



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

Efecto del ácido Palmitoléico (AGn-7) en la Expresión de HNF4 γ y la
Actividad de la Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI)

TESIS

Para optar el grado de Doctor en Ciencias de la Salud

PRESENTA

M EN C. NALLELY BUENO HERNÁNDEZ

TUTOR

Dr. Jesús Kazuo Yamamoto Furusho
INCMNSZ

CDMX a 23 de julio del 2016.

INDICE

RESUMEN	1
1) INTRODUCCIÓN	2
1.1 Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática	2
1.1.1 Diagnóstico	3
1.1.2 Tratamiento	4
1.1.3 Epidemiología	5
1.1.4 Factores etiológicos	6
1.2 Efecto de los ácidos grasos en procesos celulares relacionados con CUCI	8
1.3 Efecto de los AGn-7 en la expresión de HNF4y durante la EII	10
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	15
4. HIPÓTESIS	15
5. JUSTIFICACIÓN	15
6. OBJETIVOS	16
6.1 Objetivo general	16
6.2 Objetivos específicos	16
7. MATERIAL Y MÉTODOS	17
7.1 Diseño del estudio	17
7.2 Tamaño de muestra	17
7.3 Población de estudio	17
7.4 Procedimiento de estudio	19
7.5 Análisis estadístico	23
7.6 Definición de variables	24
7.7 Preceptos éticos	24
8. RESULTADOS	25
9. DISCUSIÓN	34
10. CONCLUSIONES	37
11. BIBLIOGRAFÍA	38
12. ANEXOS	46

RESUMEN

Introducción: La Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI) se caracteriza por inflamación de la mucosa intestinal, factores genéticos y ambientales se han asociado con la etiología. El gen HNF4 γ actúa en sitios de iniciación transcripcional regulando procesos inflamatorios en la CUCI. El AGn-7 es un ácido graso mono-insaturado que modula procesos inflamatorios.

Objetivo: Evaluar el efecto de suplementar AGn-7 a pacientes con CUCI sobre la expresión del gen HNF4 γ y la actividad inflamatoria en mucosa colónica.

Material y Métodos: Se realizó un ensayo clínico piloto, doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo en pacientes con CUCI activos a quienes se evaluó la actividad de su enfermedad por la escala de Mayo antes y después del tratamiento con AGn-7 y placebo. Los datos se analizaron en el programa SPSS y se consideró significativa una P 0.05.

Resultados: De los 20 pacientes incluidos en el estudio el 70% fueron mujeres y la edad promedio fue de 44 \pm 9 años en el grupo de AGn-7 y 42 \pm 10 años en el grupo placebo. Las características basales entre los grupos no mostraron diferencias significativas. La sangre en heces disminuyó después del tratamiento (-1.93 en el grupo tratado, P=0.05 vs -1.22 en el grupo placebo, P=0.22); el bienestar general mostró cambios en el grupo con AGn-7 (-2.25; P=0.05) comparados con el placebo (-0.33; P=0.74). La Hb aumentó en el grupo con ácido AGn-7 (2.12, P=0.03). En el grupo con AGn-7 se encontraron cambios en las proteínas totales (P=0.02), PCR (P=0.04) y VSG (P<0.05), después de tratamiento al compararlos con el grupo placebo. La expresión del gen HNF4 γ aumentó en el grupo de tratamiento con AGn-7 (P=0.05) y la expresión de la IL-6 disminuyó significativamente (P=0.005).

Conclusión: El tratamiento coadyuvante con AGn-7 durante 8 semanas podría disminuir los síntomas de los pacientes con CUCI y regular la actividad inflamatoria de la enfermedad a través del incremento de la expresión del gen HNF4 y en pacientes con CUCI.

1. 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). Ambas involucran inflamación crónica del tracto gastrointestinal y se asocian con distintos factores ambientales, genéticos e inmunológicos [1, 2].

La CUCI se manifiesta con inflamación de la mucosa intestinal y afecta al colon desde ciego hasta recto. Puede cursar con periodos de actividad que se conocen como brotes o recaídas, en los que se presenta inflamación de la mucosa, ulceraciones, depleción de moco, infiltrados de leucocitos polimorfonucleares y congestión vascular intensa, en la fase inactiva o remisión, sólo 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. Los períodos de remisión pueden durar días, meses o incluso años dependiendo de la respuesta al tratamiento farmacológico [2-4].

1.1.1. Diagnóstico

El diagnóstico de la CUCI, se realiza mediante la integración de los datos obtenidos a partir de las siguientes evaluaciones:

- **Datos clínicos:** Se consideran manifestaciones clínicas de la CUCI, diarrea sanguinolenta con urgencia y tenesmo, fiebre, pérdida de peso, moco con sangre en heces y en algunos pacientes signos graves como fiebre elevada, afectación del estado general, retraso del crecimiento (especialmente en niños), incluso acompañarse de signos clínicos extraintestinales como: pioderma gangrenoso, conjuntivitis, uveitis, artropatía periférica, colangitis esclerosante primaria y complicarse, desarrollándose cáncer de colon [5].
- **Colonoscopia:** Muestra la presencia de eritema, superficie granular, friabilidad, exudado mucopurulento, hemorragia espontánea, ulceraciones y ocasionalmente pseudopólipos.
- **Biopsia:** Es considerada el estándar de oro ya que muestra evidencia de ulceraciones epiteliales, en la arquitectura de las criptas e infiltrado linfoplasmocitario en la lámina propia [3, 6]

En la actualidad se han propuesto muchos índices o criterios de la actividad de la CUCI, pero ninguno se ha validado adecuadamente. El Segundo Consenso Europeo de la CUCI reconoce la necesidad de índices clínicos y endoscópicos validados que se relacionen con el resultado o las decisiones del tratamiento. Aunque las modificaciones de los criterios originales de Truelove y Witts se utilizan en la práctica diaria, la puntuación Mayo (Anexo 1) se utiliza de manera más

frecuente en los ensayos clínicos actuales. Para la práctica clínica, el grupo del Consenso consideró que una combinación de características clínicas, hallazgos de laboratorio, modalidades de imagenología y parámetros endoscópicos, incluyendo histopatología, ayudarán a los médicos en el manejo de sus pacientes [7 ,8]

1.1.2. Tratamiento

El manejo terapéutico de la CUCI se realiza en función a la extensión y actividad de la inflamación, los objetivos clínicos (inducción o mantenimiento de la remisión) y la presencia de manifestaciones extra-intestinales (MEIs) [5].

El tratamiento convencional disponible incluye fármacos antiinflamatorios (aminosalicilatos y esteroides) e inmunomoduladores (azatioprina, 6-mercaptopurina y ciclosporina) sin embargo, estos fármacos producen una supresión general del proceso inflamatorio y tienen una eficacia limitada, así como también efectos adversos tales como: fiebre, náusea, vómito, irritabilidad, insomnio, retención de líquido, debilidad muscular, pérdida de peso y del apetito, entre otros. Cuando el tratamiento convencional no es efectivo se recurre a la terapia biológica anti factor de necrosis tumoral alfa (anti-TNF α) tales como infliximab, adalimumab y golimumab [9].

1.1.3. Epidemiología

La EII es una enfermedad crónica e incurable que ha aumentado su incidencia a nivel mundial en forma progresiva [10]; Sin embargo, la incidencia y prevalencia de la CUCI varía ampliamente dependiendo de factores como el grupo étnico y la localización geográfica de la población. Se ha descrito que la población de origen caucásico judío tiene mayor predisposición genética a padecer esta enfermedad. Un estudio realizado en población mestiza mexicana (individuo nacido en México así como sus dos últimas generaciones) se asoció al gen HLA-DR1 con mayor susceptibilidad para desarrollar la CUCI [11].

En la actualidad a nivel mundial se reportan de 10 a 20 casos nuevos por cada 100,000 habitantes [12]. Un estudio realizado en un hospital de referencia en México, mostró que en un período de 20 años (1987 y 2006) la frecuencia de la CUCI pasó de 28.8 a 76.1 casos nuevos por año, especialmente en pacientes entre 21 y 30 años [2].

En los Estados Unidos de América, la incidencia de CUCI es de 2.2 a 14.3 casos y la prevalencia de CUCI es de 37 a 246; en todos los casos, estos datos son por año y por 100 mil habitantes. En Europa, la incidencia es mayor, con aproximadamente 8.7 a 11.8 casos por 100 mil habitantes. En este continente, las tasas de CUCI son 40% y 80% más altas en el norte que en el sur [13].

En América Latina existen pocos informes sobre la epidemiología de EII, aunque se ha sugerido una menor incidencia y un curso de enfermedad más leve. En Puerto Rico, se ha informado una incidencia es de 12.5 por 100 mil habitantes, por año [14].

Los cambios epidemiológicos que suceden cuando una sociedad ejerce la transición entre estar en desarrollo a ser desarrollado, han permitido comprender mejor la patogénesis de la EII. Se ha observado que con el desarrollo y la modernización de una población específica, la EII emerge principalmente como CUCI; ya posteriormente, se da el incremento en EC, después de un periodo de tiempo variable [14, 15].

Hasta el momento no se han visto resultados contundentes que demuestren que la CUCI tiene predilección por algún sexo. En relación a la edad, tiene una presentación bimodal, con el pico más importante entre los 15 y 30 años, y un segundo pico entre los 55 y 80 años [16].

1.1.4. Factores etiológicos

La etiología de la CUCI es hasta el momento desconocida sin embargo, existen factores que se han asociado a la aparición y evolución de la enfermedad, tales como: agentes infecciosos [17], respuesta defectuosa de la mucosa intestinal contra antígenos luminales [18], factores ambientales mediados por componentes del sistema inmunológico y susceptibilidad genética [3, 19, 20].

La expresión de genes al combinarse con factores ambientales y/o nutricionales pueden propiciar el desarrollo de la EII, actuando sobre la inmunidad innata, específicamente en moléculas presentadoras de antígenos, en la integridad de la respuesta inmune del epitelio intestinal, como transportadores de membrana o manteniendo unidas las células ("*tight junctions*") [21, 22].

Uno de los genes relacionados con la CUCI es el Factor Nuclear 4 γ del Hepatocito (HNF4 γ), el cual pertenece a la familia de receptores nucleares (HNF4), que actúan en sitios de iniciación transcripcional, regulando así procesos inflamatorios. Por otra parte, se ha descrito que HNF4 γ comparte dominios y secuencias de aminoácidos con HNF4 α , por lo que algunos estudios afirman que puede actuar de forma homóloga a éste teniendo así funciones antiinflamatorias muy similares; sin embargo, HNF4 α ha mostrado una mayor expresión y actividad transcripcional por lo que no se puede determinar tengan exactamente las mismas funciones [23-25]. Regiones específicas de HNF4 α participan en cambios de la integridad del epitelio intestinal y por consecuencia en la patogénesis de la CUCI. Se realizó un estudio con biopsias de varias regiones del colon de modelos animales y 42 pacientes con EII, donde se observó que, la expresión de HNF4 α fue significativamente menor y se acompañó de mayor presencia de signos y síntomas clínicos secundarios a la inflamación intestinal tanto en ratones como en humanos, lo que sugiere que, este gen puede tener efecto protector en los pacientes con EII [26, 27]. Por otra parte se ha medido la expresión de HNF4 γ en muestras endoscópicas de ciego y colon de pacientes con EII donde se analizaron aproximadamente 400 genes que pudieran expresarse anormalmente, se encontró que la expresión de HNF4 γ estuvo baja sin embargo, el estudio se realizó por la técnica de microarreglos, la cual es utilizada para medir alteraciones en la expresión de un gran número de genes sin determinar con claridad si se encuentra aumentada o disminuida [28].

