudinal así como en la lámina propia y en la muscular de la mucosa, y son particularmente numerosas en la mucosa [25].

De igual manera los 3 receptores para tacquicininas son expresados en el tracto gastrointestinal. Por lo general, en intestino delgado, TACR1 se expresa tanto en las células efectoras (músculo liso intestinal, células intersticiales de Cajal, epitelio, vasculatura, en la muscularis mucosa y algunas células inmunes), así como en las neuronas motoras entéricas tanto inhibitoras como excitadoras y neuronas secretomotoras; TACR2 se expresa en las células efectoras del musculo liso tanto en la capa circular como en la longitudinal, pero están ausentes en el plexo y TACR3 se expresa en las neuronas del sistema nervioso entérico, y en células musculares aunque hay escasa evidencia de su rol [25].

A nivel de colon, las tres tacquicininas se localizan en las fibras nerviosas del plexo mientérico y submucoso, en las capas del musculo liso circular y longitudinal y la mucosa. Y sus receptores en arterias y venas, así como en la capa externa del musculo liso circular. El musculo liso en colon tiene una mayor sensibilidad a TAC2 / TACR2 y menor a la estimulación de TAC1 / TACR1 y TAC3 / TACR3 [25].

Las tacquicininas liberadas de las neuronas entéricas están involucradas en las respuestas motoras secundarias a algún estímulo eléctrico o químico, son complementarias entre sí y funcionan como un co-transmisor en la vía motora entérica excitatoria, son moduladas preganglionarmente por la acetilcolina,

contribuyendo a los reflejos motores excitatorios entéricos siendo importantes para integrar la motilidad propulsiva del intestino [25].

Sin embargo, si son liberadas por las fibras nerviosas aferentes extrínsecas, participan en reflejos de asa corta en los ganglios simpáticos prevertebrales así como en reflejos vagales y espinales [25].

El resultado de estas respuestas es que es que las tacquicininas pueden estimular o inhibir la motilidad gastrointestinal, el efecto neto dependerá del sitio de acción y del receptor. Estas acciones motoras son relevantes para el control neural de la peristalsis [25].

En pacientes pediátricos estreñidos con tránsito colónico lento la TAC1 se encuentra disminuida del 23 – 70% según diferentes fuentes bibliográficas. Un estudio de inmunohistoquímica realizado en 2010 en pacientes pediátricos estreñidos con tránsito colónico lento (TCL) versus pacientes pediátricos estreñidos con retención ano-rectal (RAR), demostró la disminución de la TAC1 y péptido intestinal vasoactivo (*VIP*) a nivel de colon transversal derecho (ángulo hepático) en el músculo liso circular en pacientes estreñidos con TCL en comparación con pacientes estreñidos con RAR [26].

- Oxido nítrico

En el tracto gastrointestinal en los últimos 25 años se ha demostrado las funciones del oxido nítrico (ON), como un neurotransmisor inhibitorio, mostrando ser crucial para la relajación y motilidad de las células del músculo liso. De hecho se han identificado padecimientos como acalasia, gastroparesia, tránsito intestinal lento, enfermedad de Hirschsprung en los que puede estar involucrada alguna alteración en la señalización del ON [27].

El ON induce la relajación del músculo liso a lo largo de todo el sistema gastrointestinal, específicamente regula el tono del esfínter esofágico inferior, la acomodación y el vaciamiento gástrico, la peristalsis del intestino grueso y delgado, así como el tono del esfínter anal interno [27].

La sintetasa de óxido nítrico (NOS) actúa como la fuente de óxido nítrico. Se conocen 3 isoformas distintas de NOS (endotelial, neuronal e inducible) de las cuales la NOS neuronal (nNOS) produce ON como neurotransmisor, la cual juega el rol más importante para el sistema gastrointestinal. El principal receptor de óxido nítrico es la guanilil ciclase sensible al óxido nítrico (NO-GC), el cual envía señales a través del guanilil monofosfato cíclico (cGMP) para la activación de otras enzimas como la cGMP dependiente de proteinkinasa (PKG), fosfodiesterasas y posiblemente canales regulados por cGMP. Para efectos de motilidad, la PKG parece ser la más importante ya que la fosforilación mediada por esta enzima ejerce su efecto sobre múltiples proteínas “blanco” que se sabe son parte de los cambios inducidos por ON en la motilidad gastrointestinal [27].

En las neuronas productoras de óxido nítrico, la nNOS, sintetiza ON, el cual difunde a las células vecinas: células del musculo liso, células intersticiales de Cajal (CIC), y células fibroblastos “like” (FLC) en las cuales se activa el receptor NO-GC. Existen contactos cercanos entre las dendritas neuronales, las CIC y las FLC. De igual manera existen uniones Gap que conectan las células del músculo liso con las CIC y las FLC. De esta manera se forma una unidad eléctrica. Mediante la modulación del potencial de membrana de las células del músculo liso, las neuronas motoras del tracto gastrointestinal, integran y coordinan las señales excitatorias e inhibitorias. En las CIC, el cGMP induce una hiperpolarización vía activación del PKG. En las células del musculo liso, el cGMP induce relajación vía PKG e hiperpolarización. Y es a través de este mecanismo que el ON induce la relajación del músculo liso en el sistema gastrointestinal [27].

Se ha asumido que desórdenes del sistema nervioso entérico pueden ser la causa del estreñimiento de tránsito colónico lento, y de hecho, alteraciones en la señalización de óxido nítrico se han descrito como probable etiología [27].

En un trabajo realizado por Tomita y colaboradores, se estudió las respuestas nerviosas entéricas en segmentos intestinales de colon obtenidos de pacientes afectados por tránsito colónico lento y segmentos sanos de pacientes controles

afectados por cáncer de colon. Se obtuvieron 26 preparaciones de 8 pacientes del grupo de los casos, y 42 preparaciones de colon normal de 14 pacientes controles. Se evaluó in vitro, las respuestas musculares al estímulo eléctrico, antes y después del tratamiento con diversos bloqueadores del sistema nervioso autónomo, NG – nitro L arginina (inhibidor específico de la síntesis de óxido nítrico) y L arginina. Demostraron que el colon de pacientes con estreñimiento de tránsito colónico lento se encontraba más fuertemente inervado por neuronas inhibitorias no adrenérgicas, no colinérgicas en comparación con los segmentos de colon sano. El colón de los pacientes con tránsito colónico lento estaba más fuertemente inervado por neuronas productoras de óxido nítrico en comparación con el colon de los controles. Estos hallazgos sugieren que un aumento de óxido nítrico media a los nervios no adrenérgicos, no colinérgicos inhibidores y juega un papel importante en la dismotilidad observada en el colon de los pacientes con tránsito colónico lento [28].

Por medio de estudios de inmunohistoquímica se ha reportado tanto aumento como disminución de neuronas productoras de óxido nítrico (ON) en pacientes adultos con estreñimiento crónico funcional; otros estudios no han encontrado cambios cuantitativos en las fibras nerviosas productoras de ON en el músculo liso circular de pacientes con tránsito colónico lento [26].

- Células intersticiales de Cajal (CIC)

Se ha aceptado que las células intersticiales de Cajal integran señales neurológicas del sincitio de las células musculares lisas, con el objetivo de garantizar una adecuada motilidad gastrointestinal [27].

Las CIC son un grupo heterogéneo de células de origen mesenquimático. Coordinan diferentes funciones dependiendo de la localización dentro de la pared intestinal y la región específica del tracto gastrointestinal [27].

En general, se sugiere que las células intersticiales de Cajal tienen 3 funciones principales: actuar como marcapasos en la generación de la autoritmicidad del

músculo liso intestinal (actividad de onda lenta), conducir la propagación activa de eventos eléctricos, y mediar la neurotransmisión entérica [23].

Se ha observado que la peristalsis está comprometida en ratones con deficiencia de células intersticiales de Cajal, sugiriendo que estos marcapasos pueden además estar involucrados en reflejos neurales. Existe evidencia de que los reflejos neurales inhibidores y excitadores locales requeridos para el peristaltismo modulan la actividad del marcapasos espontáneo, al afectar el número de sitios de estimulación y la frecuencia de generación espontánea de ondas de calcio estimulación [23].

Debido a su importancia en la motilidad a través del tracto gastrointestinal, anomalías en la densidad y distribución de las células intersticiales de Cajal se han investigado y descrito en la aganglioneosis humana, algunos casos de hipoganglioneosis, pseudo-obstrucción idiopática neonatal y malformaciones anorrectales altas, acalasia, gastroenteropatía diabética, gastroparesia, enfermedad inflamatoria intestinal, así como estreñimiento refractario [23, 27].

