



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS RELACIONADOS CON LA
ENFERMEDAD CELÍACA EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON
SÍNDROME DE INTESTINO IRRITABLE



AUTOR

Marcela Estefanía Acosta Zúñiga

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS RELACIONADOS CON LA ENFERMEDAD
CELÍACA EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON SÍNDROME DE INTESTINO
IRRITABLE

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología.

Profesor guía

PhD Vinicio Danilo Armijos Jaramillo

Autor

Marcela Estefanía Acosta Zúñiga

Año

2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Vinicio Danilo Armijos Jaramillo

Doctor en Agrobiotecnología

CC: 1716829666

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Alina Aguirre Quevedo

Doctora en Ciencias Biológicas

CC: 1756594600

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos.

Carolina Alejandra Salazar Ruares

Master en biotecnología

CC: 1718836099

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

"Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes"

Marcela Acosta Zúñiga

CC: 1720939006

AGRADECIMIENTOS

a todas aquellas personas que con su ayuda lograron que este trabajo llegue a su término.

DEDICATORIA

a Marce

RESUMEN

Los Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNP) son variaciones puntuales de un solo nucleótido en la secuencia del genoma. Existen polimorfismos relacionados con el desarrollo de patologías como es el caso de la Enfermedad Celíaca (EC). En el presente proyecto se estudió la presencia de cuatro polimorfismos característicos de la Enfermedad Celíaca (EC) en personas diagnosticadas con Síndrome de Intestino Irritable (SII). El cuadro clínico que presenta la EC es similar a otras enfermedades intestinales, principalmente al síndrome de intestino irritable. Debido a que los síntomas son semejantes, existen diagnósticos ambiguos y confusión entre estas dos enfermedades. El presente trabajo persigue dilucidar la frecuencia de polimorfismos característicos de EC en personas diagnosticadas con SII. Se trabajó con un total de 58 muestras, de las cuales 28 fueron individuos con SII y 30 personas del grupo control. La metodología empleada comprendió las siguientes fases: extracción de ADN de las muestras biológicas, que podrían ser de sangre y/o saliva, la amplificación de fragmentos de interés mediante la técnica de PCR y finalmente la secuenciación empleando el método de Sanger. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba exacta de Fisher para determinar si existen diferencias significativas entre el grupo control y el de pacientes con SII. Se observó la presencia de los polimorfismos rs6441961, rs6822844 y rs9851967 (asociados a EC) sin embargo no se observaron diferencias significativas entre los grupos. Por lo cual no se pudo concluir que los SNPs relacionados con EC sean determinantes en la aparición de SII. No obstante, los cuatro polimorfismos analizados se encuentran en regiones del genoma que cumplen importantes funciones a nivel del sistema inmune, por lo que no se descarta que los polimorfismos evaluados pudieran estar involucrados en el desarrollo de este síndrome.

Palabras clave: Polimorfismos asociados a la Enfermedad Celíaca, Síndrome de Intestino Irritable, Test exacto de Fisher, secuenciación Sanger.

ABSTRACT

Simple Polymorphism Nucleotide (SNP) are punctual variations of an simple nucleotide in the genome. There are polymorphisms involved with diseases such as Celiac Disease (CD) presenting several SNPs associated with this pathology. The present project studies the presence of four typical Celiac Disease (CD) polymorphisms in people diagnosed with Irritable Bowel Syndrome (IBS). Ambiguous diagnoses and confusion exist between these two diseases and for that reason these two illness are normally misdiagnosed. This work tries to correlate the presence of typical CD SNPs with people who have been diagnosed with SII. A total of 58 samples were analyzed, of which 28 were patients with SII and 30 were from people without syndrome. To perform this experiment we used: DNA extraction from the biological samples, which were either blood or saliva, amplification of interest fragments using PCR's technology and sequencing of the fragment by Sanger's method. Fisher's exact test was used to find differences between groups. The presence of the rs6441961, rs6822844 and rs9851967 polymorphisms (associated with CD) were found in the study nevertheless they did not have statistical significance among groups. Therefore, it was not possible to establish that the EC related SNPs are present in individuals with Irritable Intestine Syndrome. However, the four analyzed polymorphisms are associated with immunological system genes, therefore the correlation with SII could not be discarded at all.

Key words: Polymorphisms associated with Celiac Disease, Irritable Bowel Syndrome, Fisher exact test, Sanger sequencing

ÍNDICE

1. Capítulo I Introducción	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema	4
1.3 Objetivos.....	5
1.3.1 Objetivo General	5
1.3.2 Objetivos específicos	6
1.4 Justificación de la investigación	6
2. Capítulo II Marco teórico	8
2.1 Síndrome de Intestino Irritable - SII	8
2.2 Causas de SII.....	10
2.3 Aspectos genéticos de SII.....	12
2.4 Conexión entre EC y SII	13
2.5 Polimorfismo de nucleótido simple (SNP)	15
2.6 SNPs relacionados con la Enfermedad Celíaca (EC).....	16
2.7 Secuenciación Sanger	18
2.8 Test exacto de Fisher	19
3. Capítulo III Diseño del plan experimental	21
4. Capítulo IV Procedimientos	23
4.1 Población y muestra	23
4.2 Procesamiento de la muestra.....	24
4.2.1 Extracción de ADN de las muestras recolectadas.....	24
4.2.2 Cuantificación de ADN	25
4.2.3 Secuenciación tipo Sanger.....	27
4.3 Evaluación estadística de los resultados.....	29

5. Capítulo V Resultados y discusión	29
5.1 Resultados de PCR.....	30
5.2 Resultados de secuenciación.....	32
5.3 Análisis estadístico y poblacional	37
5.3.1 Análisis poblacional y discusión	41
6. Conclusiones y recomendaciones	56
6.1 Conclusiones	56
6.2 Recomendaciones.....	57
Referencias	58
ANEXOS	64

1. Capítulo I Introducción

1.1 Antecedentes

La Enfermedad Celíaca (EC) es un trastorno de carácter autoinmune causado por la ingesta de gluten en individuos con predisposición genética. A nivel de intestino se presenta hiperplasia y vellosidades atrofiadas. La prevalencia de la EC es de alrededor del 1% en la población mundial (Ludvigsson et al., 2012). A las personas diagnosticadas con EC se les recomienda una dieta libre de alimentos que contengan gluten, ya que este posee altas cantidades de prolina y glutamina que al no ser digeridas en su totalidad en el intestino delgado resultan en derivados peptídicos, que al ser desaminados causan inmunogenicidad en la persona celíaca (Rubio-Tapia et al., 2013). Esta enfermedad se diagnostica por medio de dos pruebas principales: la serológica que implica exámenes de los anticuerpos antitransglutaminasa (IgA), anticuerpos derivados de gliadina (IgA/IgG) y anticuerpos antigliadina AGA. Para corroborar los resultados de las pruebas serológicas se realizan biopsias del duodeno (Shannahan and Leffler, 2016). La enfermedad celíaca puede conllevar a enfermedades como la osteoporosis, anemia, pérdida de peso, artritis, hepatitis, infertilidad, además de las diarreas; sin embargo, la enfermedad celíaca puede presentarse de forma asintomática en ciertos casos aunque no es común (Kelly et al., 2015).

En cuanto a los análisis genéticos de la EC el genotipo HLA DQ 5 y HLADQ8, son importantes para la confirmación de la Enfermedad Celíaca. Esta prueba genética es más precisa que la prueba serológica, si el individuo a ser evaluado se encuentra llevando una dieta libre de gluten (Ludvigsson et al., 2014). En la enfermedad celíaca existen numerosos hallazgos genéticos en cuanto a la susceptibilidad que presentan determinados individuos para padecer esta enfermedad. Se han definido los 6 loci dentro del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) por sus siglas

en inglés, además de variantes genéticas independientes ligadas al riesgo de padecer esta enfermedad. Se ha descrito que tan solo el 31% de variantes genéticas se hereda mientras que el 25 % son influenciadas por el MHC , a partir de este porcentaje no heredable , se pueden determinar marcadores moleculares relacionados con el riesgo de padecer la EC (Dieli-Crimi, Cénit y Núñez, 2015).

En los últimos años los estudios en cuanto a la asociación de polimorfismos de nucleótido simple SNP relacionados con la Enfermedad Celíaca han sido numerosos y se han llevado a cabo en distintas poblaciones del mundo. En un estudio realizado en el Reino Unido se examinaron 310.605 SNPs relacionados con la susceptibilidad para padecer la EC (Hunt et al., 2008). Otro estudio realizado en la población del Mediterráneo y la población española evaluó el polimorfismo rs6441961 localizado en la región 3p21 del cromosoma 3 y demostró la asociación del polimorfismo con la susceptibilidad para padecer la Enfermedad Celíaca en la población española (Dema et al., 2009).

El Síndrome de Intestino Irritable (SII) es un trastorno gastrointestinal funcional que no presenta ninguna anomalía estructural o bioquímica identificable (Aziz y Sanders, 2012). Es un desorden de alta prevalencia que se caracteriza por síntomas como dolor abdominal, constipación y diarrea. Este se diagnostica por medio de los criterios de Roma III como son: presencia de diarrea, episodios de estreñimiento, hinchazón del estómago, dolor (Lacy, 2015). No existe una razón científicamente comprobada que ayude a dilucidar la causa del desencadenamiento de la SII, sin embargo, este síndrome puede estar influenciado por episodios de estrés, factores genéticos o medioambientales (Mearin y Montoro, 2014).

El SII es un síndrome gastrointestinal frecuente mientras que la Enfermedad Celíaca es una enteropatía autoinmune de alta frecuencia en países caucásicos y de baja frecuencia en países de América. Los síntomas que presenta la EC son similares a los que caracterizan a otras enfermedades gastrointestinales (Bakhshipour et al., 2012).

Estudios realizados por diferentes grupos de investigación utilizando el examen serológico de la antitransglutaminasa como marcador para el diagnóstico de EC, en pacientes con SII demuestran que existe una diferencia significativa entre los grupos evaluados que fueron individuos con SII y controles, es decir, que los valores de resultados positivos para este anticuerpo fueron altos en el grupo con SII a diferencia del grupo control, concluyendo que existe una elevada prevalencia de EC en individuos diagnosticados con SII. (Sanders et al., 2001). Otro estudio en una población del sudeste de Irán en el cual se determinó la prevalencia de la Enfermedad Celíaca en personas diagnosticadas con Síndrome de Intestino Irritable, demostró una alta prevalencia de EC en la población evaluada, tomando como base tanto exámenes inmunológicos como los niveles de la antitransglutaminasa (Bakhshipour et al., 2012), al igual que los estudios en los cuales se han empleado biopsias duodenales como criterio de diagnóstico de EC, demuestran la prevalencia Enfermedad Celíaca en pacientes con SII (Ford et al., 2009).

Un estudio en Arabia Saudita en el cual realizaron tanto pruebas serológicas que medían los niveles de transglutaminasa (TGAs) y anticuerpos endomisiales, así como pruebas histopatológicas a individuos con SII, EC y controles arrojó que el 9.6% de personas con SII resultan positivas para las pruebas específicas de diagnóstico de EC. Estos resultados sugieren que para evitar un diagnóstico erróneo

es necesario consultar a un especialista en gastroenterología experimentado (Al-Ajlan, 2016).

Otro estudio llevado a cabo en Egipto al evaluar la prevalencia de EC en pacientes diagnosticados con SII empleando pruebas inmunológicas determinó que los pacientes con SII presentan altos niveles de antitransglutaminasa lo que sugiere que los síntomas de EC y SII se pueden ver solapados lo que conduce a un diagnóstico erróneo (Lindkvist, Törnblom y Simren, 2013).

1.2 Planteamiento del problema

El síndrome de intestino irritable es un desorden gastrointestinal crónico que presenta una prevalencia del 10% al 20%. Este trastorno se caracteriza por síntomas tales como dolores abdominales, diarreas, distensión abdominal o estreñimiento. Sin embargo, para el diagnóstico de esta enfermedad las directrices no recomiendan una investigación más exhaustiva en lo referente a una mayor cantidad de exámenes que permitan descartar otro tipo de patologías gastrointestinales; razón por la cual, los síntomas pueden estar solapando algún otro tipo de anomalía (Luthra and Ford, 2016). Los síntomas frecuentes que comparten la Enfermedad Celíaca y el SII son: diarreas, dolor abdominal e hinchazón; patrones que pueden variar ligeramente o combinar diarreas con estreñimientos, por lo que es difícil establecer un diagnóstico diferencial basado en la sintomatología.

El problema reside además, en que al ser los síntomas de la EC y SII similares, no se pueden discriminar con el examen médico de rutina, sino que es necesario

realizar pruebas más específicas para el tamizaje de la enfermedad. Esto trae como consecuencia que muchas personas que son diagnosticadas con SII en primera instancia posteriormente se ha descubierto que son personas que padecen de EC (Mearin y Montoro, 2014).

El tiempo promedio para el diagnóstico de la EC es de doce meses, pero el lapso de tiempo para que se tengan sospechas de la enfermedad es de aproximadamente 10 años (Zipser et al., 2003). El tiempo es un factor importante en este tipo de enfermedad ya que realizar la detección de la misma en edades tempranas permite que el tratamiento sea exitoso y por lo tanto mejora la calidad de vida al igual que evita la progresión de esta enfermedad (Jericho et al, 2017); el "gold standar" de diagnóstico de esta enfermedad son los estudios serológicos y biopsias duodenales, que permiten evitar tratamientos infructuosos (Chan et al,2017). Es importante recalcar que al no ser diagnosticada la EC debido a que existe solapamiento de síntomas con SII, puede tener consecuencias graves a largo plazo para el paciente como osteoporosis, insuficiencia ponderal, deficiencia de vitamina D, entre otras (Al-Ajlan, 2016).

El presente trabajo experimental persigue dilucidar la frecuencia de polimorfismos característicos de la Enfermedad Celíaca en personas diagnosticadas con Síndrome de Intestino Irritable.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar cuatro polimorfismos de nucleótido simple relacionados con la Enfermedad Celíaca en pacientes ecuatorianos diagnosticados con Síndrome de Intestino Irritable.

1.3.2 Objetivos específicos

Determinar la presencia o ausencia de los cuatro polimorfismos de nucleótido simple en las muestras de pacientes diagnosticados con Síndrome de Intestino Irritable.

Determinar la frecuencia de los polimorfismos asociados a la Enfermedad Celíaca dentro del grupo de pacientes diagnosticados con Síndrome de Intestino Irritable.

1.4 Justificación de la investigación

En el Ecuador no existen datos estadísticos oficiales de casos de Enfermedad Celíaca además de que su diagnóstico es poco frecuente a diferencia del Síndrome de Intestino Irritable que es frecuente en los consultorios médicos con una incidencia que oscila entre el 25% y el 30% (Montalvo,2011).

Debido a la similitud de los síntomas entre la EC y el SII se arriba a un diagnóstico erróneo y por lo tanto un tratamiento poco exitoso. Por lo tanto, analizar los polimorfismos característicos de la EC en personas diagnosticadas con SII, podría presentar importantes ventajas en cuanto a los análisis rutinarios. Primero, al no realizarse por medio de pruebas serológicas sino a través de pruebas moleculares, el diagnóstico es más confiable ya que las pruebas serológicas pueden arrojar resultados negativos en celíacos que han seguido una dieta libre de gluten. Por otra parte, las biopsias duodenales constituyen un procedimiento incómodo, costoso, doloroso por lo que muchas personas no están dispuestas a exponerse a este tipo de procedimientos. La toma de una muestra de sangre periférica o de saliva para la obtención de material genético que permita el análisis de los polimorfismos, en contraste, es un procedimiento mucho más sencillo, barato y poco invasivo.