Hasta el momento se desconoce la función específica de HNF4 γ , es homólogo de HNF4 α el cual se asocia con el metabolismo de ácidos grasos, procesos anti-inflamatorios y en la transcripción de genes que controlan la homeostasis de la glucosa; en este tipo de alteraciones se ha propuesto que cambios en su expresión con una alimentación rica en ácidos grasos.

1.2. Efecto de los ácidos grasos en procesos celulares relacionados con CUCI

Es ampliamente conocida la eficacia de los ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) y mono-insaturados (MUFA) en el tratamiento de pacientes con CUCI por los diferentes efectos anti-inflamatorios que ejercen. En la actualidad se ha documentado que la ingestión de ácidos grasos omega (AGn) 3 y 6 podría tener un efecto benéfico en la inflamación tanto intestinal como en otras regiones. En estudios recientes se ha demostrado que la ingestión de ácidos grasos omega juega un papel crucial en los procesos inflamatorios de los pacientes con EII.

A nivel celular se ha descrito que los PUFA actúan directamente en la regulación de inflamación intestinal a diferentes niveles del proceso inflamatorio, en pacientes con EII interviene en la regulación de factores de transcripción específicos que inhiben el proceso inflamatorio. Una de las vías más estudiadas es la de los PPAR α , donde los AG proveen de energía a la célula, permiten la organización del citoesqueleto y reducen el estrés oxidativo, así como la regulación de la vía del óxido nítrico (NO) inducida por la regulación de la óxido nítrico sintetasa (iNOS); Araki y col. mostraron que los 2 ácidos grasos específicos de la familia de los

omega 3, suprimen la inducción de la iNOS y el factor de necrosis tumoral $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), el cual regula la transcripción de enzimas pro-inflamatorias [29, 30].

Por otra parte, clínicamente en los pacientes con CUCI se ha visto asociación en el mantenimiento de los periodos de remisión y la ingestión elevada de MUFA a través de la dieta [31, 32]; sin embargo, hasta el momento no se ha descrito el mecanismo específico por el que los éstos influyen en el proceso inflamatorio y en su sintomatología aunque se sabe que el tipo de grasa ingerida puede modificar la síntesis de eicosanoides, así como de algunos mecanismos inmunomoduladores, lo que influye en la evolución de la enfermedad, lo que se manifiesta con disminución del número de evacuaciones, diarrea y tenesmo [33].

La ingestión de ácidos grasos específicos puede tener efectos importantes en la composición de la membrana lipídica, la expresión de genes, cambios en el metabolismo y diferenciación celular. En modelos animales se reporta que induce factores de transcripción, como el HNF α y NF- $\kappa\beta$, los cuales promueven la generación de enzimas pro-inflamatorias [34]. En modelos animales con CUCI inducida experimentalmente concluyó que el uso de dietas equilibradas que contengan AGn-3 y 6 puede disminuir la inflamación y el daño en la mucosa intestinal [35].

1.3. Efecto de los AGn-7 en la expresión de HNF4 γ durante la EII

El AGn-7 o ácido palmitoléico es un tipo de ácido graso de cadena larga formado por 16 carbonos, perteneciente a la familia de los MUFA, que en la actualidad se ha relacionado con procesos anti-inflamatorios su fuente principal es en aceites de origen animal, especies marinas y principalmente en una planta denominada “espino amarillo” o *Hippophae rhamnoides* (común en Europa y zonas de Asia menor). Por ser un ácido graso insaturado provee los beneficios propios de una grasa de origen vegetal, buena digestibilidad y funciones protectoras en enfermedades de inflamación crónica [36].

Se han realizado diferentes estudios para documentar su actividad específica del AGn-7 y una de las principales líneas de investigación se enfoca a una función protectora en piel, mucosas y ulceraciones gástricas, asociada principalmente a una disminución en el número de bacterias gram-positivas en estas zonas, promoviendo que la primera barrera de defensa inmune este activada [36, 37].

Yang y col. realizaron un ensayo clínico, doble ciego para evaluar el efecto de suplementar durante cuatro meses 5 g de aceite de la pulpa o semilla de espino amarillo y placebo en pacientes con dermatitis atópica y concluyeron que esta suplementación disminuye significativamente la intensidad de los signos y síntomas, apenas con un mes de tratamiento [38]. También se ha observado el efecto del AGn-7 en la apoptosis en un modelo *in vitro* donde se documentó disminución de la misma [39].

En un estudio realizado con biopsias de sigmoides en pacientes con diagnóstico de CUCI confirmado por exámenes radiológicos, histológicos y endoscópicos, se observó un porcentaje significativamente menor del AGn-7 en los fosfolípidos de cadena larga de las células del colon de estos pacientes en comparación con

personas sanas [40]. Por otra parte, la caracterización del gen en modelos celulares mostró que HNF4 γ es un factor de transcripción con ligandos de diferentes ácidos grasos cis-monoin saturados como el AGn-7 (Fig. 1) [41].

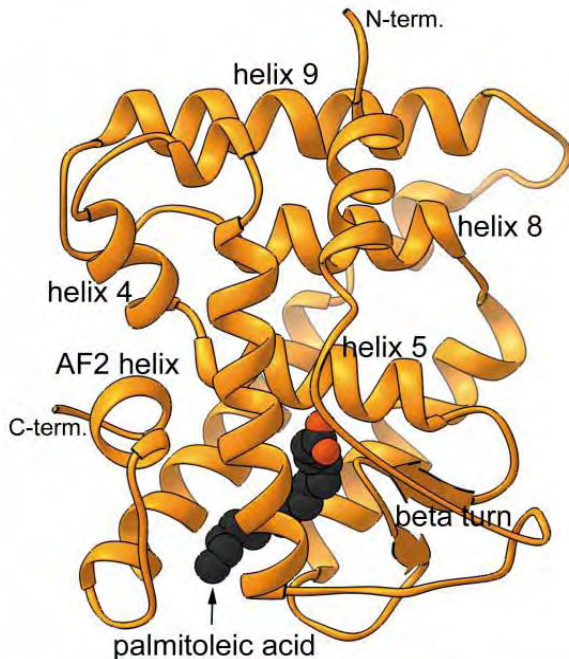


Figura 1. Diagrama de HNF4 γ . En negro se muestran los ligandos del AGn-7 (tomada de Wisely y col., 2002).

En la Clínica de EII del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Subirán (INCMNSZ), se midió la expresión del HNF4 γ en biopsias de recto de 30 pacientes con CUCI activos, 30 pacientes en remisión y 30 pacientes control (sin inflamación intestinal), se encontró que la expresión estuvo disminuida en los CUCI activos comparado con los pacientes en remisión ($p < 0.01$) y el grupo control ($p < 0.03$) (Fig. 2) [42].

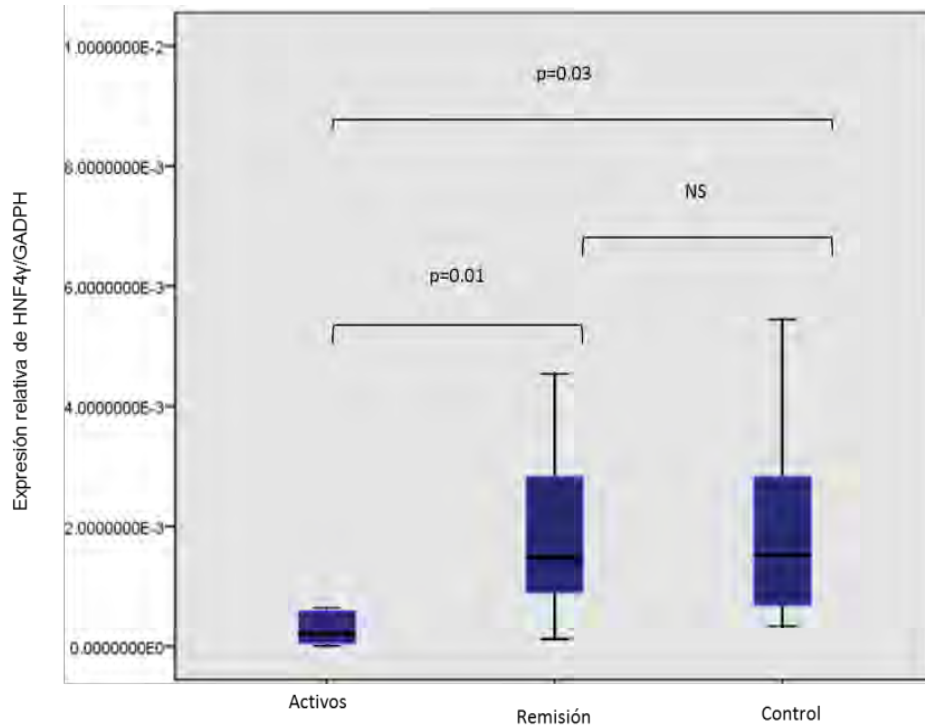


Figura 2. Expresión del gen HNF4 γ en pacientes con CUCI activo, en remisión y en un grupo control [42].

Los estudios recientes muestran que los MUFA y PUFA pueden regular procesos inflamatorios a través de diferentes vías, un ejemplo de éstas es la inhibición de la iNOS, la cual activa proceso inflamatorio en los pacientes con EII. El consumo de ácidos grasos regula factores de transcripción encargados de regular procesos inflamatorios, en vías específicas. En la figura 3 se muestra la interacción entre ácidos grasos, la regulación de la transcripción de HNF4 γ y la producción de enzimas pro-inflamatorias por la vía iNOS [44].