Existe un proto-oncogén que codifica al receptor de tirosín kinasa (*c-KIT*) el cual pertenece a una superfamilia de receptores, los cuales son reguladores de la determinación del linaje celular de muchos mamíferos. Este receptor se ha identificado principalmente en la superficie de las células hematopoyéticas, mastocitos y células intersticiales de Cajal donde es especialmente abundante [29].

Diversos estudios han sugerido que la disminución de las CIC está relacionada con el estreñimiento de tránsito lento. Un estudio realizado en adultos utilizando inmunohistoquímica, identificó que la cantidad de CIC en las capas musculares estaba significativamente disminuida respecto a los controles [30].

En 23 adultos con estreñimiento de tránsito colónico lento, el análisis del proto-oncogén *c-KIT*, sugirió tener un rol crucial en el desarrollo de las células intersticiales de Cajal y su actividad como marcapaso. Sin embargo no produjo

ninguna evidencia para una asociación entre las mutaciones en *c-KIT* y el estreñimiento de tránsito colónico lento [17].

Sin embargo otros estudios como el realizado por Tong en 2006, cuyo objetivo fue determinar si la expresión de *c-KIT* mRNA y receptor de *c-KIT* se encontraba disminuido en pacientes con estreñimiento de tránsito colónico lento, mediante el estudio de muestras de colon de estos pacientes, demostró que en este grupo existió una disminución significativa de la expresión del mRNA *c-KIT* y del receptor *c-KIT*, sugiriendo que esta vía de señalización juega un rol importante en la disminución de las CIC en el estreñimiento de tránsito colónico lento [31].

Genes y Polimorfismos.

Aproximadamente el 99.9% de la secuencia de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) de los individuos diferentes es la misma. Una proporción significativa de las diferencias encontradas en los individuos, es decir, sus diferencias fenotípicas y/o susceptibilidad a ciertas enfermedades, radica en el 0.1% de variación; a este tipo de variaciones genéticas se les conoce como polimorfismos genéticos, los cuales representan diferentes formas de la secuencia de ADN [32].

Los factores hereditarios o genes descritos por Mendel en 1865 se han considerado durante mucho tiempo como la unidad de transmisión genética de padres a hijos. Los genes son segmentos de ADN que se expresan o codifican dando lugar a polipéptidos. Es la unidad física fundamental de la herencia [33].

Científicos estadounidenses, entre ellos Watson, iniciaron en 1990 el Proyecto del Genoma Humano, cuyo objetivo era descifrar su secuencia completa. A partir de este proyecto se conoce que el genoma humano contiene entre 30,000 y 35,000 genes, y solo alrededor del 5% participa en la codificación de la información, mientras que la función del resto es hasta ahora desconocida. Por otra parte se reveló la existencia de aproximadamente 10 millones de polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP) [32].

Las mutaciones en cambio, son alteraciones genéticas caracterizadas por grandes reorganizaciones cromosómicas, así como duplicaciones o deleciones de fragmentos y hasta de cromosomas enteros [32].

De esta manera los polimorfismos se distinguen terminológicamente de las mutaciones por su frecuencia. Es decir, las diferentes formas de los polimorfismos (llamados alelos) son más frecuentes que las mutaciones, esto es tienen una frecuencia mayor al 1% en la población [32].

La gran mayoría de los SNPs tienen 2 alelos los cuales están representados por una sustitución de base por otra. En las poblaciones este tipo de alelos se clasifican en alelo principal o “silvestre” y alelo raro o mutante, clasificación basada en la frecuencia observada [32].

Debido a que los humanos son diploides, un individuo puede tener 1 de 3 genotipos: homocigoto para el alelo más frecuente, heterocigoto u homocigoto para el alelo menos frecuente. Actualmente se han catalogado más de 9 millones de variantes en la secuencia de ADN. Se describe que los SNP's se presentan uno por cada 200 pares de bases en el genoma humano [32].

Los estudios de asociación permiten identificar genes relacionados con distintas enfermedades; a partir de esto han surgido pruebas directas e indirectas para la identificación de genes candidatos. En un estudio de prueba directa, el supuesto SNP responsable de una enfermedad es genotipificado directamente. El reto de este tipo de estudios es predecir o determinar a priori cuales SNP's son los responsables del fenotipo de interés. Los estudios indirectos de asociación genética se basan en un análisis de ligamiento genético el cual utiliza “marcadores neutrales” y no hace predicciones sobre la localización del gen responsable de la enfermedad en estudio [32].

A partir de las pruebas indirectas existen dos estrategias que han sido utilizadas para identificar los genes y los polimorfismos que están implicados con el desarrollo de ciertas enfermedades: el análisis de ligamiento y estudios de asociación de genes candidatos [32].

El análisis de ligamiento requiere del reclutamiento de familias afectadas, mientras que el estudio de genes candidatos es probado por estudios de asociación de sujetos no relacionados [32].

Nuestra investigación pertenece a este último grupo de estudios, en los cuales se buscan polimorfismos individuales de genes implicados en la patogénesis de la enfermedad, y así determinar si existe algún tipo de relación con ella, para lo que primero se deben identificar genes candidatos que se crea o se sepa son importantes en la patogénesis de una condición (previamente identificados en el estudio de García B 2007). Este tipo de genes pueden ser candidatos debido a un extenso estudio de la enfermedad y/o comparando los niveles de expresión génica en tejidos normales y enfermos; el siguiente paso es identificar los diferentes polimorfismos sobre el gen que pudiera estar afectando su función (también previamente identificados en el estudio de García B 2007), y finalmente examinar si los polimorfismos elegidos ocurren más frecuentemente en individuos que tienen la enfermedad con respecto a una población control [32].

Una de las ventajas de este tipo de estudios de asociación es que los sujetos de estudio son individuos no relacionados, y no se requieren datos fenotípicos ni genotípicos de múltiples generaciones; sin embargo una asociación positiva puede no ser debida siempre a un papel causal de polimorfismo [32].

Durante este trabajo ya se ha hablado previamente del estudio realizado por García B en 2007, en el cual se estudió a 35 familias de niños con estreñimiento definido con los criterios de Roma II. En los casos y sus padres se evaluaron los genes que codifican para neurotransmisores intestinales (TAC1, TAC3, VIP), los genes que codifican sus receptores (TACR1, TACR2, TACR3) y los genes *KIT* y *NOS1*, mediante la investigación de 117 SNPs distribuidos entre estos genes [6].

Los resultados se compararon con los datos genéticos obtenidos del proyecto HapMap basados en el análisis de 30 tríos (padres e hijos) de ascendencia europea [6].

Cinco SNPs mostraron una asociación con el estreñimiento de tránsito colónico lento [6]:

TACR1: rs3771863

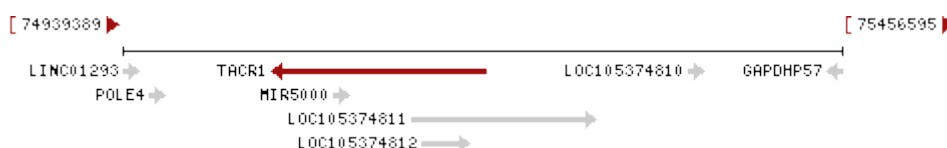
TACR3: rs4580655 y rs11722288

KIT: rs4563545

NOS1: rs3782221

A continuación se describirán los genes y polimorfismos que se estudiarán para la identificación de su asociación con el estreñimiento crónico funcional en población pediátrica en este trabajo.

Gen del receptor de tacquicinina 1 (TACR1); se encuentra en el cromosoma 2p12. Este gen pertenece a la familia de los receptores de tacquicininas; estos receptores de tacquicininas se caracterizan por la interacción con proteínas G que tiene 7 regiones transmembrana hidrofóbicas. El gen codifica para el receptor de tacquicinina 1 también conocido como gen receptor de sustancia P o neuroquinina 1. También codifica una proteína que interviene en el metabolismo del fosfatidilinositol de la neuroquinina 1 [34].

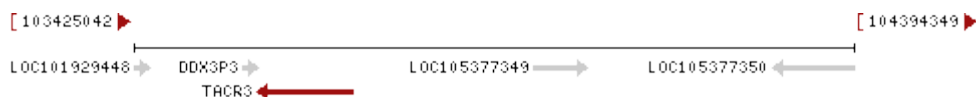


Polimorfismo rs3771863. Este representa el cambio de C por T y se localiza en el intron 1 del gen *TACR1* [35]

TTTCTTGTGTGATAGGACTCTTA[C/T]ATTGCTTTTCTGCCTCCAATGACAG

Gen del receptor de taquicinina 3. El gen del receptor de taquicinina 3 (*TACR3*) es también conocido como el receptor de neuroquinina 3 y se encuentra en la región del cromosoma 4q24. Este gen pertenece a la familia de genes que

funcionan como receptores de tacquicininas. Las afinidades del receptor son específicas para la variación de la secuencia 5'-fin; además tiene interacciones con la proteína G y 7 regiones hidrofóbicas transmembrana. Este gen codifica para el receptor de neuroquinina 3, también conocida como receptor de neuroquinina B. [36]



Polimorfismo rs4580655. Este representa el cambio de A por G y se localiza en el intrón 3 del gen *TACR3* [37].

