



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL**

**“Identificación de Marcadores Genéticos Asociados a un Desenlace
Desfavorable en Pacientes con Peritonitis Secundaria no Apendicular
con y sin Trastornos de la Nutrición”.**

TESIS

**Tesis para obtener el grado de:
Maestría en Ciencias en Biomedicina**

Presenta:

Alejo Macías Salas

Director:

Dra. en C. Verónica Loera Castañeda

Co-Director:

Dr. en C. Isaías Chairez Hernández

Victoria de Durango, Dgo., Junio del 2011



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 12:30 horas del día 8 del mes de Junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR IPN DGO para examinar la tesis titulada:

Identificación de marcadores genéticos asociados a un desenlace desfavorable en pacientes con peritonitis secundaria no apendicular con y sin trastornos de la nutrición

Presentada por el alumno:

MACÍAS

SALAS

ALEJO

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	2	2	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Verónica Loera Castañeda

Dr. Isaias Chairez Hernández

Dr. Ignacio Villanueva Fierro

Dr. José Ismael Antonio-Lares Asef

Dr. Daniel Hernández Velázquez



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE PROFESORES
DE DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD DURANGO
IPN.**

Dr. José Antonio Ávila Reyes



SIP-13-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 4 de Marzo del 2011

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Durango en su sesión Ordinaria No. 3 celebrada el día 1 del mes de Marzo conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

MACÍAS	SALAS	ALEJO
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre (a)
		Con registro: R 0 9 1 2 2 7

Aspirante de Maestría en Ciencias en Biomedicina

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
"Identificación de marcadores genéticos asociados a un desenlace desfavorable en pacientes con peritonitis secundaria no apéndice con y sin trastornos de la nutrición"

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dra. Verónica Loera Castañeda y Dr. Isaias Chairez Hernández

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:
CIIDIR-IPN Unidad Durango
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis:

Dra. Verónica Loera Castañeda

Aspirante

Alumno Macías Salas

Dr. Isaias Chairez Hernández

Presidente del Colegio

Dr. José Antonio León Rojas
CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD DURANGO



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **DURANGO, DGO.**, el día **8** del mes **JUNIO** del año **2011**, el que suscribe **MACÍAS SALAS ALEJO** alumno del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA** con número de registro **B091227**, adscrito a **CIDIR IPN UNIDAD DURANGO**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **DRA. VERÓNICA LOERA CASTAÑEDA** y del **DR. ISAÍAS CHAIREZ HERNÁNDEZ** y cede los derechos del trabajo intitulado **"IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS ASOCIADOS A UN DESENLACE DESFAVORABLE EN PACIENTES CON PERITONITIS SECUNDARIA NO APENDICULAR CON Y SIN TRASTORNOS DE LA NUTRICIÓN"** al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **virjo_3@yahoo.es**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


ALEJO MACÍAS SALAS

Nombre y firma

**EL TRABAJO CLÍNICO SE REALIZÓ EN EL HOSPITAL GENERAL DE LA
SECRETARÍA DE SALUD Y ASISTENCIA DE DURANGO Y EL ANÁLISIS
MOLECULAR EN EL CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL UNIDAD DURANGO, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA
DRA. EN C. VERÓNICA LOERA CASTAÑEDA Y EL DR. EN C. ISAIAS
CHAIRES HERNÁNDEZ.**

CONTENIDO

GLOSARIO.....	I
SÍMBOLOS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.....	VI
RELACIÓN DE CUADROS.....	VIII
RELACIÓN DE FIGURAS.....	IX
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Peritoneo: Anatomía, Localización y Función.....	4
2.2 Estado Nutricional.....	5
2.3 Epidemiología.....	6
2.3.1 Peritonitis Secundaria.....	7
2.3.2 Diagnóstico.....	8
2.3.3 Tratamiento.....	8
2.3.4 Mortandad.....	8
2.4 Estado Nutricional y Peritonitis Secundaria.....	9
2.5 Leptina.....	9
2.6 Receptor de Leptina.....	10
2.7 PPAR γ	13
2.8 Leptina, Receptor de Leptina, y PPAR γ y su Asociación a Enfermedades.....	14
2.9 Polimorfismo <i>LEP</i> G-2548A	14
2.10 Polimorfismo <i>LEPR</i> A223G.....	14
2.11 Polimorfismo PPAR γ C34G.....	15

III. JUSTIFICACIÓN.....	16
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	18
VI. HIPÓTESIS.....	18
VII. OBJETIVOS.....	18
7.1 Objetivo General.....	18
7.2 Objetivos Específicos.....	18
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
8.1 Diseño Metodológico.....	19
8.1.1 Grupos de Estudio.....	19
8.1.3 Tamaño de la muestra.....	19
8.2 Criterios de Selección.....	19
8.2.1 Criterios de Inclusión.....	19
8.2.2 Criterios de Exclusión.....	20
8.2.3 Criterios de Eliminación.....	20
8.3 Variables.....	20
8.3.1 Variable Independiente.....	20
8.3.2 Variable Dependiente.....	21
8.3.3 Variable Confusora.....	21
8.3.4 Variables Intervinientes.....	21
8.4 Procedimientos	22
8.5 Análisis Estadístico.....	28
IX. RESULTADOS.....	29

X. DISCUSIÓN.....	35
XI. CONCLUSIONES.....	37
XII. SUGERENCIAS PARA ESTUDIOS POSTERIORES.....	38
XIII. AGRADECIMIENTOS.....	39
XIV. BIBLIOGRAFÍA.....	40
XV. ANEXOS.....	44

GLOSARIO

ADN (ácido desoxirribonucleico). Molécula que codifica los genes que forman la estructura y función de los organismos vivos y permiten la transmisión de información genética de una generación a otra.

ADN genómico. Secuencia de ADN cromosómico de un gen o un segmento génico, que incluye la secuencia de ADN de regiones codificadoras y no codificadoras. También, ADN que se ha aislado directamente de células.

ADN polimerasa. Enzima que puede sintetizar una nueva cadena de ADN utilizando como modelo una cadena de ADN previamente sintetizada.

Alelo. Una de las versiones alternativas de un gen que pueden ocupar un determinado locus.

Aminoácidos. Compuestos orgánicos de una proteína para los que el ADN porta el código genético.