Esta investigación es un importante precedente para ampliar el campo de acción investigativa en enfermedades a las cuales no se les ha prestado un mayor interés probablemente debido a que la Enfermedad Celíaca presenta su génesis en países caucásicos. Sin embargo, no implica que en el Ecuador no existan personas que sufran de Enfermedad Celíaca, a pesar de ser escasas y no ser diagnosticadas eficazmente, además de que la EC puede ser confundida con otras dolencias gastrointestinales. La ausencia de datos oficiales y concretos acerca de una enfermedad, por muchos desconocida, representa una debilidad en el sistema de salud pública de nuestro país y acarrea importantes consecuencias desde el punto de vista económico y para los pacientes, a corto y a largo plazo.

2. Capítulo II Marco teórico

2.1 Síndrome de Intestino Irritable - SII

El Síndrome de Intestino Irritable (SII) es un trastorno digestivo que es diagnosticado por medio de los Criterios de Roma III (ver *Tabla 1*) que son altamente predictivos en situaciones donde existe ausencia de síntomas de alerta o incluso pérdida de peso o dolor abdominal. Se caracteriza por dolores abdominales recurrentes y crónicos, además de que presenta cambios en los hábitos intestinales afectando la defecación. El SII se presenta con frecuencia en la práctica clínica y es considerado un desorden funcional. Existe una clasificación dentro de SII en tres grupos: SII con diarrea, SII con estreñimiento y SII mixto. SII con diarrea denominado SII-D incluye a pacientes que presentaron al menos el 25% de las veces defecación con diarrea. SII con constipación denominado SII-C corresponde a pacientes que en un 25% presentaron problemas al defecar. SII mixto denominado SII-M corresponde a individuos que presentan patrones alternos de diarreas y constipación.

La prevalencia de SII varía ampliamente de acuerdo a los criterios utilizados en la rutina clínica y a la región geográfica. Se estima que el SII afecta al 12% de la población del Norte de América, siendo el subtipo SII-D el que presenta el porcentaje más alto con 40% de casos diagnosticados. La clasificación de SII-M presenta un 23% y SII-C presenta un porcentaje de 35%. La comorbilidad de SII incluye fibromialgia, cistitis intersticial, migraña, dolor crónico pélvico y desórdenes temporomandibulares. SII está asociado a una baja productividad en el trabajo y una calidad de vida menguante. Las personas diagnosticadas con SII poseen baja autoestima y problemas en la calidad de vida desde el punto de vista psicológico (Plavšić, Hauser, Tkalčić, Pletikosić, y Salkić, 2015).

La prevalencia de SII en adultos y en jóvenes es similar, es decir, que este trastorno se encuentra presente en un amplio rango de edades, incluso SII está presente en proporciones iguales tanto en hombres como en mujeres (Kurniawan y Kolopaking, 2014). La prevalencia de SII es diferente en cada población, en Estados Unidos corresponde a un 20%, mientras que en Asia oscila entre un 3.5% - 25% aproximadamente (Bakhshipour et al., 2012). Las enfermedades genéticas presentan características diversas dependiendo de la población analizada. Sin embargo, el SII aparentemente no presenta variación geográfica y tampoco predomina en ningún grupo étnico, no existen diferencias en la prevalencia de SII entre los hispanos, americanos o africanos, por otra parte, afecta a un amplio rango de edades. (Oświęcimska, Szymłak, Roczniak, Girczys-Poędniok, y Kwiecień, 2017)

Tabla 1.

Criterios de Roma III

Criterios de Roma III

Dolor abdominal recurrente al menos tres veces al mes en los últimos tres meses y que esté asociado con al menos dos o más de las siguientes características:

- Problemas al defecar
 - Cambios en las frecuencias de defecación.
 - Cambios en la apariencia de la defecación.
-

Algunos síntomas de SII se caracterizan por ser persistentes como: el dolor abdominal crónico y la afección a nivel de hábitos intestinales, por lo menos en los últimos seis meses antes de la visita al médico. Los criterios de Roma no especifican diferencias entre adultos y jóvenes. La identificación de SII en personas adultas conlleva un trabajo minucioso ya que el diagnóstico no es simple. La presencia de dolor abdominal puede presentarse como un desorden sistémico en enfermedades como la diabetes. Por lo tanto la presencia de síntomas relacionados SII en adultos mayores no es específica, por lo que puede conducir a conclusiones erróneas (Parfenov, Albulova, y Ruchkina, 2016).

La determinación de pacientes con SII no se diagnostica por medio de la exclusión de enfermedades orgánicas. Se llega a la identificación de pacientes con SII por medio de criterios basado en síntomas. La validación de los criterios fue certificada por estudios en pacientes, meta-análisis y voluntarios sanos para controles (Sood, Gracie, Law, y Ford, 2015).

2.2 Causas de SII

Se conocía hasta hace un par de años que SII no tenía causas estructurales conocidas ni tampoco se evidenciaba las bases bioquímicas implicadas. Sin embargo, existen investigaciones actuales que permiten dilucidar con mayor certeza la etiología de esta enfermedad.

Entre las distintas de SII se encuentran: factores genéticos, ambientales, una relación entre el cerebro y el intestino, desequilibrio de la microbiota intestinal, inflamación de la mucosa del intestino, desórdenes en la permeabilidad intestinal o desórdenes en el funcionamiento del cerebro. La patofisiología del SII no está totalmente dilucidada, sin embargo la desregulación entre el cerebro e intestino conlleva a una serie de alteraciones. Las principales manifestaciones de la desregulación se dan a nivel cerebral, respuesta autónoma, funciones inmunes, sensibilidad y movilidad intestinal. Todas estas se pueden desencadenar debido a factores genéticos, estrés, infecciones entéricas o dietas (Aziz & Sanders, 2012).

Existe evidencia de que los síntomas de SII se encuentran relacionados con un desorden existente entre el eje cerebro - intestino el cual permite el paso de información entre el sistema nervioso central y el sistema nervioso entérico. Las situaciones de ansiedad, depresión o estrés se han evidenciado en los casos diagnosticados con SII; debido a que el cerebro transmite información de estrés en señales que se conectan al intestino para tratar de solucionar el estrés al cual está siendo llevado el cerebro. (Holtmann, Ford, y Talley, 2016)

La permeabilidad intestinal es una causa potencial de los síntomas de SII, la cual se encuentra relacionada con la alimentación. En un estudio llevado a cabo por Lacy

se evidenció que el SII en el cual eran prevalentes las diarreas existía un aumento de la permeabilidad intestinal, a diferencia del SII en el cual predominaban períodos de estreñimiento (Lacy, 2015).

La microbiota intestinal se encuentra involucrada en la patogénesis del SII debido a que esta enfermedad puede desarrollarse en individuos predispuestos a infecciones gastroentéricas. La probabilidad de desarrollar SII aumenta seis veces más en individuos que han sufrido una infección aguda en el intestino. Los síntomas relacionados con SII comienzan a aparecer luego de la fuerte infección en un porcentaje del 18% en pacientes con SII (Lacy, 2017).

El sistema inmune posee un papel importante en SII, por ejemplo las citoquinas pro y anti inflamatorias son moduladores importantes de la respuesta inmune y poseen una importante función en el proceso de inflamación intestinal, como es el caso del SII. La producción de citoquinas se encuentra regulada por factores genéticos, por lo tanto los desórdenes en la secreción de citoquinas influye en la susceptibilidad de padecer la enfermedad y en los resultados clínicos.

El equilibrio homeostático de las citoquinas pro y anti inflamatorias se encuentra regulado por factores ambientales del intestino. No obstante, las alteraciones de la flora intestinal, las infecciones agudas gastrointestinales y el incremento de la permeabilidad de las células del epitelio intestinal permiten la filtración de citoquinas y de quimiocinas en el sitio de la inflamación. Algunas de las citoquinas pro-inflamatorias más relevantes son: el factor de necrosis tumoral TNF - α interferón - γ y la interleuquina IL12. Las citoquinas anti inflamatorias son interleuquina IL10 y el factor de crecimiento - β . Las citoquinas anti y pro inflamatorias juegan un papel importante en el proceso de inflamación. La interleuquina IL10 podría emplearse

como un potencial blanco terapéutico antiinflamatorio para disminuir el grado de inflamación en pacientes con SII (Kumar, Shukla, Ranjan, y Kumar, 2017).

2.3 Aspectos genéticos de SII

La relación entre el medioambiente y los factores genéticos favorecen a que el SII se manifieste en un individuo. Factores como el estrés, provocan una alteración en la sincronía entre el eje cerebro - intestino. La presencia de factores genéticos contribuye a la hiperreactividad de los circuitos de estrés en SII. El estrés provoca el incremento de la secreción de la hormona corticotropina y noradrenalina, lo que resulta en cambios en el comportamiento de la respuesta del sistema nervioso autónomo. La función del receptor hormonal de la corticotropina (CRH-R1) en la patofisiología de SII se encuentra relacionado con la modulación de la percepción visceral, movilidad y permeabilidad intestinal, que son funciones inmunes. Los receptores CRH-R1 se encuentran ampliamente distribuidos en el eje del sistema neuroendócrino donde cumplen importantes funciones de inervación del sistema gastrointestinal. Se ha descrito un SNP que se encuentra en el gen que codifica para CRH-R1 se encuentra implicado en la patofisiología de SII involucrado en condiciones patológicas del sistema nervioso como es la depresión (Orand et al., 2016).

La serotonina con sus propios receptores y transportadores tienen participación en la motilidad intestinal y en el estado anímico. Existen estudios de asociación de SII con genes candidatos, por ejemplo el polimorfismo localizado en la región promotora del gen transportador de la serotonina denominado 5-HTT se encuentra ligado al polimorfismo de la región 5-HTTLPR. El alelo corto del transportador de la serotonina se encuentra relacionado con la baja eficiencia transcripcional, lo que resulta en la baja expresión de 5-HTT y por lo tanto una baja tasa de consumo

celular de serotonina en una línea celular de linfoblastos (Henström y D'Amato, 2016). El gen SCN5 forma parte de una familia de genes encargados de la realización de los canales de sodio, este gen se encuentra ubicado en el cromosoma 3. También existen evidencias que corroboran la relación de factores genéticos involucrados en el desorden intestinal. En un estudio realizado en gemelos se encontró una mutación en SCN5 el cual se encuentra asociado al dolor abdominal, que es uno de los síntomas presentes en SII. Existe otra investigación en la cual buscaron SNP asociados a SII y reportaron polimorfismos en el factor de necrosis tumoral y genes que codifican al factor alfa de necrosis tumoral (Katsumata, Shiotani, Matsumoto, Fujita, y Haruma, 2016)

2.4 Conexión entre EC y SII

La Enfermedad Celíaca (EC) es una enfermedad autoinmune desencadenada por la ingesta de gluten en individuos con predisposición genética, la enfermedad se caracteriza por la presencia de atrofia en las vellosidades intestinales lo que provoca una mala absorción de los nutrientes y conlleva a problemas tales como la malnutrición, diarrea, fatiga y anemia. El único tratamiento para esta enfermedad es llevar una dieta libre de gluten (Dieli-Crimi, Cénit, y Núñez, 2015).

La prevalencia de esta enfermedad es del 1% a nivel mundial y se puede presentar en cualquier etapa de la vida, desde la niñez hasta la edad adulta. EC es frecuente en mujeres más que en hombres con una proporción de 2:1 (Rubio-Tapia, Hill, Kelly, Calderwood, y Murray, 2013).

En cuanto a los factores externos se menciona al gluten el cual es responsable de desencadenar una serie de síntomas que más tarde caracterizarán a la EC. Las

gluteninas y gliadinas son dos de los componentes principales del gluten que al no ser digeridos en su totalidad, dejan péptidos como residuos. Los péptidos del gluten son resistentes a la digestión y son el desencadenante de la respuesta inmune en la EC (Ribeiro et al., 2016). Para el diagnóstico de EC se realizan fundamentalmente dos análisis: exámenes serológicos en los cuales se evalúan anticuerpos anti-transglutaminasa (antiTG2) y anti-endomisio (EMA). El examen confirmatorio es la biopsia duodenal de la mucosa intestinal con los análisis histológicos respectivos (Megiorni y Pizzuti, 2012).

Este conjunto de trastornos que se presentan en la EC son el resultado de la acción mancomunada de factores genéticos, ambientales y la participación de la respuesta inmune. Los factores medio ambientales como la ingesta de gluten constituye un pre requisito para el desencadenamiento de EC (Ludvigsson et al., 2014). La EC es una enfermedad hereditaria multifactorial, la cual no depende de una mutación específica sino de la implicación de varios genes y de factores ambientales. La EC es poligénica, hasta el momento se ha estudiado a nivel genético a los genes involucrados con el Antígeno Leucocitario Humano (HLA). Alrededor del 100% de personas diagnosticadas con EC presentan el genotipo HLA DQA2. Sin embargo el portar el genotipo asociado al riesgo de EC no garantiza el diagnóstico de la enfermedad (Lázaro & Piedrafita, 2016). Las linfocitos T CD4+ reaccionan al gluten en la mucosa intestinal; en pacientes con EC los péptidos del gluten son ligados a las moléculas de HLADQ2 y HLADQ8 los cuales desencadenan la respuesta inmune (Stanković et al., 2014).

Los síntomas que comparten la EC y SII son distensión abdominal, diarreas o dolor. La presencia de estos síntomas en común conlleva a problemas en el momento de discriminar cada uno de los desórdenes. La encuesta realizada a varias personas celíacas por *Celiac Disease Foundation*, arrojó que algunos individuos fueron

diagnosticados en primera instancia con SII, debido a que poseían síntomas en común entre SII y EC (Mearin y Montoro, 2014). La EC es sub-diagnosticada debido a la falta de especificidad de los síntomas clínicos que presenta por lo que para llegar a un diagnóstico es necesario realizar una serie de exámenes que permitan confirmar la enfermedad, por lo tanto el tiempo se extiende hasta el diagnóstico definitivo (Barada, Abu Daya, Rostami, y Catassi, 2012).

Alrededor del año 2001 se inician los primeros estudios de evaluación de prevalencia de EC en individuos con SII. En la cual se evaluaron a personas con SII a través de inmunoglobulinas y lo interesante es que existieron casos en los cuales el resultado dio positivo para EC.

2.5 Polimorfismo de nucleótido simple (SNP)

Se conoce como polimorfismo aquellas regiones en el genoma que varían entre individuos. El polimorfismo de nucleótido simple SNP es una variación genética que provoca el cambio de un solo nucleótido en la secuencia del ADN. Los polimorfismos de nucleótido simple son las variaciones más comunes presentes en el genoma. Alrededor del 93% de los genes presentan al menos un SNP. Los polimorfismos pueden ubicarse en regiones de genes codificantes, regiones no codificantes o entre genes. Los SNPs son usados como marcadores de génicos, sin embargo, el impacto es mínimo en los sistemas biológicos. Las consecuencias funcionales de los SNPs provocan cambios en la secuencia de aminoácidos, en la estabilidad del RNA mensajero y en casos específicos afectan la función de la proteína (Uppu, Krishna, & Gopalan, 2017).

Las alteraciones en los nucleótidos se encuentran asociadas a respuestas ante drogas, predisposición a enfermedades y la patogénesis de tumores malignos. Las alteraciones de los nucleótidos pueden presentarse de diferentes formas: deleciones, inserciones, traslocaciones e inversiones. Los polimorfismos de nucleótido simple resultan de la sustitución de una sola base, denominados SNP o mutaciones de un solo nucleótido. Los SNP son útiles porque sirven como marcadores genéticos para investigar las diferencias interindividuales en cuanto a la respuesta frente a un determinado fármaco y frente a enfermedades comunes. El diagnóstico genético contribuye a una terapia personalizada con el fin de administrar tratamientos específicos y eficaces para el individuo (Matsuda, 2017).