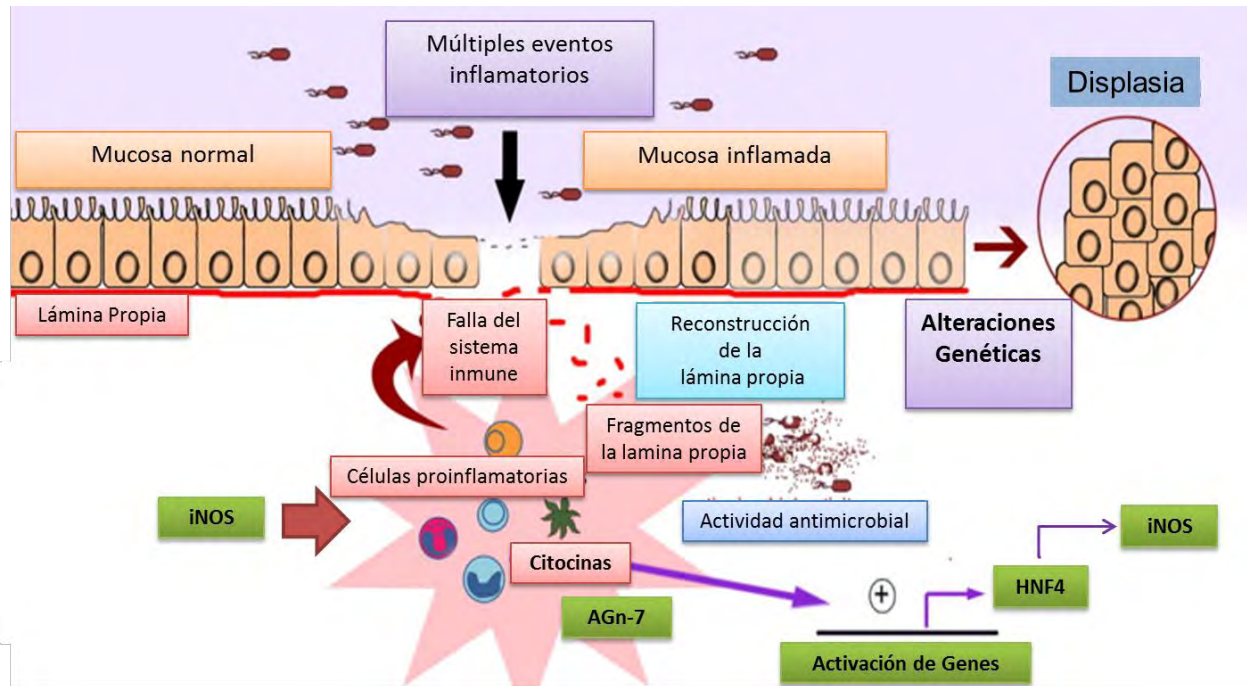


Figura 3. Esquematización del proceso inflamatorio en la CUCI, en verde se muestra el proceso de regulación inflamatoria de los AGn-7.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México la incidencia de la CUCI ha aumentado significativamente, especialmente en adultos jóvenes entre 20 y 40 años (económicamente activos), por otro lado el tratamiento convencional no es del todo efectivo, por lo cual, se recurre a terapia biológica cuyos costos son elevados y sus efectos adversos disminuyen la calidad de vida de los pacientes.

Estudios recientes han descrito que los MUFA pueden tener benéficos importantes en la disminución de los síntomas y mejoría de los pacientes con EII; sin embargo, no se ha descrito con certeza la vía por la cual disminuye la inflamación; se ha descrito que específicamente los AGn-7 podrían regular procesos inflamatorios en los pacientes con CUCI, incluso la concentración de estos ácidos grasos se encuentra significativamente disminuida en los pacientes con actividad. Por otro lado, genes como el HNF4 γ se encuentra disminuido en su expresión lo que podría estar asociado a la disminución de los ligandos de AGn-7.

Dosis específicas de AGn-7 como tratamiento coadyuvante podrían tener un efecto benéfico en el aumento de la expresión del gen HNF4 γ y en consecuencia en el curso clínico de la CUCI sin embargo, no se ha realizado suficiente investigación. Evaluar un tratamiento coadyuvante de origen natural como el AGn-7 podría mejorar el desenlace en pacientes con CUCI, con menos efectos secundarios que los tratamientos convencionales.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuánto se modifica la expresión del gen HNF4 γ y la actividad inflamatoria colónica de los pacientes con CUCI activa con la ingestión de 720 mg de AGn-7 durante 8 semanas, como tratamiento coadyuvante?

4. HIPÓTESIS

El consumo de 720 mg de AGn-7 al día durante 8 semanas aumenta la expresión génica de HNF4 γ en pacientes con CUCI y mejora los síntomas de la CUCI.

5. JUSTIFICACIÓN

En estudios recientes se ha descrito que el gen HNF4 γ puede modular la inflamación en los pacientes con CUCI sin embargo, la concentración de RNAm del gen se encuentra significativamente disminuida en estos pacientes; por otra parte, el gen presenta ligandos de AGn-7 que si se aumentaran en concentración podrían promover aumento del ARNm. Realizar un estudio que promueva aumento de la concentración, permitirá aumentar la expresión del gen y la disminución de la inflamación junto con los síntomas de la CUCI, lo que a futuro podría ofrecer a los pacientes con CUCI un tratamiento coadyuvante de origen natural que mejore el pronóstico.

Implementar los AGn-7 como tratamiento coadyuvante al convencional en los pacientes con CUCI, podría disminuir el uso de tratamientos como la terapia

biológica, los cuales son muy costosos. Por lo anterior realizar éste estudio permitiría evaluar por primera vez una dosis específica de AGn-7 que permita ver efectos benéficos en los pacientes con CUCI y podrá generar posibles hipótesis del efecto de los AGn sobre el proceso inflamatorio.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Cuantificar los cambios en la expresión del gen HNF4 γ y medir los cambios en la inflamación del colon de pacientes con CUCI activa, después de consumir 720 mg de AGn-7 durante 8 semanas.

6.2. Objetivos específicos

- Cuantificar el efecto de la ingestión de 720 mg de AGn-7 en la expresión génica de HNF4 γ en biopsias colónicas de pacientes con CUCI.
- Establecer la existencia de una relación entre en la expresión génica de HNF4 γ y el grado de actividad de los pacientes con CUCI.
- Medir el efecto sobre HNF4 α y el marcador de inflamación como la IL-6.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Diseño del estudio

Se realizó un ensayo clínico piloto, aleatorizado, doble ciego.

7.2. Tamaño de muestra

Se planteó evaluar 2 grupos: a uno se le aplicó la intervención con el AGn-7 y al otro con placebo. Interesó conocer si existen diferencias en la media de la expresión del gen HNF4 γ antes y después de la intervención entre ambos grupos, para lo cual se planteó una muestra piloto de 10 pacientes por grupo.

7.3. Población de estudio

Se realizó un muestreo consecutivo de pacientes con CUCI activa pertenecientes a la Clínica de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del Departamento de Gastroenterología del INCMNSZ.

7.3.4.1. Criterios de inclusión

- Pacientes que tengan diagnóstico definitivo de CUCI confirmado por histopatología
- Con actividad leve o moderada a nivel endoscópico
- En tratamiento únicamente con 5-aminosalicilatos (5-ASA)
- IMC de 18 a 34.9 kg/m²
- Edad de 18 a 59 años

- Nacidos en México incluyendo las dos últimas generaciones
- Que aceptaran participar en el estudio mediante la firma de la carta de consentimiento informado.

7.3.4.2. Criterios de exclusión

- Enfermedades asociadas como: diabetes mellitus, hipertensión arterial, dislipidemias, aterosclerosis y síndrome de malabsorción intestinal.
- Enfermedades autoinmunes como: lupus, VIH, cáncer, hepatitis o algún otro tipo de colitis como: infecciosa, post-radiación, medicamentosa, colitis indeterminada y enfermedad de Crohn.
- Consumo de medicamentos que inhiban absorción de grasas como el Orlistat
- Cirugía parcial o total de estómago o defectos en la función de primera o segunda porciones del intestino delgado.
- Que consuman esteroides
- Pacientes en remisión histológica, clínica y endoscópica.
- Pacientes que consuman capsulas con más de 100 mg de AGn-3, 6 y 9.

7.3.4.3. Criterios de eliminación

- Pacientes con poco apego a la maniobra
- Inasistencia a más de dos consultas o visitas.
- Pacientes que empeoraran su cuadro clínico y hayan requerido tratamiento con esteroides, infliximab o más de 4 g de 5-ASA.
- Pacientes que decidieran retirarse voluntariamente del estudio

7.4. Procedimiento de estudio

El estudio se llevó a cabo mediante 2 fases: la clínica y la básica; en la primera fase, se realizó el seguimiento de los pacientes durante las 8 semanas y en la segunda fase el procesamiento de las muestras biológicas (biopsias de colon).

FASE I: Clínica. Asignación de la maniobra y seguimiento de los pacientes.

A) Basal

- A cada uno de los pacientes incluidos en el estudio se les realizó una colonoscopia de escrutinio para evaluar actividad inflamatoria en mucosa colónica y extraer una biopsia de 2 mm para evaluar su actividad histológica y cuantificar el ARNm del gen HNF4 γ .
- Previo al inicio del tratamiento a cada paciente se le evaluó la actividad clínica en función a los signos, síntomas y estado general que cada paciente presentara al inicio del estudio (Anexo 2).
- Cada uno de los puntajes anteriores permitió asignar una calificación, en función al “Puntaje Mayo” (Anexo 1) para determinar de manera global la actividad inflamatoria de cada paciente.
- Aleatorización de la maniobra: Se etiquetaron 80 frascos, de los cuales 40 contenían 84 cápsulas de AGn-7 y 40 frascos contenían 84 cápsulas de placebo (4 frascos por paciente); un investigador externo asignó al azar 20 números consecutivos a cada grupo de frascos (placebo y AGn-7), de tal forma que cada uno tuvo un número de identificación que le correspondió a cada paciente conforme fueron entrando al estudio (Fig. 3):

- **Tratamiento más AGn-7:** En éste grupo cada paciente continuó con su tratamiento convencional a base de mesalazina más 720 mg de AGn-7 al día, que consumió 2 cápsulas con 120 mg de AGn-7 en cada comida (3 veces al día) al día durante 8 semanas.
- **Tratamiento más placebo:** Los pacientes en éste grupo continuaron con su tratamiento convencional a base de mesalazina más tomas de 2 cápsulas con placebo en cada comida (3 veces al día) diariamente durante 8 semanas.

Todos los pacientes se estandarizaron en su alimentación con una dieta individualizada (energía por Harris y Benedict), en la que el 60% del valor calórico total fue aportado por HCO, 20% por proteínas y 20% de lípidos en este último se limitó a máximo 2 equivalentes a la semana el consumo de alimentos que con elevadas cantidades de AGn-3, 6 y 9, como oleaginosas, pescado azul y aceites enriquecidos con estos omegas.

B) Seguimiento

- El paciente asistió después de la semana de inicio (basal) cada 2 semanas para evaluar apego al tratamiento, presencia de síntomas, entrega de cápsulas para el periodo correspondiente y evaluar la actividad clínica en función a la presencia de signos, síntomas y estado general.
- Se tomó una segunda biopsia colónica al terminar la maniobra para seguimiento del tratamiento del paciente y medir nuevamente los cambios en la expresión del gen, así como la actividad de la enfermedad a través de la actividad endoscópica y el análisis histológico (Fig. 4).

