



---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

EPIDEMIOLOGÍA CLÍNICA

---

**T I T U L O**

Cuantificación y comparación de la expresión de los genes HNF4 $\gamma$  y SCD1 en pacientes adultos con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI) activos, en remisión y un grupo control.

**P R E S E N T A**

Nallely Bueno Hernández

**T U T O R**

Dr. Jesús Kazuo Yamamoto Furusho

**T E S I S P A R A O B T E N E R E L G R A D O D E**

Maestra en Ciencias de la Salud

México D.F., Marzo del 2011.



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.



**La presente tesis fue realizada en la Clínica de  
Enfermedad Inflamatoria Intestinal; Gastroenterología  
INCMNSZ; México, DF.**

*Doy gracias a Dios por permitirme terminar satisfactoriamente una parte importante de mi proyecto de vida con salud y felicidad.*

*Gracias a mi mamá por su infinito apoyo a lo largo de toda mi vida y especialmente en la realización de esta maestría.*

*Al Dr. Kazúo por toda su ayuda en la realización de este trabajo y sobre todo porque confió en mí para formar parte de su equipo de trabajo.*

*Y un agradecimiento muy especial a todos y cada uno de mis compañeros de maestría por compartir conmigo esta experiencia y brindarme su valiosa amistad.*

**CONTENIDO**

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>	<b>10. RESULTADOS</b>	<b>15</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>	<b>11. DISCUSIÓN</b>	<b>18</b>
1.1. Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática	2	<b>12. CONCLUSIONES</b>	<b>21</b>
1.2. Factor Nuclear 4γ del Hepatocito	5	<b>13. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>22</b>
1.3. Esteroil CoA Desaturasa	6	<b>ANEXOS</b>	<b>25</b>
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>10</b>	ANEXO 1. GLOSARIO	25
<b>3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>10</b>	ANEXO 2. CLASIFICACIÓN DE VARIABLES	26
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>10</b>	ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO	27
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>11</b>	ANEXO 4. PCR-TIEMPO REAL	30
5.1. Objetivo general	11	ANEXO 5. SONDAS UTILIZADAS	31
5.2. Objetivo específico	11	ANEXO 6. LISTA DE MATERIAL	33
<b>6. HIPÓTESIS</b>	<b>11</b>	ANEXO 7. METODOS	35
<b>7. DISEÑO DEL ESTUDIO</b>	<b>11</b>		
<b>8. SEDE</b>	<b>11</b>		
<b>9. MÉTODO</b>	<b>14</b>		
9.1. Unidades de observación	12		
9.2. Tamaño de muestra	12		
9.3. Criterios de inclusión	12		
9.4. Criterios de exclusión	12		
9.5. Preceptos éticos	12		
9.6. Diseño metodológico	13		
9.7. Métodos del procesamiento de biopsias	13		
9.8. Análisis estadístico	13		
9.9. Diagrama de flujo del diseño metodológico	14		

## RESUMEN

**Introducción:** La Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI) es una forma de Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), caracterizada por inflamación intestinal recurrente en la mucosa del colon, de etiología desconocida; sin embargo, factores como la expresión de los genes HNF4 $\gamma$  y SCD1 pudieran participar como factores de transcripción modulando otros genes ya identificados en procesos inflamatorios o como coenzimas involucradas en la activación de citocinas proinflamatorias respectivamente. Por lo que el objetivo de este estudio fue cuantificar y comparar la expresión de HNF4 $\gamma$  y SCD1 en pacientes con CUCI activos, en remisión y un grupo control.

**Métodos:** Se incluyeron 30 pacientes con CUCI activos, 30 en remisión y 30 controles, se tomaron biopsias de colon donde se analizó la expresión relativa de HNF4 $\gamma$  y SCD1 por PCR en Tiempo Real y se compararon las expresiones de los activos y remisión, con el grupo control.

**Resultados:** La expresión de HNF4 $\gamma$  se encontró significativamente disminuida en los pacientes con CUCI activos en comparación con los sujetos sanos ( $p=0.03$  y  $p=0.01$ ). SCD1 se expresó menos en los pacientes con CUCI activos en comparación con pacientes en remisión ( $p=0.045$  y  $p=0.063$ ). Lo cual sugiere que ambos genes se pudieran participar en la inflamación idiopática de los pacientes con CUCI activos y en remisión.

**Conclusiones:** La expresión de HNF4 $\gamma$  se encontró significativamente disminuida en los pacientes con CUCI activos en comparación con los sujetos sanos y con CUCI en remisión y SCD1 se expresó menos en los pacientes con CUCI activos en comparación con pacientes en remisión y el grupo control.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática

La Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI) es una enfermedad crónica que junto con la Enfermedad de Crohn (EC) forman parte de lo que se conoce como Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) clínicamente caracterizada por recurrente inflamación intestinal, en la CUCI ésta se presenta a nivel de mucosa intestinal y afecta únicamente al colon desde ciego hasta ano. Puede cursar con periodos de actividad que se conocen como brotes o recaídas en los cuales se presenta inflamación de la mucosa, ulceraciones, depleción de la mucina, infiltrados de leucocitos polimorfonucleares y congestión vascular intensa, a diferencia de la fase inactiva o remisión en la cual solo se presenta distorsión de la arquitectura de la mucosa, algunos cambios metaplásicos, hiperplasia de folículos linfáticos, infiltrado predominante de mononucleares e hiperplasia de células endocrinas; estos periodos de remisión pueden durar días, meses o incluso años y presentarse de manera espontánea o por respuesta al tratamiento farmacológico (Sanjurjo-García y col. 2007; Sartor, 1997; Yamamoto-Furusho, 2009).

El diagnóstico de la CUCI se puede realizar por diferentes técnicas con el fin de tener un diagnóstico certero y poder diferenciar entre CUCI (activa o remisión) y EC.

**1. Datos clínicos:** Síntomas como diarrea sanguinolenta con urgencia y tenesmo, fiebre, pérdida de peso, moco con sangre en heces y en algunos pacientes se presentan algunos signos graves como: fiebre elevada, afectación del estado general, retraso del crecimiento (especialmente en niños), distensión abdominal, timpanismo y dolor abdominal a la palpación, puede tener complicaciones como cáncer de colon e incluso algunas manifestaciones extraintestinales como: Pioderma gangrenoso, conjuntivitis, uveitis, artropatía periférica, colangitis esclerosante primaria (Medina y col. 2008).

**2. Radiografía o Tomografía Axial Computalizada (TAC):** Puede revelar la existencia de obstrucción intestinal incompleta, megacolon tóxico o dilatación del colon. En el caso de la TAC se puede valorar el engrosamiento de la pared intestinal, las alteraciones de la densidad de la grasa mesentérica, la presencia y tamaño de nódulos linfáticos, la existencia de fístulas, abscesos, manifestaciones hepáticas y renales.

**3. Endoscopia:** Revela la existencia de eritema, superficie granular, friabilidad, exudado mucopurulento, hemorragia espontánea, ulceraciones y ocasionalmente pueden observarse pseudopólipos.

**4. Biopsia:** Considerada el estándar de oro ya que puede revelar cambios epiteliales, en la arquitectura de la mucosa y de la lámina propia, típicamente se encuentra eritema, pérdida del patrón vascular fino, granulación de mucosa y edema (Sanjurjo-García y col. 2007).

La EII es una alteración que se ha extendido a nivel mundial de forma progresiva, hasta el 2002 afectaba aproximadamente a 3.5 millones de individuos, sin embargo, la incidencia y prevalencia de la CUCI varía ampliamente dependiendo de factores como: grupo étnico y localización geográfica, se ha descrito que la población de origen Judío, Español y Japonés tiene una mayor predisposición genética a padecer esta enfermedad. Un estudio realizado en población Mestiza-Mexicana correlacionó la presencia del gen HLA-DR1 con mayor susceptibilidad genética para desarrollar la CUCI, esto definiendo Mestizo, como a individuos nacidos en México las 2 últimas generaciones. (Yamamoto-Furusho, 2003).

En la actualidad a nivel mundial se reportan de 10 a 20 casos nuevos por cada 100.000 habitantes relacionado a múltiples factores. (Gower - Rousseau y col. 1994; Yamamoto-Furusho, 2009). Un estudio realizado para detectar

frecuencia de casos nuevos enfermos de CUCI en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) en el periodo de 1987 al 2006, mostró que durante los primeros 10 años se presentaron 28.8 casos nuevos por año y para los 10 años subsecuentes la incidencia aumentó significativamente a 76.1 casos nuevos por año, con mayor frecuencia en pacientes entre 21 y 30 años y población femenina (Yamamoto-Furusho, 2009).

La etiología de la CUCI hasta el momento es desconocida debido a que existen múltiples factores que se han relacionado con la aparición y evolución de la enfermedad sin embargo, hasta el momento no existe una causa específica que determine la aparición de la inflamación en estos pacientes (Hanauer, 2004).

Las principales teorías son:

1. Agentes infecciosos (Knigge y col. 2005; Liu y col. 2002)
2. Mucosa intestinal defectuosa contra antígenos luminales (Gionchetti, 2006)
3. Factores ambientales mediados por componentes del sistema inmunológico (Annese, 2006; Knigge y col. 2005; Watanabe y col. 2007).
4. Susceptibilidad genética (Sartor, 1997).

Diferentes estudios han demostrado la estrecha relación que existe entre la patogénesis de la EII y la expresión de genes que al combinarse con factores ambientales y/o nutricionales pueden propiciar el desarrollo de la EII actuando en la inmunidad innata, como moléculas presentadoras de antígeno, en la integridad del epitelio intestinal, como transportadores de membrana y células de unión (Ferguson y col. 2007; Yamamoto-Furusho, 2007).

La integridad del intestino pudiera también estar mediada por 2 genes de los que se ha descrito su participación como cofactores en procesos anti o proinflamatorios así como factores de transcripción con otros genes involucrados en la EII.

## 1.2. Factor Nuclear 4γ del Hepatocito (HNF4γ)

HNF4γ es un gen localizado en el cromosoma 8, perteneciente a la familia receptores nucleares (HNF4) que actúan en sitios de iniciación transcripcional, regulando así la función y expresión de otros genes con características inflamatorias y de formación embrionaria del intestino de modelos animales, se ha detectado su expresión en diferentes órganos como: riñón, hígado, páncreas, testículos, intestino delgado y colon, HNF4γ actúa de forma homóloga a HNF4α, sin embargo, este último ha presentado mayor expresión y actividad transcripcional (Drewes y col. 1996; Taraviras y col. 2000).

Hasta el momento se desconoce la función específica de HNF4γ sin embargo, en un estudio describe la presencia de ligandos de ácidos grasos en su estructura y su participación homodímera con HNF4α lo cual le pudiera permitir a ambos la capacidad de actuar como factores de transcripción o coactivadores de diferentes rutas como la del óxido nítrico, del que se ha reportado que cuando su producción desciende induce vías de inflamación (Wisely y col., 2002; Vossen y col. 2002).