2.6 SNPs relacionados con la Enfermedad Celíaca (EC)

El cluster de receptores de quimiocina se encuentra ubicado en la región 3p21 que contiene genes como: CCR1, CCR2, CCRL2, CCR3 y CCR5, denominados con las letras CCR ya que son genes que forman parte del cluster de los receptores de quimiocina. El SNP rs6441961 se encuentra a 44kb del extremo 3' de CCR3. La importancia de las quimiocinas y sus receptores es que son las encargadas del reclutamiento de las células efectoras inmunes al sitio de inflamación (Hunt et al., 2008).

El mayor factor de predisposición genética de EC es la variante del Antígeno Leucocitario Humano (HLA) que porta el individuo. La región HLA aporta con un 40% de la probabilidad de heredar la enfermedad celíaca, esto significa que el porcentaje restante se encuentra asociado a otros genes. Se han realizado varias investigaciones de posibles loci candidatos para la susceptibilidad de padecer la EC. Finalmente se han identificado tres regiones cromosómicas como factores de

predisposición de genética. De acuerdo a la nomenclatura CELIAC2, CELIAC 3 y CELIAC4 ubicadas en los cromosomas 5q31-q33, 2q33 y 19p13 respectivamente (Brusca, 2015).

Los genes de HLA de clase I y II se encuentran localizados en el brazo corto del cromosoma 6 específicamente en 6p21.3. Estos genes codifican para glicoproteínas las cuales poseen funciones importantes en la presentación del antígeno y en el auto reconocimiento por medio de las células inmunes. Las moléculas de HLA tienen capacidad para unir péptidos antigénicos y presentarlos a los linfocitos T. Específicamente moléculas de antígenos endógenos de HLA de clase I, los cuales son reconocidos por células T CD8+, que activan la respuesta citotóxica. Paralelamente los heterodímeros de antígenos exógenos de HLA de clase II se enlazan a las células T CD4+ y se promueve la respuesta humoral (Megiorni & Pizzuti, 2012). En individuos diagnosticados con SII se evidencian bajas tasas de inflamación de la mucosa, también se evidencia el aumento de mediadores de pro-inflamatorios como las citoquinas lo que indica una participación en la respuesta inmunológica.

La región génica que comprende a la interleuquina IL2, posee una función relevante en la regulación de las células T. El rol de la interleuquina 2 es promover la proliferación y expansión de los linfocitos T CD8+ y CD4+. El SNP rs6822844 se encuentra en la posición 4q27 – IL2 y está relacionado con la susceptibilidad de padecer EC (Espino-Paisán et al., 2011).

LPP es localizada con paxilina en las adhesiones focales y el número de adhesiones focales con LPP experimenta un incremento en los fibroblastos de EC. Ocurre una alteración en la forma y adhesión celular que involucra a LPP y sucede en los

fibroblastos de EC. Lo que conlleva a la correlación entre LPP y la patogénesis de EC. LPP es el sustrato de la proteína tirosina fosfatasa (PTP1B), la pérdida de PTP1B puede atenuar la activación de la señal reguladora extracelular de la quinasa ERK, la cual es activada en la mucosa de los individuos con EC que llevan una dieta libre o no de gluten. La inhibición de la fosforilación de ERK promueve la proliferación de enterocitos de la mucosa atrofiada en EC. Cuando PTP1B es excesiva permite mayor actividad de ERK en los enterocitos, dando como resultado la progresión de EC (Huang et al., 2017).

El gen LPP se encuentra asociado con dos tipos de enfermedades autoinmunes: celiaquía y vitiligo. Este gen se encuentra involucrado en funciones de movilidad celular y adhesión celular. Estas funciones son de elevada importancia ya que mantienen la integridad de la barrera de la monocapa epitelial en el intestino delgado. El SNP rs9851967 se encuentra ubicado en el gen LPP. En la investigación de Almeida y colaboradores analizaron la expresión del gen LPP por medio de ensayos de microarrays en muestras de biopsias duodenales de pacientes con EC y controles. La baja expresión de LPP en individuos con EC determinan que es el gen causante de la patogénesis de EC, aunque no es el único gen reportado hasta el momento (Almeida et al., 2014).

2.7 Secuenciación Sanger

La secuenciación Sanger o también denominada secuenciación de primera generación es considerada la base de todas las metodologías de secuenciación. Esta técnica presenta un elevado nivel de especificidad, lo que resulta en una baja cantidad de falsos positivos (*Next Generation DNA Sequencing*, 2014). La secuenciación Sanger abarca tres procesos básicos: ciclo térmico, purificación de la muestra y electroforesis capilar (Blazej, Kumaresan, & Mathies, 2006). La técnica

de la electroforesis capilar es ampliamente utilizada para resolver distintas moléculas y fue la herramienta necesaria para la secuenciación del genoma humano (Magaña, Arenas-Sordo, & Gómez, 2009).

El rango de lectura de la secuenciación Sanger alcanza los 700 a 1000 pb por reacción. Los requerimientos de la muestra a secuenciar con Sanger se encuentran en dependencia del protocolo. Básicamente se necesitan 10ng de templado de 100pb de longitud, para obtener resultados exitosos. La limitación que presenta la secuenciación Sanger se encuentra en la fase no resuelta debido a que de las dos copias de cada gen que lleva la célula, solo se toma en cuenta una, por lo tanto, las variantes de un cromosoma no se pueden diferenciar de las variantes del otro cromosoma (Kulkarni, 2014).

2.8 Test exacto de Fisher

El test exacto de Fisher fue propuesto por primera vez en el año de 1934 y se denominó distribución de probabilidad hipergeométrica (Weinberg & Abramowitz, 2008). El test exacto de Fisher es usado para el análisis de datos en los cuales las variables dependientes e independientes son de carácter dicotómico. Este test se usa para muestras pequeñas y cuando la prueba de independencia de chi cuadrado no se puede usarse. El objetivo del test exacto de Fisher es determinar si una población difiere de otra, en proporción a la cantidad de sujetos correspondientes a cada clasificación. El test exacto de Fisher es usado ampliamente en el campo de la investigación médica. El test de chi cuadrado es una alternativa no paramétrica del test exacto de Fisher cuando la muestra es grande y las categorías presentan más de dos clasificaciones (Pett, 1997).

El test de probabilidad exacta de Fisher surge como alternativa al estadístico chi cuadrado, al no cumplirse el tamaño mínimo que es de cinco unidades por cada casilla. En el test de Fisher se calcula cada probabilidad dentro de las distintas formas que se puedan presentar los datos dentro de la tabla de contingencia (Taucher, 1997).

En el programa SPSS se calcula el test exacto de Fisher automáticamente cuando se calcula el chi cuadrado de independencia en una tabla de contingencia de 2x2, cuando el recuento de cada casilla es menor que cinco o cuando el tamaño total de la muestra es menor que 20 (Pett, 1997) .

3. Capítulo III Diseño del plan experimental

El diseño experimental del presente proyecto involucra tres fases importantes: La recolección de muestras biológicas, para lo cual se procederá a contactar a las personas interesadas en participar en la investigación y que cumplan con criterios de inclusión y exclusión específicos. Ya sea para el grupo control o para el grupo experimental conformado por individuos diagnosticados con SII. Se procederá la firma del consentimiento informado por parte de los participantes en el estudios y posteriormente, a la toma de una muestra de 3ml de sangre periférica o 2 ml de saliva.

La segunda fase involucra el procedimiento experimental en los laboratorios de la UDLA. En esta fase se procesarán todas las muestras del grupo experimental y del grupo control, desde la extracción de ADN hasta finalmente la secuenciación. La

fase final es el procesamiento de los datos obtenidos a partir de la secuenciación para su análisis por medio del programa estadístico SPSS (Ver *Figura 1*).

Grupo experimental: personas ecuatorianas diagnosticadas con síndrome de intestino irritable de acuerdo a los criterios de Roma III.

Grupo control: personas ecuatorianas que no hayan sido diagnosticadas con ningún tipo de enfermedad intestinal.



Figura 1. Fases del Plan Experimental.

Las fases del plan experimental del presente proyecto, iniciaron con la recolección de muestras biológicas de los voluntarios, continuando con la fase del desarrollo experimental y finalmente el análisis de los datos obtenidos.

4. Capítulo IV Procedimientos

4.1 Población y muestra

La población está conformada por individuos ecuatorianos diagnosticados con SII por medio de los criterios de Roma III (Plavšić et al., 2015). La muestra está constituida por 28 individuos ecuatorianos diagnosticados con SII y 30 individuos ecuatorianos que no presenten ningún tipo de enfermedad gastrointestinal, los cuales fueron asignados como grupo control. Las muestras seleccionadas corresponden a una base de datos de los pacientes de gastroenterólogos que decidieron colaborar con la investigación. Se procedió a contactar a los pacientes diagnosticados con SII y los interesados fueron parte del presente estudio.

El material biológico de partida para el presente proyecto fue sangre periférica y/o saliva, dependiendo del consentimiento del voluntario. Antes de la toma de la muestra biológica de los voluntarios participantes en la investigación, se realizó la firma del consentimiento informado a cada persona (ver anexo 1). Se procedió a la toma de muestra de 2 ml de saliva la cual fue depositada en un tubo estéril eppendorf de 50 ml. Para la toma de muestra de sangre periférica se utilizó el material necesario para la toma de muestra (ver *Tabla 2*).

Tabla 2.

Materiales para extracción de sangre

Materiales	Función
Algodón	Limpiar la zona de contacto
Alcohol	Desinfección de piel
Curita	Cubrir la zona del pinchazo
Jeringa	Extracción de sangre
Frasco con anticoagulante	Almacenar la sangre
Torniquete	Presión

4.2 Procesamiento de la muestra

4.2.1 Extracción de ADN de las muestras recolectadas

Para la extracción de ADN de sangre periférica se utilizó el kit PureLink®GenomicDNA de Invitrogen. El procedimiento inició con la fase de digestión. Para lo cual se colocó en un tubo eppendorf de 1,5ml 200ul de sangre más 20ul de proteinasa K y 20ul de RNAsa. Se mezcló mediante vortex y se añadió 200ul de buffer de lisis. Se llevó la mezcla a un bloque térmico a 55°C durante 10 minutos. Al término de este tiempo se añadió etanol al 100 % y se mezcló mediante vortex.

Se continuó con la fase de ligamiento de ADN. Se trasladó el líquido homogenizado a una columna de extracción con el respectivo tubo colector y se lo centrifugó durante un minuto a 10000 x g. Se colocó la columna de extracción en un nuevo tubo colector. Se procedió con la fase de los lavados. Se añadió 500ul de *Wash*

Buffer 1 y se centrifugó durante un minuto a 10000 x g, se descartó el líquido. Se añadió *Wash Buffer 2* y se centrifugó durante 3 minutos a máxima velocidad, se descartó el líquido y se colocó la columna en un tubo eppendorf de 1,5 ml. Finalmente se concluyó con la fase de elución de ADN. Se colocó 30 ul de *Elution Buffer* en el centro de la columna y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto. Se descartó la columna de extracción y el ADN se colocó a -20°C.

Para la extracción de saliva se utilizó el kit *PureLink®GenomicDNA* de Invitrogen. Se colocaron 20ul de *proteinasasa K* en un tubo eppendorf de 1.5ml y 400ul de saliva. Se añadieron 400ul de *Buffer de lisis*, se mezcló por medio de vortex y se colocó en el bloque térmico a 55°C durante 10 minutos. Se centrifugó durante un minuto a 2000 x g y se añadieron 200ul de etanol al 100%.

Se continuó el proceso de ligamiento de ADN. Se colocaron 500ul de la mezcla en una columna de extracción con su respectivo tubo colector y se centrifugó a 10000x g durante un minuto. Se colocó la columna en un nuevo tubo colector. Luego se continuó con la fase de lavado. Se añadieron 500ul de *Wash Buffer 1* y se centrifugó durante un minuto a 10000 x g. Se descartó el líquido y se añadieron 500ul de *Wash Buffer 2*. Se centrifugó a máxima velocidad durante 3 minutos, se descartó el líquido y la columna se colocó en un tubo eppendorf de 1.5ml.

Se terminó el proceso con la fase de elución, para la cual se añadió 30ul de *Elution Buffer* en el centro de la columna. Se centrifugó a máxima velocidad durante un minuto, se descartó la columna de extracción y el ADN se lo guardó a una temperatura de -20°C.

4.2.2 Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN extraído se realizó por medio del equipo NanoDrop2000. Se colocaron 2 ul de Elution Buffer como blanco para la medición. Luego se colocaron 2ul de muestra y se procedió a la medición de los ácidos nucleicos. El valor de la medición está dado en unidades de ng/ul.

4.2.3 Amplificación del fragmento de interés

En el presente estudio se evaluaron cuatro polimorfismos de nucleótido simple que fueron: rs6441961, rs6822844, rs9851967 y rs2187668. Para cada uno de ellos se diseñó primers específicos (ver *Tabla 3*) por medio de las secuencias depositadas en el GenBank.

Tabla 3.

Polimorfismos con sus respectivos cebadores.

Polimorfismo		Gen	GenBank
rs6441961	C/T	CCR1/CCR2	NM_178329.2
Forward – TTGGCAGCCTGGACATTGAA			
Reverse –TGTCAAGGGGCACAGTGATG			
rs6822844	G/T	IL2/IL21	NM_000586.3
Forward – TGGCCACATATGAACCACCT			
Reverse -CTCGCTGGCAAAGTTGTTTGT			
rs9851967	C/T	LPP	AH006645.2
Forward – ACTGCTGCCTTTGAGCTAGG			
Reverse –CAGTGACTIONTAGCCTGTGGGG			
rs2187668	A/G	HLA-DQA1	LN885089.1
Forward –AAAGCTTAGCCACATGCCCA			
Reverse –TTCCGATGTCTCCGGTGGTA			

Las condiciones y los materiales que se utilizaron para realizar la PCR se describen en el (*Tabla 4*). En el ensamblaje de la PCR se colocaron los reactivos respectivos en los tubos para PCR, también se colocó el control negativo, el cual tenía agua en lugar de ADN. Se colocaron las muestras en el termociclador con las condiciones especificadas. Al finalizar el programa de PCR, los fragmentos obtenidos se visualizaron en el transiluminador.

Tabla 4.

Condiciones de PCR

Compuesto	Concentración	Concentración Final	Vol 1x (ul)
Agua PCR			12
Buffer	50mM	3mM	2
dNTPs	100mM	0,2mM	0.4
Primer FW	100ul	0.2ul	0.4
Primer RV	100ul	0,2ul	0.4
Cofactor MgCl₂	10mM	0,2mM	0.6
Taq platinum	5U/ul	0,02 U/ul	0.2
ADN	5 ng/ul		4
Volumen total			20ul

Tabla 5.

Condiciones del termociclador.

Fase	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	94	4'	1
Denaturación	94	30''	
Hibridación	64.1	30''	35
Elongación	72	45''	
Elongación final	72	10'	1
Enfriamiento	4	10'	1

4.2.4 Secuenciación tipo Sanger

La secuenciación de los fragmentos obtenidos de la PCR se llevó a cabo en tres fases. La primera que corresponde a la purificación se utilizó el *Kit Agencourt AMPureXP®*. Se añadió 15ul de reactivo Ampure en 10 ul de producto de PCR. Se mezcló mediante vortex hasta homogeneizar y se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos. Se colocaron los tubos en la placa magnética durante cinco minutos hasta que se formó un anillo de color café en las paredes del tubo. Se procedió a extraer con la pipeta el líquido sin tocar las paredes del tubo. Se añadieron 200ul de etanol al 70% y se dejó reposar durante 30 segundos. Se extrajo el líquido en su totalidad con la ayuda de la pipeta. Se colocó la placa magnética con las muestras en la incubadora a 37° durante 30 minutos. Se retiraron los tubos de la placa magnética y se los re suspendió con 30ul de agua Milli-Q. Se mezcló mediante vortex hasta que el líquido se tornó color café y se colocaron nuevamente los tubos en la placa magnética. Se extrajo el líquido y se lo colocó en nuevos tubos de PCR.