ARN (ácido ribonucleico). Ácido nucleico formado a partir de un modelo de ADN, que contiene ribosa, en lugar de desoxirribosa.

ARNm (ARN mensajero). Es el modelo a partir del cual se sintetizan los polipéptidos.

ARNt (ARN de transferencia). En colaboración con los ribosomas, coloca los aminoácidos activados en su posición a lo largo del modelo de ARN.

ARNr (ARN ribososomal). Es un componente de los ribosomas, funciona como un lugar no específico de síntesis de polipéptidos.

Asociación Genética. Presencia conjunta en una población de dos o más características fenotípicas en forma más frecuente de la que se esperaría por azar, para establecer la relación entre variables genéticas poblacionales y el fenotipo determinado. No debe confundirse con *ligamiento*.

Asociación Epidemiológica. Es considerada como los indicadores que miden la fuerza con la que una enfermedad o evento de salud (que se presume como resultado), está asociado o relacionado con un determinado factor (que se presume como su causa).

Cadena antisentido de ADN. Cadena de ADN no codificadora que es complementaria al ARNm y sirve de molde para la síntesis de ARN. También denominada *cadena transcrita*.

ADNc. (ADN complementario o ADN de copia). ADN sintético de cadena sencilla transcrito a partir de un ARNm maduro de cadena simple específico por medio de la acción de la enzima transcriptasa inversa.

Código Genético. Tripletes de bases que especifican los 20 aminoácidos hallados en las proteínas.

Codón. Triplete de bases en una molécula de ADN o ARN que especifica un solo aminoácido.

Codón de terminación. Uno de los tres codones (UAG, UAA y UGA) que termina la síntesis de un polipéptido. También denominado *Codón de detención*.

Consentimiento Informado. Es un documento legal que se basa en la habilidad de los investigadores para comunicarse honesta y completamente con sus pacientes.

Cromosoma. Estructura en forma de hebra contenida en el núcleo celular, formada por cromatina y portadora de información genética.

Delección. Pérdida de una secuencia de ADN en un cromosoma. El ADN perdido puede ser de cualquier longitud, desde una o varias bases hasta gran parte de un cromosoma.

Desnaturalización. Conversión de ADN del estado de doble cadena al de una sola cadena, generalmente mediante calentamiento para destruir los enlaces químicos que participan en el apareamiento de bases.

Desviación Estándar. El valor absoluto de diferencia media de los valores individuales con respecto a la media.

Detección. Método de selección de individuos para incluirlos en un estudio genético.

Dominancia. Capacidad de un rasgo para expresarse en forma heterocigota.

Endonucleasa de restricción. Enzima derivada de bacterias, que puede reconocer una secuencia específica de ADN y cortarla (habitualmente de doble cadena) en el lugar de reconocimiento o en algún otro cercano.

Enfermedad. Es un estado de desequilibrio bio-psico-social de un individuo.

Epidemiología Clínica. Es un método para hacer e interpretar observaciones científicas en medicina. Es la aplicación de los principios y métodos epidemiológicos a los problemas encontrados en la medicina clínica.

Ética. Ciencia que estudia la bondad o maldad de los actos humanos.

Exón. Región transcrita de un gen que está presente en un ARN mensajero maduro.

Exposición. Significa que una persona ha entrado en contacto con un factor de riesgo o que lo ha manifestado antes de desarrollar la enfermedad.

Expresividad. Intensidad con la que se expresa un rasgo.

Factores de Riesgo. Son aquellos que están asociados con un riesgo aumentado de contraer una enfermedad.

Fenotipo. Características bioquímicas, fisiológicas y morfológicas de un individuo, determinadas por su genotipo y el ambiente en el que se expresa. Expresión de algún gen o genes determinados.

Gen. Unidad hereditaria. En términos moleculares, secuencia de ADN cromosómico que se requiere para el origen de un producto funcional.

Gen estructural. Gen que codifica cualquier producto proteico o de ARN pero no un factor regulatorio.

Genoma. Secuencia de ADN completa que contiene la información genética total de un gameto, un individuo, una población o una especie.

Genotipo. Constitución genética (genoma). Los alelos presentes en un locus.

Heterocigoto (heterocigótico). Individuo o genotipo con dos alelos diferentes en un locus determinado en un par de cromosomas homólogos. Típicamente, un alelo es la forma normal y el otro es mutante, pero el término también se emplea para referirse a la heterocigosis para diferentes alelos normales o para referirse a diferentes alelos en cada hebra de una molécula de ADN.

Homocigoto (homocigótico). Individuo o genotipo con alelos idénticos en un determinado locus en un par de cromosomas homólogos o en cada hebra de una molécula de ADN.

Incidencia. Es la fracción o proporción de un grupo inicialmente libre de algún padecimiento que lo desarrolla en un período de tiempo dado.

Intervalo. Diferencia entre el valor menor y el valor mayor de una distribución.

Intrón. Segmento de un gen que inicialmente se transcribe, pero que a continuación se retira de la transcripción del ARN primario por medio del ensamblaje de las secuencias situadas (exones) a cada lado de dicho ARN.

Isoforma. Diferentes formas de una proteína que puede ser producida a partir de genes diferentes, o por el mismo gen por uniones alternativas.

Kilobase. Una unidad de 1,000 bases en una secuencia de ADN o ARN. En el ADN de doble cadena, pares de kilobases.

Ley de Hardy-Weinberg. El principio de Hardy-Weinberg recibe el nombre del matemático inglés G. H. Hardy y el físico alemán Wilhelm Weinberg. Es un postulado que se aplica a la genética de poblaciones, que nos indica que una población, se halla en equilibrio cuando no actúan factores externos como la selección natural, migraciones y/o mutaciones. Este equilibrio se manifiesta cuando se observa que las proporciones genotípicas y por lo tanto las fenotípicas de una población se mantienen constantes. Como consecuencia de esto, se asume que la herencia mendeliana no induce cambios evolutivos por sí misma. Ley que relaciona la frecuencia génica con la genotípica; se utiliza en genética clínica para determinar las frecuencias alélicas y de heterocigotos cuando se conoce la incidencia de un trastorno.

Loci. Plural de Locus.