AAATGACACACGCACTCATATGTTCA[AG]TTACCACGCTATTCACAATAGCAAA

Polimorfismo rs11722288. Este representa el cambio de A por G y se localiza en el intrón 3 del gen *TACR3* [38].

CATCCACACCTCAGTAAGTGTCATC[AG]TCATCTATCTGACTGCCAGAGACAG

Gen c-KIT Hardy-Zuckerman 4 oncogén homólogo del sarcoma viral felino. El gen *c-KIT* Hardy-Zuckerman 4 oncogén homólogo del sarcoma viral felino (*c-KIT*); da instrucciones para producir proteínas llamadas receptor de tirosina-kinasas y que se encuentra en el cromosoma 4q11-q12. Estas transmiten señales de la superficie celular hacia el interior de las células a través de un proceso llamado transducción. Las proteínas *KIT* se encuentran en la membrana celular de cierto tipo de células donde una proteína específica, llamada factor de células madre se une a ella. Esta unión activa las proteínas *KIT* las cuales activan otras proteínas dentro de la célula al añadir átomos de oxígeno y fosfato en posiciones específicas (fosforilación) con lo que se activan múltiples proteínas en la vía de señalización. Esto es importante para ciertos tipos celulares como las células reproductivas, células madres hematopoyéticas, células inmunes, células del tracto gastrointestinal llamadas células intersticiales de Cajal y los melonacitos. En el tracto gastrointestinal la

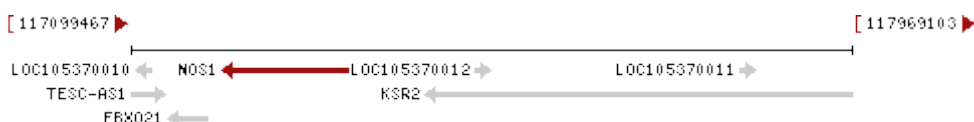
proteína producida por el gen *KIT* participa como proteína receptora en las células intersticiales de Cajal [39].



Polimorfismo rs4563545. Este representa el cambio de C por T y se localiza en la posición 50 kb “upstream” del gen *KIT* [40].

GAGACTCTTGAAGTTAAGGATGACA[C/T]TTAATTAATTATTGGATATTCTAGG

Gen óxido nítrico sintetasa 1. El gen óxido nítrico sintetasa 1 (*NOS1*) produce una proteína que pertenece a la familia de óxido nítrico sintetasa, la cual sintetiza óxido nítrico a partir de L-arginina; se encuentra situada en el cromosoma 12q24.22. El óxido nítrico es un radical libre que actúa como mediador biológico en varios procesos los que incluyen neurotransmisión, actividades antitumorales y antimicrobianas. En el cerebro y sistema nervioso periférico se comporta como neurotransmisor y ha sido implicado en la neurotoxicidad asociada a eventos vasculares cerebrales o enfermedades neurodegenerativas; en el tracto gastrointestinal regula al músculo liso que incluye peristaltismo y erección del pene. Esta proteína se expresa de manera ubícu, con alto nivel de expresión en el músculo esquelético. Varias variantes de transcripción que difieren en el 5´UTR se han descrito para este gen, pero la naturaleza de la longitud completa de estas transcripciones no se conoce. Adicionalmente se han encontrado variantes de transcripción empalmadas alternativamente que codifican diferentes isoformas. [41].



Polimorfismo rs3782221. Este representa el cambio de A por G y se localiza en la posición 5´ UT del gen *NOS1* [42].

CCGCACAGACCCACAGAACCTGAGT[A/G]ACAGGCAACACATGAAGTCTTGCA

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estreñimiento funcional es un problema común en los pacientes pediátricos, con una prevalencia estimada alrededor del mundo del 3%. [4]. Constituyendo una de las 10 principales causas de la consulta pediátrica y el 25% de los motivos de consulta del gastroenterólogo pediatra [9]. En México un estudio realizado en pacientes en edad escolar reporta una prevalencia de 12.6% siendo el más común de los trastornos gastrointestinales funcionales [1] con un impacto negativo en la calidad de vida.

La prevalencia del estreñimiento funcional es alta en pediatría. En la etiología la agregación familiar es importante. La fisiopatología subyacente a este fenómeno no es clara.

En 2007, García B y colaboradores, identificaron 5 polimorfismos genéticos en relación con estreñimiento de tránsito colónico lento distribuidos en genes que codifican para neurotransmisores intestinales (TAC1, TAC3, VIP), genes que codifican sus receptores (TACR1, TACR2, TACR3) y los genes *KIT* y *NOS1*. Estos 5 polimorfismos fueron identificados como: En el gen *TACR1*: *rs3771863* En el gen *TACR3*: *rs4580655* y *rs11722288*. En el gen *KIT*: *rs4563545* y por ultimo en el gen *NOS1*: *rs378222*. El polimorfismo *TACR1 rs3771863* se ha fue el que tuvo una mayor asociación con estreñimiento funcional, pero no fue posible establecer una relación definitiva [6].

Hasta la fecha y hasta nuestro conocimiento no se ha realizado algún otro estudio que replique estos resultados en población pediátrica, y por otro lado, para que la relación sea más contundente, es necesario buscar la presencia de los mismos polimorfismos en grupo control sin estreñimiento. Por tanto establecer una clara asociación entre estos polimorfismos genéticos y la presencia de estreñimiento funcional aun no es posible. En México se desconoce la prevalencia de estos polimorfismos en la población general y en personas con y sin estreñimiento.

Actualmente se está realizando un proyecto de manera paralela que busca identificar la presencia de estos 5 polimorfismos en población pediátrica con

estreñimiento crónico funcional, por lo que esta investigación, se investigó la presencia de 2 de los 5 polimorfismos en un grupo control de niños sin estreñimiento, para incrementar la validez de los resultados.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la frecuencia de los polimorfismos de los genes Receptor de *Tacquinina 1(rs3771863)* y *Óxido Nítrico Sintetasa Neuronal 1 (rs3782221)* en población pediátrica no estreñida?

V. JUSTIFICACION

- Magnitud: El estreñimiento es el principal trastorno funcional gastrointestinal en pediatría. Se ha demostrado la asociación de 5 polimorfismos genéticos con estreñimiento de tránsito colónico lento, sin embargo el conocimiento es escaso y no existe suficiente evidencia científica para establecer de manera terminante esta asociación. Esta investigación permite el estudio de la fisiopatología subyacente a la agregación familiar como factor predisponente. El identificar los polimorfismos en controles no estreñidos, incrementa la validez de la misma investigación en los casos estreñidos.
- Trascendencia: En México se desconoce la prevalencia de estos polimorfismos en población pediátrica no estreñida. Esta investigación permite el estudio de un grupo control sin estreñimiento que junto con un proyecto que corre paralelamente (número de registro R-2014-1302-54) busca identificar la relación entre polimorfismos genéticos y el estreñimiento funcional en población pediátrica. Los hallazgos intentan brindar una nueva explicación etiológica al estreñimiento funcional y eventualmente el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas
- Factibilidad: El Hospital de Pediatría de la Unidad Médica de Alta Especialidad del Centro Médico Nacional de Occidente, cuenta con una importante afluencia de pacientes pediátricos del occidente del país que acuden por otras patologías o programación de procedimientos quirúrgicos a la toma de muestras en el laboratorio de nuestro hospital,

de los cuales se tomaron las muestras sanguíneas para la determinación de dichos polimorfismos en población pediátrica no estreñida (controles).

- Vulnerabilidad: La selección de los pacientes es a partir de niños que acuden al laboratorio por otros motivos, que se consideran sin estreñimiento en base a encuesta con criterios de Roma IV. Sin embargo son pacientes que acuden a una unidad médica de tercer nivel por lo que no es una población sana.

Una de las desventajas de los estudios de asociación genética es que, una asociación positiva puede no ser debida siempre a un papel causal del polimorfismo. Por ejemplo, puede haber asociaciones de falsos positivos si un grupo étnico diferente (con distinta frecuencia del polimorfismo) está sobre-representado en el grupo de casos o el control.

VI. HIPOTESIS

Al ser un estudio transversal descriptivo no requiere de hipótesis.

VII. OBJETIVOS

General: Determinar la frecuencia de los polimorfismos de los genes *Receptor de Tacquicinina 1(rs3771863)* y *Óxido Nítrico Sintetasa Neuronal 1 (rs3782221)* en población pediátrica sin estreñimiento del occidente del país.