Con el ADN purificado se realizó la PCR de secuencia que corresponde a la segunda fase. Para la cual se utilizó el kit de secuenciación *BigDye® Terminator 3.1Cycle*. Los reactivos y las condiciones utilizadas se describen en el (*Tabla 5*).

Tabla 6.

Reactivos y condiciones para PCR Seq

Compuesto	Concentración	Volumen (ul)
Big Dye Terminator mix		0,5
Big Dye Sequencing Buffer	0,75 X	0,9
Primer RV o FW Purificado (amplificado)	0,27 uM	1,6
Agua MilliQ		1,5
Volumen final		6 ul

Tabla 7.

Condiciones del termociclador para PCR Seq

Etap	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Denaturación Inicial	96	3'	1
Denaturación	96	10''	25
Hibridación	50,5	5''	
Elongación	60	4'	

Una vez que se terminó de realizar la PCR de secuencia se procedió con la última fase de purificación. Se utilizó el kit *Agencourt CleanSEQ*, se agregaron 2 ul de *CleanSEQ* y 16,2 ul de etanol al 85% al producto de PCR de secuencia. Se mezcló mediante vortex y se los colocó en la placa magnética durante tres minutos. Se procedió a extraer el líquido de los tubos y se añadió 100ul de etanol. Se dejó reposar los tubos en la placa magnética y se retiró la totalidad del líquido de los tubos. Se colocó la placa magnética en la incubadora durante 30 minutos a una temperatura de 37°C. Se re suspendieron los tubos con 20ul de agua Milli-Q, se mezcló mediante vortex y se los colocó en la placa magnética durante 30 segundos. Se extrajo el líquido de los tubos y se lo colocó en la placa de secuenciación de Genetic Analyzer 3130. Los resultados de la secuenciación se visualizaron en el software Geneious.

4.3 Evaluación estadística de los resultados

Para el análisis estadístico se utilizó el test exacto de Fisher la cual nos permitió establecer si existieron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo con SII. Esta prueba estadística se realizó para cada uno de los polimorfismos de nucleótido simple evaluados. Para lo cual se calculó el valor p, mediante el programa SPSS 2.0.

5. Capítulo V Resultados y discusión

5.1 Resultados de PCR

Se obtuvieron los fragmentos de PCR que contienen los cuatro SNPs rs6441961, rs2187668, rs9851967, rs6822844 relacionados a la EC. Se analizaron un total de

58 muestras, de las cuales 28 corresponden al grupo de pacientes y 30 al grupo control. A cada muestra se le colocó un código de identificación que contiene las siglas de la enfermedad SII y la respectiva numeración, desde 001 a 028.

Una vez finalizados los 35 ciclos de la PCR, se procedió a realizar la corrida electroforética a 100 V durante 30 minutos en gel de agarosa al 2%. El polimorfismo rs6441961 presentó un amplicón de 225 pb. En la *Figura 2* se muestra el gel de agarosa observado en el transiluminador, el cual presenta los productos de PCR resultantes del polimorfismo rs6441961 de seis muestras de pacientes con SII.

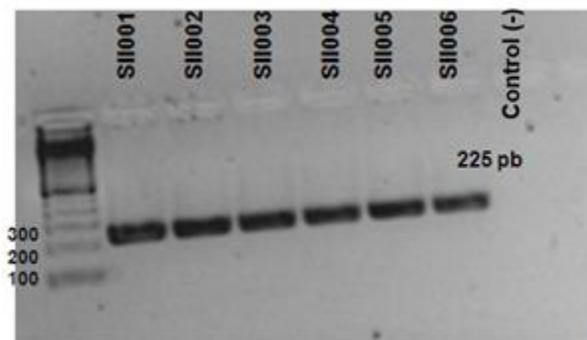


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los fragmentos amplificados por PCR para el polimorfismo rs6441961.

En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular de 100 pb y en los carriles del dos al siete se muestran las amplificaciones de las muestras SII001 hasta SII006. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V por 30 minutos y el fragmento amplificado tiene una talla de 225pb.

En la *Figura 3* se muestran los fragmentos amplificados para los SNPs rs2187668 y rs6822844. Como se observa en la corrida electroforética para el polimorfismo rs2187668 se presenta un amplicón de 242 pb y para rs6822844 un amplicón de

413 pb. Para rs2187668 se observan los amplicones de ocho muestras y para rs6822844 se observan los amplicones de nueve muestras.

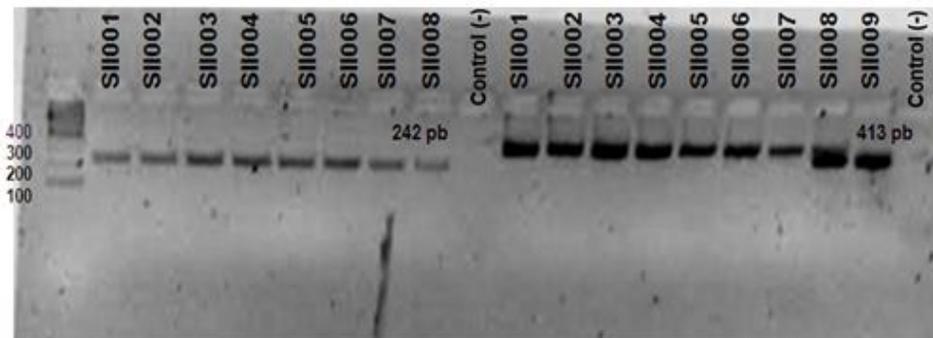


Figura 3. Corrida electroforética en gel de agarosa muestra los amplicones de los polimorfismos rs2187668 y rs6822844.

En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular de 100 pb. Desde el carril segundo hasta noveno se encuentran los amplicones correspondientes al polimorfismo rs2187668 con un peso de 242 pb y se encuentran presente ocho muestras desde SII001 hasta SII008. El polimorfismo rs6822844 presentó un amplicón de 413pb, las muestras se ubican desde el carril undécimo hasta el décimo noveno, con muestras desde SII001 a SII009.

En la *Figura 4* se aprecia la corrida electroforética en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos por PCR del polimorfismo rs9851967. En la cual se observan los amplicones de ocho muestras de pacientes con SII los cuales presentaron un peso de 298 pb.

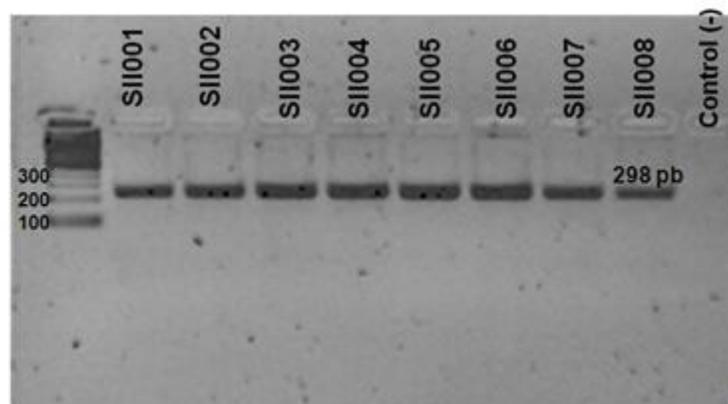


Figura 4. Corrida electroforética en gel de agarosa de los productos de PCR del polimorfismo rs9851967.

En el carril primero se encuentra el marcador de peso molecular de 100pb. Desde el carril segundo hasta el carril noveno se encuentran los amplicones de ocho muestras de SII del polimorfismo rs9851967, que presentó un peso de 298pb.

5.2 Resultados de secuenciación

Con los fragmentos amplificados por PCR y observados en la corrida electroforética se procedió a realizar la secuenciación. Para secuenciar las muestras se deben seguir tres pasos. Primero se eliminan las impurezas de los amplicones obtenidos por PCR, luego se realiza una PCRseq (PCR para la secuenciación) y finalmente se realiza una purificación final. El producto obtenido es ingresado en la placa del secuenciador Genetic Analyzer y los resultados de los electroferogramas son analizados en el programa Geneious 10.2.2 mediante el alineamiento de las secuencias.

En la *Figura 5* se muestra el electroferograma para el polimorfismo rs6441961, en el cual se observa el genotipo CC (homocigoto) y CT (heterocigoto representado

por la letra Y). El pico de color verde corresponde a la letra T de Timina mientras que la presencia de un pico azul corresponde a la letra C de Citosina y la presencia de dos picos solapados azul y verde corresponde a la letra Y (C o T). El SNP se produce por un cambio de una T por una C, siendo la letra C el alelo ancestral o *wilde type*, por lo tanto si un individuo presenta T o Y se le incluye en el grupo portador del polimorfismo.

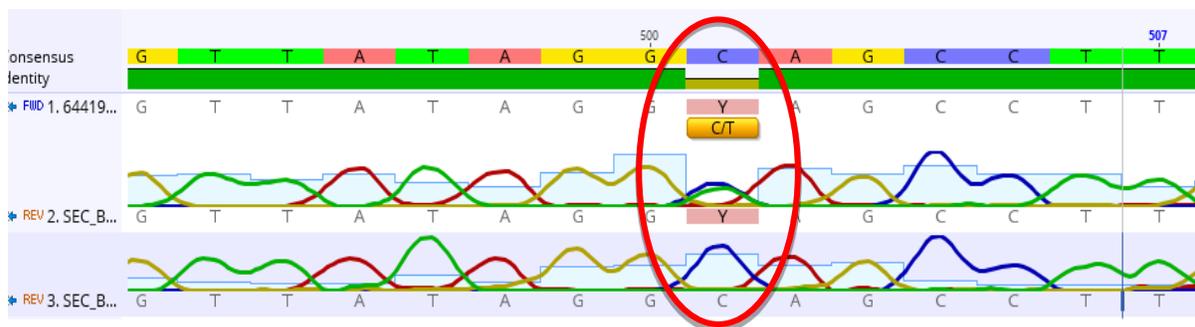


Figura 5. Electroferograma del polimorfismo rs6441961 (óvalo rojo) para la muestra SII001 y SII010.

El SNP representa un cambio de base de T por C. En el electroferograma para la muestra SII001 (arriba) presenta el polimorfismo ya que se aprecia la letra Y que corresponde a la presencia de dos picos: uno en azul y otro en verde. Mientras que para la muestra SII010 (abajo) se observa la presencia de un solo pico en color azul que corresponde a la letra C de Citosina.

El polimorfismo rs6822844 es un SNP que representa un cambio de base de Timina (T) por Guanina (G), siendo Timina el alelo ancestral. En el electroferograma a la Timina se le representa con un pico en color verde y a la Guanina con un pico en color amarillo. Para determinar la presencia del polimorfismo el resultado debe presentar la letra K que significa el solapamiento de dos picos uno en amarillo y otro

en verde, o presentar la letra T el pico de color verde. En el electroferograma de la *Figura 6* el pico en color verde representa a Timina y el pico en color amarillo corresponde a Guanina. En la imagen se observa el electroferograma para la muestra SII004 que no presentó el polimorfismo ya que presenta un pico en amarillo correspondiente a G.

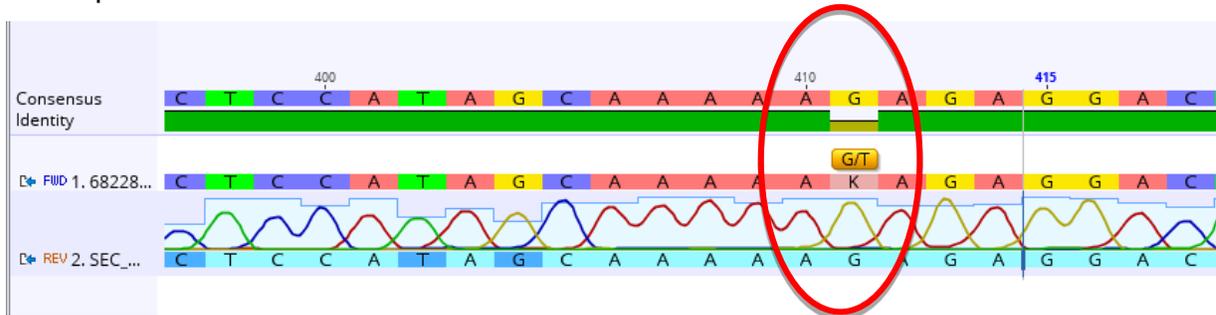


Figura 6. Electroferograma del polimorfismo rs6822844 (óvalo rojo) para la muestra SII004.

El diagrama corresponde a una muestra del grupo de pacientes con SII que muestra la ausencia del polimorfismo rs6822844 debido a que presenta la letra G y un pico definido en color amarillo.

El polimorfismo rs9851967 corresponde a un cambio de base de Timina (T) por Citosina (C), siendo el alelo ancestral Timina y el polimorfismo la Citosina. En el electroferograma *Figura 7* se representa a la Timina con un pico en color verde y a la Citosina con un pico en color azul. La presencia del polimorfismo rs9851967 está dado por la letra Y la cual presenta el pico en azul y verde superpuestos. Mientras que la ausencia del polimorfismo está dada por la letra C y el pico en color azul.

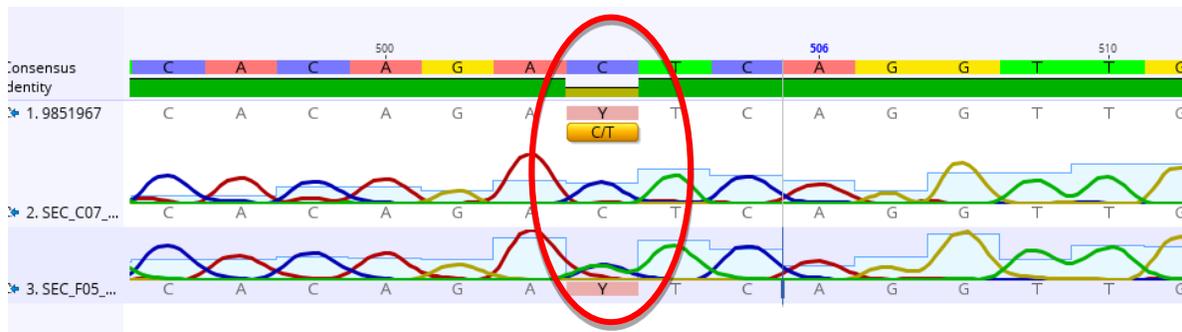


Figura 7. Electroferograma de polimorfismo rs9851967.

En el óvalo rojo para la muestra SII015 y SII022. El diagrama correspondiente a la muestra SII015 la cual presenta la letra C y el pico de color azul, lo que indica la ausencia del polimorfismo. Para la muestra SII022 el polimorfismo se encuentra presente con la letra Y y se observan los picos en azul y verde solapados.

Para el polimorfismo rs2187668 representa un cambio de base de Guanina (G) por Adenina (A), siendo Guanina el alelo ancestral. En la *Figura 8* se encuentra el electroferograma de la muestra SII023 en la cual se representa a la Adenina con la letra A y el pico en color rojo, mientras que para la Guanina se la representa con la letra G y el pico en color amarillo. La presencia del polimorfismo corresponde a la presencia de la letra A o la letra R que corresponde al solapamiento de dos picos uno rojo y otro amarillo. Sin embargo, en la investigación desarrollada no se encontró ningún individuo con la presencia del polimorfismo rs2187668.