Locus. Posición de un gen en un cromosoma. Diferentes formas del gen (alelos) pueden ocupar el locus.

Lugar de restricción. Secuencia corta en el ADN que puede reconocer y cortar una endonucleasa de restricción específica.

Media. Es la suma de todos los valores de las variables, dividida entre el número total de elementos.

Mediana. El punto donde el número de observaciones superiores es igual al de las inferiores.

Muestra. Es un subgrupo de una población, que es seleccionada de entre ella.

Mutación. Cualquier cambio hereditario en la secuencia de ADN genómico.

Mutación puntual. Cambio en un par de bases de un solo nucleótido en el ADN.

Nucleótido. Molécula compuesta de una base nitrogenada, un azúcar de cinco carbonos y un grupo fosfato. Un ácido nucleico es un polímero de muchos nucleótidos.

Oligonucleótidos. Molécula corta de ADN (habitualmente de 8 a 50 pares de bases) sintetizada para utilizarse como sonda.

Población. Es un grupo de personas en un ambiente dado.

Poligénica. Herencia determinada por muchos genes en diferentes loci, con pequeños efectos aditivos. También denominada *cuantitativa*. No debe confundirse con *multifactorial* en la que pueden participar factores ambientales y genéticos.

Polimorfismo. Presencia conjunta en una población de dos o más genotipos alternativos, cada uno con una frecuencia mayor que la que podría mantenerse sólo por mutación recurrente. Un locus se considera polimórfico si el alelo raro tiene una frecuencia mayor de 0.01, de manera que la frecuencia del heterocigoto es al menos de 0.02,

Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Técnica molecular que sirve para identificar la diferencia polimórfica en la secuencia de ADN entre individuos que puede reconocerse con endonucleasas de restricción.

Polipéptido. Cadena de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos entre el grupo amino de uno y el grupo carboxilo del contiguo. Una molécula de proteína puede estar compuesta de una sola cadena polipeptídica o de dos o más polipéptidos idénticos o diferentes.

Prevalencia. Es la fracción (proporción) de un grupo que tiene una condición clínica en un momento dado del tiempo.

Promotor. Secuencias de ADN localizadas en el extremo 5' de un gen que determinan el lugar de inicio de la transcripción y algunas veces también la distribución en los tejidos del ARNm.

q. En citogenética, brazo largo de un cromosoma en genética poblacional, frecuencia del menos común de los alelos de un par.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Técnica en la que una secuencia corta de ADN o ARN puede amplificarse $>10^6$ veces por medio de dos iniciadores de oligonucleótidos próximos y ciclos repetidos de amplificación con ADN-polimerasa, a partir de una plantilla o molde de ADN.

Recesivo. Rasgo o gen que se expresa sólo en homocigotos o hemicigotos.

Salud. Es un estado de completo bienestar físico, mental y social de cada individuo.

Translocación. Transferencia de un segmento de un cromosoma a otro. Si la transferencia es entre dos cromosomas no homólogos, la translocación se denomina recíproca.

SÍMBOLOS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

Aa	Aminoácido
°C	Grados Centígrados
cc	Centímetros cúbicos
CTAB	Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio Del inglés <i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i>
DTAB	Bromuro de Deciltrimetilamonio Del inglés <i>Dodecyl Trimethyl Ammonium Bromide</i>
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético, Del inglés <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FNT	Factor de Necrosis Tumoral
IC	Intervalo de Confianza
IPM	Índice de Peritonitis de Mannheim
IRC	Índice de Riesgo Cardíaco
JAK	Quinasa Janus, Del Inglés <i>Janus Kinase</i>
LEP	Leptina
LEPR	Receptor de Leptina
LUZ UV	Luz ultravioleta con una longitud de onda de 260nm
MAPK	Proteínquinasa mitogen activada, Del inglés <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
Min	Minutos
mL	Mililitro
M	Molar
mM	Milimolar
MPM	Modelo de Predicción de Mortalidad
Mpm	Marcador de peso molecular

NaCl	Cloruro de Sodio
ng	Nanogramos
kDa	Kilodalton
kb	Kilobases
OD	Odds Ratio
OMS	Organización Mundial de la Salud
OB-Rb	Isoforma larga
OB-Ra	Isoforma corta
OB-Re	Isoforma soluble
pb	Pares de Bases
POMC	Proopiomelanocortina
PS	Peritonitis severa. Del inglés <i>Peritonitis Severity Score</i>
RC	Restricción Calórica
RCP	Proteína C reactiva. Del inglés <i>Reaction C protein</i> .
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
.	Del inglés <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RM	Razón de Momios
Rpm	Revoluciones por Minuto
Seg	Segundos
STAT	Transductores de señal y activadores de transcripción Del inglés <i>Signal Transducers and activators of transcription</i>
µL	Microlitros
V	Volts

RELACIÓN DE CUADROS

TABLA 1. Frecuencias del gen <i>LEP</i>	27
TABLA 2. Frecuencias del gen <i>LEP</i> y variables analizadas.....	28
TABLA 3. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg.....	28
TABLA 4. Frecuencias del gen <i>LEPR</i>	29
TABLA 5. Frecuencias del gen <i>LEPR</i> y variables analizadas.....	29
TABLA 6. Frecuencias del gen <i>PPARγ</i>	30
TABLA 7. Frecuencias del gen <i>PPARγ</i> y variables analizadas.....	31
TABLA 8. Estimación de riesgos mediante Razón de momios.....	32
TABLA 9. Diferencias entre las interleucinas, en ambos grupos, comparadas por género.....	32

RELACIÓN DE FIGURAS

- Figura 1.** Identificación del polimorfismo C34G del gen *PPAR γ* mediante los productos de SM-PCR en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio... 21
- Figura 2.** Fragmento del gen *LEP* amplificado mediante PCR y evidenciado en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio.....23
- Figura 3.** Identificación del polimorfismo G-2548A del gen *LEP* mediante la técnica de RFLP y evidenciado por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio.....23
- Figura 4.** Fragmento del gen *LEPR* obtenido por amplificación mediante PCR de punto final evidenciado por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% teñidos con bromuro de etidio.....25
- Figura 5.** Identificación del polimorfismo A223G del gen *LEPR* mediante la técnica de RFLP evidenciado en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio.....25

RESUMEN

Identificación de Marcadores Genéticos Asociados a un Desenlace Desfavorable en Pacientes con Peritonitis Secundaria no Apendicular con y sin Trastornos de la Nutrición.