Específicos:

- Calcular las frecuencias alélica y genotípica de los polimorfismos de los genes *Receptor de Tacquicinina 1(rs3771863)* y *Óxido Nítrico Sintetasa Neuronal 1 (rs3782221)* en la población estudiada.
- Describir las características socio-demográficas de los sujetos estudiados.
- Determinar la frecuencia de estreñimiento en familiares de primera línea (mamá, papá y hermanos) de niños sin estreñimiento funcional.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

a) Clasificación del estudio: Transversal descriptivo

b) Universo de estudio: población pediátrica que acudió al laboratorio del Hospital de Pediatría CMNO a toma de muestras sanguíneas por otros padecimientos no abdominales y no relacionados con etiologías conocidas con estreñimiento.

c) Criterios de Inclusión: Pacientes mayores de 4 años y menores de 16 años de edad que acudieron a toma de muestras sanguíneas al laboratorio que no presenten estreñimiento crónico funcional.

d) Criterios de no Inclusión:

- Pacientes que cumplieron con 2 o más criterios de Roma IV para estreñimiento funcional:

** Criterios de Roma IV: para pacientes mayores de 4 años, al menos 2 de los siguientes criterios deben estar presentes al menos una vez por semana por al menos un mes [8]:

- Dos o menos evacuaciones en el baño por semana
- Al menos un episodio de incontinencia fecal por semana
- Historia de posturas retencionistas o retención voluntaria de las heces excesiva
- Historia de evacuaciones dolorosas
- Presencia de materia fecal abundante en el recto
- Historia de evacuaciones anchas de pueden obstruir el baño

En adición, los síntomas no son suficientes para cumplir con los criterios diagnósticos de síndrome de intestino irritable y los síntomas no pueden ser explicados por otra condición médica después de una adecuada evaluación [8]

- Pacientes con patología gastrointestinal o extra-gastrointestinal reconocida como etiología de estreñimiento (Enfermedad de Hirschsprung, acalasia rectal,

diabetes mellitus, hipotiroidismo, malformaciones ano-rectales o espinales, fibrosis quística, hipercalcemia o intolerancia a proteínas de la leche de vaca)

- Antecedente de cirugía abdominal
- Trastornos neurológicos o retraso mental

e) Criterios de exclusión: sujetos cuyas muestras carecían de material genético suficiente o adecuado para el procesamiento molecular.

f) Operacionalización de las variables

Tabla 1. Variables dependientes

Variable	Tipo de variable	Naturaleza	Escala de medición	Indicador	Estadística
Polimorfismo <i>rs3771863</i> del gen <i>receptor de taucinina 1</i>	Dependiente	Cualitativa	Nominal	1.Homocigoto Silvestre 2. Heterocigoto 3.Homocigoto polimórfico	Frecuencia y %
Polimorfismo <i>rs3782221</i> del gen <i>Óxido Nítrico Sintetasa Neuronal 1</i>	Dependiente	Cualitativa	Nominal	1.Homocigoto Silvestre 2. Heterocigoto 3.Homocigoto polimórfico	Frecuencia y %

Tabla 2. Variables independientes

Variable	Tipo de variable	Naturaleza	Escala de medición	Indicador	Estadística
Edad	Independiente	Cuantitativa	Discreta	Años cumplidos	Media y desviación estándar ó mediana y rangos
Sexo	Independiente	Cualitativa	Nominal	Hombre/Mujer	Frecuencia y %
Familiar con estreñimiento (mamá, papa, hermanos)	Independiente	Cualitativa	Nominal	1.Mamá 2. Papá 3. Hermano(a) 4. Ninguno	Frecuencia y %

g) Cálculo del tamaño de la muestra:

Debido a que este estudio forma parte de una línea de investigación y complementa los controles de un protocolo paralelo, se requirieron 60 sujetos según una fórmula para diseños de casos y controles para comparar dos proporciones; los datos para el cálculo se obtuvieron de la frecuencia de polimorfismos en población México – Americana y población general mundial, misma que se obtuvo de Gene Bank. Al desconocerse la frecuencia de polimorfismos en pacientes pediátricos con estreñimiento crónico funcional, se asumió una frecuencia del 50%. Asumiendo pérdidas del 10%, se estima que cada grupo (casos y controles) deberá tener 60 individuos. Nuestro protocolo abarca el grupo de los controles, por lo que se reclutó una muestra mínima de 60 individuos de acuerdo a esta fórmula.

Cálculo del tamaño de la muestra

✓ Fórmula para comparar dos proporciones

$$n = \frac{(p^1q^1 + p^2q^2)(K)}{(p^1 - p^2)^2}$$

p^1 = Frecuencia del polimorfismo en población mexicano-americana

p^2 = 50%

$K = (Z \text{ alfa} + Z \beta)^2$. Significancia 0.05% / Poder 80% → 7.9
a dos colas

✓ ***** 60 pacientes por grupo**

h) Desarrollo del estudio

-Reclutamiento de pacientes.

Se incluyó a todos los pacientes que completaron los criterios de inclusión y en quienes se programen estudios de laboratorio electivos. Se acudió al laboratorio, al momento de la toma de muestras y se seleccionó a los pacientes que cumplieron con criterios de inclusión y se eliminó a aquellos que cumplieron con criterios de no inclusión. Se aplicó el instrumento (encuesta) para no incluir a aquellos pacientes que cumplieran con los criterios de Roma IV, y con el mismo instrumento se obtuvieron datos de identificación, socio-demográficos y clínicos (Anexo 1). Se firmó consentimiento informado y posteriormente se procedió a la toma de muestras sanguíneas, 5 ml en tubo heparinizado por cada individuo.

-Análisis molecular

La identificación de los polimorfismos se llevó a cabo mediante 4 diferentes etapas:

1. *Extracción de ADN genómico.* Para la extracción de ADN genómico, se les tomó una muestra de sangre venosa periférica (5mL). La toma de muestra se realizó en el laboratorio. La extracción de ADN genómico se hizo de acuerdo al método descrito por Gustincich [43].
2. *Cuantificación y determinación de pureza de ADN.* La determinación de la concentración y pureza del ADN extraído se realizó mediante espectrofotometría. Debido a que el ADN se encuentra asociado a proteínas, se debe estimar su pureza, para ello se debe obtener su densidad óptica a las longitudes de onda de 260 y 280 nm, ya que en estas longitudes de onda se obtiene la máxima absorbancia del ADN y de las proteínas, respectivamente. De esta forma, si la relación de densidad óptica 260/280 nm es mayor de 1.7 el ADN tiene una pureza adecuada, mientras que si esta relación es menor de 1.7, esto indica contaminación de la muestra, principalmente por proteínas. La verificación de la integridad del ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con syber green [44]. Una vez que el ADN extraído tuvo las condiciones óptimas, se almacenó a -20°C hasta su procesamiento para la identificación de los polimorfismos.
3. *Amplificación génica por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).* En la identificación de los polimorfismos está implicada la amplificación génica por PCR. Este es un método de síntesis *in vitro* de ácidos nucleicos, por medio de la cual un segmento de ADN es amplificado. Esta metodología involucra iniciadores (oligonucleótidos) que flanquean el fragmento de ADN por ser amplificado, así como ciclos repetidos de desnaturalización para separar la doble hebra de ADN, seguido del alineamiento o apareamiento de los iniciadores a sus secuencias complementarias en las hebras de ADN blanco, y la extensión o polimerización de los iniciadores alineados mediante la *Taq* ADN polimerasa termoestable en dirección 5' a 3', lo que

permite el análisis de secuencias cortas de cantidades muy pequeñas de ADN [45].

4. *RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)*. Es el procedimiento mediante el cual los fragmentos amplificados mediante *PCR* son digeridos con enzimas de restricción. Las enzimas de restricción hidrolizan el ADN de doble hebra en sitios específicos dentro o adyacente a una secuencia particular, conocida como sitio de reconocimiento. Estas enzimas reconocen secuencias que tienen de 4 a 6 nucleótidos en longitud generalmente palindrómicas [44].
5. *PCR* alelo específica: un polimorfismo se identificará por este método.

Tabla3. Iniciadores, fragmento ampliado, enzimas de restricción y fragmentos esperados en la determinación de polimorfismos de interés.