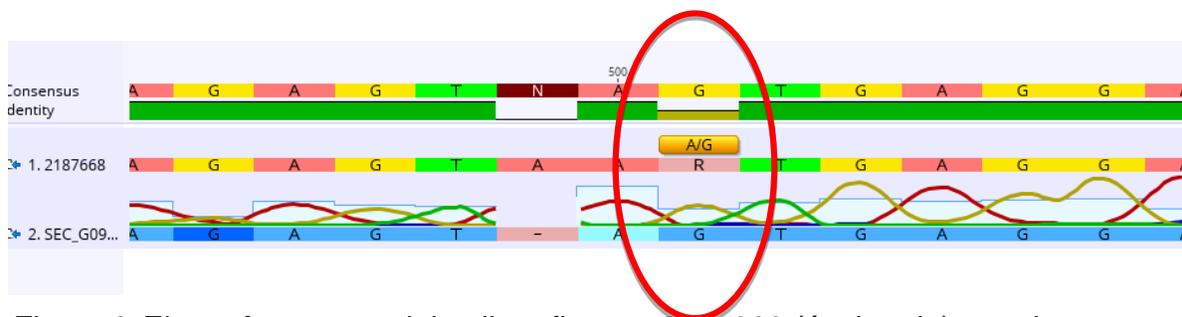


Figura 8. Electroferograma del polimorfismo rs2187668 (óvalo rojo) para la muestra SII023.

El Electroferograma muestra la presencia del pico amarillo correspondiente a Guanina. La muestra SII023 no presenta el polimorfismo rs2187668.

Se analizaron los cuatro SNPs en cuestión para determinar cuantitativamente el número de individuos que presentaron los polimorfismos. El análisis se realizó tanto para el grupo control como para el grupo diagnosticado con SII. En la *Tabla 8* se muestra el número total de individuos que presentaron los distintos polimorfismos. Se evidencia ausencia completa del polimorfismo rs2187668 en los dos grupos evaluados.

Tabla 8.

Polimorfismos evaluados en el grupo control y grupo con SII.

SNP	rs6441961		rs6822844		rs9851967		rs2187668	
	CP	SP	CP	SP	CP	SP	CP	SP
SII	10	18	2	16	14	14	0	28
Controles	20	10	3	27	15	15	0	30
TOTAL	<u>30</u>		<u>5</u>		<u>29</u>		<u>0</u>	

Nota. CP: Con Polimorfismo; SP: Sin Polimorfismo o ancestral

En la *Figura 9* se muestra un diagrama de barras, en el cual se observa de manera gráfica la presencia de los cuatro polimorfismos estudiados. También se aprecia la comparación entre el grupo control con el grupo con SII. El polimorfismo más

abundante en los dos grupos fue rs6822844, mientras que el polimorfismo rs6441961 obtuvo el valor más alto en el grupo control. Finalmente el polimorfismo rs9851967 se encontró en proporciones iguales tanto para el grupo control como para el grupo con SII.

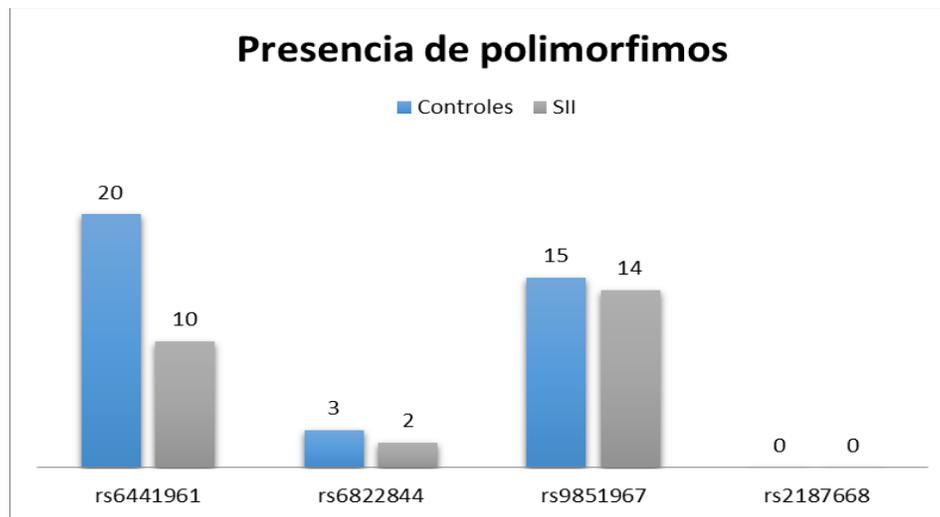


Figura 9. En el diagrama de barras de la presencia de los cuatro polimorfismos evaluados.

En el eje x se encuentran los SNP y en el eje y se encuentra el número de individuos. Las barras de color azul representan a los participantes del grupo control y las barras en color gris corresponden al grupo con SII.

El SNP rs6441961 presenta 20 individuos con la presencia del polimorfismo en el grupo control y para el grupo con SII se encuentran 10 individuos con el polimorfismo. Para el SNP rs6822844 en el grupo con SII se encuentran 2 individuos y en el grupo control se encuentran 3 individuos con la presencia del polimorfismo. El SNP rs9851967 en el grupo con SII se encontró 14 individuos con la presencia del polimorfismo, mientras que en el grupo control se encontraron 15 individuos.

Para el polimorfismo rs2187668 no se registró la presencia del SNP en los dos grupos evaluados. *Figura 9.*

5.3 Análisis estadístico y poblacional

Se procedió a realizar el cálculo de las frecuencias para cada polimorfismo en los dos grupos evaluados y también se calcularon las frecuencias de los genotipos para cada polimorfismo. Para el cálculo de las frecuencias se procedió a dividir el número de individuos portadores del polimorfismo por el total de individuos (grupo con SII 28 y grupo control 30) el resultado se lo multiplicó por 100 y se obtuvo un valor de porcentaje.

El polimorfismo rs6441961 presentó una frecuencia de 35,7% en el grupo con SII mientras que en el grupo control fue de 66,7%, lo que representa un porcentaje elevado que no se esperaba en individuos sanos, ya que se parte de la hipótesis de que la EC se encuentra subdiagnosticada y se la confunde con SII, por lo tanto se esperaba una mayor frecuencia del SNP rs6441961 en individuos ya diagnosticados con SII. Para el polimorfismo rs6822844 las frecuencias obtenidas no superaron el 10%, ya que el grupo con SII presentó 7,1% y el grupo control presentó 10%. Mientras que para el polimorfismo rs9851967 tanto el grupo control como el grupo con SII presentaron una frecuencia del 50%. Finalmente, para el SNP rs2187668 no se encontró presencia de este polimorfismo en ninguno de los dos grupos evaluados. Ver *Tabla 9.*

Como se muestra en la *Tabla 9* se calcularon las frecuencias genotípicas para cada polimorfismo. El SNP rs6441961 presentó un 64,3% para el genotipo ancestral CC en individuos diagnosticados con SII, mientras que en el grupo control fue de 33,3%.

En cuanto al genotipo CT fue de 35,7% en el grupo con SII y 43,3% para los controles. Finalmente, el genotipo TT presentó un porcentaje de 23,3% en el grupo control y de 0% para el grupo con SII.

Para el polimorfismo rs6822844 se obtuvieron los siguientes porcentajes de frecuencias genotípicas: con un valor de 92,9% para el genotipo ancestral GG en el grupo con SII y del 90% en el grupo control. Para el genotipo GT se obtuvo 7,1% y 10,0% para el grupo con SII y grupo control respectivamente. El genotipo TT presentó total ausencia en los dos grupos evaluados.

El SNP rs9851967 presentó los tres genotipos, el CC denominado ancestral, CT y TT para los cuales se calcularon las respectivas frecuencias. En el grupo control y el grupo con SII se obtuvo un valor de 50% para el genotipo CC. Para el genotipo CT se obtuvo un porcentaje de 42,9% para el grupo con SII y de 33,3% para el grupo control. Finalmente, para el genotipo TT se obtuvo 7,1% y 16,7% para el grupo con SII y controles respectivamente.

Para el SNP rs2187668 la frecuencia del genotipo ancestral GG fue del 100% mientras que para los genotipos AG y AA fueron del 0%, no se encontraron individuos con la presencia de este polimorfismo.

Tabla 9.

Frecuencias genotípicas de los cuatro polimorfismos analizados.

<i>SNP</i>	<i>SII (%)</i>	<i>Controles (%)</i>
rs6441961	35,7%	66,7%
CC	64,3	33,3
CT	35,7	43,3
TT	0,0	23,3
rs6822844	7,1%	10,0%
GG	92,9	90,0
GT	7,1	10,0
TT	0,0	0,0
rs9851967	50,0%	50,0%
CC	50,0	50,0
CT	42,9	33,3
TT	7,1	16,7
rs2187668	0%	0%
GG	100,0	100,0
AG	0,0	0,0
AA	0,0	0,0

Nota. Zona en gris: frecuencia general de cada polimorfismo; Zona en blanco: frecuencia de los genotipos de cada polimorfismo

Se procedió a realizar el análisis estadístico con los valores de la *Tabla 10* mediante el uso del test exacto de Fisher para comparar los dos grupos estudiados y determinar si existían diferencias significativas entre el grupo control y el grupo diagnosticado con SII.

Para el SNP rs6441961 se obtuvo un valor de p de 0.008 que es altamente significativo lo que significa que existen diferencias significativas entre el grupo con SII y el grupo control. En este caso, la presencia del polimorfismo se encuentra en mayor proporción en el grupo control que en el grupo con SII.

Para el polimorfismo rs6822844 se obtuvo un valor de p igual a 0.698 lo que indica que no existen diferencias significativas, en cuanto a la presencia del polimorfismo entre el grupo control y el grupo con SII.

El SNP rs9851967 no presentó diferencias entre el grupo control y el grupo con SII, ya que se obtuvo un valor de p de 0,488 lo que significa que no existen diferencias significativa para este polimorfismo entre ambos grupos.

Para el polimorfismo rs2187668 no se calculó el valor de p , debido a que no encontró el polimorfismo en ninguno de los dos grupos evaluados.

Tabla 10.

Test exacto de Fisher de los SNPs evaluados

SNP	SII	Controles	Valor p
rs6441961			
CC	18	10	0,008**
CT	10	13	
TT	0	7	
rs6822844			
GG	26	27	0,698
GT	2	3	
TT	0	0	
rs9851967			
CC	14	15	0,488
CT	12	10	
TT	2	5	
rs2187668			
GG	28	30	NC
AG	0	0	
AA	0	0	

Nota. ** Altamente significativo; NC: No Calculado

5.3.1 Análisis poblacional y discusión

En poblaciones del Sudeste de Irán se evaluaron pacientes diagnosticados con SII mediante el uso de anticuerpos específicos para el diagnóstico de EC; en este trabajo, los investigadores determinaron que la prevalencia de EC en pacientes diagnosticados con SII era elevada (Bakhshipour et al., 2012). Sin embargo, en el estudio realizado por Ozdil la prevalencia de EC no aumenta significativamente en individuos con SII. En la mencionada investigación se trabajó con una muestra de 60 individuos con SI y ninguno presentó resultados positivos para EC en el análisis de muestras de biopsias duodenales. Sin embargo, si se presentaron casos que positivos para los anticuerpos específicos de EC (Ozdil et al., 2008). Estos casos representan un número reducido y pudieran ser de falsos positivos, no obstante, el examen confirmatorio que son las biopsias duodenales resultaron negativas lo que nos lleva a la conclusión de que para determinar la frecuencia de SII en EC es necesario trabajar con exámenes diagnóstico confirmatorios. En el presente trabajo se utilizaron SNPs asociados a EC, sin embargo, dichos polimorfismos no se encuentran validados aún como marcadores moleculares para el diagnóstico de EC.

En esta investigación, no se encontraron diferencias estadísticas significativas en cuanto a la presencia de los polimorfismos en los grupos evaluados. No obstante, si se evidenció la presencia de polimorfismos relacionados con EC en pacientes ya diagnosticados con SII.

Por su parte, en poblaciones de Estados Unidos, (por medio de anticuerpos para EC y de biopsias duodenales en individuos con SII y al grupo control) llegaron a la conclusión de que la prevalencia de casos positivos de EC para el grupo control y grupo con SII fueron similares. Pero al igual que en la investigación de Ozdil, existió un porcentaje pequeño de casos positivos para EC (Cash et al., 2011).

Los porcentajes obtenidos en cuanto a la presencia de los polimorfismos se utilizaron para realizar la respectiva comparación con otras poblaciones ya reportadas. En la muestra de la población ecuatoriana estudiada para el rs6441961 se obtuvieron los siguientes resultados: el mayor porcentaje 52% corresponde a individuos que presentaron el polimorfismo (*Figura 11*) este valor es elevado, comparado con lo reportado para otras poblaciones (*Figura 12*).

ECU



Figura 11. Frecuencia del polimorfismo rs6441961 en la muestra de la población ecuatoriana analizada. El 48% corresponde al alelo C y el 52% al alelo T. El mayor porcentaje corresponde a individuos con la presencia del SNP

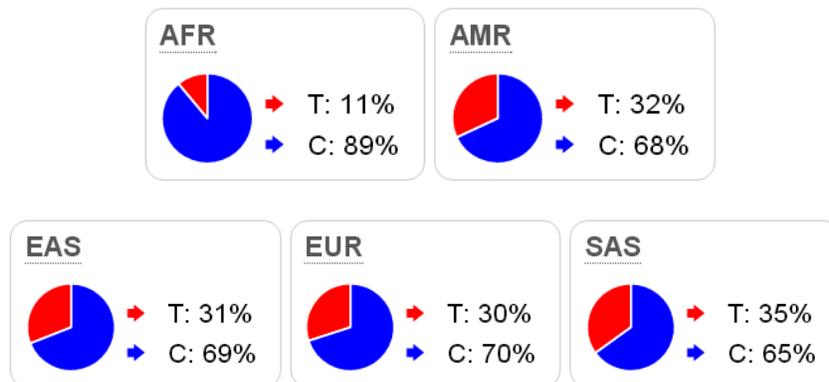


Figura 12. Frecuencia del polimorfismo rs6441961 en distintas poblaciones.

Tomado de Ensembl, (2017)

En la *Tabla 11* se muestra la comparación por medio del test exacto de Fisher entre la población americana (AME) y los datos obtenidos en la presente investigación (ECU). El valor p obtenido al comparar estas dos poblaciones fue de 0.682, es decir,

no presentan diferencias significativas, por lo que estas poblaciones se están comportando de manera similar en cuanto a la presencia del polimorfismo rs6441961. A pesar de haber trabajado con un tamaño de muestra pequeño (58 individuos) y no poder extrapolarlo a la población ecuatoriana, se evidencia estadísticamente que entre estas dos poblaciones no existe diferencia significativa por lo tanto la frecuencia del SNP rs6441961 es semejante entre estas poblaciones (Rao, 2012)

Tabla 11.

Prueba exacta de Fisher para el polimorfismo rs6441961.

	T	C	Total	valor <i>p</i>
AME	221	473	694	
ECU	10	18	28	0.682
Total	231	491	722	

Nota. AME: población americana, datos bibliográficos.; ECU: población ecuatoriana, datos experimentales.

El SNP rs6441961 se encuentra localizado en cromosoma 3 entre el gen CCR3 Y CCR2 (*Figura 13*). En el estudio de Dema confirmaron la asociación del SNP localizado en la región 3p21 (rs6441967) con la susceptibilidad para padecer la EC en la población española (Dema et al., 2009).