Regiones específicas de HNF4α se han asociado con cambios en la integridad del epitelio intestinal y por consecuencia en la patogénesis de la CUCI, un estudio realizado con biopsias de varias regiones de colon, en 42 pacientes con CUCI y EC, así como en modelos animales, determinó que la expresión de este gen se encuentra significativamente disminuida y mayor presencia de síntomas clínicos de la EII tanto en los ratones como en humanos (The UK IBD Genetics Consortium y col. 2009; Sung y col. 2008).

La expresión de HNF4γ aún no se ha determinado si también pudiera estar disminuida en pacientes con CUCI sin embargo, se realizó un estudio con 36 muestras de pacientes con CUCI y EC donde se analizaron aproximadamente 400

genes que pudieran expresarse diferente a lo normal y se encontró que en muestras con CUCI la expresión de genes que regulan la biosíntesis, metabolismo y transporte electrolítico se encontraban significativamente alterados, entre estos HNF4 $\gamma$ , el cual mostró una expresión significativamente disminuida, esto fue medido con 2 técnicas: 1) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real, utilizada para medir la expresión relativa del ARN mensajero (ARNm) gen blanco en función a la expresión de otro gen de referencia denominado constitutivo (por ejemplo GAPDH) (Costa J, 2004) y 2) Microarreglos, utilizada para medir alteraciones en la expresión de un gran número de genes (Wu y col., 2007).

### **1.3. Esteroil CoA Desaturasa (SCD1)**

La SCD1 es un gen localizado en el cromosoma 10 en la región 10q24.31 que tiene una función enzimática en el catabolismo y biosíntesis de ácidos grasos monoinsaturados a partir de ácidos grasos saturados, por lo que ha descrito que su actividad pudiera ser modificada con nutrimentos específicos (Petersson y col. 2008). La expresión de SCD1 se ha identificado tanto en modelos animales (ratones) como en humanos compartiendo una homología de aminoácidos del 85% (Wang y col., 2005). En humanos se ha descrito su expresión principalmente en hígado sin embargo, dada su relación con el metabolismo de lípidos, glucosa y obtención de energía también se han realizado estudios para identificar su expresión y posible función a nivel de riñón, páncreas e intestino, así como en procesos de obesidad, diabetes, aterosclerosis, adenocarcinomas, aterosclerosis, hipertrigliceridemia, dislipidemias y EII (Attie y col. 2002; Kazuhisa y col. 2005; Savrasky y col. 2008; Warensjö y col. 2007).

Existe una estrecha relación entre este gen y una inflamación crónica, en un estudio donde midieron los niveles sanguíneos de diferentes ácidos grasos para medir de manera indirecta la actividad de SCD1, concluyen que este correlaciona

significativamente con marcadores de inflamación ( $p=0.001$ ), y por tanto en la función endotelial en adultos mayores, así como también que los ácidos grasos saturados y carbohidratos pueden influenciar la actividad de SCD1. Por otra parte concluyen que en humanos algunos tratamientos para control de glucosa incrementan la expresión del ARNm de SCD1 (Pintersson y col. 2008). En tejido hepático se estudió la actividad de SCD1 por medio de receptores que integran la respuesta metabólica e inflamatoria en obesidad y diabetes donde se encontró que la expresión disminuye significativamente y aumenta la presencia de ácidos grasos de cadena larga (Kazuhisa y col. 2005).

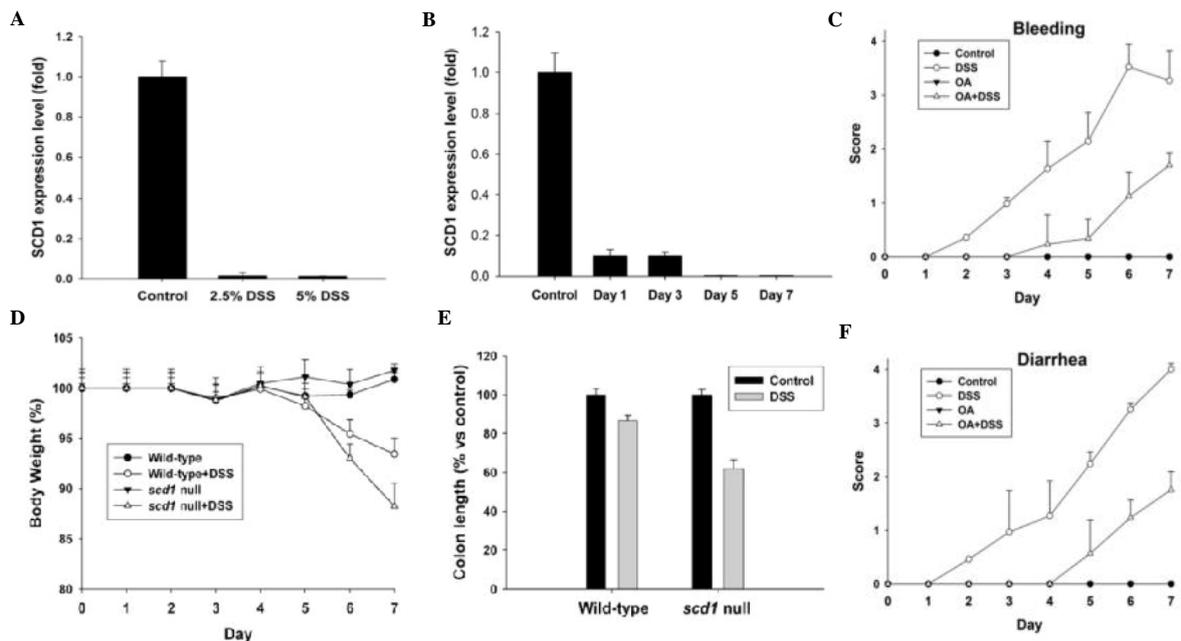
Chen y colaboradores mostraron resultados relacionando la expresión de SCD1 con la EII inducida artificialmente con Dextran Sulfato de Sodio (DSS) en modelos animales, donde utilizaron muestras de hígado para determinar la expresión del gen bajo diferentes condiciones y se encontró que la expresión del ARNm de SCD1 está significativamente disminuida en aquellos ratones a los que se les indujo la inflamación, se evaluó el efecto a diferentes dosis de DSS y se encontró que con una mínima inducción de inflamación la expresión del ARNm de SCD1 disminuye de manera significativa en comparación con los ratones sin inflamación (Fig. 1a).

En este mismo estudio se analizaron los niveles de expresión de SCD1 siete días después inducirles de la inflamación y se encontró que la expresión del gen va disminuyendo paulatinamente a lo largo del tiempo después del suministro de DSS (Fig. 1b) (Chen y col. 2008).

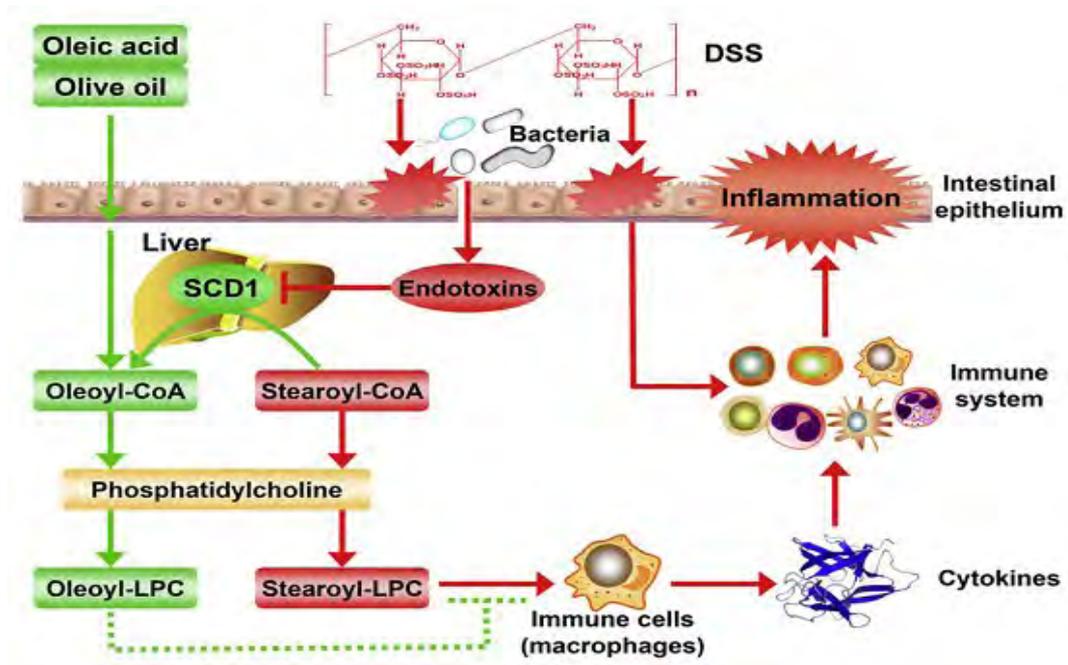
Después de medir la expresión de SCD1 se evaluó el efecto sobre la evolución de la inflamación y se encontró que los ratones con una expresión nula de SCD1 tenían un curso clínico de la EII más acelerado en comparación con aquellos que tenían una expresión normal del gen medido por cambios en el peso corporal de los ratones, tamaño del colon, días con diarrea, presencia de sangre en heces y evidencia de inflamación en tejido (Fig. 1c a 1f). Los ratones que

presentaron una elevada expresión de SCD1 tenían una dieta rica en ácido oleico, lo que explicaron, pudiera tener una función protectora debido a la inhibición de la señalización de enzimas proinflamatorias (Fig. 2) (Chen y col. 2008).

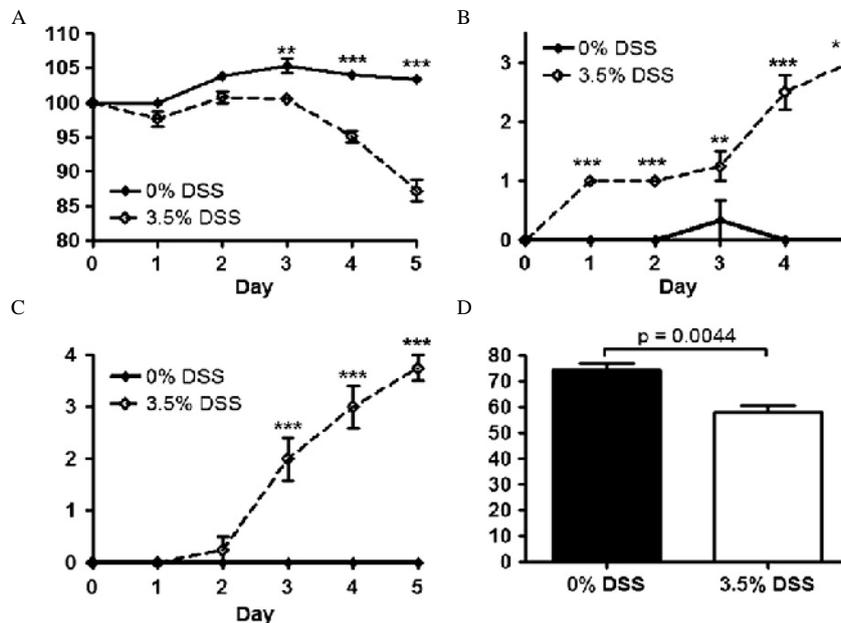
Por otra parte un estudio publicado en el 2009, sustenta que el DSS puede estar influenciando por el consumo de líquidos en modelos animales, demostrando que cuando la inflamación se induce a una dosis diferente de DSS ajustada por el consumo de líquidos, la deficiencia de SCD1 no acelera el curso clínico de la colitis en modelos animales, medida por peso corporal de los ratones, días con diarrea, presencia de sangre en heces y tamaño del colon. Concluyendo también que si bien ciertos ácidos grasos alteran la actividad de SCD1, el proceso por el cual contribuye a la inflamación es aun desconocido (Fig. 3) (MacDonald y col. 2009).