Genes / Polimorfismos	Iniciadores	Técnica	Fragmento ampliado	Enzima de restricción	Fragmentos esperados
TACR1 rs3771863	F 5' CACTGGATTGGGAATACTCAT3' R 5' TGGAAAGTTGAGGGGTTGAAC 3'	RFLP	436 pb	BsrDI	Alelo C 436 pb Alelo G 350 + 86 pb
NOS1	F 5' CTCTGTGAGTAAGATGCAAAG 3' FM 5' AGACTTCATGTGTTGCCTGTT 3' R 5' CAGTGTGGGTTTGTAGTGA 3'	Alelo específico	***	***	Alelo G 426 pb Alelo A 228 pb

-Captura y procesamiento de datos

Se realizó una base de datos en el programa Excel de Office 2010. El análisis estadístico se realizó con ayuda del programa SPSS versión 21.0. Los resultados se presentaron en cuadros y gráficos.

i) Análisis de datos

Se realizó estadística descriptiva de acuerdo del tipo de variables:

- a. Las variables cualitativas se evaluaron con frecuencias y porcentajes
- b. Para las variables cuantitativas se utilizaron medidas de tendencia central y de dispersión, se analizaron de acuerdo a su curva de distribución:

- Si presentaron distribución simétrica se utilizó media y desviación estándar
- Si presentaron curva no simétrica de los datos se utilizó medianas y rangos

IX. ASPECTOS ETICOS

De acuerdo a la Ley General de Salud (1997), título segundo, capítulo I y artículo 17, se considera como un estudio categoría II como “investigación con riesgo mínimo”; sin embargo, dado que se trata de una investigación relacionada al genoma humano se solicitó a los padres o tutores, mediante una carta de consentimiento informado, la autorización para la participación de sus hijos en el estudio.

Se encuentra dentro de las consideraciones éticas de acuerdo al Código de Nuremberg y la Declaración de Helsinki modificada en 2012.

Aprobado por el Comité Local de Investigación y Ética en Salud de la UMAE Hospital de Pediatría CMNO con número de registro R-2017-1302-150.

X. ORGANIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

a) Cronograma de actividades (Anexo 1).

b) Recursos

La Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social cuenta con el personal humano y pacientes para realizar el presente estudio. Así como el apoyo de la Unidad de Investigación del mismo hospital para el análisis genético.

Humanos: Asesor clínico con especialidad en Gastroenterología y Nutrición Pediátrica y actualmente es Doctorante en Ciencias Médicas, Personal de laboratorio y para toma de las muestras; tesista residente de segundo año de Gastroenterología y nutrición pediátrica.

Físicos: Lápices, bolígrafo, hojas blancas, engrapadora, archivero, separadores, Computadora, impresora, programas SPSS versión 21.0, Office 2010: Word, Excel, Power Point.

Financieros: Los costos del estudio son cubiertos por la tesista y asesor.

c) Experiencia del grupo:

El asesor de tesis cursa el doctorado en Ciencias Médicas, cuenta con maestría en nutrición humana y es gastroenterólogo pediatra adscrito al Servicio de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica donde se desarrollará el estudio. De igual manera la tesista es residente de segundo año de Gastroenterología Pediátrica del mismo hospital.

XI. RESULTADOS

Se estudió a un total de 106 sujetos que cumplieron con criterios de inclusión en el periodo especificado de diciembre de 2017 a enero de 2018. De las 106 muestras analizadas, solo en 69 fue posible obtener ADN genético en adecuada concentración y pureza para su posterior amplificación génica por PCR. Las muestras que no fueron adecuadas no contenían suficiente volumen, concentración de ADN, o previamente habían sido procesadas para determinación de citometría hemática.

De los 69 individuos incluidos en el estudio, 41 (60%) fueron del sexo masculino y 28 (40%) del sexo femenino, con una media de edad de 10.8 años, y una mediana de 11 años con rango de 4 a 15.

No fue posible realizar la determinación del polimorfismo *rs3782221* del gen *Óxido Nítrico Sintetasa Neuronal 1*, en este momento nos encontramos en espera de recursos económicos para completar el análisis molecular.

El estudio genético reportó 5 sujetos homocigotos para el polimorfismo *rs3771863* del gen *TACR1* (cambio de Citosina (C) por Timina (T) en el intrón 1 del gen *TACR1*); 26 heterocigotos y 38 homocigotos para el alelo principal o

“silvestre”. Con lo cual se puede calcular las frecuencias genotípicas y alélicas como se demuestra a continuación:

Tabla 1. Frecuencias genotípicas

	Base	Número de individuos	Frecuencia genotípica
Homocigoto polimórfico	T/T	5	7 %
Heterocigoto	T/C	26	38 %
Homocigoto silvestre	C/C	38	55 %
Total		69	100%

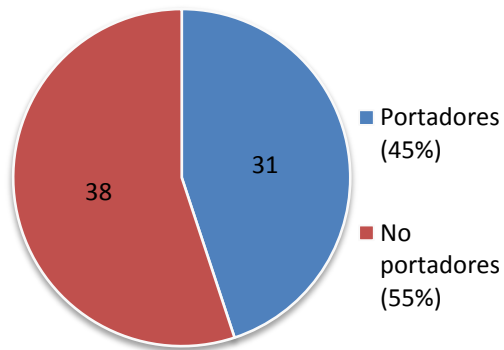
Tabla 2. Frecuencias alélicas

	Homocigotos Polimórficos	Heterocigotos	Homocigotos silvestres	Total	Frecuencia alélica
Timina (T)	5x2 (T)= 10	26x 1(T)=26		36 (T)	26.1%
Citosina (C)		26x1(C)=26	38x2(C)=76	102 (C)	73.9%

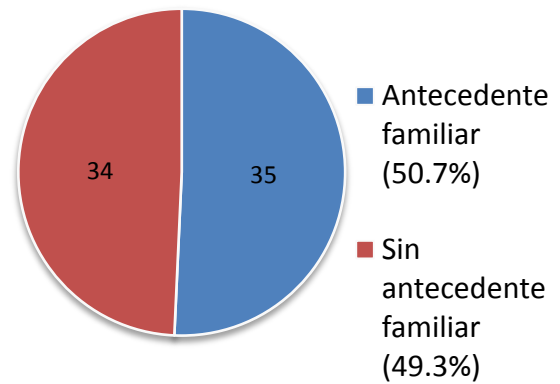
Los sujetos portadores del alelo polimórfico (heterocigotos [C/T] y homocigotos para el polimorfismo [T/T]) sumaron un total de 31, lo que representa el 45% del total de participantes, mientras que los individuos no portadores de alelo polimórfico, es decir los homocigotos para el alelo silvestre, constituyeron un 55% con 38 niños [gráfica 1].

Se determinó que 35 (50.7%) de los controles estudiados tenían uno o más familiares en rama directa (madre, padre o hermanos) afectado(s) con estreñimiento funcional [Gráfica 2]. En 25 sujetos (36%) la mamá padecía estreñimiento, en 17 (24.6%) uno o más hermanos, y solo en 1 individuo (1.4%) el padre era estreñado [Gráfica 3].

Gráfica 1. Frecuencia de portadores del polimorfismo del gen TACR1

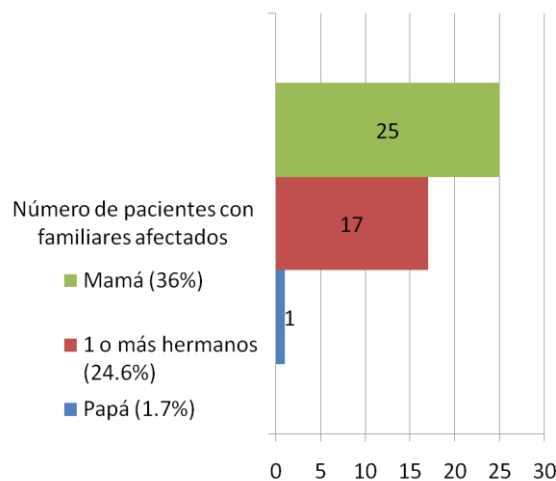


Gráfica 2. Familiares de primera línea con estreñimiento

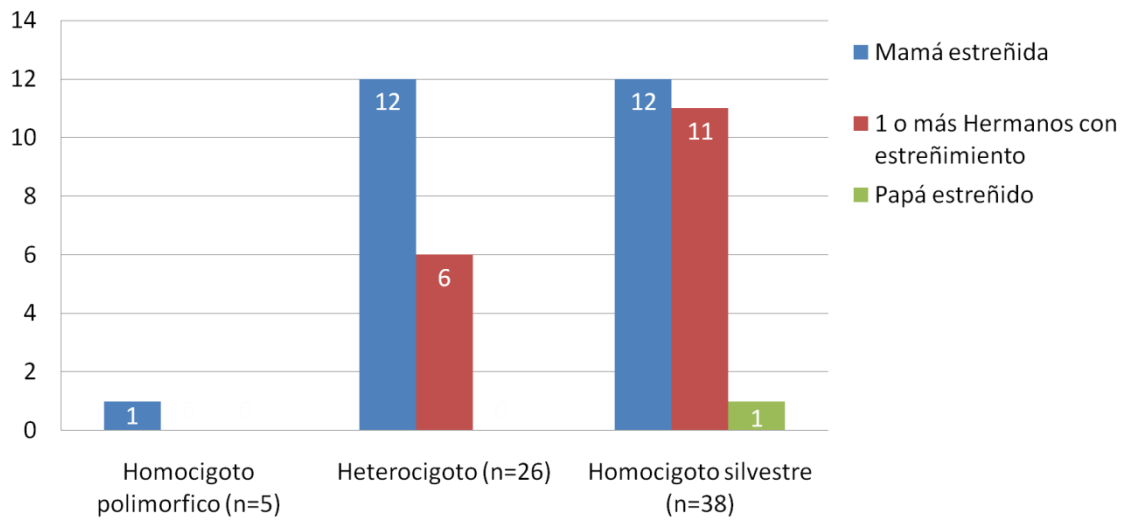


De los sujetos homocigotos para el polimorfismo, solo 1 de 5 (20%) tuvo algún antecedente familiar de estreñimiento. Del total de los heterocigotos, 15 de 26 (57.6%), contaban con algún familiar estreñado (en 12 casos la mamá, y en 6 algún hermano), y de los homocigotos para el alelo silvestre, 19 de 38 (50%) tuvieron algún antecedente familiar de estreñimiento (en 12 individuos la mamá, en 11 algún hermano, y en 1 caso el papá), como se ejemplifica en la gráfica 4 y 5.