En el estudio realizado en la población ecuatoriana, en el cual se evaluó el SNP rs6441961 no se encontraron diferencias significativas entre los individuos ecuatorianos diagnosticados con EC y el SNP evaluado. Por lo tanto, se concluyó que el rs6441961 no se encuentra asociado a la EC en la población ecuatoriana (UDLA, 2017). En otra investigación concluyeron que para llegar a determinar si el SNP rs6441961 representa una variante funcional relevante en la EC en la región de los genes CCR1, CCR2, CCR3 es necesario una investigación más profunda al

respecto (Amundsen et al., 2010). Es por ello, de que a pesar de que existen varias evidencias de que este SNP se encuentra asociado al riesgo de la EC, como en el caso de la población española (Dema et al., 2009). Esta asociación no se cumple para todas las poblaciones del mundo debido a factores genéticos y ambientales.

El SNP rs6441961 se encuentra en la región que contiene un cluster de genes que codifican para receptores de quimiocinas, que son proteínas quimio-atrayentes, las cuales son la señal clave en el sistema inmune ya que juega un papel como mediadores pro-inflamatorios en patologías como SII o cáncer colorrectal (Škrlec, Pucer Janež, Rogelj, Štrukelj, & Berlec, 2017). Dentro del grupo de genes se encuentra el CCR3, que está ubicado a 44kb del SNP. La funcionalidad relevante de las quimiocinas radica en que están involucradas en el transporte de leucocitos durante procesos de infección o inflamación. La participación de los receptores de quimiocinas en la EC está dada por la relación de estos con las gliadinas lo que conlleva al aumento de la permeabilidad intestinal (Sood et al., 2015).

Al aumentar la permeabilidad del intestino disminuye la selectividad y esto a su vez conlleva el paso de patógenos no deseados o de sustancias extrañas, lo que trae como consecuencia que se desencadenen enfermedades autoinmunes o enfermedades gastrointestinales, incluyendo el SII (Kato et al., 2017).

Por lo tanto a pesar de llegar al mismo resultado que es el aumento de la permeabilidad intestinal, en el caso de la EC este es provocado por las gliadinas, lo que conduce al desencadenamiento de la enfermedad autoinmune debido a que existe una predisposición genética. En este caso la región génica que contiene el cluster de receptores de quimiocinas. Mientras que para SII no existen factores genéticos que estén involucrados en la función de permeabilidad intestinal. Sin

embargo, se evidencian síntomas en común entre estas dos anomalías como son los episodios de diarreas o estreñimiento debido a esto, los síntomas se solapan y se dificulta el diagnóstico.

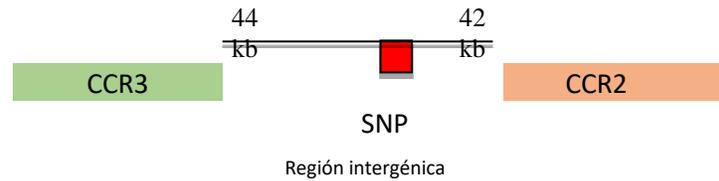


Figura 13. Ubicación del SNP rs6441961.

El SNP rs6441961 se encuentra localizado entre los genes CCR3 (región en verde) y CCR2 (región en rosado). El polimorfismo (cuadrado rojo) se encuentra a 44kb del gen CCR3 y a 42kb del gen CCR2. Este SNP se encuentra en la región de genes receptores de quimiocina que son los encargados del transporte de los leucocitos en los procesos de infección.

Frecuencia obtenida para el polimorfismo rs6822844 fue del 9%. *Figura 14.* El valor calculado es cercano a los porcentajes de otras poblaciones ya reportadas en la bibliografía. *Figura 15.*

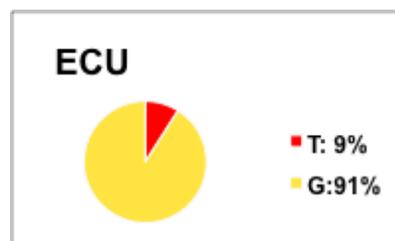


Figura 14. Frecuencia del polimorfismo rs6822844.

El 9% corresponde para alelo T y el 91% para el alelo G. El SNP se encuentra en una baja frecuencia en la población estudiada.

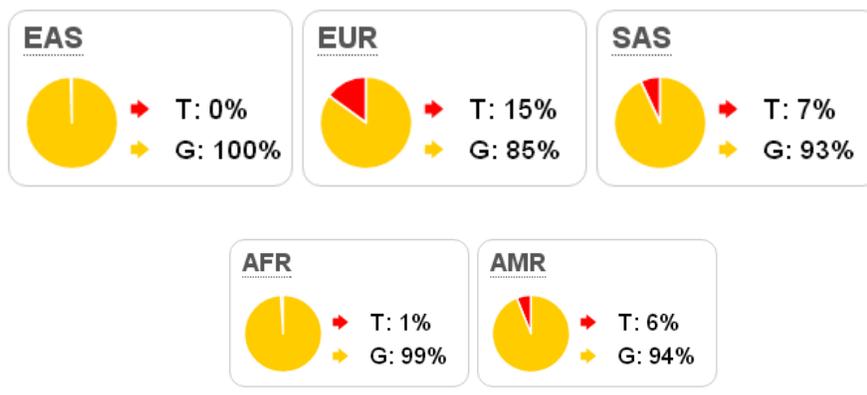


Figura 15. Frecuencia del polimorfismo rs6822844 en distintas poblaciones.

Tomado de Ensembl, (2017)

En la *Tabla 12* se aprecia la comparación realizada entre la población AME americana y los datos de la presente investigación ECU, en relación a la frecuencia del polimorfismo rs6822844. Se calculó el Test exacto de Fisher y se obtuvo un valor de p de 0.686, el cual representa que no existió diferencia significativa entre estas poblaciones analizadas; lo cual concluye que el SNP rs6822844 presenta una frecuencia similar entre la población americana y la población evaluada en la presente investigación.

Tabla 12.

Prueba exacta de Fisher polimorfismos rs6822844.

	T	G	Total	valor p
AME	42	652	694	0.686
ECU	2	26	28	
Total	44	678	722	

El SNP rs6822844 se encuentra ubicado en el cromosoma 4 en la región intergénica entre el gen IL2 y el IL21. *Figura 16*. Los genes IL2 y IL21 codifican para citoquinas que están involucradas en el mecanismo que desencadena enfermedades intestinales inflamatorias. IL2 cumple funciones dentro de la respuesta inflamatoria ya que es la llave para la activación y proliferación de células T. La IL21 permite la síntesis del interferón alfa, beta y actúa como un potente regulador de las células del sistema inmune incluidas las Natural Killer (NK) (Dubois y van Heel, 2008).

En la investigación de van Heel y colaboradores demuestran que la asociación encontrada en la región génica de KIAA1109/Tenr/IL2/IL21 con enfermedades autoinmunes, concluyendo que los cambios en el locus son en general un factor de riesgo para múltiples enfermedades autoinmunes (van Heel et al., 2007). En otro estudio demostraron la asociación de la región IL2 y IL21 con diabetes tipo 1 y artritis reumatoide que también son enfermedades autoinmunes (Zhernakova et al., 2007).

Los SNPs rs6441961 y rs6822844 se encuentran localizados en genes que cumplen funciones del sistema inmune. Como la EC es una enfermedad autoinmune presenta una amplia variedad de síntomas no específicos para un diagnóstico de rutina médica. A diferencia de SII que es un trastorno que implica varios desórdenes funcionales en el intestino y que presenta síntomas como dolor abdominal, distensión, estreñimiento o diarreas. Los cuales son diagnosticados frecuentemente en la consulta médica.

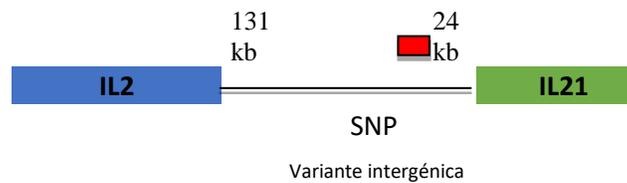


Figura 16. Ubicación del polimorfismo rs6822844.

El polimorfismo se encuentra localizado entre el gen de la interleuquina IL2 y el gen IL21. El SNP está situado a 131 kb del gen IL2 (zona azul) y a 24 kb del gen IL21 (zona verde). rs6822844 (rectángulo rojo)

La frecuencia del polimorfismo rs9851967 en estudios reportados en la población europea con 45% y americana con 35%, son porcentajes cercanos a los obtenidos en la presente investigación. (*Figura 17*). En el caso de la presente investigación el porcentaje obtenido fue del 50 %. *Figura 18*.

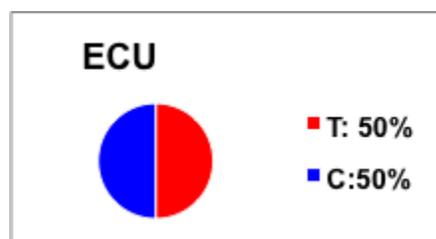


Figura 17. Frecuencia del polimorfismo del rs9851967.

El 50% corresponde al alelo T y el 50% restante corresponde al alelo C. El polimorfismo se encuentra distribuido en una proporción 50:50 en las 58 muestras evaluadas.

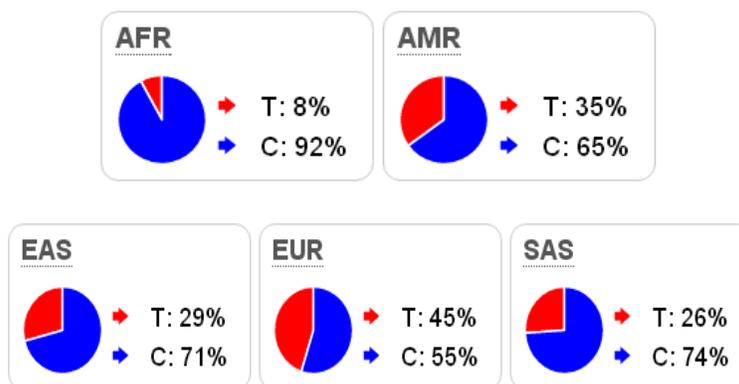


Figura 18. Frecuencia del polimorfismo 9851967 en distintas poblaciones.

Tomado de Ensembl, (2017)

En la *Tabla 13* se aprecia el análisis estadístico realizado, usando el Test exacto de Fisher, el cual se utilizó para la comparación de la población americana AME y la población ECU a través de los datos obtenidos en la presente investigación. Se obtuvo un valor de p de 0.158, lo que significa que no existió diferencia significativa entre estas dos poblaciones comparadas, lo que se concluye que la frecuencia del polimorfismo rs9851967 es semejante dentro de las poblaciones evaluadas.

Tabla 13.

Prueba exacta de Fisher polimorfismos rs9851967.

	T	C	Total	valor p
AME	246	448	694	
ECU	14	14	28	0.158
Total	260	462	722	

El polimorfismo rs9851967 se encuentra ubicado en el gen LPP en el cromosoma 3 y el cual contiene 12 SNPs. *Figura 19*. Este gen se encuentra involucrado en la movilidad y adhesión celular. Esta función juega un papel fundamental en el

intestino delgado, porque mantiene íntegra la barrera de las capas de los epitelios. En pacientes diagnosticados con EC se aprecian alteraciones en la mucosa del intestino. Por lo cual para llegar a un diagnóstico eficiente es necesario el examen de la biopsia duodenal. Sin embargo en SII no se evidencia un daño de la mucosa intestinal, lo que presenta este trastorno es hinchazón abdominal causada por la acumulación de gases o dolor abdominal (Huang et al., 2017).

En el estudio realizado por Hunt se identificó el SNP rs1464510 ubicado en el gen LPP como polimorfismo potencial asociado con SII, este se ubica a continuación del SNP evaluado en el presente estudio rs9851967 que está relacionado con la enfermedad celíaca (Hunt et al., 2008).

Se ha evaluado la región del gen LPP demostrando que esta representa factores de riesgo potencial para EC tanto en poblaciones europeas como americanas (Wouters et al., 2014).



Figura 19. Ubicación del SNPrs1464510 en el gen LPP.

El gen LPP posee 11 exones graficados en las zonas de color naranja e intrones representados en color azul. El polimorfismo rs9851967 (rectángulo en rojo) se encuentra localizado en uno de los intrones que presenta el gen LPP. Este gen cumple funciones de movilidad y adhesión celular en el intestino delgado.

La frecuencia obtenida para el polimorfismo rs2187668 fue del 0%, ya que ninguna muestra de ninguno de los dos grupos evaluados: control y SII, presentaron este SNP. El total de las muestras presentaron el alelo C. *Figura 20.*

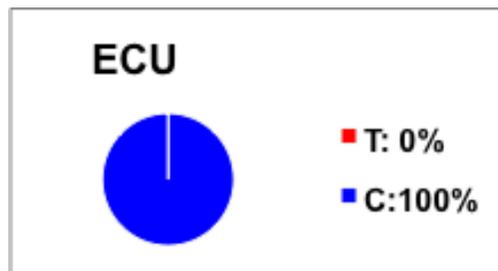


Figura 20. Frecuencia del polimorfismo rs2187668. El 100% corresponde al alelo C, no se detectó la presencia del SNP

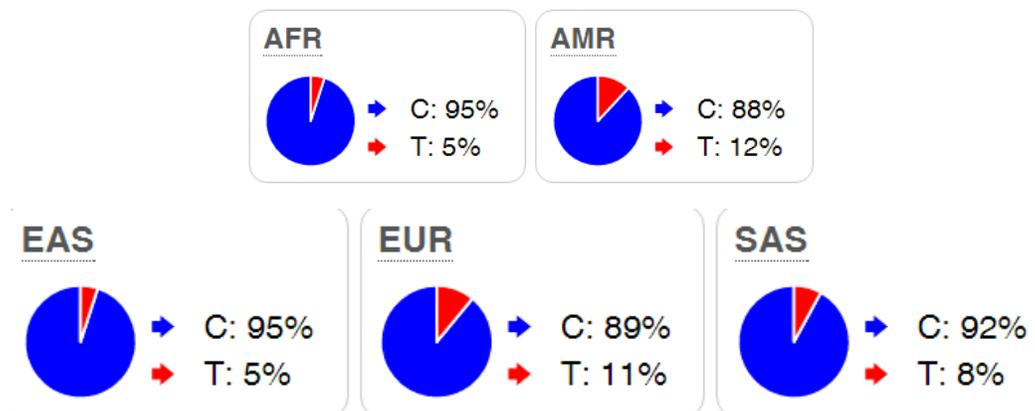


Figura 21. Frecuencias para cada una de las poblaciones reportadas.

Tomado de Ensembl, (2017)

En la *Tabla 14* se muestra el valor de p obtenido en el Test exacto de Fisher, el cual corresponde a 0.062. Se procedió a comparar la población americana AME con datos reportados en bibliografía, con la población ecuatoriana ECU con los datos obtenidos en la presente investigación. El valor calculado de p demuestra que no existió diferencia significativa entre las muestras comparadas, lo que sugiere que la

frecuencia del SNP rs2187668 se está comportando de manera similar en estas poblaciones analizadas.

Tabla 14.

Prueba exacta de Fisher polimorfismos rs2187668.