**Figura 1.** **A)** Expresión del ARNm de SCD1 en hígado de ratones (n=5) con EII inducida con DSS a dosis de 2.5% y 5%. **B)** Medición de la expresión del ARNm de SCD1 (n=5) a lo largo del tiempo (Chen y col. 2008). **C)** Presencia de sangre en heces. **D)** Cambio de peso a lo largo del tiempo. **E)** Diferencia de longitud del colon. **F)** Episodios de diarrea a lo largo del tiempo (Modificada de: Chen y col. 2008).



**Figura 2.** Representación grafica de la función de SCD1 en el proceso antiinflamatorio. Se muestra como el ácido oleico, de oliva y SCD1 modulan la producción de oleoil-CoA para formar oleoil-LPC que contribuye a la inhibición de la formación de citocinas proinflamatorias (Tomada de: Chen y col. 2008).



**Figura 3.** Manifestaciones clínicas de inflamación en ratones con y sin DSS ajustado. **A)** Cambio de peso a lo largo del tiempo. **B)** Episodios de diarrea a lo largo del tiempo. **C)** Presencia de sangre en heces. **D)** Longitud del colon (Modificada de: MacDonald y col. 2009).

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos 10 años se ha reportado un aumento en la incidencia de casos con CUCI, principalmente en adultos entre los 21 y 30 años, siendo este grupo la población económicamente activa. La CUCI es una enfermedad que puede disminuir la calidad de vida de los pacientes y su integración social, ya que los síntomas y complicaciones como cáncer de colon entre otras, comprometen de manera importante su desempeño laboral, social y personal. Por otra parte hasta el momento no existe una causa específica que determine la aparición de la enfermedad y uno de los factores asociados es la expresión de genes específicos que participan en procesos inflamatorios que podrían formar parte importante del curso clínico y de la gravedad de los síntomas, se ha sugerido que la expresión de SCD1 pudiera influir la inflamación sin embargo, esta no se ha descrito en humanos. La expresión de HNF4 $\gamma$  se ha documentado puede participar en procesos inflamatorios y su expresión se ha encontrado significativamente alterada en pacientes con CUCI, pero no existe evidencia suficiente que determine los niveles de expresión y si ésta se modifica dependiendo del estado clínico de la enfermedad (activos o en remisión).

## 3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué cambios en la expresión de los genes HNF4 $\gamma$  y SCD1 se presentan en pacientes con CUCI activos, en remisión con comparación con un grupo control sin inflamación?

## 4. JUSTIFICACIÓN

Medir factores que pudieran estar asociados a la inflamación que se presenta en los pacientes con CUCI, pudiera ayudar a un mejor pronóstico del paciente, por otra parte cuantificar y comparar en pacientes con CUCI activos y en remisión la

expresión de genes potencialmente modificables en su expresión o actividad en los procesos inflamatorios como HNF4 $\gamma$  y SCD1, ayudaría al conocimiento de los diferentes procesos que interactúan en la inflamación idiopática de los pacientes con CUCI activa o en remisión.

## 5. OBJETIVOS

### 5.2. Objetivo Primario

Comparar la expresión de los genes HNF4 $\gamma$  y SCD1 en pacientes con CUCI activos o en remisión y un grupo control.

### 5.3. Objetivo Secundario

- Asociar los niveles de expresión de HNF4 $\gamma$  y SCD1 en pacientes con CUCI activos y remisión con las características de la enfermedad.

## 6. HIPÓTESIS

Los niveles de expresión de los genes HNF4 $\gamma$  y SCD1 son diferentes en pacientes con CUCI dependiendo de su estado, activos o en remisión, en comparación con el grupo control.

## 7. DISEÑO DEL ESTUDIO

Transversal comparativo.

## 8. SEDE

Clínica de Enfermedad Inflamatoria Intestinal, Departamento de Gastroenterología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), México, D. F.

## 9. MÉTODO

### 9.1. Unidades de observación

Pacientes con CUCI activos o en remisión que asistan a clínica de EII en el INCMNSZ para colonoscopia de escrutinio de cáncer colorectal.

### 9.2. Tamaño de muestra

Se tomó una muestra por conveniencia de 30 pacientes por grupo: CUCI activos, CUCI en remisión y grupo control sin inflamación intestinal, para tener un total de 90 individuos incluidos en el estudio.

### 9.3. Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico confirmado por histopatología de CUCI con actividad o en remisión
- Ambos sexos
- IMC de 20 a 39.9 kg/m<sup>2</sup>
- Con un rango de edad de 18 a 65 años.
- Nacidos en México incluyendo las 2 últimas generaciones

### 9.4. Criterios de exclusión

- Pacientes con otras enfermedades autoinmunes como: Lupus, VIH, cáncer y cualquier tipo de hepatitis.
- Con presencia de otro tipo de colitis como; infecciosa, post-radiación medicamentosa, indeterminada y enfermedad de Crohn.
- Que presentaran algún tipo de diabetes mellitus

### 9.5. Preceptos éticos

El protocolo fue aprobado por el comité de ética en investigación del INCMNSZ y realizado bajo los estatutos referidos en el artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y cada

paciente incluido en el estudio tuvo riesgo mínimo y se le informó del procedimiento a seguir, los derechos que tenía, así como el objetivo del estudio por medio del consentimiento informado que cada uno firmó (Anexo 3).

#### **9.6. Diseño metodológico**

Se estudiaron 30 pacientes con CUCI activos y 30 en remisión, que acudieron a colonoscopia de rutina o indicada por diagnóstico, 30 sujetos control, definidos como: individuos sin inflamación intestinal que acudan por pérdida de peso, sangrado de tubo digestivo bajo, deficiencia de hierro, anemia o diarrea crónica. A cada sujeto el médico le realizó colonoscopia y tomó una biopsia de recto para determinar la expresión relativa de HNF4 $\gamma$  y SCD1 por PCR en Tiempo Real (Anexo 4) y analizar si existieron cambios en la expresión de cada grupo.

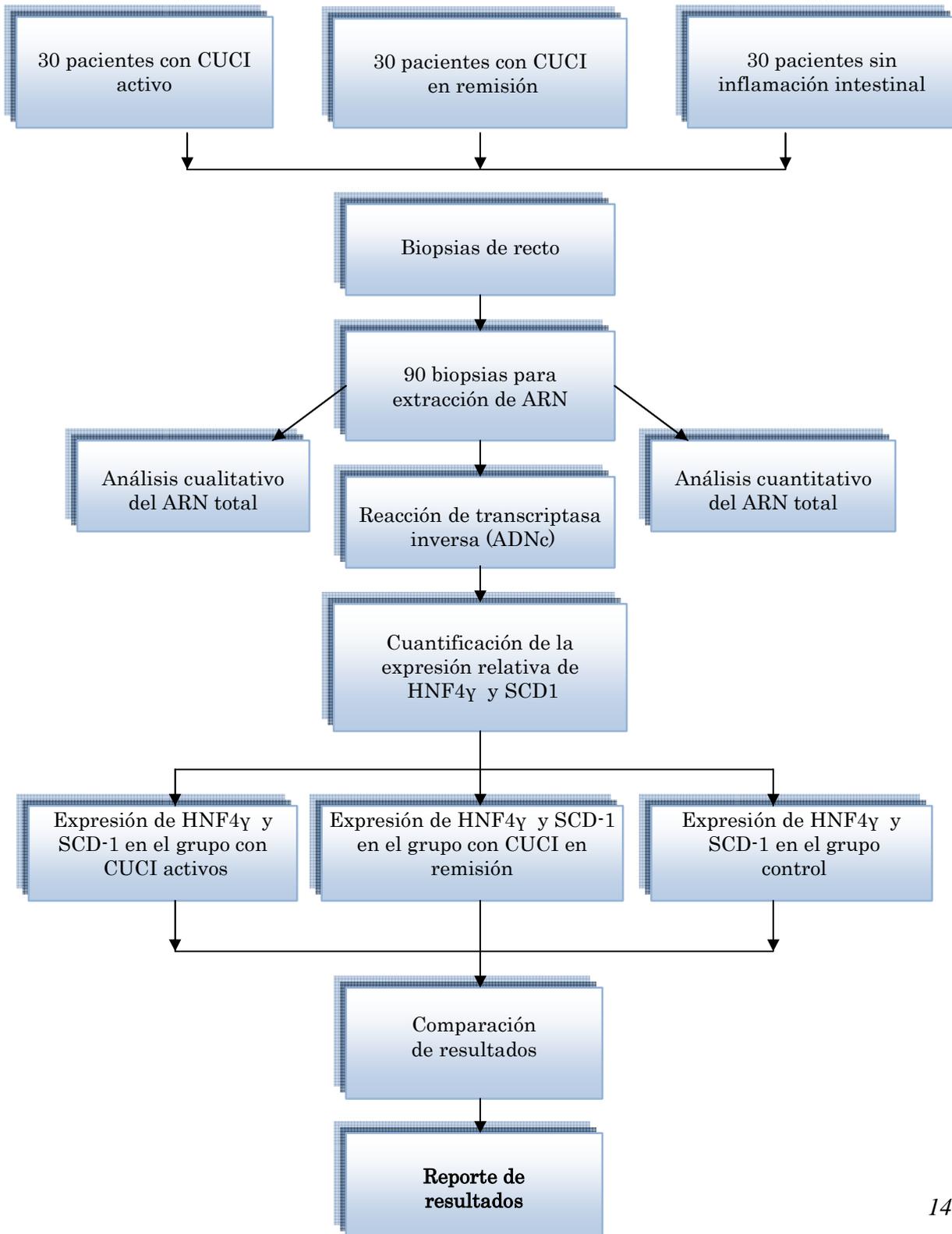
#### **9.7. Métodos de procesamiento de biopsias**

- Extracción de ARN-total a partir de biopsias de recto de pacientes con CUCI activos, en remisión y grupo control por el método de isotiocianato de guanidina.
- Síntesis de ADN complementario, por retrotranscripción en PCR (RT-PCR).
- Cuantificación relativa de la expresión de HNF4 $\gamma$  y SCD1 por PCR en Tiempo Real con sondas TaqMan (Anexos 5 a 7).