Gráfica 3. Tipo de familiar afectado con estreñimiento

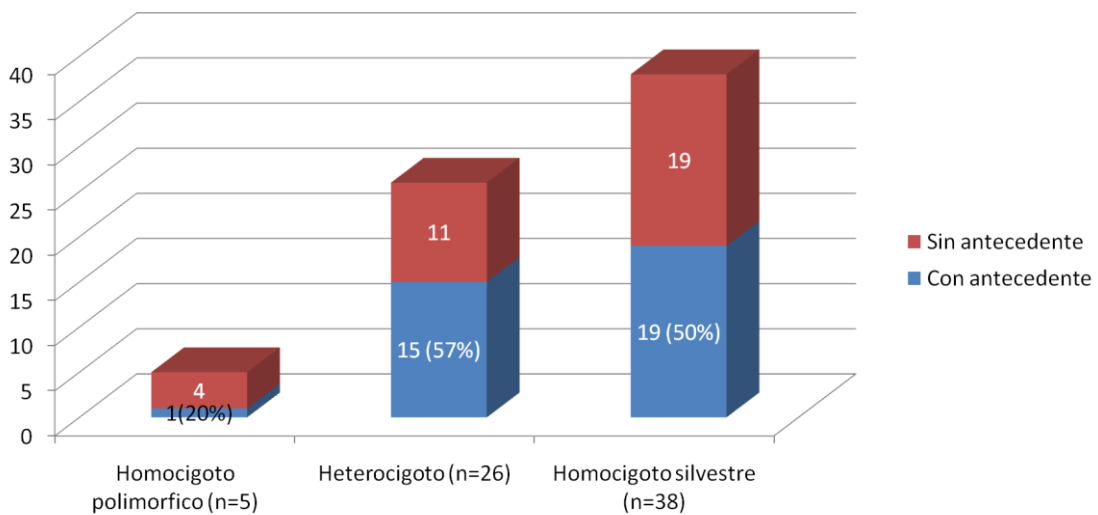


Gráfica 4. Antecedente familiar de estreñimiento por genotipo

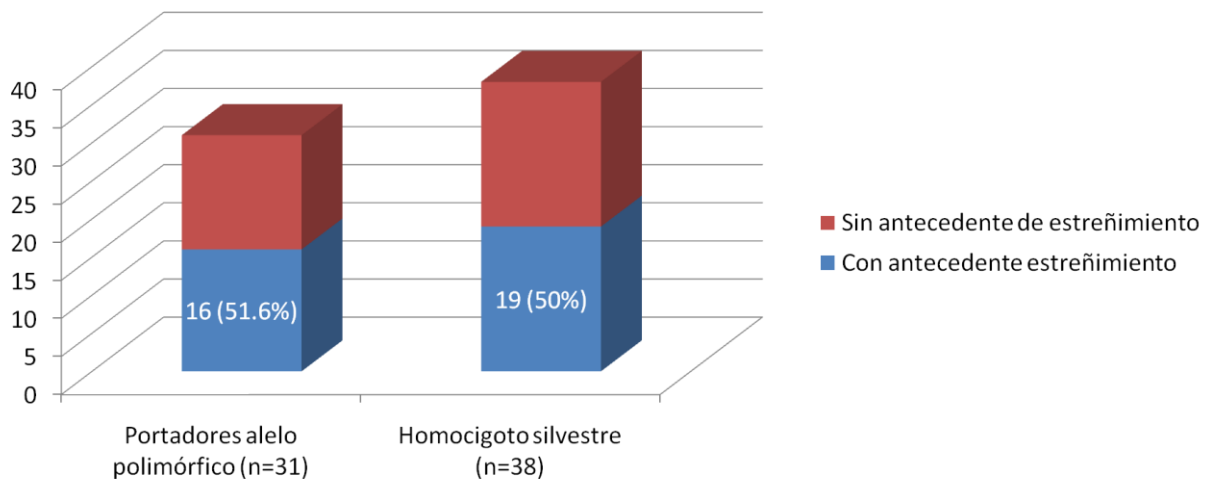


La frecuencia de antecedentes familiares en los sujetos portadores del polimorfismo (heterocigotos y homocigotos para el alelo polimórfico) fue del 51.6%, con 16 individuos de 31; similar a la de los individuos homocigotos para el alelo silvestre fue del 50% con 19 sujetos con algún familiar afectado, del total de 38 pertenecientes a este grupo [Gráfica 6].

Gráfica 5. Porcentaje de individuos con familiares estreñidos por genotipo



Gráfica 6. Antecedente familiar de estreñimiento por portadores del polimorfismo



XII. DISCUSIÓN

Aunque existe un número limitado de estudios sobre estreñimiento funcional y agregación familiar en población pediátrica, se ha demostrado que el estreñimiento funcional ocurre con más frecuencia en familiares de pacientes con estreñimiento que en los controles sanos [17].

En nuestra investigación encontramos que la frecuencia de antecedentes familiares de primera línea (mamá, papá y hermanos) en niños sin estreñimiento es del 50.7%, lo cual nos sugiere que el estreñimiento funcional es un problema de salud de gran prevalencia en nuestro medio. Ya que otras investigaciones sobre agregación familiar en estreñimiento han encontrado frecuencias en familiares de primer grado en sus grupos de controles sanos que oscilan entre 8 y 9% [14, 15], las cuales son representativamente menores a los resultados de nuestro estudio

No obstante debe señalarse que la identificación de estreñimiento en familiares de primer grado en nuestra investigación, se realizó por interrogatorio directo a la persona entrevistada sin aplicar los criterios de Roma IV para los posibles familiares afectados de estreñimiento, lo cual puede sobreestimar la frecuencia de este padecimiento en familiares de primer grado.

Aunque se han publicado numerosos estudios que muestran que la etiología del estreñimiento es extremadamente heterogénea y a pesar de haberse identificado muchos mecanismos predisponentes, entre ellos la agregación familiar como uno de los más importantes, el proceso fisiopatológico subyacente a este fenómeno todavía no es claro. Se sabe que los factores genéticos desempeñan un papel, pero los estudios de asociación y la secuenciación directa de genes, aún no han encontrado alteraciones específicas (mutaciones o polimorfismos) para establecer una relación definitiva con el estreñimiento crónico funcional en la edad pediátrica [17].

Hasta nuestro conocimiento, solo un estudio, publicado por García B. y colaboradores (2007), identificó 5 polimorfismos en los genes *TACR1*, *TACR3*, *KIT* y *NOS1*, los cuales están potencialmente asociados con el estreñimiento de tránsito colónico lento, aunque la importancia de estos resultados no resiste la corrección para pruebas múltiples, como ellos mismos lo afirman en su propia investigación [6], por lo que no se puede establecer una interacción significativa

Aun así afirman que el polimorfismo *rs3771863* en el intrón 1 del gen *TACR1*, mostró la mayor asociación con estreñimiento de tránsito colónico lento ($P = 0.0075$). La frecuencia de este polimorfismo en pacientes y sus familias (madre y padre) fue del 0.175 (17.5%), la cual resulta superior que la reportada en los datos del HapMap (proyecto que pretende establecer catálogo de polimorfismos en la especie humana a partir del estudio de diversas poblaciones de origen africano, asiático y europeo), la cual es del 0.142 (14%) [6].

Nuestro estudio reveló una frecuencia alélica para el mismo polimorfismo del 26%. Considerando que nuestro grupo de estudio es en controles sin estreñimiento, llama la atención que es muy superior a la de las familias con estreñimiento estudiadas en la investigación de García B. Sin embargo es importante señalar que ambas poblaciones son distintas en volumen y origen étnico, ya que la investigación de García B, fue realizada en un grupo de pacientes pediátricos de Australia y todos los sujetos estudiados eran de raza

blanca. Por este motivo no se puede comparar adecuadamente estas poblaciones ni establecer una asociación entre estos datos con el estreñimiento funcional.