OBJETIVO: Determinar si los polimorfismos G-2548A del gen *LEP*, A223G del gen *LEPR* y C34G del gen *PPAR γ* , son factores genéticos de riesgo para un desenlace desfavorable en peritonitis secundaria.

MATERIAL Y MÉTODOS: Cohorte prospectiva. Se incluyeron 75 pacientes del servicio de cirugía general del Hospital general de Durango, SSA. Con diagnóstico de peritonitis secundaria no apendicular, confirmada quirúrgicamente. Se excluyeron pacientes con peritonitis apendicular, pacientes con peritonitis pancreática, o con tratamiento inmunosupresor o con ingesta crónica de corticoesteroides. Se realizó extracción de ADN a partir de sangre total, mediante el método DTAB/CTAB, reacción en cadena de la polimerasa punto final y mutación específica, así como polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.

RESULTADOS. Se captaron 75 pacientes (42 ♂ $Ds \pm 19.5$ y 33 ♀ $Ds \pm 20.25$), la edad promedio del grupo de hombres sobrevivientes fue de 43 y para las mujeres de 55 años respectivamente. Un IMC ($24.20_{\text{♀}}$ y $23.6_{\text{♂}}$). De los 75 pacientes, 22 fallecieron, y 53 sobrevivieron.

Realizando el análisis de riesgos mediante el modelo de razón de momios, se observa que el alelo mutado A del polimorfismo G-2548A del gen *LEP* representa 4.64 veces más riesgo de no sobrevivir con respecto a los individuos que presentan el alelo silvestre (G).

Con respecto al polimorfismo A223G del gen *LEPR*, la presencia del alelo mutado (G), sugiere la posibilidad de un factor protector 3.5 veces, sin embargo el intervalo de confianza no es definitivo. El polimorfismo C34G del gen *PPAR γ* no representa un factor de riesgo para desenlace desfavorable

Palabras clave: Leptina, receptor de leptina, *LEP* G-2548A, *LEPR* A223G, *PPAR γ* .

ABSTRACT

Identification of Genetic Markers Associated to an Unfavorable Outcome in Patients with non Apendicular Secondary Peritonitis with and without Dysfunctions of Nutrition.

OBJECTIVE: To determine if the Polymorphism G-2548A of the *LEP* gene, A223G of the *LEPR* gene and C34G of the *PPAR γ* gene, are genetic factors of risk for an unfavorable outcome in secondary peritonitis.

MATERIAL AND METHODS: Prospective cohort. 75 patients of the service of general surgery of the General Hospital of Durango, SSA were included, with diagnose of peritonitis secondary non apendicular, confirmed surgically. Were excluded patient with peritonitis apendicular, pancreatic peritonitis, immonosuppressive treatment or chronic corticosteroids intake. Was done extraction of DNA starting from total blood, PCR final point, and mutation specifies, as well as RFLP.

RESULTS. 75 patients were includ (42♂ and 33♀), the age average of men survivors was of 43 and 55 year-old of women survivors. A Body Mass Index (BMI) average a total patients (24.20♀ and 23.6♂). Of the 75 patients, 22 died, and 53 survived.

Analysis of risks. The mutated allele (A) to polymorphism of the *LEP* gene represents 4.64 times more non survival risk individuals with wild allele (G).

With regard to the polymorphism A223G of the gene *LEPR*, the presence of the allele muted (G), suggests the possibility of a factor protective 3.5 times, however the interval of trust is not definitive. The polymorphism C34G of the gene *PPAR γ* doesn't represent a factor of risk for unfavorable outcome

Key words: Leptin, leptin receptor, *LEP* G-2548A, *LEPR* A223G. *PPAR γ*

I. INTRODUCCIÓN

La relevancia clínica de la peritonitis secundaria ha motivado, desde hace muchos años, la identificación de factores de riesgo con significado pronóstico de mortalidad postoperatoria. Los primeros índices de la gravedad de la enfermedad fueron elaborados a partir de los años sesenta con el propósito de cuantificar y predecir el riesgo general de morbilidad y mortalidad según parámetros fisiológicos y analíticos (Fraccalvieri, 2009).

La clasificación de la *American Society of Anesthesiologist (ASA)*, se ha utilizado ampliamente desde 1963, a pesar de ser una clasificación pobremente definida y subjetiva.

El Índice de Riesgo Cardíaco (IRC) diseñado por Goldman, evalúa la probabilidad de complicaciones cardiológicas en pacientes sometidos a cirugía no cardíaca. El Índice Nutricional Pronóstico (INP) fue elaborado para predecir el riesgo de complicaciones postoperatorias según el estado nutricional preoperatorio.

En 1985 se describió el Modelo de Predicción de Mortalidad (MPM), que considera, como factores de riesgo de mortalidad postoperatoria, la edad, la frecuencia cardíaca, la presión arterial sistólica, el ingreso de tipo quirúrgico y urgente, si ha habido reanimación anterior al ingreso, la malignidad del proceso, la insuficiencia renal crónica, la historia de ingreso previo en unidad de cuidados intensivos, las infecciones y el estado de coma. Posteriormente, este índice fue modificado a MPM II para pacientes con sepsis.

El APACHE II (*Acute Physiologic And Chronic Health Evaluation II*) es probablemente, el índice de gravedad con significado pronóstico más conocido y empleado en la práctica clínica. Fue diseñado especialmente para pacientes con enfermedad severa ingresados en unidades de cuidados intensivos; utiliza 12 variables. El APACHE II es un sistema de puntuación muy válido y se ha demostrado su utilidad en enfermos con sepsis de origen intraabdominal aptos para cirugía, con un alto grado de correlación entre puntuación y mortalidad. Sin embargo, no es un índice específico para pacientes quirúrgicos.

El APACHE III fue elaborado con la intención de mejorar la predicción de riesgo de mortalidad del APACHE II.

El índice POSSUM (*Physiological and Operative Score for the enUmeartion of Morbidity*) fue descrito por Copeland et al en 1991 y en él se identifican 12 parámetros fisiológicos y 6 operatorios como factores de riesgo de mortalidad y morbilidad.