#### **9.8. Análisis estadístico**

Se utilizó estadística descriptiva, no paramétrica, prueba de hipótesis Kruskal-Wallis, considerando una  $p$  significativa  $<0.05$ . Para el análisis de la base de datos se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 17 y la presentación de los resultados se realizó en tablas y gráficas correspondientes.

9.9. Diagrama de flujo del diseño metodológico



## 10. RESULTADOS

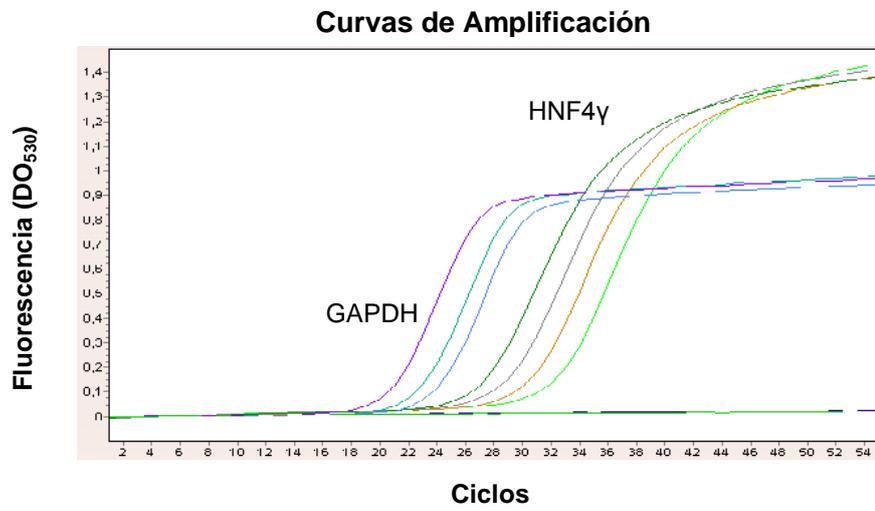
La expresión relativa de HNF4 $\gamma$  y SCD-1 determinada en las biopsias de mucosa de colon se determinó en función al gen de referencia GAPDH. En la Figura 4 se muestran ejemplos de curvas de amplificación del los genes blanco y constitutivo es decir HNF4 $\gamma$ /GAPDH en diluciones seriadas a diferentes concentraciones.

Se estudiaron 90 individuos, de los cuales 60 tenían diagnóstico de CUCI, el 60% fueron mujeres y el promedio de edad en este grupo fue de 45 años (DE=10), en el grupo control se incluyeron 30 individuos, de estos el 32% fueron hombres y el promedio de edad fue de 48 años (DE=15).

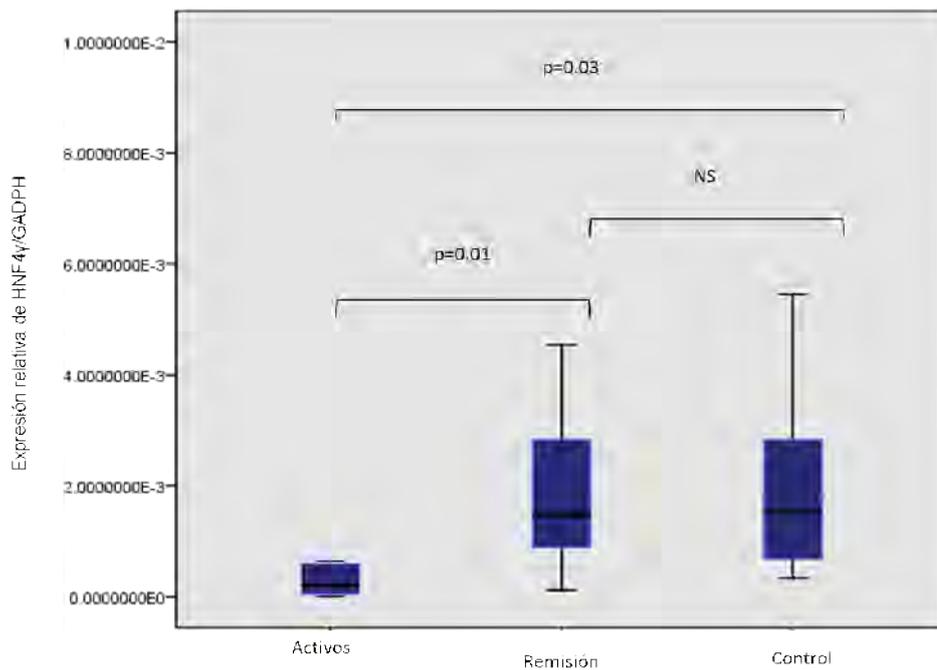
La expresión de HNF4 $\gamma$  se encontró significativamente disminuida en los pacientes con CUCI activos en comparación con los pacientes en remisión ( $p=0.01$ ) y con el grupo control ( $p= 0.03$ ). Entre el grupo de pacientes con CUCI en remisión y los sujetos sanos la expresión de HNF4 $\gamma$  fue similar sin diferencias significativas (Fig. 5).

Por otra parte la expresión de SCD1 se encontró menor en el grupo activo y remisión en comparación con los sujetos control con una  $p=0.045$  y  $p=0.063$  respectivamente (Fig. 6).

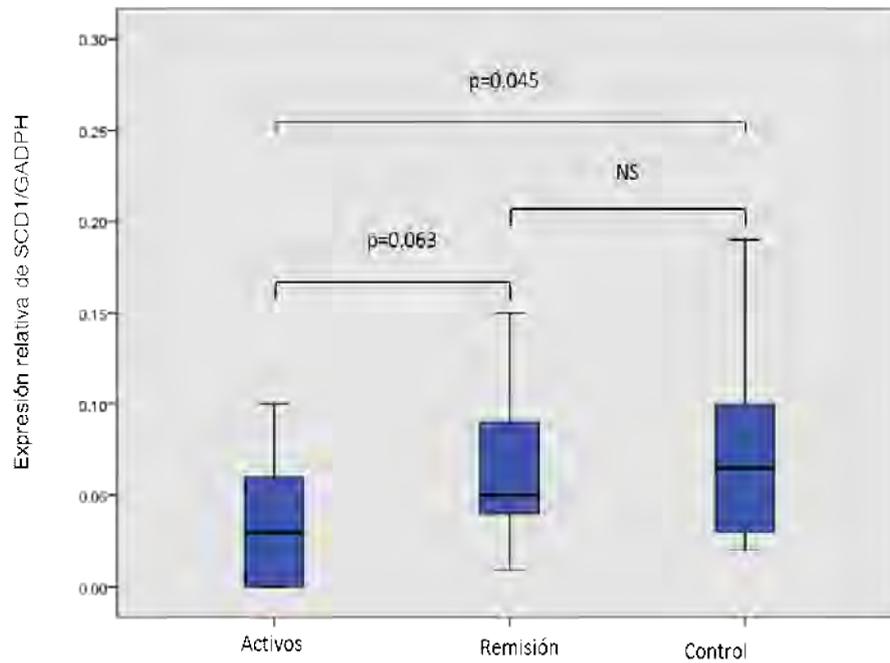
Se realizó análisis de correlación de los niveles de expresión de HNF4 $\gamma$  y SCD1 con algunas características clínicas de la CUCI y se encontró que en los pacientes en remisión la expresión de HNF4 $\gamma$  correlaciona significativamente con la actividad de la CUCI ( $r=0.78$ ;  $p<0.05$ ) y con el peso de manera inversa ( $r=-0.64$ ;  $p<0.05$ ), la presencia de manifestaciones extraintestinales también correlacionó con la expresión de SCD1 ( $r=0.65$ ;  $p<0.05$ ) en los pacientes con CUCI en remisión, no así los pacientes con actividad (Tabla 1).



**Figura 4.** Curvas de amplificación de expresión de HNF4 $\gamma$  en función a la expresión del gen constitutivo GAPDH en diluciones seriadas de muestras de colon.



**Figura 5.** Expresión del gen HNF4 $\gamma$  en pacientes con CUCI activo, remisión y grupo control.



**Figura 6.** Expresión del gen SCD1 en pacientes con CUCI activo, remisión y grupo control.

**Tabla 1.** Correlación de expresión de HNF4y -SCD1 con características clínicas de la CUCI.

	HNF4y		SCD1	
	Activo	Remisión	Activo	Remisión
<b>Actividad</b>	0.49	0.78*	0.15	0.23
<b>Peso</b>	0.22	-0.64*	0.31	-0.3
<b>Manifestaciones extraintestinales</b>	0.45	0.23	0.49	0.65*

\*  $p < 0.05$

## DISCUSIÓN

En los últimos años se ha reportado que la incidencia de la CUCI ha incrementado en nuestro país, principalmente en mujeres y población joven económicamente activa (Yamamoto-Furusho, 2009); en el presente estudio encontramos también una mayor frecuencia de la enfermedad en pacientes femeninas (60%) y con un promedio de edad de 45 años; sin embargo, cabe destacar que se realizó en un hospital de referencia y que la mayoría de los pacientes eran con más de 3 años de evolución.

El aumento en la incidencia de pacientes con CUCI se ha atribuido a múltiples factores como: infecciosos, inmunes, ambientales y genéticos (Hanauer, 2004). Dentro de los genes que se han relacionado más con la EII se encuentran aquellos que participan en la integridad del epitelio intestinal, como factores de transcripción modulando otros genes directamente relacionados con procesos inflamatorios o aquellos que tienen una actividad enzimática y que pueden inhibir procesos inflamatorios (Ferguson y col. 2007; Yamamoto-Furusho, 2007).

En los pacientes con CUCI se han relacionado algunos como HNF4 $\gamma$  y SCD1, ambos genes identificados como posibles cofactores en procesos inflamatorios intestinales y potencialmente manipulables en su expresión por algunos ácidos grasos específicos, ya que contienen ligandos o son estimulados por estos (Wisely y col., 2002; Wu y col., 2007) Por lo anterior se consideró importante evaluar su expresión en función a la cantidad de ARNm en recto de pacientes con CUCI activos y en remisión comparados con pacientes sin inflamación intestinal.

Previos estudios reportaron que la expresión de HNF4 $\gamma$  esta alterada, sin determinar si esta aumenta, disminuye o presenta algún polimorfismo en pacientes

con CUCI y sugieren que la actividad del gen pudiera estar relacionada con procesos inflamatorios de estos pacientes, (Wu y col., 2007). Evaluar la expresión de HNF4 $\gamma$  en los 3 grupos nos permitió no solo confirmar que la expresión se encuentra alterada en los pacientes con CUCI, sino también que los pacientes con CUCI activos presentan una expresión de HNF4 $\gamma$  significativamente menor en comparación con el grupo control ( $p=0.03$ ) y el grupo de pacientes en remisión histológica ( $p=0.01$ ) (Fig. 5) de esta forma se hace mas fuerte la hipótesis, de que este gen participa significativamente en la actividad inflamatoria de los pacientes con CUCI activos.