Por otro lado, de acuerdo a la base de datos del Reference SNP (refSNP), la frecuencia del alelo menos común o MAF por sus siglas en inglés (Minor Allele Frequency) para el polimorfismo *rs3771863* del gen *TACR1*, es del 36% para la población general según el proyecto 1000 genomas (proyecto mundial que pretende obtener una base de datos que permita establecer la variabilidad genética humana) [34]. Este reporte registra una frecuencia alélica mayor para la población general del mismo polimorfismo que la encontrada en nuestro estudio de sujetos controles sin estreñimiento que es del 26%. A pesar que este hallazgo pudiera estar en relación con que la población no estreñida tiene menos frecuencia de este polimorfismo, esta relación no puede establecerse ya que nuevamente las diferencias en el tamaño de la población estudiada son significativas y los grupos étnicos también son distintos.

En lo referente a las frecuencias genotípicas, cabe mencionar que el 7% de los sujetos estudiados, fueron homocigotos para el polimorfismo en cuestión, lo que sugiere que, el estado homocigoto para el alelo polimórfico, no es un factor determinante para la manifestación de la enfermedad, así como tampoco lo es el estado heterocigoto ya que, como en diversos estudios se ha manifestado la etiología del estreñimiento es extremadamente heterogénea.

De acuerdo a estos hallazgos no se puede establecer la relación entre la presencia del polimorfismo con el antecedente familiar de estreñimiento ya que el 51% de los portadores del alelo polimórfico contaba con algún familiar de primera línea estreñido, que resulta similar con el grupo homocigoto para el alelo silvestre, en los cuales el 50% tuvo algún familiar estreñido.

Como era esperado, el grupo de sujetos homocigotos para el alelo silvestre, representó la mayoría de nuestra población estudiada (55%). Aun así, esto implica que el 45% restante de nuestra población no estreñida, es portadora del alelo polimórfico, ya sea como homocigoto o heterocigoto, lo cual indica que la

frecuencia del polimorfismo es alta, estando presente en casi la mitad de los sujetos no estreñidos. Estos hallazgos muestran que la frecuencia del polimorfismo es alta tanto en nuestro grupo de controles sin estreñimiento como en la población general (de acuerdo a los reportes de las bases de datos internacionales); sin embargo con esta información no se puede establecer, hasta el momento, una asociación de este polimorfismo con el estreñimiento funcional.

No hay, hasta nuestro conocimiento y después de una búsqueda exhaustiva en PubMed, estudios en población mexicana que determinen las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *rs3771863* del gen *TACR1*, tanto en población general como en pacientes con o sin estreñimiento.

Por estas razones se puede decir que para lograr una asociación contundente de este polimorfismo con el estreñimiento es necesario obtener los resultados de las frecuencias alélicas y genotípicas de población pediátrica estreñida y población general mexicana, y compararlas con los resultados de nuestro estudio. Actualmente corre una investigación en paralelo (número de registro R-2014-1302-54) con el grupo de casos estreñidos de la misma población pediátrica del occidente de nuestro país.

A la fecha no hay publicaciones que refuten o confirmen de manera definitiva la presencia de algún polimorfismo en relación con estreñimiento funcional, no obstante, conforme incrementa el conocimiento de la función de los genes y sus defectos, nuestro entendimiento de la fisiopatología del estreñimiento funcional en pediatría se perfeccionará [17].

XIII. CONCLUSIONES

1. La frecuencia del polimorfismo del gen Receptor de *Tacquinina* 1(rs3771863) es alta en niños no estreñidos, por el porcentaje de pacientes portadores en nuestro grupo de estudio. Aun así la frecuencia alélica es discretamente menor a la de la población general según lo reportado en la bibliografía internacional.
2. El presente estudio sugiere que el genotipo homocigoto o heterocigoto para el alelo polimórfico no es determinante para la presencia de estreñimiento funcional.
3. Se requiere la comparación de nuestro grupo de controles con el grupo de casos y un grupo de población general mexicana para determinar la asociación del polimorfismo del gen *Receptor de Tacquinina* 1(rs3771863) con el estreñimiento funcional.

XIV. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Dhroove G, Saps M, García BC, Leyva JA, Rodriguez RL, Velazco BC. Prevalencia de trastornos gastrointestinales funcionales en escolares mexicanos. *Revista de Gastroenterología de México* 2016; 30 (20):1-6.
2. De la Torre ML. Hernandez VG. Estreñimiento funcional en pediatría. *Acta Pediátrica de México* 2014; 35: 411-422.
3. Rajindrajith S, Devanarayana NM, Crispus Perera BJ, Benninga MA. Childhood constipation as an emerging public health problem- *World Journal of Gastroenterology* 2016; 22(30): 6864-6875.
4. Tabbers MM, DiLorenzo C, Berger MY, Faure C, Langendam MW, Nurko S, et al. Evaluation and treatment of functional constipation in infants and children: Evidence-based recommendations from ESPGHAN and NASPGHAN. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2014; 58: 258-274.
5. Dehghani SM, Moravej H, Rajaei E, Javaherizadeh H. Evaluation of familial aggregation, vegetable consumption, legumes consumption, and physical activity on functional constipation in families of children with functional constipation versus children without constipation. *Prz Gastroenterol* 2015;10 (2): 89-93.
6. García BM, King SK, Miao X, So M, Hutson JM, Tam PKH. Application of HapMap data to the evaluation of 8 candidate genes for pediatric slow transit constipation. *Journal of pediatric surgery* 2007;42: 666-671.
7. Benninga MA, Faure C, Hyman PE, St James Roberts I, Schechter NL, Nurko S. Childhood functional gastrointestinal disorders: Neonate/toddler. *Gastroenterology* 2016; 150: 1443-1455.
8. Hyams JS, Di Lorenzo C, Saps M, Shulman RJ, Staiano A, Van Tilburg M. Childhood functional gastrointestinal disorders: Child/Adolescent. *Gastroenterology* 2016; 150: 1456-1468.
9. Remes TJ, Chavez BJ, Gonzalez OB, Heller RS, Montijo BE, Velazco LM, et al. Guías de diagnóstico y tratamiento del estreñimiento en México. *Evaluación y tratamiento del estreñimiento en población pediátrica. Revista de gastroenterología de México* 2011;2 (76): 155-168.
10. Tam YH, Li AM, So HK, Shit KY, Pang KK, Wong YS, et al. Socioenvironmental factors associated with constipation in Hong Kong

- children and Rome criteria III. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 55: 56-51.
11. Zohu H, Yao M, Cheng GY, Chen YP, Li DG. Prevalence and associated factors of functional gastrointestinal disorders and bowel habits in Chinese adolescents: a school based study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011; 53:168-173.
 12. Driessen LM, Kieft de Jong JC, Wijtzes A, Raat H, Moll HA. Preschool physical activity and functional constipation: the Generation R study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013; 57: 768-173
 13. Teitelbaum JE, Sinha P, Micale M, Yeung S, Jaeger J Obesity is related to multiple functional abdominal diseases. *J Pediatr* 2009; 154: 444-446.
 14. Ostwani W, Dolan J, Elitsur Y. Familial clustering of habitual constipation: a prospective study in children from West Virginia. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2010; 50 (3): 287-289.
 15. Chan AO, Hui WM, Lam KF, Leung G, Yuen MF, Lam SK, et al. Familial aggregation in constipated subjects in a tertiary referral center. *The American Journal of Gastroenterology* 2007; 102: 149-152.
 16. Larrosa HA, Colunga RC, García EA, Huesca JC, Macías RR, Vallarta RJ, et al. Agregación familiar para estreñimiento y síndrome de intestino irritable de niños con estreñimiento crónico funcional. *Rev Gastroenterol Mex* 2010; 75 Supl 2: 288-318.
 17. Peeters B, Benninga MA, Hennekam RC. Childhood constipation; an overview of genetic studies and associated syndromes. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* 2011; 25: 73-88.
 18. Glottlieb SH, Schuster MM. Dermatoglyphic (fingerprint) evidence for a congenital syndrome of early onset constipation and abdominal pain. *Gastroenterology* 1986;91 (2): 428-432.
 19. Satiano A, Andreotti MR, Perrotta V, Strisciuglio P. Prevalence of digital arches in children with abdominal pain and constipation. *The Journal of Pediatrics* 1990; 117 (3): 436-436.
 20. Chen B, Knowles CH, Scott M, Anand P, Williams NS, Milbrandt J, et al. Idiopathic slow transit constipation and megacolon are not associated with neurturin mutations. *Neurogastroenterology & Motility* 2002;14 (5): 513-517.