Un sistema de puntuación ideal debe poder aplicarse con el mismo rigor tanto en departamentos de medicina intensiva como en las unidades de urgencias o de hospitalización convencional de hospitales de diferente nivel asistencial, debe ser practico y fácil de usar, reproducible, y su cálculo ágil y rápido. Las variables a considerar deben ser datos o factores objetivos y específicos para que posteriormente se puedan comparar resultados.

El Índice de Peritonitis de Mannheim (IPM) ha sido el primer sistema de puntuación de gravedad diseñado con el fin de evaluar y proporcionar el pronóstico de mortalidad postoperatoria individual de pacientes con peritonitis y que pueden recibir tratamiento quirúrgico. Descrito en 1987 por Wacha et al, fue elaborado mediante el análisis de 20 posibles factores de riesgo prequirúrgicos e intraoperatorios, de los cuales solamente 8 resultaron tener relevancia significativa.

La severidad de la sepsis intraabdominal está en relación con variables como la edad, el sexo, el fallo orgánico, la presencia de lesión neoplásica, la duración de la peritonitis, el origen extra-cólico de la perforación, la extensión de la peritonitis y las características del líquido peritoneal.

La ventaja del IPM se deben a que es un sistema de fácil aplicación al ofrecer una estimación del riesgo individual de mortalidad: cada variable puede calcularse en condiciones clínicas habituales, rápidamente, sin ayuda técnica y se registra únicamente al momento de la intervención.

En el año 2000 se describe un nuevo sistema de puntuación para la peritonitis: *Peritonitis Severity Score* (PSS), elaborado de forma específica para la perforación del colon izquierdo y basado en parámetros objetivos fisiopatológicos y quirúrgicos (Fraccalvieri, 2009).

La peritonitis generalizada es una condición con una alta letalidad y continúa siendo uno de los mayores problemas que enfrenta el médico cirujano y los pacientes. En el siglo pasado la peritonitis tratada medicamente alcanzó una mortalidad del 90%. En 1926, Krishner mostró que la mortalidad de la peritonitis podría ser reducida con la implementación de criterios quirúrgicos estrictos, y la tasa de mortalidad cayó por debajo del 50%, desde entonces a pesar de los avances quirúrgicos, agentes antimicrobianos y cuidados de apoyo, la mortalidad de la peritonitis continúa alta, y actualmente se reporta entre el 13 y 43% (Ajaz, 2010).

II. ANTECEDENTES

La peritonitis se define como el proceso inflamatorio general o localizado de la membrana peritoneal secundaria; una irritación química, invasión bacteriana, necrosis local, procesos tumorales, entre otros (Huamán, 1999).

La peritonitis generalizada es una condición letal y hasta hoy continúa representando uno de los mayores problemas que enfrenta el médico cirujano y los pacientes.

En el siglo pasado la peritonitis tratada medicamente alcanzó una mortalidad del 90% actualmente, en el siglo XXI a pesar de los avances quirúrgicos, agentes antimicrobianos y cuidados de apoyo, la mortalidad de la peritonitis continua siendo alta, y actualmente se reporta entre el 13 y 43% (Ajaz, 2010; Bracho, 2002).

2.1 Peritoneo: Anatomía, Localización y Función.

El peritoneo es en esencia, una membrana dializadora que regula el equilibrio hidroelectrolítico entre el medio interno y el líquido intraperitoneal. Éste recubre las vísceras y se localiza en la cavidad abdominal, la cual se delimita superiormente por las cúpulas diafragmáticas, inferiormente por el suelo pélvico, lateralmente por las paredes abdominales laterales, al frente y atrás por las paredes abdominal anterior y posterior (Celmo, 1999; Latarjet, 2008).

El peritoneo se divide en dos, en el peritoneo parietal que recubre las paredes abdominales y el peritoneo visceral que se adosa íntimamente a las vísceras, creando entre ellas un espacio virtual que constituye la cavidad peritoneal, la cual normalmente contiene una pequeña cantidad de líquido (100cc), éste líquido contiene entre 2000 y 2500 células por milímetro cúbico y su función es permitir el desplazamiento de las vísceras con la respiración, los cambios de posición, y los movimientos peristálticos (Celmo, 1999; Latarjet, 2008).

El peritoneo microscópicamente está formado por dos capas, una superficial de mesotelio (capa simple de células escamosas), y otra profunda de tejido conectivo laxo que contiene fibras elásticas, colágena, grasa, y una rica red de capilares y linfáticos (Celmo, 1999; Huamán, 1999).

El peritoneo parietal es muy sensible y su inervación está dada por los últimos 6 nervios aferentes intercostales los cuales son útiles para hacer el diagnóstico de abdomen agudo (Guyton, 2006; Huamán, 1999).

El peritoneo visceral es relativamente insensible, solo registra estímulos muy prolongados o intensos como la tensión intraabdominal, aumento de la presión de tejidos, y se refiere como un dolor vago y sordo el cual es condicionado por la inervación esplénica (Guyton, 2006; Huamán, 1999).

2.2 Estado Nutricional

En la actualidad los trastornos de la nutrición, son un problema de salud mundial. La obesidad propicia un estado de inflamación crónica, manifestado por un aumento de los niveles séricos de las citocinas pro inflamatorias, así como alteraciones en la función de los linfocitos de sangre periférica, influye directa o indirectamente con la respuesta inflamatoria al estado de enfermedad (O'rouke, 2009; Ye, 2010).

La inflamación relacionada con la obesidad, se considera como una alteración de la inmunidad innata ya que los monocitos, macrófagos y neutrófilos son los efectores de esta respuesta (O'rouke, 2009).

La consecuencia de estas alteraciones es un estado de inflamación crónica de bajo grado y metabólicamente activado, el cual se ha denominado "metainflamación" (Dixit, 2008; Ye, 2010), ésta metainflamación es producida por hipoxia en el tejido adiposo, lo que genera la respuesta inflamatoria inicial. Además de generar estrés oxidativo en el retículo endoplasmico rugoso y disfunción mitocondrial, proceso que activan también la respuesta inflamatoria (O'rouke, 2009; Dixit, 2008; Ye, 2010).