Por otra parte se correlacionó la expresión de HNF4 $\gamma$  con el peso en el grupo de pacientes con CUCI en remisión y se entró que a mayor expresión, mas actividad ( $r=0.78$ ;  $p<0.05$ ) en menor peso ( $r=-0.64$ ;  $p<0.05$ ), confirmando los hallazgos previos donde analizaron algunas manifestaciones clínicas secundarias a la inhibición total del gen en modelos animales (ratones knockout) y encontraron que los ratones que no expresaban el gen tendían a un mayor peso, secundario al consumo de kilocalorías y menor actividad física, es posible que en los pacientes con CUCI en remisión suceda un fenómeno similar (Gerdin y col. 2006) (Tabla 1).

Algunas investigaciones han correlacionado la expresión de SCD1 con procesos inflamatorios crónicos en modelos animales. Chen y colaboradores estudiaron y correlacionaron la actividad del gen con procesos antiinflamatorios induciendo inflamación intestinal de ratones con DSS, describiendo ampliamente que la actividad del gen fue significativamente menor y las manifestaciones clínicas como: cambios en el peso, episodios de diarrea, sangre en heces y longitud del colon, se vieron alteradas por la actividad de SCD1, sugiriendo una posible participación del gen en los procesos inflamatorios de la CUCI y por consecuencia con las manifestaciones clínicas secundarias (Chen y col. 2008).

Sin embargo, MacDonald y colaboradores describen que por las características químicas del DSS, al ser consumidas por los ratones estas se deberán ajustar al consumo de agua, de no ser así esto modificaría los efectos del compuesto y por tanto los síntomas secundarios sin embargo, pese a que refuta los hallazgos de Chen y col. en términos de manifestaciones clínicas y expresión, en nuestro estudio encontramos que la expresión de SCD1 es menor en pacientes activos comparados con el grupo control ( $p=0.045$ ) y los pacientes en remisión ( $p=0.063$ ), lo cual sugiere que la falta de actividad de este gen pudiera repercutir de manera negativa la inflamación intestinal de pacientes con CUCI activos, similar a los modelos animales. Aunque la expresión de SCD1 en ratones y humanos pudiera ser similar por su homología de aminoácidos, esta no necesariamente debe ser igual. Por otra parte correlacionó de forma positiva la expresión con la presencia de manifestaciones extraintestinales en el grupo de pacientes con CUCI en remisión ( $r=0.65$ ;  $p<0.05$ ), esto probablemente debido a que SCD1 puede participa en los diferentes procesos de las manifestaciones extraintestinales.

Estudiar estos 2 genes en muestras de pacientes permitió corroborar previos estudios en animales y reafirmar la hipótesis de su posible participación en la inflamación idiopática de los pacientes con CUCI.

Cabe mencionar que ambos genes se han relacionado de con algunos ácidos, incluso algunos estudios sugieren una posible modificación de su actividad a base de ácidos grasos insaturados. De manera aislada es bien sabido el efecto terapéutico de estos ácidos grasos en el tratamiento de diferentes enfermedades secundarias a inflamación crónica sin embargo, los resultados de este estudio plantean las bases para una potencial modificación futura. Se sugiere hacer más estudios para determinar con mayor certeza si estos genes pudieran actuar de manera benéfica al manipular su actividad.

El estudio permitió disipar algunas dudas en torno a su expresión en la inflamación de la CUCI; sin embargo, es necesario hacer más investigaciones para determinar los procesos específicos por los cuales HNF4 $\gamma$  y SCD1 intervienen en las rutas de inflamación y si estos en verdad son potencialmente modificables en su actividad.

## **11. CONCLUSIONES**

La expresión de HNF4 $\gamma$  se encontró significativamente menor en los pacientes con CUCI activos comparados con los sujetos sin inflamación intestinal y pacientes en remisión histológica.

SCD1 se expresó menos en el grupo de pacientes con CUCI activos en comparación con pacientes en remisión y controles.

## 12. BIBLIOGRAFIA

- Annese, V. 2006. Pharmacogenetics in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterology*. **12**(23):3657-3667.
- Attie, A. D., Krauss, R. M., Gray-Keller, M. P., Brownli, A., Miyazaki, M., Kastelein, J. J., Lusi, A. J., Stalenhoef, A. F., Stoehr, J. P., Hayden, M. R. y Ntambi, J. M. 2002. Relationship between stearyl-CoA desaturase activity and plasma triglycerides in human and mouse hypertriglyceridemia *J Lipid Res*. **34**(11):1899-1907.
- Chen, C., Chah, M. Y., Morimura, K., Kristopher, W. K., Miyazaki, M., Richardson, A. T., Morgan, T. E., Ntambi, M. J., Inde, R. J. y Gonzalez, F. J. 2008. Metabolomics Reveals that Hepatic Stearyl-CoA Desaturase 1 Downregulation Exacerbates Inflammation and Acute Colitis. *Cell Metab*. **7**(2):135-147.
- Costa, J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. **22**(5):299-305.
- Drewes, T., Senkel, S., Holewa, B. y Ruffel, G. U., 1996. Human Hepatocyte Nuclear Factor 4 Isoforms are Encode by Distinct and Differentially Expressed Genes. *Mol Cell Biol*. **16**(3): 925-931.
- Ferguson, L. R., Andrew, N. S., Browning, B. L. Huebner, C. y Petermann, I. 2007. Genes, diet and inflammatory bowel disease. *Mutation Research*. **622**(1):70-83.
- Gerdin, A. K., Surve, V. V., Jönsson, M., Bjursell, M., Björkman, M., Edenro, A., Schuelke, M., Saad, A., Bjurström, S., Lundgren, E.J., Snaith, M., Fransson-Steen, R., Törnell, J., Berg, A. L. y Bohlooly-Y. M. 2006. Phenotypic screening of hepatocyte nuclear factor (HNF) 4-gamma receptor knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*. **349**(2):825-832.
- Gionchetti, P. 2006. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterology*. **13**(30):4807-4812.
- Gower – Rousseau, C., Salomez, J. L., Dupas, J. L., Martí, R., Nuttens, M. C., Votte, A., Lemahieu, M., Lemaire, B., Colombel, J. F. y Cortot, A. 1994. Incidence of inflammatory bowel disease in northern France. *Gut*. **35** (10):1443, 1994.
- Hampe, J., Schreiber, S., Shaw, K. F. Lau, H. A., Bridger, K. S., Macpherson, A. J. S., Cardon, J. R., Sakul, H., Harris, T. J. R., Buckler, A., Hall, J., Stokkers, P., Deventer, S. J. H., Nürnberg, P., Mirza, M. M., Lee, J.C.W., Lennard-Jones, J. E., Mathew, C. G. y Curran, M. E. 1999. A Genomewide Analysis Provides Evidence for Novel Linkages in Inflammatory Bowel Disease in a Large European Cohort. *The American Journal of Human Genetics*. **64**(3):808-816.

- Hanauer, S. B. 2004. Update on the etiology, pathogenesis and diagnosis of ulcerative colitis. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*. **1**(1):26-31.
- Huggert, J., Dheda, K., Bustin, S. y Zumla, A., 2005. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes and Immunity*. **6**:279-284.
- Kazuhisa, M., Haiming, C., Keita, K., Cem, Z. G., Masato, F., Kadir, T. U., Quiong, C., Genichi, A., Harry, M., Bala, K., Yasuhiko, M., Barabara, B. K., Rex, A., Parker y Gökhan, S. H. 2005. Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metabolism*. **1**:107-119.
- Knigge, K. L., 2002 Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Cornerstone*. **4**(4):49-57.
- Liu, Y., Van, K. H. J., West, A. B., Cartun, R. W., Cortot, A. y Colombel, J. F., 1995. Immunocytochemical evidence of Listeria, Escherichia coli, and Streptococcus antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology*. **108**(5):1396-1404.
- MacDonald, M.L.E., Bissada, N., Vallance, B. A. y Hayden, M. R. 2009. Absence of stearoyl-CoA desaturase-1 does not promote DSS-induced acute colitis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1791**. 1166-1172.
- Medina, B. E., Prieto, B. G., Rodríguez, R. M. F. y Suárez, C. L. 2008. Enfermedad inflamatoria intestinal. *Grastroenterología*. Pag. 63-71.
- Petersson, H., Lind, L., Hulthe, J., Elmgren, A., Calderholm, T y Riserus, U., 2008. Relationships between serum fatty acid composition and multiple markers of inflammation and endothelial function in an elderly population. *Atherosclerosis*. **203**:298-303.
- Sanjurjo-García, J. L., Aranda-Jiménez, G., Garuño-Delgado, R., y García-Manzo, N. T. 2007. Guías clínicas de diagnóstico y tratamiento de la colitis ulcerativa crónica idiopática (CUCI). *Rev. Gastroenterol Mex*. **72**(2):136-138.
- Sartor, R. B. 1997. Pathogenesis and immune mechanism of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol*. **92**(12):5-11.
- Savrasky, V., Jun, J., Li, J., Nanayakkara, A., Fonti, S., Moser, A. B., Steele, K. E., Schweitzer, M. A., Patil, S. P., Chanot, S., Schwartz, A. R. y Polotsky, V. Y. 2008. Dyslipidemia and atherosclerosis induced by chronic intermittent hypoxia are attenuated by deficiency of stearoyl coenzyme A desaturase. *Circ Res*. **103**(10):1173-1180.
- Sung, H. A., Yatrik, M. S., Junko, I. M. S., Keiichirou, M., Insook, K., Sun Hee, Y., Gilles, L., Reiko, K., Kunio, N., Gonzalez, F. J. y Yusuke, I. 2008. Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$  in the Intestinal Epithelial Cells Protects Against Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. **14**(7):908-920.