21. Tong WD, Liu BH, Zhang LY, Zhang SB. Analysis of the *c-KIT* gene in patients with slow transit constipation. *Gut* 2006; 55(8): 1207-1208.
22. Rossi E, Villanci V, Fisogni S, Morelli A, Salerni B, Grigolata P, et al. Chromosomal study of enteric glial cells and neurons by fluorescence in situ hybridization in slow transit constipation. *Neurogastroenterology & Motility* 2007; 19 (7): 578-584.
23. Knowles Ch, Martin JE. Slow transit constipation: a model of human gut dysmotility. Review of possible aetiologies. *Neurogastroenterology and Motility* 2000; 12: 181-196.
24. Romero TJ, Frank MN, Cervantes BR, Cadena LJ, Montijo BE, Zarate MF, et al. Sistema nervioso entérico y motilidad gastrointestinal. *Acta Pediátrica de México* 2012; 33 (4): 207-214.
25. Improta G, Broccardo M. Tachykinins: Role in human gastrointestinal tract physiology and pathology. *Current Drug Targets* 2006; 7: 1021-1029.
26. King SK, Sutcliffe JR, Ong SY, Lee M, Koh TL, Wong SQ, et al. Substance P and vasoactive intestinal peptide are reduced in right transverse colon in pediatric slow-transit constipation. *Neurogastroenterology and Motility* 2010; 22: 883-92.
27. Groneberg D, Vosen B, Friebe A. Integrative control of gastrointestinal motility by nitric oxide. *Current Medicinal Chemistry* 2016; 23: 2715-2735.
28. Tomita R, Fujisaki S, Ikeda T, Fukuzawa M. Role of nitric oxide in the colon of patients with slow-transit constipation. *Disease of the Colon and Rectum* 2002; 45(5): 593-600.
29. Chai Y, Huang Y, Tang H, Tu X, He J, Wang T, et al. Role of stem cell growth factor/*c-KIT* in the pathogenesis of irritable bowel syndrome. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2017; 13 (4): 1187-1193.
30. Geramizadeh B, Hayati K, Rahsaz M, Hosseini SV. Assessing the interstitial cells of Cajal, cells of enteric nervous system and neurotransmitters in slow transit constipation, using immunohistochemistry for CD117, PCP9.5 and serotonin. *Hepatogastroenterology* 2009; 56 (96): 1670-1674.

31. Tong WD, Liu BH, Zhang LY, Xiong RP, Liu P, Zhang SB. Expression of *c-KIT* messenger ribonucleic acid and *c-KIT* protein in sigmoid colon of patients with slow transit constipation. *Int J Colorectal Dis* 2005; 20 (4): 363-367.
32. Checa C. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México* 2007; 20 (3): 213-221.
33. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA. *Conceptos de genética*. 8ª ed. Madrid. Pearson Educación, SA. 2006
34. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6869>
35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs3771863>
36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6870>
37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs4580655>
38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs11722288>
39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3815>
40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs4563545>
41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4842>
42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs3782221>
43. Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G, Schneider C, Carninci P. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques* 1991;11:298-300
44. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Preparation and analysis of eukariotic genomic DNA. En: Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T, 3 ed, Vol 1. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor, pp 5.1-5.9, 2001; pp 6.1-6.62
45. Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1985;48:487.

XI. ANEXOS

Anexo1. Cronograma de actividades

	Nov Dic	Ene Feb	Mar Abril	May Ago	Sep Oct	Nov Dic	Dic Ene	Feb
Selección de la bibliografía	xxx	xxx						
Elaboración del protocolo			xxx	xxx	xxx			
Autorización por comité de Investigación y Ética						xxx		
Recolección de datos							xxx	
Análisis estadístico y conclusiones								xxx
Presentación del protocolo al comité de ética								xxx
Impresión de la tesis								xxx

Anexo 2. Hoja de Recolección de Datos

Datos generales

Nombre del participante::	
Número de afiliación:	
Fecha de llenado:	Fecha de nacimiento:
Sexo: Femenino Masculino	Grupo: Casos
Teléfono celular	Teléfono particular

Datos clínicos:

Criterios de Roma IV para >4 años	Sí	No
<i>≥ de dos criterios con duración de 8 semanas, haber alcanzado los htos del desarrollo de 4 años y que no cumpla con criterios para síndrome de intestino irritable</i>		
- ≤ 2 evacuaciones en el baño por semana		
-1 episodio de incontinencia fecal 1 vez por semana		
- Postura retencionista o retención voluntaria de heces		
- Historia de evacuaciones dolorosas		
- Presencia de masa fecal abundante o voluminosa en recto		
- Historia de heces anchas que pueden obstruir el inodoro		
≥ 2 criterios al menos una vez por semana por al menos 1 mes		

Asociación familiar:

Papá estreñido	Si () No ()	Mamá estreñida	Si () No ()
Hermanos estreñidos	Si () No ()	Hermanas estreñidas	Si () No ()
Número:		Número:	

Resultados de polimorfismos (SNP):

SNP TACR1 rs3771863	Presente	Ausente	SNP TACR3 rs4580655	Presente	Ausente
SNP TACR3 rs4580655	Presente	Ausente	SNP KIT rs4563545	Presente	Ausente
SNP NOS1 rs3782221	Presente	Ausente			

Anexo 3. Carta de consentimiento informado



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLITICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
(NIÑOS Y PERSONAS CON DISCAPACIDAD)

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

Nombre del estudio:	“Frecuencia de Polimorfismos de los genes Receptor de <i>Tacquinina 1(rs3771863)</i> y <i>Óxido Nítrico Sintetasa Neuronal 1 (rs3782221)</i> en población pediátrica sin estreñimiento”						
Patrocinador externo (si aplica):	Ninguno						
Lugar y fecha:	Guadalajara, Jalisco, México; septiembre- octubre del 2017						
Número de registro:	Aprobado por el Comité Local de Investigación y Ética en Salud de la UMAE Hospital de Pediatría CMNO con número de registro R-2017-1302-150						
Justificación y objetivo del estudio:	Se ha demostrado asociación del estreñimiento funcional con 5 alteraciones genéticas (a las que llamaremos polimorfismos) aunque la evidencia científica es escasa. Esta investigación permitirá el estudio de un grupo control que junto con un proyecto que corre paralelamente (número de registro R-2014-1302-54) busca identificar la asociación entre polimorfismos genéticos y el estreñimiento funcional en población pediátrica. El objetivo del presente estudio es buscar la existencia de alteraciones genéticas (polimorfismos), en el material genético encargado de los movimientos gástricos e intestinales, en niños sin estreñimiento funcional.						
Procedimientos:	Aplicación de un cuestionario y toma de 5 ml de muestra sanguínea por punción con aguja y jeringa para análisis genético.						
Posibles riesgos y molestias:	Dolor, enrojecimiento, infección, hinchazón, colección de sangre en piel y sangrado en el sitio de punción.						
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	Identificación de polimorfismos relacionados con el estreñimiento						
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna como a responder cualquier pregunta y aclarar dudas que le planteé (siendo la persona responsable del paciente) acerca de los procedimientos que se llevaran a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación. Se brindaran resultados vía telefónica una vez obtenidos. No se requiere manejo terapéutico para su realización						
Participación o retiro:	Es voluntario el ingreso al estudio y se permitirá el retiro del protocolo en cualquier momento que el familiar lo solicite.						
Privacidad y confidencialidad:	Los resultados serán confidenciales guardando privacidad de los datos.						
En caso de colección de material biológico (si aplica):	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 10%;"><input type="checkbox"/></td> <td>No autoriza que se tome la muestra.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Si autorizo que se tome la muestra para este estudios y estudios futuros.</td> </tr> </table>	<input type="checkbox"/>	No autoriza que se tome la muestra.	<input type="checkbox"/>	Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.	<input type="checkbox"/>	Si autorizo que se tome la muestra para este estudios y estudios futuros.
<input type="checkbox"/>	No autoriza que se tome la muestra.						
<input type="checkbox"/>	Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.						
<input type="checkbox"/>	Si autorizo que se tome la muestra para este estudios y estudios futuros.						
Disponibilidad de tratamiento médico en derechohabientes (si aplica):	Dado que se trata de sujetos no estreñidos, no requieren tratamiento médico a pesar de poseer el polimorfismo						
Beneficios al término del estudio:	Identificación de polimorfismos relacionados con estreñimiento						
En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:							
Investigador Responsable:	Dra. Andrea Livier Barajas Castro (01 33) 3617 0060 ext. 31727						
Colaboradores:	Dr. Sergio Pacheco Sotelo						
En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque “B” de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx							

Nombre y firma de ambos padres o
tutores o representante legal

Testigo 1

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre, dirección, relación y firma

Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio.

Clave: 2810-009-013