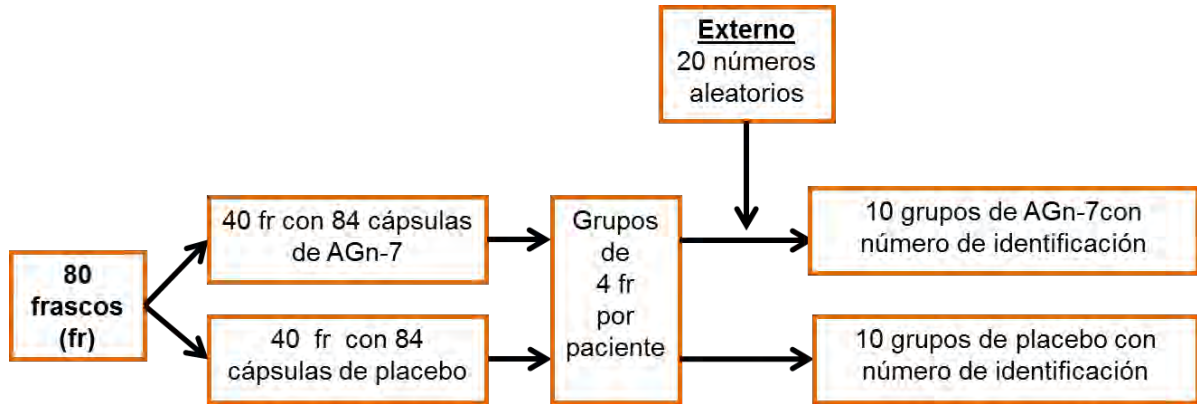


Figura 3. En el diagrama se muestra la aleatorización de la maniobra, donde se muestra el número de frascos que fueron necesarios para el estudio y como se realizó la aleatorización de los grupos.

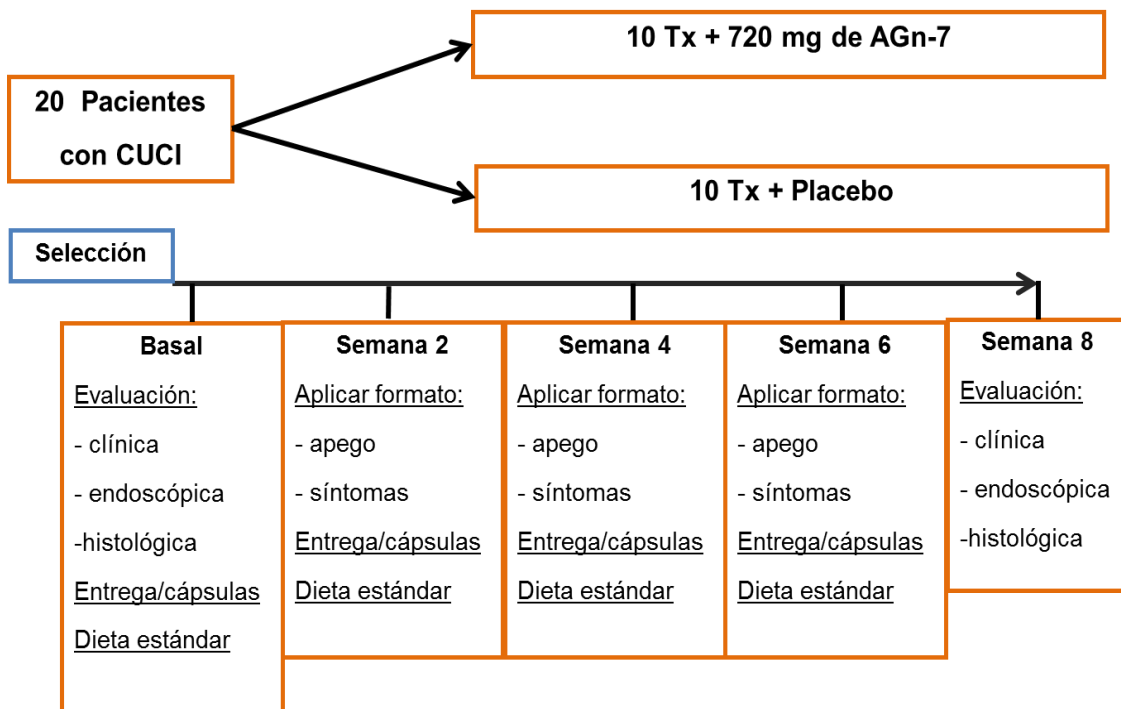


Figura 4. Esquema de seguimiento y diseño metodológico. En el esquema se muestra el seguimiento de los pacientes y las maniobras que se realizaron en cada una de las visitas durante el estudio.

FASE II: Básica. Procesamiento de muestras para medir expresión de genes.

Cada una de las biopsias tomadas (2 mm) en ambos grupos de estudio se almacenaron a -70°C con solución de ARN lator, para posteriormente llevar a cabo el siguiente procedimiento:

A) Extracción del ARN-total: Cada muestra fue procesada por la técnica de isotiocianato de guanidina con el kit de extracción High Pure RNA-tissue de Roche®. Para obtener la mayor cantidad ARN presente en la biopsia, posteriormente se realizó un análisis cuali y cuantitativo, para asegurar la pureza del ARN extraído y determinar la cantidad necesaria para el siguiente procedimiento.

B) Síntesis de ADN complementario (ADNc): Ésta se realizó por retro-transcripción en PCR (RT-PCR); previa cuantificación del ARNm para construir una cadena de ADN de la plantilla de ARN, realizado en el lugar de la polimerasa y proceder a la cuantificación. Se utilizó 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 H₂O y 2 μL de ARN, con un volumen final de 20 μL . Finalmente para medir la expresión génica a través del ARNm de HNF4 α , HNF4 γ , IL-6 y GAPDH como gen de referencia.

C) PCR-Tiempo Real: Se llevará a cabo con el objetivo de medir la cantidad de ARNm del gen HNF4 γ en tejido inflamado del paciente por Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR) con sondas de TaqMan

Roche® usando como gen de referencia GAPDH y así medir la expresión del gen HNF4 γ antes y después del tratamiento, los oligos que se utilizaron se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Oligos utilizados para cada gen en Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real

	Izquierdo	Derecho
HNF4 α	tgacaacctgtgcaggaga	cgttggtcccatatgtcc
HNF4 γ	tgactgaatcacctccaaa	gctgacacctagtccccaga
IL-6	cgttggtcccatatgtcc	cgttggtcccatatgtcc
GAPDH	agccacatcgctgagaca	gccaatacgaccaaattcc

7.5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete SPSS versión 17. Para evaluar la distribución de los datos se utilizó la prueba de Kolmogórov-Smirnov, las variables con distribución normal se describieron con promedios y desviación estándar, t pareada para evaluar los cambios antes y después del tratamiento y X^2 para comparar las variables cualitativas de los grupos; las variables que no tuvieron una distribución normal se describieron con medianas y rango intercuartil, prueba de Wilcoxon para evaluar los cambios antes y después del tratamiento y U de Mann Whitney, para evaluar los cambios en la expresión del gen entre grupos. Se consideró significativa una $P < 0.05$.

7.6. Definición de variables

A) Variables independientes: AGn-7 y placebo.

B) Variables dependientes: Expresión relativa de HNF4 γ , sangre en heces, episodios de diarrea, número de deposiciones, grado de actividad histológica y endoscópica.

C) Variables confusoras: Presencia de manifestaciones extraintestinales (MEIs) como: pioderma gangrenoso, conjuntivitis, uveitis, artropatía periférica, colangitis esclerosante primaria y tiempo de diagnóstico de la CUCI.

7.7. Preceptos éticos

Este protocolo se realizó bajo los estatutos referidos en el artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, donde se documenta que los pacientes incluidos en éste estudio tuvieron un riesgo mayor al mínimo sin embargo, ningún paciente presentó complicaciones durante los procedimientos. El protocolo fue sometido y aprobado por el Comité de Ética del INCMNSZ con el número de referencia REF453; así como registrado en la página del ClinicalTrials.gov, con el que se identificó con el número NCT01771224.

A cada paciente se le informó sobre el objetivo de la presente investigación, el procedimiento a seguir, los derechos que tiene por participar en el estudio y esta misma información se le dio a conocer en el consentimiento informado (Anexo 3).

7.8. Financiamiento

El presente estudio fue financiado con recursos de la Clínica de EII del departamento de Gastroenterología del INCMNSZ.

8. RESULTADOS

FASE I: Clínica. Asignación de la maniobra y seguimiento de los pacientes.

Asignación de la maniobra

En la primera fase del estudio, se incluyeron a 20 pacientes con diagnóstico de CUCI confirmado por histopatología, que acudieran a consulta de seguimiento y fuera necesario que se realizaran una colonoscopia de escrutinio. Cada uno de los pacientes incluidos en el estudio fueron aleatorizados de forma cegada a cada uno de los dos grupos, tratamiento con AGn-7 y placebo, del total de la muestra en ambos grupos el 70 % fueron mujeres y la edad promedio fue de 44 ± 9 años en el grupo de intervención y 44 ± 10 años en el grupo control, el tiempo de evolución previo al inicio del estudio fue de 8 y 10 años en el grupo de intervención y placebo respectivamente, en ambos grupos los pacientes incluidos en el estudio tenían por lo menos una MEI, las cuales no mostraron diferencias significativas entre grupos ($P > 0.05$) (Tabla 2).

Tabla 2. Características demográficas y clínicas de la muestra

	AGn-7	Placebo	
	(n=10)	(n=10)	P
Sexo (H/M)	4/6	2/8	
Edad (años±DE)	44±9	42±10	NS
Edad al diagnóstico (años)	34	35	NS
Tiempo de evolución de evolución (años)	8	10	NS
Peso (kg)	61	64	NS
Índice de Masa Corporal (kg/m ²)	24	25	NS
Manifestaciones extraintestinales (n)	3	5	NS
Tratamiento con 5-ASA (g)	3.5	4	NS

Seguimiento de los pacientes.

El seguimiento de los pacientes se realizó durante 8 semanas, a lo largo de ese periodo ningún paciente empeoró su actividad clínica, endoscópica, histológica o bioquímica, tampoco fue necesario aumentar o cambiar su tratamiento convencional.

La actividad clínica y bioquímica, fueron los parámetros que mostraron cambios antes y después del tratamiento con AGn-7, no así en el grupo placebo, al evaluar las diferencias de cambio por aspectos individuales, se encontró que la presencia de sangre en heces (P=0.05) disminuyó significativamente, de igual forma el bienestar general evaluado por escala del 0 al 3 donde 0 es bien y 3 muy mal (P=0.02).

En la evaluación de la actividad bioquímica se encontró que de forma general (todos los parámetros a evaluar) no existieron cambios significativos sin embargo, en la evaluación individual, la hemoglobina ($P=0.03$) mejoró significativamente en el grupo de tratamiento con AGn-7, a diferencia del grupo placebo, donde no existieron cambios significativos (Tabla 3).

Al comparar el grado de cambio de cada parámetro bioquímico después del tratamiento entre el grupo tratado con AGn-7 y el grupo placebo, se encontraron cambios en las proteínas totales ($P=0.02$), PCR ($P=0.04$) y VSG ($P<0.05$) (Tabla 4).

Tabla 3. Diferencia de cambios entre los grupos estudiados antes y después de la intervención.