- Taraviras, S., Mantamadiotis, T., Dong-Si, T., Mincheva, A., Lichter, P., Drewes, T., Ryffel, G.U., Monaghan, A. P. y Schütz, G. 2000. Primary structure, chromosomal mapping, expression and transcriptional activity of murine hepatocyte nuclear factor 4gamma. *Biochim Biophys Acta*. **1490**(1,2):21-32.
- The UK IBD Genetics Consortium and The Wellcome trust Case Control Consortium 2. 2009. Genome – wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet*. **41**(12):1330-1334.
- Vossen, C. y Erard, A. 2002. Down-regulation of nuclear receptor DNA-binding activity by nitric oxide – HNF4 as a model system. *Med Sci Monit*. **8**(10):217-220.
- Wang, J., Yu, L., Schmidt, R. E., Su, C., Huang, X., Gould, K. y Cao, G. 2005. Characterization de HSCD5, a novel stearyl-CoA desaturase unique to primates. *Biochem Biophys Res Commun*. **332**(3):735-742.
- Warensjö, E., Ingelsson, E., Lundamark, P., Lannfelt, L., Syyänen, A. C., Vessby, B. y Resérus, U. 2007. Polymorphisms in the SCD1 gene: associations with body fat distribution and insulin sensitivity. *Obesity*. **15**(7):1732-1740.
- Watanabe, T., Kobunai, T., Toda, E., Kanazawa, T., Kazama, Y., Tanaka, J., Tanaka, T., Yamamoto, T., Hata, K., Kojima, T., Yokoyama, T., Konoshi, T., Okayama, Y., Sigimoto, T., Oka, T., Sasaki, S., Ajioka, Y., Tuto, T y Nagawa, H. 2007. Gene Expression Signature and the Predictor of Ulcerative Colitis-Associated Colorectal Cancer by DNA Microarray. *Clin Cancer Res*. **13**(2):415-420.
- Wisely, B. G., Miller, B. A., Davis, G. R., Thornquest, D. A., Johanson, R., Spitzer, T., Sefler, A., Shearer, B., Moore, T. J., Miller, B. A., Willson, M. T. y Williams, P. S. 2002. Hepatocyte Nuclear Factor 4 is a Transcription Factor the Constitutively Binds Fatty Acids. *Structure*. **10**:1225-1234.
- Wu, F., Dassopoulos, T., Cope, L., Maitra, A., Brant, R. S., Harris, L. M., Bayless, M. T., Parmigiani, G. y Chakravarti, S. 2007. *Genome-wide Gene Expression Differences in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis from Endoscopic Pinch Biopsies: Insights into Distinctive Pathogenesis*. *Inflamm Bowel Dis*. **13**:807-821.
- Yamamoto-Furusho, J. K. 2009. Clinical epidemiology of ulcerative colitis in Mexico: a single hospital-based study in a 20-year period (1987-2006). *J Clin Gastroenterol*. **43**(3):221-224.
- Yamamoto-Furusho, J. K. 2007. Genetic factors associated with the development of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. **13**(42): 5594-5597.
- Yamamoto-Furusho, J. K., Uscanga, L. F., Vargas-Alarcon, G., Ruiz-Morales, J. A., Higuera, L, Cutino, T., Rodriguez-Perez, J. M., Villarreal-Garza, C. y Granados, J.,

2003. Clinical and genetic heterogeneity in Mexican patients with ulcerative colitis. *Hum Immunol.* **64**:119-123.

# ANEXOS

## ANEXO 1. GLOSARIO

- **Aminoácidos:** Unidad mas simple de una proteína. Monómero que al unirse covalentemente mediante el enlace peptídico forma cadenas polipeptídicas.
- **Abdominalgia:** Dolor localizado en el abdomen.
- **ADN:** El ácido desoxirribonucleico, es un tipo de ácido nucleico, que contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos conocidos y de algunos virus, siendo el responsable de su transmisión hereditaria.
- **ADNc:** Es el ADN complementario que se obtiene *in vitro* mediante la enzima transcriptasa inversa que utiliza como base ARNm maduro. Por lo tanto los ADNc no contienen intrones.
- **Amplificar:** Incremento geométrico en el número de copias de una secuencia en particular del ADN.
- **ARN:** Acido ribonucleico. Polímero formado por la unión covalente de nucleótidos. Las moléculas de ARN son de hebra simple. Adoptan estructuras secundarias y terciarias, con participación de secuencias duplex, que le confieren mayor estabilidad.
- **ARNm:** Molécula de ARN mensajero que contiene la información para la secuencia de aminoácidos de una proteína.
- **Citocinas:** Proteínas que regulan la función de las células que las producen u otros tipos celulares. Son los agentes responsables de la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas.
- **Dextran Sulfato de Sodio (DSS):** Complejo de sustancias sintetizadas para diferentes fines dentro de la química como inducir Enfermedad Inflamatoria Intestinal en modelos animales.
- **Eritema:** Enrojecimiento de la piel condicionado por una inflamación debida a un exceso de riego sanguíneo mediante vasodilatación.
- **Expresión génica:** Proceso en el que la información codificada por un gen se convierte en las estructuras constituyentes y funcionales de la célula.
- **Factor de transcripción:** Proteína que participa en la regulación de la transcripción del ADN, pero que no forma parte de la ARN polimerasa, puede actuar reconociendo y uniéndose a secuencias concretas de ADN, uniéndose a otros factores, o uniéndose directamente a la ARN polimerasa.
- **Fístulas:** Conexión anormal entre un órgano, un vaso o el intestino y otra estructura.
- **Friabilidad:** Debilidad o fragilidad intestinal ante factores internos o externos.
- **Gen:** Conjunto de una secuencia determinada de nucleótidos de uno de los lados de la escalera del cromosoma referenciado. La secuencia puede llegar a formar proteínas, o serán inhibidas, dependiendo del programa asignado para la célula que aporte los cromosomas.
- **Gen blanco:** Gen que se desea analizar.
- **Gen de referencia:** También llamado gen constitutivo, es un gen está siempre activo. Su expresión es función de la interacción de la

ARN polimerasa con el promotor, sin regulación adicional.

- **IMC:** Índice de Masa Corporal. Medida de asociación entre el peso y la talla que indica la cantidad de masa corporal de un individuo.
- **PCR-Tiempo Real:** Es un método *in vitro* para la amplificación enzimática de secuencias específicas de ADN. Utiliza iniciadores y la ADN polimerasa Taq. La amplificación ocurre a través de ciclos de desnaturalización, anillamiento con primer y extensión con ADN pol. La secuencia de ADN se amplifica 10<sup>6</sup> veces (Anexo 4).
- **Polimerasa:** Enzima que cataliza la formación de ADN o ARN a partir de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, respectivamente.
- **Pseudopólipos:** Proyecciones intraluminales de la mucosa compuestas por una mezcla de componentes epiteliales y estromales no neoplásicos y de células inflamatorias.
- **Tenesmo:** Sensación constante de la necesidad de vaciar los intestinos, acompañada de dolor, cólicos y esfuerzos involuntarios.
- **Timpanismo:** Hinchazón de alguna cavidad del cuerpo producida por gases y en especial, abultamiento del vientre, que por acumulación de gases en el conducto intestinal o en el peritoneo.

## ANEXO 2. CLASIFICACIÓN DE VARIABLES

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Categorías	Nivel de Medición
<b>Grupos</b>	Conjunto de personas con características en común.	<p><b>Activos:</b> Pacientes con diagnóstico de CUCI confirmado por histopatología, con actividad leve, moderada y grave.</p> <p><b>Remisión:</b> Pacientes con diagnóstico de CUCI sin actividad inflamatoria, confirmada por histopatología.</p> <p><b>Controles:</b> Pacientes sin diagnóstico de inflamación intestinal.</p>	<p><b>Activo</b></p> <p><b>a) Leve:</b> Mucosa hiperémica, edematosa y granular, focos de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos.</p> <p><b>b) Moderado:</b> Edema, vascularidad, células inflamatorias agudas y crónicas, epitelio intacto.</p> <p><b>c) Grave:</b> Hemorragia, úlceras, aplanamiento de las células epiteliales, arquitectura distorsionada y microabscesos de criptas, ulceración y exudado.</p> <p><b>Remisión</b></p> <p>Pacientes con diagnóstico de CUCI, con reducción del patrón vascular y granularidad colónica.</p> <p><b>Controles</b></p> <p>Pacientes con diarrea crónica, sangrado de tubo digestivo bajo, pérdida de peso y deficiencia de hierro.</p>	Cualitativa Nominal
<b>Expresión génica</b>	Evaluación de la capacidad de codificación de un gen blanco en un tejido específico.	Medición cuantitativa del ARNm de HNF4γ y SCD1 en función al ARNm del gen de referencia GAPDH.	<p><b>Sobreexpresión</b></p> <p>Mayor cantidad del ARNm de HNF4γ y SCD1 en función a GAPDH.</p> <p><b>Subexpresión</b></p> <p>Menor cantidad del ARNm de HNF4γ y SCD1 en función a GAPDH.</p>	Cuantitativo Continua

### ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO

---



### *Informe para el paciente*

---

#### TÍTULO DEL ESTUDIO:

Cuantificación de la expresión de los genes SCD1 y HNF4 $\gamma$  en pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI) activos, en remisión y un grupo control.

#### PATROCINADOR:

Bristol Myers Squibb: Av. Revolución #1267 Col. Tlacopac, C. P. 01049, México D. F.

#### INVESTIGADORES:

- Dr. Jesús Kazuo Yamamoto Furusho
- LN. Nallely Bueno Hernández
- Dr. Aarón Domínguez López

#### TELEFONOS:

Gastroenterología: (55) 5487 0900 Ext. 2711 y 2712

Celulares: (044) 55 124 44 164 y (045) 775 75 110 16

#### INTRODUCCIÓN:

Antes de que decida participar en este estudio de investigación es importante que lea y comprenda la siguiente explicación de los procedimientos que se proponen. Esta declaración describe el propósito, los procedimientos, los beneficios, molestias y precauciones de este estudio. También describe su derecho a retirarse del estudio en cualquier momento. No podemos garantizar ni asegurar los resultados de este estudio.

#### PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO:

Se le invita a participar de este estudio debido a que padece Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI), enfermedad que hasta el momento no se sabe la causa específica que lo ocasiona, por lo que nosotros queremos evaluar la expresión de 2 genes (SCD1 y HNF4 $\gamma$ ) que pudieran estar involucrados en la aparición y evolución de la enfermedad, para lo que necesitamos su aprobación para tomar una pequeña muestra de tejido (biopsia) de una o dos partes de colon, este procedimiento no generara ninguna molestia ni costo para usted debido a que se llevara a cabo durante la colonoscopia que se le realizará de rutina, dicha biopsia será sometida a diferentes procesos de laboratorio para determinar si la expresión de los 2 genes de interés está aumentada o disminuida en comparación con pacientes que no tienen inflamación pero que en algún momento también padecieron de CUCI y con personas que nunca han tenido CUCI.

Estos resultados nos servirán para en un futuro pretender modificar la expresión de los genes de forma positiva para los pacientes con tratamientos nutricionales y/o farmacológicos.

#### SELECCIÓN:

Para participar en el estudio, usted será sometido a una evaluación donde se determinará si cumple con los siguientes criterios de selección ya establecidos.

#### Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico confirmado por histopatología de CUCI (activos o en remisión).
- Ambos sexos
- Mayores de 18 años
- Nacidos en México incluyendo las dos últimas generaciones
- Pacientes con registro que asistan a clínica de EII del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ)

En caso de presentar alguna complicación a causa de la maniobra, se le brindara atención médica inmediata y sin ningún costo para usted, así mismo, si tiene alguna duda y/o aclaración sobre el protocolo será resuelta a la brevedad posible. Su participación es voluntaria y cuenta con todo el derecho y confianza de rehusarse a participar en el proyecto en cualquier momento, con la seguridad de que la información obtenida será plenamente confidencial ya que solo será utilizada para fines de investigación. De igual forma si coincide con alguno de los siguientes criterios su participación dentro del estudio será impedida.

#### Criterios de exclusión

- Pacientes con otras enfermedades autoinmunes asociadas
- Con presencia de otro tipo de colitis como; infecciosa, post-radiación medicamentosa, indeterminada y enfermedad de Crohn.