La restricción calórica (RC), provoca una expansión controlada o reducida del tejido adiposo, lo que provoca una disminución de citocinas pro-inflamatorias, dado que no hay hipoxia, ni estrés oxidativo (Ye, 2010).

Los efectos pleiotrópicos de la RC se observan también en el sistema inmune y se ha sugerido mejora muchos parámetros de la respuesta inmune, tales como la respuesta de la células T, actividad de las células NK, la capacidad de las células mono nucleares y la producción de citocinas pro inflamatorias. También se ha descrito que la RC aumenta los factores orexigénicos, como Neuro Péptido Y, la grelina y reduce las hormonas anorexigénicas como la leptina.

La grelina es un péptido acetilado de 28 Aa, secretado principalmente por el estomago es un potente inhibidor de las citocinas pro inflamatorias liberadas de las células T, monocitos y células endoteliales, a través de la vía de unión con el receptor de la hormona de crecimiento. La RC también inhibe la secreción de leptina la cual aumenta la secreción de citocinas actuando directamente en isoforma larga de su receptor localizado en las células inmunes pro inflamatorias (Dixit, 2008; Ye, 2010).

La leptina y el PPAR γ son dos proteínas que regulan la respuesta inflamatoria así como la función y diferenciación de los linfocitos T y B. La síntesis de leptina se incrementa en respuesta a una infección aguda, la sepsis, y secreción de mediadores inflamatorios como IL-1, FNT α (Factor Necrosis Tumoral α), y regula la ingesta de comida y el gasto de energía, todo esto evidencia un papel preponderante en el estado nutricional del paciente (Otero, 2005; Frühbeck, 2006).

2.3 Epidemiología

En un estudio suramericano, del Instituto de investigación en ciencias de la salud de la ciudad de Asunción, Paraguay en 1989, reportó que el 2,8% de las intervenciones quirúrgicas abdominales, evolucionaban a peritonitis (Bracho, 2002). En el periodo comprendido de 1994-1999, el Hospital General de México, el 14.76% de los paciente con cirugía abdominal presentaron peritonitis (Bracho, 2002).

En Durango en el año 1999, del total de los procedimientos quirúrgicos efectuados en el Hospital General de Durango, 7% se diagnosticaron con peritonitis, la peritonitis se diagnosticó en el 21% de los casos de cirugía abdominal (Bracho, 2002).

2.3.1 Peritonitis Secundaria.

Las enfermedades peritoneales se pueden agrupar en tres grandes apartados: a) peritonitis, b) tumores peritoneales, c) otras afecciones peritoneales poco frecuentes.

La peritonitis se clasifica en primaria, secundaria y terciaria. Siendo la peritonitis bacteriana secundaria al que se produce como consecuencia de la contaminación de la cavidad peritoneal por gérmenes procedentes del tracto gastrointestinal, el árbol biliar, el páncreas o el aparato genitourinario, debido al paso de bacterias a través de los tejidos inflamados o por la perforación espontánea o traumática de estas vísceras, o a la contaminación externa por heridas o traumatismos penetrantes (Gomollon, 2004).

La peritonitis consecutiva a la perforación del tracto digestivo es, en la mayoría de los casos, una infección polimicrobiana constituida por gérmenes aerobios Gram negativos, (*Escherichia coli* y otros) y anaerobios (*Bacteriodes fragilis* y otros) como la *E. coli*, destaca por su capacidad de producir bacteriemias.

Las peritonitis intrahospitalarias generalmente siguen a una intervención quirúrgica y frecuentemente se contaminan por *Pseudomonas spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus*. Especialmente resistentes a medicamentos (Gomollon, 2004).

La peritonitis secundaria tiene una elevada morbimortalidad, los factores que influyen en la supervivencia son la demora en el diagnóstico y el tratamiento, el lugar de la perforación, la infección postoperatoria, el estado nutricional del paciente, la afección multiorgánica y la edad (Gomollon, 2004).

2.3.2 Diagnóstico.

El dolor intenso y de presentación brusca es el síntoma más frecuente e importante. El dolor empeora con los movimientos y con la respiración por lo que es habitual encontrar al paciente inmóvil, con respiración rápida y superficial y con las rodillas flexionadas (Gomollon, 2004).

Generalmente hay fiebre de 38 a 40°C, taquicardia e hipotensión. En la peritonitis generalizada, el shock suele estar presente. Los ruidos intestinales están disminuidos o ausentes, existe sensibilidad abdominal, contractura muscular involuntaria y dolor a la descompresión brusca del abdomen.

Los resultados de laboratorio muestran leucocitosis con neutrofilia y formas jóvenes, hemoconcentración y acidosis metabólica. En la radiografía simple de abdomen suele existir dilatación de las asas intestinales. En el caso de perforación se encuentra neumoperitoneo en el 60-75% de los enfermos. La Tomografía computada es más sensible y, por tanto, tiene un valor predictivo mayor, además de revelar a menudo la etiología del proceso o la presencia de líquido libre peritoneal (Gomollon, 2004).

2.3.3 Tratamiento.

El tratamiento de la peritonitis bacteriana secundaria es la intervención quirúrgica que tiene como objetivos básicos el control de la causa de la infección y el drenaje de la cavidad abdominal. El diagnóstico precoz de la peritonitis es trascendental para iniciar cuanto antes el tratamiento preoperatorio y aumentar la supervivencia de estos pacientes (Gomollon, 2004).

2.3.3 Mortalidad

La peritonitis secundaria tiene una elevada morbimortalidad. Los factores que influyen en la supervivencia son la demora en el diagnóstico y el tratamiento, el lugar de la perforación, la infección postoperatoria, el estado nutricional del paciente, la afección multiorgánica y la edad.

La mortalidad por perforación libre del colon se sitúa entre el 20 y 40%, mientras que la debida a una perforación ulcerosa es inferior al 10% (Gomollon, 2004). Actualmente se reporta entre el 13 y 43% (Ajaz, 2010).

Las tasas de mortalidad varían entre el 5 y el 35% según las series publicadas y en función de la etiología y el tipo de procedimiento quirúrgico aplicado (Fraccalvieri, 2009).