	T	C	Total	valor p
AME	82	612	694	
ECU	0	28	28	0.062
Total	82	640	722	

El polimorfismo rs2187668 está presente en el gen HLA-DQR1 del cromosoma 6. *Figura 22.* Este SNP es usado para el diagnóstico de EC. En la región que codifica para el Antígeno Leucocitario Humano (HLA) se encuentran genes altamente polimórficos, los cuales han sido ampliamente estudiados. El HLA cumple funciones directamente relacionadas con el control de la respuesta inmune y la asociación con una amplia variedad de desórdenes inmunológicos e infecciosos. HLA DQA1 codifica para las glicoproteínas que son moléculas formadas por proteínas y glúcidos; importantes en la presentación del antígeno y el reconocimiento propio por parte de las células inmunes (Pisapia et al., 2016).

En el presente proyecto no se identificó ningún caso con la presencia del polimorfismo rs2187668 en los dos grupos evaluados.

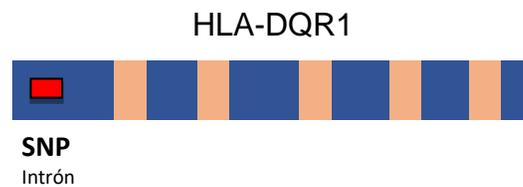


Figura 22. El SNP rs2187668 se encuentra ubicado en el gen HLA-DQR1.

El gen HLA-DQR1 está formado por cinco exones representados en color naranja e intrones en color azul. El SNP rs2187668 (rectángulo rojo) se encuentra localizado en el intrón inicial en el gen HLA-DQR1. Este gen está relacionado con el control de las respuestas del sistema inmunológico y muestra asociación con varios trastornos de origen inmune.

En el estudio de Ford y colaboradores concluyen que la prevalencia de EC en pacientes diagnosticados con SII se encuentra cuatro veces más elevada que en el grupo control (Ford et al., 2009). Sin embargo, en investigaciones de Locke y colaboradores y de Hin y colaboradores demuestran datos opuestos a los de Ford, ya que no encontraron que la prevalencia de EC se haya visto incrementada en individuos con SII (Hin, Bird, Fisher, Mahy, y Jewell, 1999) (Locke, Murray, Zinsmeister, Melton, y Talley, 2004).

La elevada prevalencia de EC en relación con el grupo control puede deberse a que en la investigación trabajaron con test serológicos como es el anticuerpo anti transglutaminasa y el elevado porcentaje se refiere a que existen personas que toleran mal la proteína del trigo, gluten. A diferencia de los resultados de la investigación de Sanders y colaboradores que trabajaron con biopsias duodenales, en las cuales no demuestran una prevalencia de EC (Sanders et al., 2001).

Existen estudios que evidencian la prevalencia de EC en personas diagnosticadas con SII, sin embargo, también existen estudios que evidencian que no existe prevalencia significativa de EC en individuos con SII. No obstante la prevalencia de EC en individuos con SII puede deberse al estudio realizado en cada población del mundo, ya que las investigaciones realizadas en poblaciones europeas demuestran una elevada prevalencia de EC, a diferencia de estudios realizados en Estados Unidos en los cuales no demuestran dicha prevalencia de EC en individuos con SII (Mearin y Montoro, 2014).

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

Los resultados demuestran que existieron casos con la presencia de los polimorfismos rs6441961, rs6822844, rs9851967 y rs2187668 (asociados a la Enfermedad Celíaca) sin embargo no obtuvieron significancia estadística. Por lo cual no se pudo establecer que los SNPs relacionados con EC se encuentran presentes en individuos con Síndrome de Intestino Irritable en base al análisis estadístico realizado.

En los individuos analizados se encontró la presencia de los SNPs (rs6441961, rs6822844, rs9851967) con diferentes frecuencias, tanto en tanto en el grupo con SII como en el grupo control. No se encontró presencia del SNP rs2187668 en ninguno de los grupos analizados.

Las frecuencias de los polimorfismos rs6822844, rs9851967 evaluados en el presente proyecto son similares a las frecuencias reportadas en otras poblaciones del mundo. La frecuencia del polimorfismo rs6441961 en el presente trabajo fue de 52% que es mayor al resto de las poblaciones ya reportadas, sin embargo, no es significativamente diferente.

El polimorfismo rs6441961 y rs6822844 no presentaron el genotipo TT en el grupo diagnosticado con SII de la población ecuatoriana a diferencia de las poblaciones

reportadas en otras partes del mundo bibliográficamente que si presentan el genotipo TT en bajo porcentaje.

6.2 Recomendaciones

El tamaño de muestra utilizada para el desarrollo del presente trabajo fue de 28 individuos diagnosticados con SII, lo cual representa un tamaño pequeño y no brinda resultados que se puedan extrapolar a la población ecuatoriana. Por ello, se recomienda aumentar el tamaño de muestra para futuras investigaciones y obtener datos más robustos.

El Síndrome de Intestino Irritable presenta tres sub tipos, clasificados de acuerdo al síntoma que prevalece. Se debe dividir al grupo de pacientes diagnosticados con SII de acuerdo a cada sub tipo, con el fin de determinar si existe alguna diferencia significativa en cuanto a la presencia de los polimorfismos de EC dependiendo del tipo de SII que presente el paciente.

El porcentaje de SNPs presentes en el material genético de los humanos dificulta la asociación de uno o varios SNPs con una determinada enfermedad. Por lo que se recomienda establecer SNPs como marcadores genéticos para una enfermedad y en una población específica.

Se recomienda mejorar los métodos diagnósticos de las enfermedades, para disminuir el porcentaje de error en los trabajos experimentales que dependen de un diagnóstico previo.

REFERENCIAS

- Almeida, R., Ricano-Ponce, I., Kumar, V., Deelen, P., Szperl, A., Trynka, y G., Wijmenga, C. (2014). *Fine mapping of the celiac disease-associated LPP locus reveals a potential functional variant*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de <https://doi.10.1093/hmg/ddt619>
- Amundsen, S. S., Rundberg, J., Adamovic, S., Gudjónsdóttir, A. H., Ascher, H., Ek, J., y Sollid, L. M. (2010). *Four novel coeliac disease regions replicated in an association study of a Swedish–Norwegian family cohort*. Recuperado el 1 de mayo de 2017 de <https://doi:10.1038/gene.2009.67>
- Aziz, I., y Sanders, D. S. (2012). *The Irritable Bowel Syndrome-Celiac Disease Connection*. Recuperado el 4 de mayo de 2017 de <https://doi:10.1016/j.giec.2012.07.009>
- Bakhshipour, A., Nezam, S. K., Zakeri, Z., Gharibi, R., Bahari, A., y Kaykhaei, M. A. (2012). *Coeliac disease in irritable bowel syndrome (Rome III) in Southeast Iran*. Recuperado el 13 de mayo de 2017 de <https://doi:10.1016/j.ajg.2012.03.003>
- Barada, K., Abu Daya, H., Rostami, K., y Catassi, C. (2012). *Celiac Disease in the Developing World*. Recuperado el 12 de mayo de 2017 de <https://doi:10.1016/j.giec.2012.07.002>
- Blazej, R. G., Kumaresan, P., y Mathies, R. A. (2006). *Microfabricated bioprocessor for integrated nanoliter-scale Sanger DNA sequencing*. Recuperado el 11 de mayo de 2017 de <https://doi:10.1073/pnas.0602476103>
- Cash, B. D., Rubenstein, J. H., Young, P. E., Gentry, A., Nojkov, B., Lee, D. y Chey, W. D. (2011). *The Prevalence of Celiac Disease Among Patients With Nonconstipated Irritable Bowel Syndrome Is Similar to Controls*. Recuperado el 10 de mayo de 2017 de <https://doi:10.1053/j.gastro.2011.06.084>
- Dema, B., Martinez, A., Fernandez-Arquero, M., Maluenda, C., Polanco, I., de la Concha, E. G., y Nunez, C. (2009). *Association of IL18RAP and CCR3 with*

- coeliac disease in the Spanish population*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de [https://doi: 10.1136/jmg.2009.067041](https://doi:10.1136/jmg.2009.067041)
- Dieli-Crimi, R., Cénit, M. C., y Núñez, C. (2015). *The genetics of celiac disease: A comprehensive review of clinical implications*. Recuperado el 9 de mayo de 2017 de [https:// doi: 10.1016/j.jaut.2015.07.003](https://doi:10.1016/j.jaut.2015.07.003)
- Dubois, P. C., y van Heel, D. A. (2008). *Translational Mini-Review Series on the Immunogenetics of Gut Disease: Immunogenetics of coeliac disease*. Recuperado el 1 de mayo de 2017 de [https://doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03704.x](https://doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03704.x)
- Espino-Paisán, L., De La Calle, H., Fernández-Arquero, M., Figueredo, M. A., De La Concha, E. G., Urcelay, E., y Santiago, J. L. (2011). *Study of polymorphisms in 4q27, 10p15, and 22q13 regions in autoantibodies stratified type 1 diabetes patients*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de [https:// doi: 10.3109/08916934.2011.592515](https://doi:10.3109/08916934.2011.592515)
- Ford, A. C., Chey, W. D., Talley, N. J., Malhotra, A., Spiegel, B. M. R., y Moayyedi, P. (2009). *Yield of Diagnostic Tests for Celiac Disease in Individuals With Symptoms Suggestive of Irritable Bowel Syndrome: Systematic Review and Meta-analysis*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de <https://doi:10.1001/archinternmed.2009.22>
- Henström, M., y D'Amato, M. (2016). *Genetics of irritable bowel syndrome. Molecular and Cellular*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de <https://doi:10.1186/s40348-016-0038-6>
- Hin, H., Bird, G., Fisher, P., Mahy, N., y Jewell, D. (1999). *Coeliac disease in primary care: case finding study*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de [https://doi: 10.1136/bmj.318.7177.164](https://doi:10.1136/bmj.318.7177.164)
- Huang, S.-Q., Zhang, N., Zhou, Z.-X., Huang, C.-C., Zeng, C.-L., Xiao, D., y Jing, C.-X. (2017). *Association of LPP and TAGAP Polymorphisms with Celiac Disease Risk: A Meta-Analysis. International*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de [https://doi: 10.3390/ijerph14020171](https://doi:10.3390/ijerph14020171)

- Hunt, K. A., Zhernakova, A., Turner, G., Heap, G. A. R., Franke, L., Bruinenberg, M., y van Heel, D. A. (2008). *Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de [https://doi: 10.1038/ng.102](https://doi:10.1038/ng.102)
- Kato, T., Honda, Y., Kurita, Y., Iwasaki, A., Sato, T., Kessoku, T., y Nakajima, A. (2017). *Lubiprostone improves intestinal permeability in humans, a novel therapy for the leaky gut: A prospective randomized pilot study in healthy volunteers*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de <https://doi:10.1371/journal.pone.0175626>
- Kulkarni, S. (2014). *Clinical genomics*. Recuperado el 10 de abril de 2017 de http://thebooksout.com/downloads/clinical_genomics_kulkarni
- Kumar, S., Shukla, R., Ranjan, P., y Kumar, A. (2017). *Interleukin-10: A Compelling Therapeutic Target in Patients With Irritable Bowel Syndrome*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de [https://doi: 10.1016/j.clinthera.2017.01.030](https://doi:10.1016/j.clinthera.2017.01.030)
- Kurniawan, I., y Kolopaking, M. S. (2014). *Management of irritable bowel syndrome in the elderly*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25053688>
- Lacy, B. E. (2015). *The Science, Evidence, and Practice of Dietary Interventions in Irritable Bowel Syndrome*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de <https://doi:10.1016/j.cgh.2015.02.043>
- Lacy, B. E. (2017). *Hot Topics in Primary Care: Role of the Microbiome in Disease: Implications for Treatment of Irritable Bowel Syndrome*. Recuperado el 2 de marzo de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28375407>
- Lázaro, Y. A., y Piedrafita, S. S. (2016). Enfermedad celíaca. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de [https://doi: 10.1016/j.med.2016.02.010](https://doi:10.1016/j.med.2016.02.010)
- Locke, G. R., Murray, J. A., Zinsmeister, A. R., Melton, L. J., y Talley, N. J. (2004). *Celiac Disease Serology in Irritable Bowel Syndrome and Dyspepsia: A Population-Based Case-Control Study*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de [https://doi: 10.4065/79.4.476](https://doi:10.4065/79.4.476)

- Universidad de las Américas. (2017). *Determinación de polimorfismos de nucleótido simple para el diagnóstico de la Enfermedad Celíaca en individuos de la población del cantón Quito*. Ecuador.
- Ludvigsson, J. F., Bai, J. C., Biagi, F., Card, T. R., Ciacci, C., Ciclitira, P. J., y Authors of the BSG Coeliac Disease Guidelines Development Group. (2014). *Diagnosis and management of adult coeliac disease*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de [https://doi: 10.1136/gutjnl-2013-306578](https://doi:10.1136/gutjnl-2013-306578)
- Magaña, J. J., Arenas-Sordo, M. de la L., y Gómez, R. (2009). *La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico*. Recuperado el 2 de febrero de 2017 de <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872009000700014>
- Matsuda, K. (2017). *PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de [https://doi: 10.1016/bs.acc.2016.11.002](https://doi:10.1016/bs.acc.2016.11.002)
- Mearin, F., y Montoro, M. (2014). *Síndrome del intestino irritable, enfermedad celíaca y gluten: «Una cosa es predicar y otra dar trigo»*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de [https:// doi: 10.1016/j.medcli.2013.06.006](https://doi:10.1016/j.medcli.2013.06.006)
- Megiorni, F., y Pizzuti, A. (2012). *HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de <https://doi10.1186/1423-0127-19-88>
- Next Generation DNA Sequencing: A Review of the Cost Effectiveness and Guidelines*. (2014). Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health. Recuperado el 02 de mayo de 2017 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK274072/>
- Orand, A., Naliboff, B., Gadd, M., Shih, W., Ju, T., Presson, A. P., y Chang, L. (2016). *Corticotropin-releasing hormone receptor 1 (CRH-R1) polymorphisms are associated with irritable bowel syndrome and acoustic startle response*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de [https://doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.07.204](https://doi:10.1016/j.psyneuen.2016.07.204)

- Ozdil, K., Sokmen, M., Ersoy, O., Demirsoy, H., Kesici, B., Karaca, C., y Sakiz, D. (2008). *Association of Gluten Enteropathy and Irritable Bowel Syndrome in Adult Turkish Population*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de <https://doi.org/10.1007/s10620-007-0082-0>
- Parfenov, A. I., Albulova, E. A., y Ruchkina, I. N. (2016). *Irritable bowel syndrome in the light of Rome consensus III (2006): 10 years later*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de <https://doi.org/10.17116/terarkh20168824-9>.
- Pett, M. A. (1997). *Nonparametric statistics for health care research: statistics for small samples and unusual distributions*. Recuperado el 15 de mayo de 2017 de <https://us.sagepub.com/en-us/nam/nonparametric-statistics-for-health-care-research/book240591>
- Pisapia, L., Camarca, A., Picascia, S., Bassi, V., Barba, P., Del Pozzo, G., y Gianfrani, C. (2016). *HLA-DQ2.5 genes associated with celiac disease risk are preferentially expressed with respect to non-predisposing HLA genes: Implication for anti-gluten T cell response*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2016.03.016>
- Plavšić, I., Hauser, G., Tkalčić, M., Pletikosić, S., y Salkić, N. (2015). *Diagnosis of Irritable Bowel Syndrome: Role of Potential Biomarkers*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de <https://doi.org/10.1155/2015/490183>
- Ribeiro, M., Rodriguez-Quijano, M., Nunes, F. M., Carrillo, J. M., Branlard, G., y Igrejas, G. (2016). *New insights into wheat toxicity: Breeding did not seem to contribute to a prevalence of potential celiac disease's immunostimulatory epitopes*. Recuperado el 10 de mayo de 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.043>
- Rubio-Tapia, A., Hill, I. D., Kelly, C. P., Calderwood, A. H., y Murray, J. A. (2013). *ACG Clinical Guidelines: Diagnosis and Management of Celiac Disease*. Recuperado el 5 de mayo de 2017 de <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.79>
- Sood, R., Gracie, D. J., Law, G. R., y Ford, A. C. (2015). *Systematic review with meta-analysis: the accuracy of diagnosing irritable bowel syndrome with*