#### Criterios de eliminación

- Muestras biológicas insuficientes

### **Carta de consentimiento informado**

He leído este consentimiento informado y he tenido la oportunidad de discutir su contenido con la LN. Nallely Bueno Hernández. Tuve la oportunidad de hacer preguntas acerca de los procedimientos, inconveniencias, riesgos y beneficios del estudio. Se ha dado respuesta a todas mis preguntas a mi completa satisfacción y estoy de acuerdo en participar de manera voluntaria en el estudio titulado: "Cuantificación y comparación de la expresión de los genes HNF4 $\gamma$  y SCD1 en pacientes adultos con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI) activos, en remisión y un grupo control que acuden al INCMNSZ" cuyo objetivo es estudiar la expresión de 2 genes (SCD1 y HNF4 $\gamma$ ) involucrados en la aparición de la CUCI y relacionarlos con el estado clínico de la enfermedad.

1. Mi participación sólo consiste en permitir la obtención de una o dos biopsias de colon de aproximadamente 1 mm.
2. Los resultados me serán comunicados a la brevedad posible y serán totalmente confidenciales.
3. Las muestras obtenidas no serán sometidas a ninguna otra tipo de manipulación.
4. Este tipo de estudio no conlleva ningún riesgo para mi persona.
5. El costo de los gastos que genere la toma de biopsia será cubierto en su totalidad por los investigadores.

Mi firma indica que después de haber leído, entendido y recibido una explicación completa de la información en mi propio idioma (Español), consiento participar en el estudio, entiendo que puedo decidir retirarme en cualquier momento sin que esto afecte mi atención médica futura en la institución participante.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

He recibido una copia completa de este escrito incluyendo las firmas y los datos que quien a continuación aparecen.

**Nombre y firma del paciente (representante legal en caso de que aplique):**

\_\_\_\_\_  
Nombre

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma

Teléfonos: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

*El suscrito, ha explicado ampliamente los detalles importantes de este al paciente cuyo nombre aparece arriba (o a su representante legal en caso de que aplique).*

**Nombre y firma del investigador (o persona que haya explicado el consentimiento):**

\_\_\_\_\_  
Nombre

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma

**Nombre y firma de un primer testigo:**

\_\_\_\_\_  
Nombre

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma

Relación o parentesco con el paciente

**Nombre y Firma de un segundo testigo:**

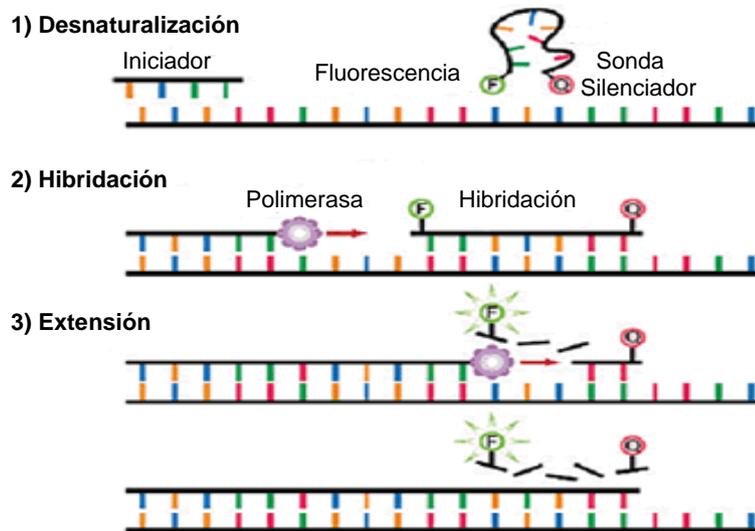
\_\_\_\_\_  
Nombre

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma

Relación o parentesco con el paciente

## ANEXO 4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) TIEMPO REAL



**PCR-Tiempo Real:** Técnica basada en la replicación del ADN por la enzima ADN polimerasa que sintetiza una cadena complementaria de ADN en el sentido 5' a 3' usando un molde de cadena sencilla, para crear esta región de doble cadena se usan los denominados iniciadores que son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de ADN que se desea amplificar.

Se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

- 1) Primera etapa (desnaturalización)** la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97 °C). La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya.
- 2) Segundo paso (hibridación)** los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza gracias a la bajada de la temperatura (50-65 °C).
- 3) Tercera etapa (extensión)** se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5' a 3' mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde.

Esta reacción emite fluorescencia en cada ciclo la cual es detectada por el software y forma gráficos representando en este caso la expresión de los genes deseados.

Esta técnica es utilizada y validada para medir expresión de génica. (Costa, 2004; Huggert y col., 2005).

**ANEXO 5. SONDAS UTILIZAS**

**1. NM\_004133.4**

**Probe Finder fue diseñado para un óptimo ensayo en PCR-Tiempo Real:**

**NM\_004133.4 Para el ARNm del factor nuclear 4 gamma del hepatocito (HNF4G) en humano.**

Fila 1 del ensayo

Usar sonda #43 (cat. no. 04688031001)

Cebador	Extensión	Posición	Tiempo	%GC	Secuencia
Sentido	25	60 – 84	59	36	caacttacacaactttggagttga
Antisentido	25	131 – 155	59	40	cgttgtctgtggtattcatactgt

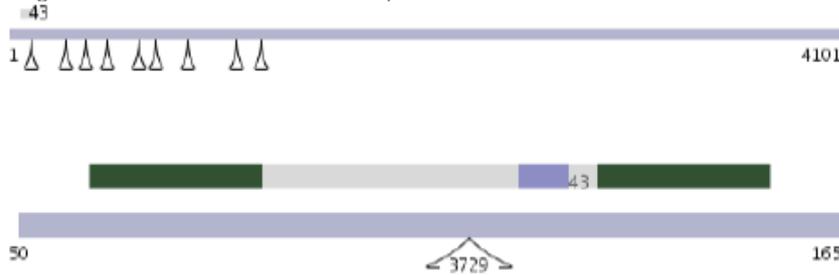
Amplícón (96 nt)

caacttacacaactttggagttgaaactatgcagattctataatcaagtgatgttctgcccagagacaagtatgaataccacagacaacg

La búsqueda se realizó para el iniciador que usa el análisis

Este análisis tiene: **Todos los criterios cumplidos.**

Longitud de los iniciadores utilizados para este análisis: 3729 nt



Secuencia de entrada:

>NM\_004133.4

```

gagggatcagaaccaactactggacatggacatggcaaat tacagtgaaagtttggacc
aaccttacacaactttggagttgaaactatgcagattctataatcaagtgatgttct
tgcccagagacaagtatgaataccacagacaacgggtgcactgctctgtgctatctg
tggggacagagacaacaggaacactatggggcatccagctgtgaggggcaagggttt
cttcagacgcagcattcgttaagagtcagcttattcttgacaggttcagtcggcaatggt
tghtgacaaggacaagaagaatcaatgtagatattgtcgatgaagaaggttttagagc
gggaatgaaagaagaagctgtcaaaaatgaacgtgacagaataagcacagagaagaacac
atattgatggcagacaactccctccatatacacactggcacaagotgaagttcggtctcg
ccagatctcagctcctcaagccctgggtcaagcaactgacataaacgttaagaaaattgcaag
tatttggtgatgctgtggaatctatgaacaacagcagctcttagctcttggtgaaatgggctaa
atataatccctgctctctgtgaaat taccattggatgatccaggtggcactgttgagagctca
cgcaggggagcacttactgcttgaggctacaagaagatccatgatgataaagatatttt
gcttttgggaacaactatgatttaccgcccaacagctgtgaaagttagatagccgtgt
ggccaactcgtgtctagatagctgggttagaccatttcaagaatccagattgatgacaa
tgagtagctgttttaaggcaattgtatttttgatccagatgcaaaagggtcaaggca
tccagtaaaaatgaagaacatggaggtccaagtgtagatcggtttggagagctacatcaa
tgatcggcagtagctcccgggggaggttggagagttgctctgctcctgccacaact
gcagagcatcagctggcaaatgatggagcaaatcacagttgttaaaccttttgggatggt
taaaatgcaaatctacttcaggaaatgctattaggtggggctcccaatgatggcagtcac
tctccatcaatcaatgcatccacatttgtctcaagaccatcaactgggacaacataact
tttaggtcccatgtcaacaactgggtccatgcagaccagatctcaactcctgaaacccaact
ccctcccccccaaggctctgggcaagaacagtaaaaaatagctgcaaaccaagcatc
agtcatttcaaccacagcactctcccaaaaaagcaattgtgaaatggttttactctcag
aacggcaactacataaagtgaagaattgttgatctgaaatctcagggatagcaactttt
ggcaaacctcttagccaaggctctctcattgggtgctgtataagatgggttccatattct
tggttatagcttcaactcgtttgtttattgctactatgtaaaacttccacatgcaaccaat
gtatctcaggtttgaagatgtttatagggtatttttccaactgcccctgcaattgtg
cctgaaccaatgaaatctatgtatgagtttcaattgttttataatgttaatttaaac
tgtaaaataatgctttatgtgagtgatgatacagaacaaggttctcgtttttgactgaaaa
tagtagatcagaatctcagtttaataataaattgagctcaagtttttaaaaataaata
aacttggagattagaaaaataaagcagttgctgtagaataggctgtatcttttcaagaa
gaatctcttatggacagctctgtgtaagaagaacactcttggcttagagttaaatctc
ctatcttaagtttagaaaaatcaaaaaaccattccaagatgactggatacttttgaa
atctgactttcttgaagatgtatgtaagcaaaaactgtgctttatcagttaggat
acaggggtgaactgtacaagaacccctcaaacagtgactaaatcaagagaggaatcta
ttcttctcctgaaacaatttagaaaatagttatccatgactagaatagtagatgc
ccacagctggctcccacgtagccaggaatattctataggtggaaggtctgtgtagc
caaagcagtagctcctgagagaactgatctgaggacaagtagccatccaccacct
gtcccttatttggtcctcaataaacacttagggagagatatactatcgtgttttata
aataagggaactttagcttgagggtttaggaacaataaccaaggtccacaacaataacg
agtgagagaaacacattcaagcccaggtctagttgactttaatgaatcttgggtggaa
tgaaaaatgtgaactcttactcatagtggtttttaaataatagcagttgagtgatga
ttggatactattcatcatattgcctataatataattaccgataagcagtgagtgtaa
atgtttagctgtaataagaacccactttgtagtttttaaccagactttctctaaaaa
cattagataaaaataaagattcaccggatggattctgatgaaacgaaacaaagtaaaa
tgactggcttagcagatctcttgaatgtgtagcagccagggatgacaaaatgtcgaa
ctagactgaggagtagagttcaatggagctttaaactctctgatatacacttaagctgga
ggttattttaaacaataaagaacatgggcccactcatgatgcagtggtctctctggtt
gaggagaggggaaattggaaaaactggtagaatatcaataatttttttaaaaaga
ggatcccaactgtaaaagattgaaataactcttccaggattttttaaattgctaaagat
tatgatgcatatctcccacttaactataagtaaaaagggttaatacaagtaacttat
agctcttaagtaaaaatgaaacttataaagctatctatgatttaatagatttaataaa
atctctcaagcactggtaacctgtgaaactgtaaaatataatcaatggggggagttt
ttaaactctatttttgaataattactgtagctctatctcgtgaaataagaatttttga
tttgatcacaataaactttgttagattttgttactttgggggggttcccttaga
agacattaaaaaaaataactgcttggctgtgtaggctggtgaaatgaaatactgaa
cttggcagctataaacaacagaaat ttaattctcgtgtctcaatggtggaagcca
agattaaagggatcaacaataataggctctggatcatacagcatttctagctgtgctc
tatacaataaaaggaaggttagctctcctcagctctctttaaataagatacctaattctc
atgactgaatcaccctccaaaaggcccaccctcctaataaccatcactcggggaactaggt
    
```