2.4 Estado Nutricional y Peritonitis Secundaria.

Más de mil millones de personas a nivel mundial tienen sobrepeso, de estos 300 millones cumplen con todos los criterios de obesidad. La obesidad está acompañada por una plétora de otras enfermedades relevantes como, enfermedades cardiovasculares, cerebro vasculares, enfermedades hepáticas, diabetes tipo 2, y dislipidemias. La obesidad conlleva a un aumento de citocinas inflamatorias y adipocitocinas, y cambios en las moléculas relacionadas como la leptina y adiponectina, las cuales pueden contribuir a múltiples alteraciones en individuos predispuestos.

La inflamación, evaluada por concentraciones séricas altas de citocinas inflamatorias, y otros marcadores inflamatorios, pueden ser una consecuencia de la obesidad y sus comorbilidades (Oreste, 2010).

2.5 Leptina.

La leptina se descubrió al final de 1994, su nombre deriva de la palabra griega "Leptos" que significa delgado, es codificada por el gen OB o *LEP* localizado en el cromosoma 7 del humano, en el brazo largo en la posición 31.3 y consta de 3 exones separados por dos intrones. La leptina es una proteína de 167Aa y es una proteína no glicosilada de 16 kDa, que estructuralmente pertenece a la superfamilia de las citocinas 1 y se caracteriza por una cadena helicoidal de 4 estructuras parecida a la hormona de crecimiento, prolactina, IL-3 (Interleucina-3) (Parachi, 2005).

La expresión del gen de la leptina es regulado por varios factores, principalmente por la ingesta de comida y hormonas. La síntesis de leptina se incrementa en respuesta a una infección aguda, sepsis, y secreción de mediadores inflamatorios como IL-1, FNT α , (Factor Necrosis Tumoral α).

La expresión de esta hormona es inhibida por la testosterona y promovida por los esteroides ováricos.

La leptina tiene influencia en un amplio espectro de funciones biológicas, tales como el metabolismo de glucosa y lípidos, la síntesis de gluco-corticoides, insulina, proliferación de linfocitos T-CD4, secreción de citocinas, fagocitosis y transmisión sináptica. Además de regular el eje, hipotálamo-hipófisis-adrenales, maduración del sistema reproductivo, hematopoyesis, angiogenesis y desarrollo fetal (Otero, 2005; Frühbeck, 2006).

La leptina es producida y secretada al torrente circulatorio principalmente por el tejido adiposo, siguiendo un ritmo circadiano, parecido al de la insulina y el cortisol (Parachi, 2005). Pero no es la única fuente. La placenta, mucosa gástrica, el epitelio mamario, musculo esquelético, hipotálamo, hipófisis, medula ósea y hueso son capaces de producir pequeñas cantidades de leptina, bajo condiciones especiales. La leptina es degradada en los túbulos renales (Frühbeck, 2006)

2.6 Receptor de Leptina.

La función de la leptina es mediada a través del receptor de la leptina, y ambos la leptina y su receptor están involucrados en el control homeostático del apetito, peso, metabolismo y funciones reproductivas (Ragin, 2009).

El receptor humano de la leptina es miembro de la familia de los receptores de las citocinas clase 1, y fue identificado en el cerebro. El gen que lo codifica se encuentra en el cromosoma 1p31 y hay seis isoformas del receptor de leptina. La larga es la más abundante en el hipotálamo, la cual es responsable de la señalización de la leptina. La isoforma corta predomina en el tejido periférico y la isoforma soluble en sangre (Várkonyi, 2010).

La isoforma larga del receptor de la leptina se asemeja a la glicoproteína 130, que es un receptor de la familia de las citocinas, tiene 302 residuos de aminoácidos a nivel citoplásmico, y dominios para la activación de señales de transducción, se expresa en el hígado fetal humano, epitelio yeyunal, células β -pancreáticas, células foliculares ováricas, células endoteliales vasculares, CD34, precursores hematopoyéticos en la médula ósea, y linfocitos T.

Solo la isoforma larga del receptor de la leptina contiene los motivos intracelulares requeridos para la activación de la vía de traducción de señal JAK/STAT. Típicamente la cascada de la señal de traducción JAK/STAT, es activada por interferon, interleucinas u otras citocinas cuyos receptores carecen de actividad cinasa intrínseca. El receptor de la leptina actúa como un dímero preformado, es una proteína integral de membrana con un dominio de unión hormonal extracelular y un dominio de señalización intracelular. El receptor de la leptina no posee ninguna actividad enzimática intrínseca. Pero libera una tirosina cinasa (JAK2) para la señal. Cuando la leptina se une a su receptor, activa parcialmente a la JAK2, la cual después se autofosforila, incrementando de esta manera la actividad de la JAK2 cinasa (Meyers, 2010).

El receptor de leptina opera como un dímero preformado esto es: una proteína integral de membrana con un dominio de unión hormonal extracelular y un dominio de señal intracelular. Los receptores de leptina no contienen ninguna actividad enzimática intrínseca, pero posee un motivo o caja rico en residuos de prolina que se requieren para la interacción y activación de la JAK. Cuando la leptina se une a el receptor este parcialmente activa a la JAK2, la cual posteriormente se autofosforila y de esta manera aumenta la actividad de la JAK2. La activación completa de la JAK2 ocurre cuando esta fosforila los tres residuos de tirosina a nivel intracitoplasmático, del receptor de leptina. Cada uno de estos residuos se une a diferentes proteínas para transmitir la señal. El residuo Tyr1138 se une a un factor de transcripción latente STAT3 el cual es fosforilado por la JAK2. El STAT3 fosforilado es translocado a el núcleo donde controla la expresión génica (Meyers, 2010).

El residuo Tyr1077 recluta un factor de transcripción, STAT5, el cual es fosforilado y translocado al núcleo, para regular la expresión de otros genes (Frühbeck, 2006; Otero, 2005; Meyers, 2010).