	AGn-7 (n=10)			Placebo (n=10)		
	Pre Tx	Post-Tx	P	Pre Tx	Post-Tx	P
Actividad clínica	-1.511		0.13	-1		0.32
<i>Cantidad de deposiciones</i>	-1.414		0.16	-0.447		0.65
<i>Sangre en heces</i>	-1.933		0.05	-1.222		0.22
<i>Dolor abdominal</i>	-0.52		0.60	-0.264		0.79
<i>Bienestar general</i>	-2.251		0.02	-0.333		0.74
Actividad endoscópica	-0.414		0.68	-1		0.32
Actividad histológica	-0.447		0.65	-1		0.32
Actividad bioquímica	-1.134		0.26	0		1.00
<i>Proteínas totales</i>	1.414		0.15	0		1.00
<i>Albúmina</i>	0.577		0.56	0		1.00
<i>Hemoglobina</i>	2.126		0.03	0.135		0.89
<i>PCR^a</i>	-1.342		0.18	-1		0.32
<i>VSG^b</i>	-1.367		0.17	-0.701		0.48
Actividad por escala Mayo	-0.974		0.48	-1		0.28

^a Proteína C Reactiva.

^b Velocidad de Sedimentación Globular.

Tabla 4. Efecto estimado de cambio en valores bioquímicos de pacientes con CUCI que recibieron AG-7 o placebo.

	AGn-7 (n=10)	Grupo Placebo (n=10)	Efecto estimado	P
Proteínas totales (g/dL)				
Basal	7.3	7.5		
Post Tx	8.7	7.6		
			1.1 (6.7 a 8.8)	0.02
Albúmina (g/dL)				
Basal	3.8	4.3		
Post Tx	4.3	4.6		
			-0.3 (0.01 a 4.3)	NS
Hemoglobina (g/dL)				
Basal	12.3	13.2		
Post Tx	14.4	14.1	0.3 (0.1 a 10.2)	NS
PCR (mg/dL)				
Basal	3.2	3.4		
Post Tx	1.8	2.4		
			-0.6 (0.1 a 0.9)	0.04
VSG (mg/dL)				
Basal	29.6	22.6		
Post Tx	28.3	21.9		
			6.4 (3.5 a 10.5)	<0.05

FASE I: Básica. Procesamiento de muestras para medir expresión de genes.

Expresión de genes HNF4 γ , HNF4 α e IL-6 en mucosa colónica

Se evaluó la expresión de los genes HNF4 γ , HNF4 α e IL-6 así como el gen de referencia (constitutivo) GADPH en ambos grupos del estudio (grupo tratado con AGn-7 y grupo placebo).

Los resultados mostraron que la expresión del gen HNF4 γ está significativamente mayor ($P=0.05$) en los pacientes con CUCI después del tratamiento con AGn-7, en comparación con aquellos que recibieron placebo, donde la expresión se mantuvo igual antes y después del tratamiento (SN) (Figura 2).

Por otra parte la expresión del gen HNF4 α mostró tendencia en el aumento de la expresión antes y después del tratamiento con el AGn-7 ($P=0.07$), comparado con el grupo de pacientes que recibió placebo, donde la expresión se mantuvo sin cambios (NS) (Figura 3).

Se evaluaron los cambios de la IL-6 como marcador de inflamación antes y después del tratamiento en ambos grupos y se encontró que la expresión disminuyó significativamente en los pacientes que recibieron tratamiento con los AGn-7 ($P=0.005$) al igual que en los pacientes que recibieron placebo sin embargo, esta disminución no fue tan significativa como en el grupo de tratamiento con AGn-7 ($P=0.03$) (Figura 4).

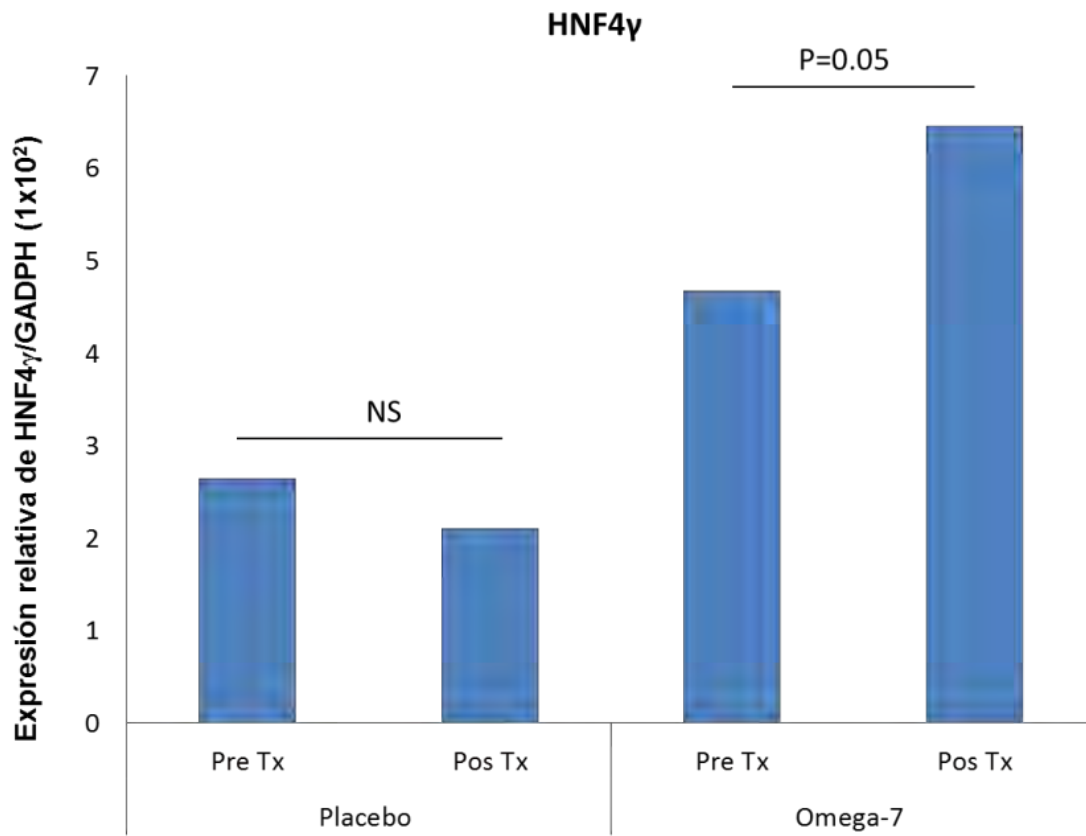


Figura 2. Análisis del ARNm de HNF4 γ en pacientes con CUCI activos antes (pretratamiento) y después (post-tratamiento) del tratamiento con AGn-7 y placebo, tomando como gen de referencia el GADPH. El análisis para evaluar los cambios Pre y Pos Tx, se realizó con la prueba de Wilcoxon.

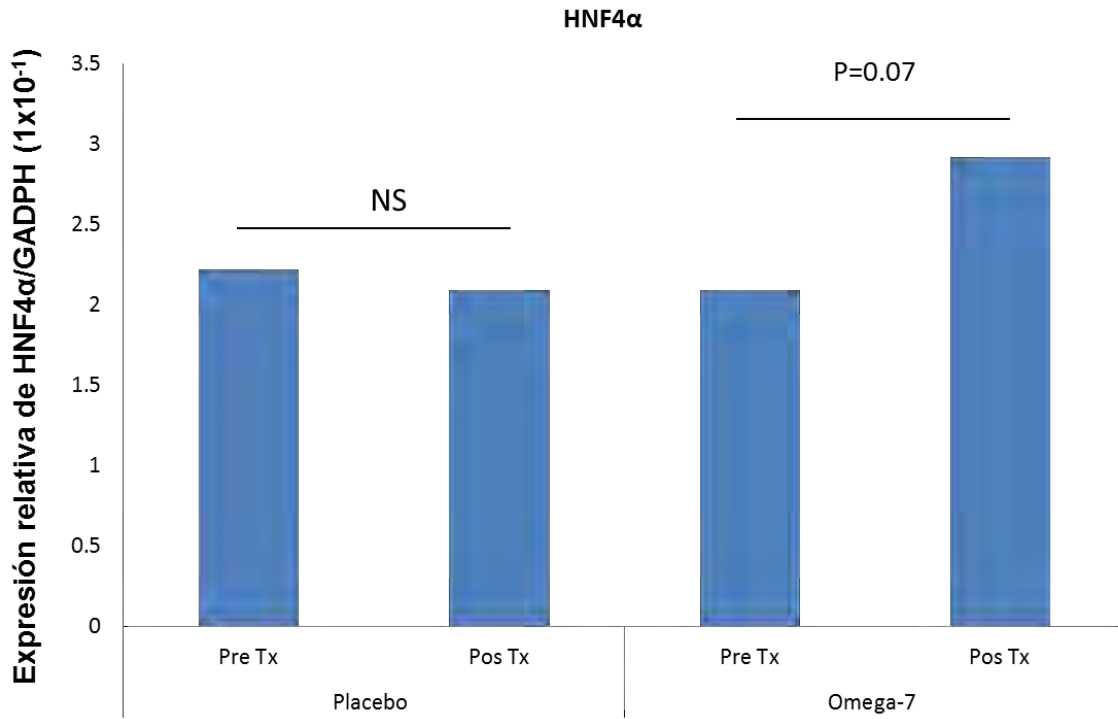


Figura 3. Análisis del ARNm de HNF4 α en pacientes con CUCI activos antes (pretratamiento) y después (post-tratamiento) del tratamiento con ácido graso omega-7 y placebo, tomando como gen de referencia el GADPH (Wilcoxon).

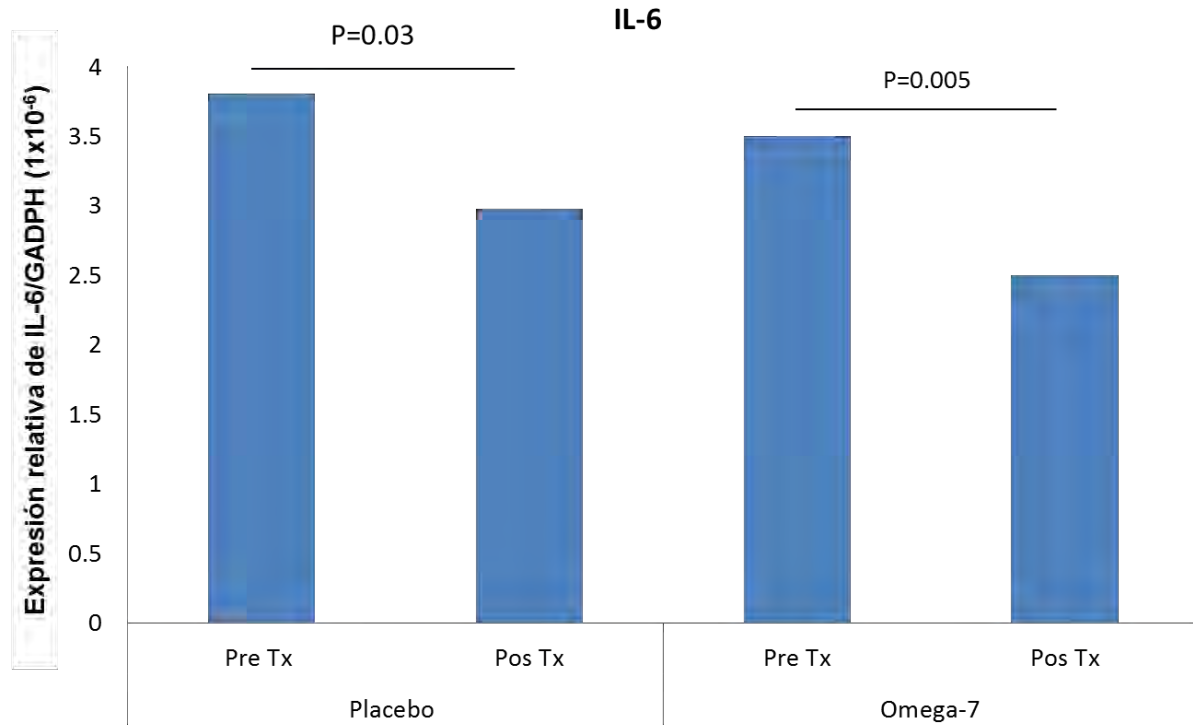


Figura 4. Análisis del ARNm de IL-6 en pacientes con CUCI activos antes (pretratamiento) y después (post-tratamiento) del tratamiento con ácido graso omega-7 y placebo, tomando como gen de referencia el GADPH. El análisis para evaluar los cambios Pre y Pos Tx, se realizó con la prueba de Wilcoxon.