ggaaaaatttctccttgggttgctagatottgggtgtattctctgtaagtgtagctcaa  
ataggtcatcatgaaaggttaaaaaagcagggtggccatgttatgctgggttaaggcc  
agggcctctccaaacctgtgccactgacttgcctgtgtgacctgggcaagtcaactaac  
tataaggtgctcagtttctctctgttaaaatggggataataactgactacotcaa  
agggcagtttgaggcatgactaatgctttttagaagcattttgggatccttcagcaca  
ggaaattctcaagacctgagtatftttataataggaatgtccacctgaacttgatacgt

ccgtgtgtccagatgctgtcatttagtotatatggttctccaagaaactgaatgaatcca  
ttggagaagcgggtggataactagcagacaaaatttgagaatacacaacacgattgc  
cacggaacatacagaggatgctttctgtgatgggtgggatttttcccttttatg  
tgggatagtagttactgtgacaagaataatttggaataattctotataatcaac  
totgaagctaatgtactaatctgagattgtgtttgttcataataaaagtgaagtgaatc  
tgattgcaaaaa

## ANEXO 6. LISTA DE MATERIAL

### Reactivos

1. Kit para extracción de ARN de tejido (High Pure RNA Tissue Kit).
  - Sol amortiguadora intermediaria de rompimiento de células (Guanidina-HCL 4.5 mM y fosfato de sodio 100 mM, pH 6.6)
  - ADNsa para eliminación de contaminación por ADN (ADNsa I 10 kU)
  - Solución amortiguadora de lavado I (Guanidina-HCl 5 M, Tris – HCl 20 mM y 20 mL etanol absoluto, pH 6.6)
  - Solución amortiguadora de lavado II (NaCl 20 mM, Tris-HCl 2 mM y 40 mL de etanol absoluto, pH 7.5)
  - Solución amortiguadora de elución para recuperación del ARN (H<sub>2</sub>O libre de ARNsas)
2. Reactivos para síntesis de ADNc (Transcriptor First Strand cDNA Síntesis Kit).
  - Solución amortiguadora para reverso transcriptasa 5X (250 mM Tris/HCl, 150 mM KCl, 40 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.5)
  - Iniciador Oligo dT (50 µM)
  - Inhibidor de ARNsa 40 U/µL (20 mM Hepes-KOH, 50 mM KCl, 8 mM ditiotreitól, 50 % glicerol (v/v), pH 7.6)
  - Mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) 10 mM c/u (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
  - Reverso Transcriptasa 20 U/µL (200 mM fosfato de potasio, 2 mM de ditiotreitól, 0.2 % de triton X-100 (v/v), 50 % de glicerol (v/v), pH 7.2).
  - Iniciadores aleatorios (600 µM)
3. Mezcla de reacción para PCR-Tiempo Real compatible con sondas TaqMan.
  - Solución amortiguadora de PCR-Tiempo Real 5X
  - H<sub>2</sub>O estéril
  - Mezcla de reacción para PCR-Tiempo Real 5X hecha por el fabricante (Taq DNA polimerasa de inicio rápido, solución amortiguadora para mezcla de reacción, MgCl<sub>2</sub> y mezcla de dNTPs)
  - Enzima uracil-N-glicosilada 100 µM
4. Mezcla de reacción para PCR-Tiempo Real compatible con sondas de hibridación.
  - H<sub>2</sub>O estéril
  - Mezcla de reacción para PCR-Tiempo Real 10X (dNTPS, Solución amortiguadora y H<sub>2</sub>O estéril)

- MgCl<sub>2</sub> 40mM
  - Enzima uracil-N-glicosilada 100 µM
5. Sondas TaqMan de la librería universal del genoma humano No. 43 para HNF4γ, No. 82 para SCD1 y No. 60 para GAPDH 100 mM
  6. Iniciadores para gen blanco, 0.5 mM (Invitrogen Custom Primers®).
    - HNF4γ, Sentido: 5' – CAACTTACACAACCTTTGGAGTTTGA – 3'
    - HNF4γ, Antisentido 5' – ACATCATCAGCAAGCCAGGT – 3'
    - SCD1 Sentido: 5' – CCTAGAAGCTGAGAACTGGTGA – 3'
    - SCD1 Antisentido 5' – CATCATCAGCAAGCCAGGT – 3'
  7. Iniciadores para gen constitutivo, 0.5 mM (Invitrogen®).
    - GAPDH, Sentido: 5'–GCCCAATACGACCAAATCC-3'
    - GAPDH, Antisentido: 5'-AGCCACATCGCTGAGACA-3'

#### **Material de plástico y vidrio**

1. Pipetas del siguiente volumen: P10, P20, P200 y P1000 (Pipetman®)
2. Tubos cónicos de polipropileno estériles (Eppendorf®) de 0.5 y 1,5 mL
3. Tubos estériles de 0,2 mL de pared delgada, para PCR-Tiempo Real
4. Guantes de plástico
5. Vasos de precipitado
6. Pipetas de transferencia
7. Probeta graduada de 100, 200, 500 y 1000 mL

#### **Equipo disponible en el laboratorio de Gastroenterología del INCMNSZ**

1. Ultracongelador de -70°C marca Frilatic®, No. B3-0318
2. Refrigerador 4°C /Congelador -20°C marca América®, No. B-B-02661
3. Termociclador Perkin Elmer® modelo 9600
4. Termociclador en tiempo real LightCycler 2.0, de Roche®
5. Espectrofotómetro Perkin Elmer® Lambda modelo E2201
6. Cámaras de electroforesis Gibco BRL Horizon® 58
7. Ultracentrífuga refrigerada Hettich Zentrifugen® Mikro 22R
8. Microcentrífuga MiniSpin de Eppendorf®
9. Fotodocumentador UVP® (TM – 15 de 115V, 50 Hz y 1.20 Amps)
10. Homogeneizador de biopsias marca Politrón Kinematica® AG, PT 1300D
11. Software y cámara fotográfica para geles de agarosa Kodak® modelo DC290
12. Vortex Maxi Mix® del tipo II

## ANEXO 7. METODOS

**1. Extracción de ARN:** Se realizó extracción de ARN total de cada una de las biopsias con kit de extracción High Pure RNA-tissue de Roche®. Para realizar la extracción se colocó la biopsia en un tubo cónico de polipropileno y se adicionaron 300 µL de amortiguador, se homogeneizó a una velocidad de 14,000 rpm y se centrifugó a 12,000 rpm, 2 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo cónico de polipropileno estéril y se agregó 0.5 volumen de etanol absoluto frío, la mezcla se homogeneizó en el vortex por 1 minuto y se transfirió a la columna de separación (colocada en el tubo de recolección) se centrifugó a 13,000 rpm, 30 segundos. Posteriormente se agregó a la columna 100 µL de solución de ADNsas (5 kU) y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente, al finalizar ese tiempo, se lavo la columna con la solución amortiguadora de lavado I y se centrifugó a 10000 rpm, 15 segundos. Enseguida se adicionaron 500 µL de solución amortiguadora de lavado II y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos, nuevamente se adicionaron 300 µL de solución de lavado II y se volvió a centrifugar a 12,000 rpm, durante 2 minutos. La columna se transfirió a un nuevo tubo cónico estéril de polipropileno y se adicionaron 50 µL de solución amortiguadora de elución, el ARN se eluyó a 10,000 rpm, durante 1 minuto. Posteriormente se evaluó la pureza del ARN por el contenido de proteína en espectrofotometría a una absorbancia de 240/260 nm, a partir de una dilución 1:250. Se verificó la integridad del ARN de cada una de las muestras por electroforesis en agarosa al 1.5 %, preparada con: 35 mL de ácido 3-N-monofolinopropanesulfónico (MOPS) al 1X, 0.7 g de agarosa, 4 µL de bromuro de etidio, 300 mL de formaldehído al 37 %, cada muestra se preparó con: 5 µL de ARN, 3 µL de colorante (Azul de bromofenol y xilencianol) y 5 µL de MOPS, se corrió simultáneamente con las muestras un marcador de peso molecular de 100 Pb, la mezcla del marcador se realizó con: 2 µL de marcador de 100 Pb, 3 µL de colorante y 3 µL MOPS, se corrió en una cámara horizontal a 90 volts durante 1 hora. Finalmente se observaron las bandas y se fotodocumentaron.

**2. Síntesis de ADNc:** La síntesis de ADNc, se realizó por RT-PCR de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción: 2 µL de Oligo dT (5 µM), 4 µL de solución amortiguadora para transcriptasa reversa (1X), 0.5 µL de inhibidor de ARNsas (0.5 U/µL), 2 µL de mezcla de dNTPS (0.25 mM), 0.5 µL de transcriptasa reversa (0.5 U/µL), 1 µL de H<sub>2</sub>O y 2 µL de ARN, con un volumen final de 20 µL. El ADNc obtenido se cuantificó en el espectrofotómetro a una absorbancia de 240/260 nm en una dilución 1:250. Se verificó la integridad del ADNc de las muestras por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 %. La banda de ADNc se analizó en un fotodocumentador.

**3. Cuantificación relativa de HNF4 $\gamma$  y SCD1 en función a GAPDH:** Se realizó por PCR-Tiempo Real (Anexo 4.) del gen blanco HNF4 $\gamma$  y SCD1 en función a la expresión del gen constitutivo gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción: 2.4  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, 2.0  $\mu$ L de mezcla de reacción (1X), 0.1  $\mu$ L de sonda, 0.2  $\mu$ L del iniciador sentido (2 mM), 0.2  $\mu$ L de iniciador antisentido (2 mM), 0.1  $\mu$ L de uracil (1  $\mu$ M), 5  $\mu$ L de ADNc, para un volumen final de reacción de 10  $\mu$ L, la amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo uracil a 40 °C durante 10 minutos para eliminar ARN contaminante, 1 ciclo de preincubación a 95 °C durante 10 minutos, 45 ciclos de amplificación dividido en 3 pasos: desnaturalización a 95 °C durante 10 segundos, alineación a 60°C durante 30 segundos y extensión a 70 °C durante 1 segundo y 1 ciclo de enfriamiento a 40 °C durante 30 segundos.