- symptoms, biomarkers and/or psychological markers*. Recuperado el 4 de mayo de 2017 de <https://doi: 10.1111/apt.13283>
- Stanković, B., Radlović, N., Leković, Z., Ristić, D., Radlović, V., Nikčević, G., y Zukic, B. (2014). *HLA genotyping in pediatric celiac disease patients*. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de <https://doi: 10.17305/bjbmms.2014.3.28>.
- Taucher, E. (1997). *Bioestadística*. Santiago: Comité de Publicaciones Científicas, Vicerrectoría de Asuntos Académicos y Estudiantiles, Universidad de Chile : Universitaria. Recuperado el 6 de abril de 2017 de <http://www.uchile.cl/publicaciones/109035/bioestadistica>
- Uppu, S., Krishna, A., y Gopalan, R. (2017). *A review on methods for detecting SNP interactions in high-dimensional genomic data*. Recuperado el 6 de abril de 2017 de <https://doi: 10.1109/TCBB.2016.2635125>
- van Heel, D. A., Franke, L., Hunt, K. A., Gwilliam, R., Zhernakova, A., Inouye, M., y Wijmenga, C. (2007). *A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21*. Recuperado el 6 de abril de 2017 de <https://doi: 10.1038/ng2058>
- Weinberg, S. L., y Abramowitz, S. K. (2008). *Statistics using SPSS: an integrative approach*. Recuperado el 6 de abril de 2017 de https://books.google.com.ec/books/about/Statistics_Using_SPSS.html?id=5t6lsYu0pk4C&redir_esc=y
- Wouters, M. M., Lambrechts, D., Knapp, M., Cleynen, I., Whorwell, P., Agréus, L., y Boeckxstaens, G. (2014). *Genetic variants in CDC42 and NXP1 as susceptibility factors for constipation and diarrhoea predominant irritable bowel syndrome*. Recuperado el 6 de abril de 2017 de <https://doi:10.1136/gutjnl-2013-304570>
- Zhernakova, A., Alizadeh, B. Z., Bevova, M., van Leeuwen, M. A., Coenen, M. J. H., Franke, B., y Wijmenga, C. (2007). *Novel Association in Chromosome 4q27 Region with Rheumatoid Arthritis and Confirmation of Type 1 Diabetes Point to a General Risk Locus for Autoimmune Diseases*. Recuperado el 6 de abril de 2017 de <https://doi: 10.1086/522037>

ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado

Consentimiento Informado para Muestras Biológicas

Título de proyecto:	Determinación de biomarcadores moleculares para el diagnóstico de Enfermedad Celíaca en individuos de la población ecuatoriana.
Investigador principal:	Ing. Carolina Salazar Ruales MSc. (C: 0999969873)
Otros Investigadores:	Francisco Loor García

PARTE A

La enfermedad celíaca se caracteriza por el daño grave a la mucosa del intestino delgado causado por el consumo de gluten que se encuentra en los cereales como el trigo, la avena, la cebada y el centeno en individuos vulnerables genéticamente. Este estudio está diseñado para identificar métodos poco invasivos como biomarcadores moleculares (moléculas de ADN) para la enfermedad celíaca. El posible beneficio de esta investigación involucra la facilidad de diagnosticar la enfermedad de una manera más rápida y menos molesta aplicable en todas las edades. Además, la detección como la intervención temprana ayudará a mejorar la calidad de vida de las personas que tienen enfermedad celíaca.

Así, para el desarrollo de este proyecto se usará una muestra de biopsia de duodeno previamente tomada por el médico gastroenterólogo del Hospital Metropolitano que ya le fue realizada en exámenes anteriores y/o una muestra de sangre tomada por una única punción con una jeringa estéril y/o una muestra de saliva recolectadas por parte del equipo de investigación. El biobanco donde se encuentran las muestras biológicas se encuentra en el Hospital Metropolitano de Quito. El Comité de Investigación y el Departamento de Enseñanza Médica del Hospital han sido informados sobre el proyecto y el mismo ha sido aprobado.

La investigación no presenta ningún riesgo, tanto físico como psicológico, debido a que las muestras que se van a utilizar ya han sido tomadas por el médico y el participante no tendrá que someterse a ningún procedimiento.

En algunos casos se podrá pedir al Hospital Metropolitano la historia clínica del paciente, por ejemplo en casos donde se tenga dudas sobre el diagnóstico del médico. La revisión de la historia se realizará dentro de las instalaciones del Hospital Metropolitano, bajo supervisión de doctores del Hospital y por ningún motivo la historia clínica dejará dichas instalaciones. Toda la información de la historia clínica, personal y genética será mantenida bajo confidencialidad y no será revelada bajo ninguna circunstancia. Todos los datos serán llevados con anonimidad, asignando un código único para evitar revelar información personal.

Cualquier material biológico será utilizado únicamente para este estudio y no será utilizado para ningún otro ensayo biomolecular o de cualquier tipo, todo remanente de la muestra será eliminado luego de terminar el estudio.

La participación en el estudio no tendrá costo alguno para los participantes, ni presentará ninguna remuneración para los mismos.

Usted puede retirar su participación en este estudio en cualquier momento.

Para el voluntario:

Se me ha solicitado dar mi consentimiento para que YO participe en el estudio de investigación titulado "Determinación de biomarcadores moleculares para el diagnóstico de Enfermedad Celíaca en individuos de la población ecuatoriana". El estudio de investigación incluirá la recolección de muestras en el biobanco del Hospital Metropolitano, muestra de sangre y/o saliva. Yo he leído la información anterior previamente, de la cual tengo una copia. Yo consiento voluntariamente en esta investigación.

Marque
con una X

1. Confirmando que he leído y comprendido la información [PARTE A], he tenido la oportunidad de hacer preguntas; que estoy de acuerdo para no restringir el uso de los datos generados usando mis muestras.
2. Estoy dispuesta/o a participar en este estudio, sobre la base de la información que me han dado y entiendo que puedo retirarme del estudio en cualquier momento.

Nombre y apellidos del voluntario: _____

Firma del participante

Fecha

Para el investigador:

Yo he leído verazmente la hoja de información participante y utilizando lo mejor de mi habilidad me aseguré que la persona comprenda que se hará lo siguiente:

1. Se tomarán ciertos datos de la persona
2. Toma de muestras.
3. Si el participante lo desea se le detallará cualquier protocolo que se vaya a realizar.

Yo confirmo que el voluntario se le dio la oportunidad de hacer preguntas sobre el estudio y todas las preguntas hechas han sido respondidas correctamente y aplicando lo mejor de mi habilidad. Yo confirmo que el participante no ha sido obligado a dar su consentimiento. El consentimiento ha sido dado libre y voluntariamente.

Nombre y firma del investigador que obtiene el consentimiento:

_____ / _____

Fecha: _____

Anexo 2. Aprobación comité de bioética



Quito, 10 de marzo de 2017

Marcela Acosta
Estudiante investigador

De mis consideraciones:

Por medio de la presente el Comité de Ética y Bioética para la Investigación de la Universidad de Las Américas (CEBE-UDLA) le informa que el protocolo y los instrumentos de investigación del proyecto de titulación **"Evaluación de polimorfismos relacionados con la enfermedad celiaca en pacientes diagnosticados con síndrome de intestino irritable"**, con fecha de hoy 10 de marzo de 2017, han sido aprobados por el Comité.

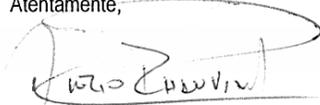
Esta aprobación, tiene una duración de un año, después del cual se debe pedir extensión si fuera necesaria.

En toda correspondencia con el Comité de Ética y Bioética para la investigación, favor referirse al siguiente código de aprobación: 2017-0302.

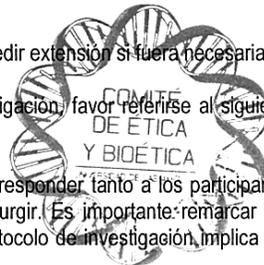
El Comité estará dispuesto a lo largo de la implementación del estudio a responder tanto a los participantes como a la investigadora en relación a cualquier inquietud que pudiere surgir. Es importante remarcar que cualquier novedad debe ser comunicada al Comité; todo cambio en el protocolo de investigación, implica que debe pedir una nueva aprobación al CEBE.

El Comité de Ética y Bioética para la Investigación de la Universidad de Las Américas ha otorgado esta probación con base en la información entregada por los solicitantes, quienes al presentarla asumen la veracidad, corrección y autoría de los documentos entregados. Los solicitantes de la aprobación son los responsables de aplicar y respetar la información, procedimientos y condiciones expresados en estos documentos aprobados por el Comité; también son responsables de respetar la legislación vigente aplicable y los estándares nacionales e internacionales en la materia.

Atentamente,

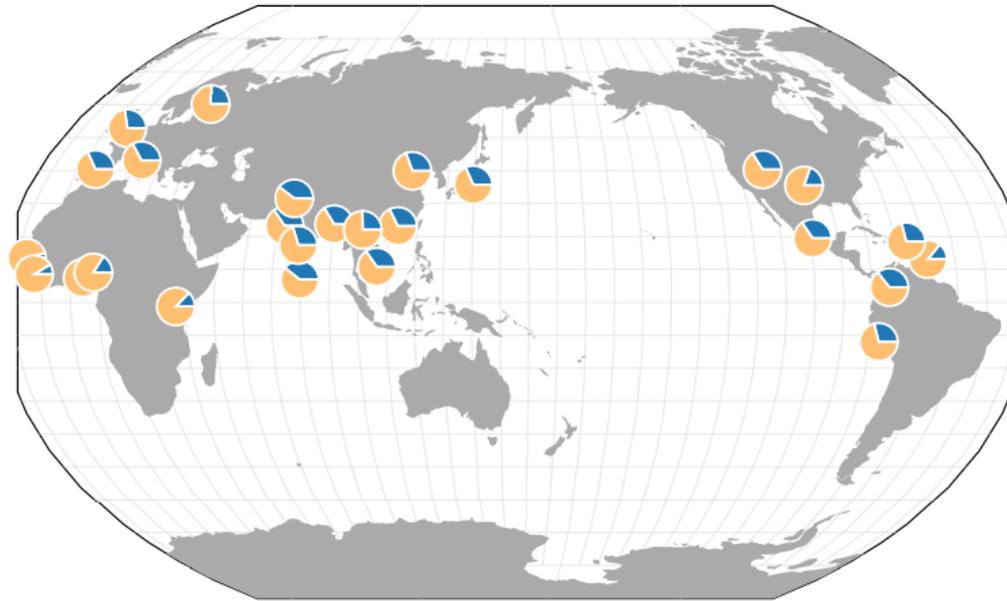


Diego R. Chauvin P.
Presidente del CEBE-UDLA

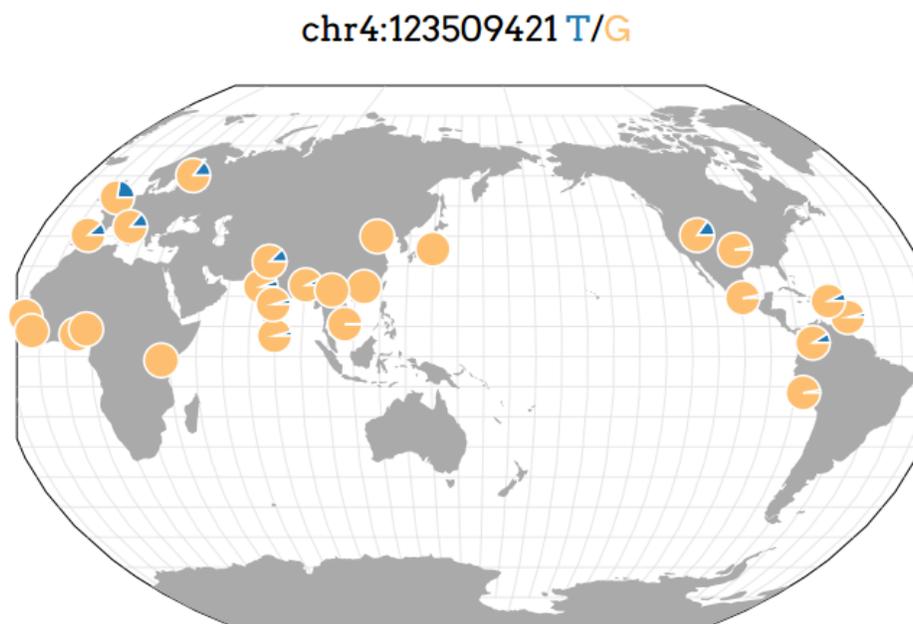


Anexo 3. Frecuencia del polimorfismo rs6441961 en diferentes poblaciones del mundo (Map: Geography of Genetic Variants Browser)

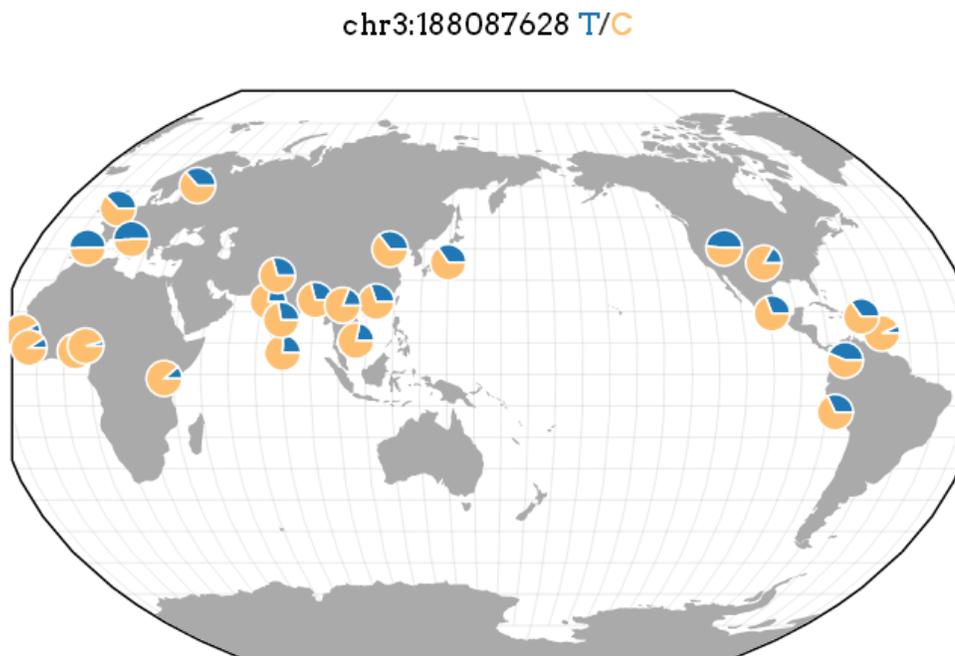
chr3:46352384 T/C



Anexo 4. Frecuencia del polimorfismo rs6822844 en diferentes poblaciones del mundo (Map: Geography of Genetic Variants Browser)



Anexo 4. Frecuencia del polimorfismo rs9851967 en diferentes poblaciones del mundo (Map: Geography of Genetic Variants Browser)



Anexo 4. Frecuencia del polimorfismo rs2187668 en diferentes poblaciones del mundo (Map: Geography of Genetic Variants Browser)

chr6:32605884 T/C