9. DISCUSIÓN

En este estudio se comparó el efecto del AGn-7 sobre la actividad inflamatoria de la CUCI en pacientes activos y la expresión de los genes HNF4 γ y HNF4 α ; la actividad de la inflamación también se evaluó a través de la expresión de la IL-6. Nuestros resultados muestran que en el grupo de pacientes que consumió AGn-7 la actividad clínica (sangre en heces, bienestar general) mejoró significativamente al compararlos con el grupo que recibió placebo. Un estudio publicado por Ferguson y cols. mostraron que diferentes componentes de la dieta como los MUFA podrían modular genes activadores de procesos inflamatorios en pacientes con EII [21]. Otros estudios han descrito la utilización del AGn-7 como protector de la mucosa de duodeno y estómago, lo que sugiere que tiene un efecto regenerador de mucosas y, por tanto, podría explicar la mejoría en el estado general y la disminución de sangre en las evacuaciones de los pacientes que recibieron AGn-7 durante el presente estudio. El aumento en la concentración de Hb en el grupo de pacientes tratado con AGn-7 puede ser reflejo de la disminución de sangre en las evacuaciones ($P=0.05$), algo que no sucedió en el grupo que recibió placebo. Estos cambios sugieren que la inflamación de la mucosa mejora con el uso del AGn-7.

Otros valores bioquímicos de inflamación en pacientes con CUCI que mejoraron con el uso del AGn-7, al disminuir los niveles de PCR-us y VSG así como aumento en los niveles de albúmina y proteínas totales. Además se encontró que aquellos pacientes que fueron sometidos a tratamiento con AGn-7, la concentración de proteínas totales fue significativamente mayor después del tratamiento a diferencia

del grupo que recibió placebo, donde no existieron cambios. Estos hallazgos confirman lo publicado por Berntein y cols, quienes mostraron que una toma de 220 mg ácido cis-palmitoléicos (omega-7) durante 30 días reduce significativamente la concentración de PCR-us en pacientes con inflamación generalizada hasta en un 44%, debido a que el ácido graso omega-7 reduce la expresión del ARNm de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α y resistina [44]. Estos hallazgos confirman que en la etiología de la CUCI participan factores genéticos e inmunológicos posiblemente modulados por factores ambientales como los ácidos grasos, mismos que modifican la expresión de múltiples genes entre los que se encuentran el HNF4 γ y HNF4 α [45, 46]. Los MUFA son ácidos grasos cuya concentración correlaciona con la disminución de la actividad de la CUCI a través de diferentes vías [47-50]; así un estudio encontró que la concentración del AGn-7 en mucosa intestinal de pacientes con CUCI estuvo significativamente disminuida en comparación con la de un grupo sin inflamación intestinal, lo que explica que la expresión pueda disminuir mientras el proceso inflamatorio se mantiene [40]. En nuestro estudio se midió el ARNm de HNF4 γ y HNF4 α en el grupo que recibió tratamiento con Agn-7 y en el grupo placebo antes y después de la intervención, encontrándose que en el grupo tratado con AGn-7 la expresión de HNF4 γ y HNF4 α aumentó significativamente después de la intervención en comparación con el grupo que solamente recibió placebo.

Estos resultados sugieren que la suplementación de AGn-7 juega un papel importante en la regulación de procesos inflamatorios, ya que se sabe que los genes HNF4 γ y HNF4 α tienen ligandos del AGn-7 que regulan la actividad y función de las proteína [41]. Previamente nuestro grupo de investigación ya había

informado que la expresión del gen HNF4 γ se encontró significativamente disminuida en los pacientes con CUCI activos en comparación con los pacientes en remisión y controles [42], lo que podría estar ligado a la baja concentración del AGn-7 y, en consecuencia, manifestarse como mayor actividad de la enfermedad.

Se evaluó también la expresión de la IL-6 como marcador de inflamación y se encontró que en el grupo de intervención con AGn-7 la expresión del gen de IL-6 disminuyó significativamente más que en el grupo que recibió placebo. Estos hallazgos podrían deberse a que en ambos grupos se mantuvo el tratamiento convencional durante el tiempo del estudio y aunque no existieron diferencias significativas en los gramos de 5-ASA que ambos grupos tomaron, esto pudo haber tenido un impacto sobre la expresión de la IL-6, ocasionando que disminuyera de manera significativa en el grupo placebo.

Estos resultados sugieren que la disminución en la inflamación clínica en los pacientes con CUCI que recibieron AGn-7 podría estar regulada por la expresión de HNF4 γ y HNF4 α , lo cual puede apoyar la hipótesis de que los MUFA de la dieta intervienen en procesos inflamatorios a través de la regulación de citocinas pro y anti-inflamatorias en los pacientes con CUCI que se asocia a disminución de los síntomas y las manifestaciones clínicas [26, 51-53].

10. CONCLUSIONES

El grupo de pacientes sometidos a tratamiento con AGn-7, mostró mayores cambios a la semana 8 después de la intervención en aspectos relacionados con la actividad clínica de la enfermedad comparado con el grupo placebo.

Un tratamiento coadyuvante con ácido graso omega-7 durante 8 semanas puede disminuir el cuadro clínico de los pacientes con CUCI y regular la actividad inflamatoria de la enfermedad a través del incremento de la expresión del gen HNF4 γ .

11. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Cruz-Guillén AA, Cortés-Espinosa T, Sánchez-Chávez X y cols. Comportamiento clínico de la colitis ulcerosa crónica inespecífica en pacientes del CMN 20 de Noviembre, ISSSTE, y comparación con la bibliografía americana. *Med Int Mex.* 2011.27(3):224-230.
- 2) Yamamoto-Furusho, J. K. Clinical epidemiology of ulcerative colitis in Mexico: a single hospital-based study in a 20-year period (1987-2006). *J Clin Gastroenterol.* 2009. 43(3):221-224.
- 3) Sanjurjo-García, J. L., Aranda-Jiménez, G., Garuño-Delgado, R., y García-Manzo, N. T. Guías clínicas de diagnóstico y tratamiento de la colitis ulcerativa crónica idiopática (CUCI). *Rev. Gastroenterol Mex.* 2007. 72(2):136-138.
- 4) Sartor, R. B. Pathogenesis and immune mechanism of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol.* 1997. 92(12):5-11.
- 5) Medina, B. E., Prieto, B. G., Rodríguez, R. M. F. y Suárez, C. L. Enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterología.* 2008. Pag. 63-71.
- 6) A special meeting review edition: CCFA/Advances in Inflammatory Bowel Diseases 2015: Highlights in Ulcerative Colitis and Crohn's Disease: A Review of Selected Presentations From the CCFA/Advances in Inflammatory Bowel Diseases 2015 Clinical and Research Conference • December 10-12, 2015 • Orlando, Florida
Special Reporting on:• New and Future Adhesion Molecule-Based Therapies in IBD• Efficacy and Safety of Vedolizumab for Inflammatory Bowel Disease in Clinical Practice• A Multicenter, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 3 Study of Ustekinumab, a Human IL-12/23p40 Monoclonal Antibody, in Moderate-Severe Crohn's Disease Refractory to Anti-TNF α : UNITI-

- 1• Intravenous Iron Sucrose for Treatment of Iron Deficiency Anemia in Pediatric Inflammatory Bowel Disease• Does Vedolizumab Affect Postoperative Outcomes in Patients Undergoing Abdominal Operations for Inflammatory Bowel Disease?PLUS Meeting Abstract SummariesWith Expert Commentary by: Gary R. Lichtenstein, MDProfessor of MedicineDirector, Center for Inflammatory Bowel DiseaseUniversity of Pennsylvania Health SystemHospital of the University of PennsylvaniaPhiladelphia, Pennsylvania. *Gastroenterology & Hepatology*. 2016;12(2 Suppl 1):1-20.
- 7) Hurtado-Andrade H, Hernández-Guerrero A, García-Díaz C, Nava-Muciño D, Rivera-Ramos F y Vallejo-Soto M. Guías clínicas de diagnóstico y tratamiento de la colitis ulcerativa crónica idiopática (CUCI), Tratamiento médico. *Rev Gastroenterol Mex*, 2007. 72(3):302-304.
- 8) Dignass A, Eliakim R, Magro F y cols. Segundo Consenso Europeo basado en evidencia sobre el diagnóstico y tratamiento de la colitis ulcerosa crónica idiopática Parte 1: Definiciones y diagnóstico (versión española). *Rev Gastroenterol Mex*. 2014, 79(4);79:263-89.
- 9) Yamamoto-Furusho JK. Innovative therapeutics for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2007; 13:1893-1896.
- 10) Colombel JF, Vernier-Massouille G, Cortot A, Gower-Rousseau C y Salomez, J L. Epidemiology and risk factors of inflammatory bowel diseases. *Bull Acad Natl Med*. 2007. 91(6):1105-1118.
- 11) Yamamoto-Furusho J K, Uscanga LF, Vargas-Alarcón G, Ruiz-Morales JA, Higuera L, Cutino T, Rodríguez-Pérez JM, Villarreal-Garza C. y Granados J.

- Clinical and genetic heterogeneity in Mexican patients with ulcerative colitis. *Immunol.* 2003. 64:119-12.
- 12) 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. Incidence of inflammatory bowel disease in northern France. *Gut.* 1994.35(10):1443, 1994.
 - 13) Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39:690-697.
 - 14) Bosques-Padilla FJ, Sandoval-García ER, MartínezVázquez MA, Garza-González E y Maldonado-Garza HJ. Epidemiología y características clínicas de la colitis ulcerosa crónica idiopática en el noreste de México. *Revista de Gastroenterología de México* 2011;76(1):34-38.
 - 15) Shanahan F, Bernstein CN. The evolving epidemiology of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2009; 25:301-305.
 - 16) Vergara Fernández O, Takahashi Monroy T y González Contreras QH. Conceptos actuales en colitis ulcerativa crónica inespecífica. *Cirujano General* 2006, 28(1): 41-49.
 - 17) Knigge KL. Inflammatory bowel disease. *Clinical Cornerstone.* 2002. 4(4):49-57.
 - 18) Gionchetti P. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2006. 13(30):4807-4812.

- 19) Annese V. Pharmacogenetics in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2006. 12(23):3657-3667.
- 20) Watanabe T, Kobunai T, Toda E, Kanazawa T y cols. Gene Expression signature and the predictor of ulcerative colitis-associated colorectal cancer by DNA microarray. *Clin Cancer Res.* 2007. 13(2):415-420.
- 21) Ferguson L R, Andrew NS, Browning BL, Huebner C y Petermann I. Genes, diet and inflammatory bowel disease. *Mut Res.* 2007. 622(1):70-83.
- 22) Yamamoto-Furusho JK. Genetic factors associated with the development of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2007. 13(42): 5594-5597.
- 23) Drewes T, Senkel S, Holewa B y Ruffel GU. Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. *Mol Cell Biol.* 1996. 16(3): 925-931.
- 24) Taraviras S, Mantamadiotis T, Dong-Si T, Mincheva A, Lichter P, Drewes T, Ryffel GU, Monaghan AP y Schütz G. Primary structure, chromosomal mapping, expression and transcriptional activity of murine hepatocyte nuclear factor 4 gamma. *Biochem Biophys Act.* 2000.1490(1,2):21-32.
- 25) Kenji D, Takeshi K, Yoshihiro O y cols. Proteomic analysis of native hepatocyte nuclear factor-4a (HNF4a) isoforms, phosphorylation status, and interactive cofactors. 2010. 286(1): 674-686.
- 26) Sung H A, Yatrik MS, Junko IMS y cols. Hepatocyte nuclear factor 4g en the intestinal epithelial cells protects against inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2008. 14(7):908-920.

- 27) The UK IBD Genetics Consortium, The Wellcome Trust Case Control Consortium 2. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nature genetics*. 2009;41(12):1330-1334.
- 28) Wu F, Dassopoulos T, Cope L, Maitra A y cols. Genome-wide gene expression differences in Crohn's disease and ulcerative colitis from endoscopic pinch biopsies: Insights into distinctive pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis*. 2007. 13:807-821.
- 29) Araki Y, Matsumiya M, Matsuura T y cols. Peroxidation of n-3 polyunsaturated fatty acids inhibits the induction of iNOS gene expression in proinflammatory cytokine-stimulated hepatocytes. *J Nutr Metab*. 2011; 2011: 374542.
- 30) Cooney JM, Barnett MPG, Brewster D, Knoch B y cols. Proteomic analysis of colon tissue from interleukin-10 gene-deficient mice fed polyunsaturated fatty acids with comparison to transcriptomic analysis. *J. Proteome Res*. 2011. En línea
- 31) John S, Luben R, Shrestha SS, Welch A, Khaw KT y Hart AR. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and the etiology of ulcerative colitis: a prospective cohort study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010. 22(5):602-606.
- 32) Bueno-Hernández N, Núñez-Aldana M, Ascaño-Gutierrez I, Yamamoto-Furusho JK. Evaluation of Diet Pattern Related to the Symptoms of Mexican Patients with Ulcerative Colitis (UC): Through the Validity of a Questionnaire. *Nutr J*. 2015; 14: 25.

- 33) Steinhart, A. H. y Greebgerg, G. R. Nutrition in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroen.* 1997. 13:140-145.
- 34) Jump DB y Clarke SD. Regulation of gene expression by dietary fat. *Ann Rev Nutr.* 1990. 19:63-90.
- 35) Nieto N, Torres MI, Ríos A y Gil A. Dietary polyunsaturated fatty acids improve histological and biochemical alterations in rats with experimental ulcerative colitis. *J. Nutr.* 2002. 132:11–19.
- 36) Will JJ y Kydonieus A. Palmitoleic acid isomer (C16:1 Δ 6) in human skin sebum is effective against gram-positive bacteria. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology.* 2003. 16:176-187.
- 37) Longmuir, K. J., Resele-Tiden, C. y Rossi, M. E. Fatty acids of pulmonary surfactant phosphatidyl-chiline from fetal rabbit lung tissue in culture. Biosynthesis of n-10 monogenic fatty acids. *J of Lipid Research.* 1988. 29:1065-1077.
- 38) Yang, B., Kalimo, K., Mattila, L., Kallio, S., Katajisto, J., Peltola, O. y Kallio H Effects of dietary supplementation with sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) seed and pulp oils on atopic dermatitis. *The J of Nut Biochem.* 1999. 10(11):622-630.
- 39) Yamasaki M, Chujob H, Noua S, Tachibanab H. y Yamadab K. Alleviation of the cytotoxic activity induced by trans10, cis12-conjugated linoleic acid in rat hepatoma dRLh-84 cells by oleic or palmitoleic acid. *Cancer Lett.* 2003.196(2):187-196.

- 40) Nishida T, Miwa H, Shigematsu A, Yamamoto M y Lida M. Increased arachidonic acid composition of phospholipids in colonic mucosa from patients with active ulcerative colitis. *Gut*. 1987. 28:1002-1007.
- 41) Wisely BG, Miller BA, Davis GR y cols. Hepatocyte nuclear factor 4 is a transcription factor the constitutively binds fatty acids. *Structure*. 2002. 10:1225-1234.
- 42) Bueno-Hernández N, Sánchez-Muñoz F, Barreto-Zuñiga R, Dominguez-López A y Yamamoto-Furusho J K. Expression of HNF4g is downregulated in patients with active ulcerative colitis (UC) compared to UC patients in remission and healthy controls. 2011. 17(8): *Inflamm Bowel Dis*. 2011.17(8):E91.
- 43) Moberaten K, Haug TM, Kleiveland CR y Lea T. Omega-3 and omega-6 PUFAs induce the same GPR120-mediated signalling events, but with different kinetics and intensity in Caco-2 cells. *Lipids Health Dis*. 2013;12:101.
- 44) Bernstein AM, Roizen MF y Martinez L. Purified palmitoleic acid for the reduction of high-sensitivity C-reactive protein and serum lipids: A double-blinded, randomized, placebo controlled study. *J Clin Lipidol*. 2014. 8:612–617.
- 45) Annese V. Pharmacogenetics in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2006. 12(23):3657-3667.
- 46) Watanabe T, Kobunai T, Toda E y cols. Gene Expression signature and the predictor of ulcerative colitis-associated colorectal cancer by DNA microarray. *Clin Cancer Res*. 2007. 13(2):415-420.

- 47) Bueno-Hernández N, Mañe-Almero J, Cortés I, y cols. Role of Nutrition in Inflammatory Bowel Disease (IBD): New therapeutic approaches and recent outcomes. *J Nutr Therapeutics* 2012, 1:59-73.
- 48) Taraviras S, Mantamadiotis T, Dong-Si T y cols. Primary structure, chromosomal mapping, expression and transcriptional activity of murine hepatocyte nuclear factor 4 gamma. *Biochem Biophys Act.* 2000.1490(12):21-32.
- 49) Kenji D, Takeshi K, Yoshihiro O y cols. Proteomic analysis of native hepatocyte nuclear factor-4a (HNF4a) isoforms, phosphorylation status, and interactive cofactors. 2010. 286(1): 674-686.
- 50) Maedler K, Spinas G. A, Dyntar D, y cols. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on β -cell turnover and function. *Diabetes.* 2001;50:69-76.
- 51) Araki Y, Matsumiya M, Matsuura T y cols. Peroxidation of n-3 polyunsaturated fatty acids inhibits the induction of iNOS gene expression in proinflammatory cytokine-stimulated hepatocytes. *J. Nut and Met.* 2011. 2011:374542.
- 52) Jump DB y Clarke SD. Regulation of gene expression by dietary fat. *Ann Rev Nutr.* 1990. 19:63-90.
- 53) Hanauer SB. Update on the etiology, pathogenesis and diagnosis of ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol & Hepatol.* 2004. 1(1):26-31.

12) **ANEXOS****ANEXO 1. Puntaje mayo para actividad de CUCI****1. Frecuencia de deposiciones**

a. Normal	0
b. 1-2 mas de lo normal	1
c. 3-4 mas de lo normal	2
d. > 5	3

2. Sangrado rectal

a. Ausente o no visible	0
b. Estrías en heces la mitad del tiempo	1
c. Sangre obvia casi siempre	2
d. Sangrado franco	3

3. Hallazgos endoscópicos

a. Normal o enfermedad inactiva	0
b. Enfermedad leve (eritema, disminución del patrón vascular y friabilidad leve)	1
c. Enfermedad moderada (eritema aumentado, patrón vascular ausente, friabilidad y erosiones)	2
d. Enfermedad grave (sangrado espontaneo, ulceras)	3

4. Valoración global del medico

a. Normal	0
b. Enfermedad leve	1
c. Enfermedad moderada	2
d. Enfermedad grave	3

Total de puntos: _____**Interpretación:**

<2:	Remisión
2-4:	Actividad leve
4-6:	Actividad moderada
>6:	Actividad grave

ANEXO 2. Hojas de recolección de datos.**Hoja para el investigador**

Título:	Efecto del ácido palmitoléico (omega-7) en la expresión de HNF4 γ y la actividad de la Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI) en pacientes activos y sin inflamación					
Nombre:				Registro:		
Fecha de nacimiento (dd/mm/aaaa):	/	/		Teléfono:		
Diagnóstico:	Control ()	CUCI activo		Actividad:	Leve	Moderada
Extensión:	Proctitis	Proctosigmoiditis	Pancolitis	Tiempo de diagnóstico:	6m	1a 2a \geq 3a
Tratamiento con 5 ASA:	500mg/6-12 h	4g/12 h	Talla (cm):			
Manifestaciones extraintestinales:	Cutáneas	Oculares	Hepatobiliares	Óseos	Articulares	Pulmonares
Tratamiento:	Dieta + ácido palmitoléico		Dieta + placebo			

	Basal	Cita 4
Fecha (dd/mm/aaaa)		
Expresión HNF4 γ (UA)		
Número de deposiciones (0, 1, 2, 3)		
Hallazgos endoscópicos (0, 1, 2, 3)		
Hallazgos histológicos (0, 1, 2, 3)		

	Basal	Cita 1	Cita 2	Cita 3	Cita 4
Fecha (dd/mm/aaaa)					
Peso (kg)					
Cintura (cm)					
Cadera (cm)					
Número de deposiciones (0, 1, 2, 3)					
Sangre en heces (0, 1, 2, 3)					
Temperatura (°C)					
Apego al tratamiento (0, 1, 2, 3)					
Nombre del evaluador					

Hoja para el paciente

Diario de pacientes con CUCI																				
Nombre:											No. de registro:				No. Paciente:					
Fecha de ingreso:											Fechas de consulta								Fecha de término:	
											2:		3:		4:					
Instrucciones:																				
* Se debe completar el diario todos los días.																				
* Todos los registros se deben realizar antes de irse a dormir, y las respuestas deben describir las 24 horas previas.																				
* Las puntuaciones de dolor abdominal y bienestar general deben reflejar el dolor o el bienestar promedio de ese día.																				
* Recuerde traer el diario cada que acuda a consulta.																				
No. de día	Fecha dd/mm/aa	Toma de cápsulas	Cantidad de deposiciones que superan lo normal				Sangre en las heces				Dolor abdominal/ retortijones				Bienestar general				¿Tomó algún medicamento para la diarrea?	
			A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
			A=Normal B=Una a dos C=Tres o cuatro D=Cinco o más Cant. Normal de deposiciones=_____				0=No observó sangre 1= Velas de sangre en las heces o sangre notoria en las hecesen 50% de las deposiciones 2=Sangre notoria en las heces en >50% de las desposiciones 3=Solo expulsó sangre en alguna deposición				0=Nada 1=Leve, lo siente pero el tolerable 2=Moderado, interfiere en la actividad normal 3=Grave, incapacitante				0=Generalmente bien 1=Regular 2=Malo 3=Fatal				(También marque "si" en caso de usar narcóticos) Sí / No	
1	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
2	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
3	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
4	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
5	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
6	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
7	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
8	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
9	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
10	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
11	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
12	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
13	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
14	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
15	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
16	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
17	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
18	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
19	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
20	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
21	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
22	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
23	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
24	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
25	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No
26	/ /	De / Co / Ce	A	B	C	D	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	Sí	No

Anexo 3. Consentimiento informado



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRAN"

HOJA DE INFORME PARA PARTICIPAR EN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Usted padece CUCI por lo que se le invita a participar en el estudio titulado:

"Efecto del ácido palmitoléico (AGn-7) en la expresión del gen HNF4γ y la actividad inflamatoria de la Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI)"

El cual será llevado a cabo bajo la supervisión de los siguientes investigadores, quienes a su vez, podrán responder a todas sus dudas y supervisarán el seguimiento de su tratamiento durante el estudio.

• **Dr. Jesús Kazuo Yamamoto Furusho, Investigador principal:**
Tel. 54 87 09 00 Ext. 2710; Mail. kazuofurusho@hotmail.com

• **Man C. Nallely Bueno Hernández**
Tel. 54 87 09 00 Ext. 2711 y 2712; Mail. nallely_bh5@yahoo.com.mx

• **Dra. Florencia Vargas Vorácková**
Tel. 54 87 09 00 Ext. 2712; Mail. florencia.vargasv@quetzal.innsz.mx

• **Dra. María del Pilar Milke García**
Tel. 54 87 09 00 Ext. 5032; Mail. nutriclinica@hotmail.com

Introducción

La enfermedad que usted padece se caracteriza por inflamación de la mucosa de una parte o en su totalidad del intestino grueso. En estudios recientes se ha visto que la expresión de genes puede propiciar el desarrollo de ésta enfermedad; uno de éstos genes es el Factor Nuclear 4γ del Hepatocito (HNF4γ), el cual se ha visto puede regular la inflamación en pacientes con la enfermedad que usted padece; por otra parte, se ha visto que el Omega 7 puede modular la expresión del gen y actuar como antiinflamatorio, de esa forma las manifestaciones clínicas de la enfermedad disminuirían de manera importante.



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRAN"

Justificación y objetivo

Realizar éste estudio permitiría ofrecer a pacientes como usted un tratamiento coadyuvante de origen natural que pueda controlar de manera eficiente la inflamación a través del gen HNF4γ; el Omega 7 complementaría su tratamiento farmacológico y podría ayudar a disminuir el uso de medicamentos como la terapia biológica que tiene efectos secundarios tales como: fiebre, dolores del cuerpo, náusea, vómito, irritabilidad, insomnio, retención de líquido, debilidad muscular, pérdida de peso y del apetito, entre otros.

Por lo anterior el objetivo del estudio es cuantificar los cambios en la expresión del gen HNF4γ y medir los cambios en la inflamación del colon después de consumir 720 mg de Omega 7 durante 8 semanas.

Selección de pacientes

Para comprobar lo anterior se realizará un estudio con pacientes que cumplan con los siguientes criterios:

a) Inclusión

- Debe tener diagnóstico de CUCI confirmado por histopatología
- Con actividad leve o moderada evaluada por clínica, endoscopia e histología.
- Estar bajo tratamiento con 5-aminosalicilatos (5-ASA)
- IMC de 18 a 34.9 kg/m²
- Edad de 18 a 59 años
- Nacidos en México incluyendo las dos últimas generaciones
- Que acepten participar en el estudio

b) Exclusión

- Enfermedades asociadas como: diabetes mellitus, hipertensión arterial, dislipidemias, aterosclerosis y síndrome de malabsorción.
- Enfermedades autoinmunes como: lupus, VIH, cáncer, hepatitis o algún otro tipo de colitis como: infecciosa, post radiación, medicamentosa, colitis indeterminada y enfermedad de Crohn
- Consumo de medicamentos que inhiban absorción de grasas como Orlistat.
- Cirugía resectiva parcial o total de estómago y/o cirugía resectiva o desfuncionalización de primera y/o segunda porciones del intestino delgado (ej. cirugía bariátrica).
- Que consuman esteroides
- Pacientes en remisión histológica, clínica y endoscópica.
- Pacientes que consuman capsulas con más de 800 mg de AGn-3, 6 y 9



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"

Metodología

Una vez aceptado en el estudio, se le realizará una endoscopia para evaluar la inflamación en la mucosa, se tomará una biopsia de 2 mm y se evaluarán los síntomas que presente al inicio del protocolo.

Posteriormente al azar se formarán 2 grupos de 10 pacientes cada uno, en el primero se continuará con el tratamiento con una dosis más 720 mg de Omega 7 y en el otro grupo se indicará su tratamiento más cápsulas de placebo.

A lo largo del estudio usted deberá consumir 2 cápsulas de Omega 7 ó placebo (dependiendo el grupo) en cada comida (desayuno, comida y cena) diariamente durante 8 semanas (56 días), éste tratamiento también incluirá un seguimiento nutricional.

Cada 2 semanas usted deberá asistir a consulta de seguimiento donde se evaluará su apego al tratamiento, los síntomas que presente y se le proporcionarán las cápsulas necesarias continuar el tratamiento durante las siguientes 2 semanas. De tal forma que deberá acudir a 5 consultas exclusivamente. En la última cita (semana 8) se le realizará nuevamente una endoscopia en la que se tomará una biopsia y se volverán a evaluar los síntomas que presente después de la intervención.

Los gastos originados por las colonoscopías, biopsias y evaluación clínicas no tendrán ningún costo para usted, todo será cubierto por los fondos destinados a ésta investigación.

Los resultados de ambas colonoscopías, biopsias y evaluaciones clínicas serán absolutamente confidenciales y le serán entregados al final del estudio para que usted pueda ver los cambios en la actividad inflamatoria, de esa forma usted podrá tener un mejor control de su enfermedad.

A lo largo del estudio se le proporcionará respuesta a cualquier pregunta y/o aclaración a cerca del protocolo de investigación. En caso de presentar algún efecto adverso (nauseas, vomito o distensión abdominal) se le dará atención médica inmediata. Su participación en el estudio será voluntaria y puede rehusarse o retirarse en cualquier momento, sin perder sus beneficios como paciente del instituto.

Se le podrá excluir del estudio en caso de:

- Poco apego a la maniobra medida por la revisión del número de cápsulas
- Insistencia a más de dos consultas o visitas.
- Si empeora su cuadro clínico y requiere tratamiento con esteroides, infliximab o más de 4 g de 5-ASA.



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____, manifiesto y le informo a mi hijo de informarme del primer título: "Efecto del ácido palmítico (AGr-7) en la expresión del gen HNF4y y la actividad inflamatoria de la Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI)". He tenido oportunidad de discutir ampliamente su contenido con el responsable del estudio, me han explicado las características, riesgos, beneficios, derechos y obligaciones que tengo al ser incluido en el estudio, así como, la confiabilidad de mis resultados.

Fueron aclaradas todas mis dudas, por lo que estoy de acuerdo en participar voluntariamente en el estudio cuyo objetivo es evaluar el efecto de consumir 720 mg de Omega 7 en la actividad de mi enfermedad.

Mi participación consistirá en:

1. Permitir la evaluación de los signos y síntomas clínicos que presento por tener CUCI.
2. Tomar 720 mg de Omega 7 o placebo.
3. Seguir una dieta calculada de acuerdo a mis requerimientos nutrimentales.
4. Permitir la realización de una endoscopia y la extracción de 1 biopsia antes y después del tratamiento.

Entiendo que este estudio no conlleva ningún riesgo para mi persona salvo el riesgo de la insuflación y la toma de la biopsia. El costo de la endoscopia, toma de biopsias y su procesamiento en laboratorio será enteramente cubierto por los investigadores.

Al firmar este documento indico que acepto participar en el estudio, pero también sé que puedo decidir retirarme del estudio en cualquier momento sin que se afecte mi atención médica futura en la institución.

Nombre y Firma del paciente

Fecha

Nombre y Firma del investigador (o de la persona que haya aplicado el consentimiento)

Nombre y Firma del testigo

Relación con el paciente

Nombre y Firma del testigo

Relación con el paciente

ANEXO 4. Cronograma de actividades.

	1er. Año						2do. Año						3er. Año						4to. Año					
	Jul	Sep	Nov	Ene	Mar	May	Jul	Sep	Nov	Ene	Mar	May	Jul	Sep	Nov	Ene	Mar	May	Jul	Sep	Nov	Ene	Mar	May
	Ago	Oct	Dic	Feb	Abr	Jun	Ago	Oct	Dic	Feb	Abr	Jun	Ago	Oct	Dic	Feb	Abr	Jun	Ago	Oct	Dic	Feb	Abr	Jun
Revisión bibliográfica	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Sometiendo del protocolo al comité de ética del Instituto	■	■	■																					
Solicitud y entrega de material y ácidos grasos			■	■																				
Selección de la muestra				■																				
Contactar y citar pacientes					■	■	■	■	■	■	■	■												
Seguimiento						■	■	■	■	■	■	■	■	■										
Preparación de examen de cadidatura											■	■	■	■										
Contactar y citar pacientes							■	■	■	■	■	■	■	■	■									
Toma de biopsia							■	■	■	■	■	■	■	■	■									
Procesamiento de muestras							■	■	■	■	■	■	■	■	■									
Análisis estadístico										■	■	■	■	■	■	■	■	■						
Presentación de resultados															■	■	■	■						
Examen de titulación																	■	■						
Publicación de artículo																			■	■	■	■	■	

*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 Ale por su infinito apoyo a lo largo de toda mi vida.

*A todos los que formaron parte de este protocolo como investigadores y
pacientes muchas gracias.*