En el receptor de leptina, otro residuo importante es el Tyr985, el cual tiene sitios de unión para dos proteínas. La primera de ellas es la SHP 2, la cual es fosforilada por la tirosincinasa y es requerida para la activación de Ras/Raf/ERK (cinasa reguladora de señal extracelular). Los ERK son miembros de la familia MAPK (Proteína mitogena activada por cinasa), que son componentes de la cascada de señalización de Ras/Raf/MAPK; esta vía es activada por la porción intracelular del receptor largo de la leptina. El segundo, sitio de unión es para la proteína STAT3, lo que incrementa la producción de proteínas llamadas, SOCS3 y POMC; la unión de SOCS3 y Tyr985 inhibe a la JAK2, y esta unión “apaga” la señal del receptor de la leptina en un proceso llamado inhibición por retroalimentación (Otero, 2005; Frühbeck, 2006; Meyers, 2010).

El receptor de leptina tiene esencialmente 4 puntos principales, los cuales transmiten la señal corriente abajo: 1) señal JAK2, 2) Tyr985 y SHP2/SOCS3, 3) Tyr1077 y STAT5, y 4) Tyr1138 y STAT3. Estas cuatro señales combinadas, median toda la acción de la leptina en el balance energético, homeostasis de la glucosa y función endocrina (Meyers, 2010).

La forma corta del receptor de la leptina pose el dominio intra y extracelular se expresa en los plexos coroideos, riñón, hígado, endotelio vascular, gónadas y pulmón; Contienen 34 residuos de aminoácidos de dominio intracitoplasmático (Frühbeck, 2006; Parachí, 2005; Otero, 2005).

La isoforma soluble, se encuentra unida a la leptina en sangre, y solo posee el dominio extracelular del receptor (Frühbeck, 2006; Parachí, 2005; Otero, 2005).

2.7 PPAR γ .

Los activadores de la proliferación de los receptores de proxisomas (PPAR), son un factor transcripcional multifuncional, que regula la adipogénesis, inmunidad, inflamación, desarrollo del sistema nervioso, y de linfocitos B y T. Son miembros de la familia de los factores de transcripción cuya subfamilia forma parte de los receptores hormonales esteroideos nucleares y controlan varios genes relacionados con la diferenciación celular (García, 2008).

Los PPAR forman heterodímeros con los receptores de retinoides X, (RXRs) los que regulan la transcripción de varios genes implicados en el metabolismo lipídico, síntesis de insulina, carcinogénesis e inflamación.

Hay tres subtipos conocidos de PPARs: PPAR α , PPAR δ y PPAR γ , este último está involucrado en la diferenciación adipocítica (Meirhaeghe, 1998; Swarbrick 2001).

El gen *PPAR γ* se localiza en el cromosoma 3q25; está formado por 9 exones, posee una longitud total de más de 100 kb se han descrito varias isoformas, el *PPAR γ 1* codificado por 8 exones, se expresa en corazón, hígado, músculo esquelético y tejido adiposo, puede modificar la susceptibilidad a Diabetes tipo 2 y a obesidad (García, 2008; Parachi, 2005).

El *PPAR γ 2* está codificado por 7 exones, donde se han descrito los polimorfismos C161T que corresponde a una mutación sinónima y C34G, se expresa más abundantemente en el tejido adiposo. El *PPAR γ 3* se expresa en tejido adiposo, macrófagos y epitelio colónico.

El polimorfismo más común con una frecuencia aproximada de 0.12% en caucásicos, se presenta en el *PPAR γ 2*, específicamente en el exón B. En la posición 34, que consiste en una sustitución de C por G, lo que condiciona un cambio de aminoácido, de una prolina a una alanina en el codón 12,

(Pro12Ala). Funcionalmente, esta variante presenta una afinidad disminuida para la activación de los genes blanco (Swarbick, 2001; Parachi, 2005).

2.8 Leptina, Receptor de Leptina, y *PPAR* γ y su Asociación a Enfermedades.

Los *PPAR*, son un factor transcripcional multifuncional, que regula la adipogénesis, inmunidad, inflamación, desarrollo del sistema nervioso, y de linfocitos B y T (Parachí, 2005; Garcia, 2008).

La leptina es una hormona semejante a la citocinas, con acciones pleiotropicas que ejerce su función tras la unión con sus receptores sobre todo la isoforma larga que activa la vía JAK-STAT.

Las acciones conocidas de la leptina en la respuesta inmune incluyen, la modulación de monocitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos citolíticos naturales, y células dendríticas. Además de inducir la activación de las células T principalmente las cooperadoras (Parachí, 2005).

2.9 Polimorfismo *LEP* G-2548A

Se define como polimorfismo *LEP* G-2548A, a la presencia del alelo A y ausencia del alelo G, en la secuencia -2560. Este polimorfismo, localizado en la región promotora del gen *LEP* influye en la expresión de leptina y por lo tanto en los niveles de secreción de la hormona en tejido adiposo (Sida, 2010).

Se observó en mujeres brasileñas, que el polimorfismo G-2548A es un importante predictor del incremento de la leptina en plasma, así como también del incremento del índice de masa corporal, relacionándose con un riesgo elevado para el desarrollo de obesidad (Hinuy, 2010)

2.10 Polimorfismo *LEPR* A223G

El polimorfismo A223G, definido por la presencia del alelo G o ausencia del alelo A, se localiza en el exón 6 en la posición 668, secundario a un cambio en el codón 223 de glutamina por arginina. Debido a su ubicación dentro de la región de dominio extracelular el polimorfismo, se asocia con niveles de actividad elevados en dicha unión (Sida, 2010). En la población brasileña el polimorfismo A223G se ha relacionado con un incremento en el índice de masa corporal (Gallicchio, 2009).

2.11 Polimorfismo *PPAR* γ C34G.

La importancia del gen en el control de la sensibilidad a la insulina en humanos, se ha comprobado por los hallazgos de varias familias diabéticas con resistencia a la insulina, en las cuáles hay pérdida de la función, sin embargo cuando hay ganancia de la función se asocia con obesidad en hombres (Bendolava, 2008).

El polimorfismo C34G en el *PPAR* γ se ha asociado con diabetes tipo 2, con cambios en los niveles plasmáticos de insulina, y con la sensibilidad a la insulina, así que se acepta como una variante para desarrollar diabetes tipo 2. Además de encontrarse con una baja capacidad de transactivación (Bendolava, 2008).

III. JUSTIFICACIÓN

La peritonitis es una condición de urgencia y continúa siendo uno de los mayores problemas que enfrenta el médico cirujano y el paciente. En el siglo pasado la peritonitis tratada medicamente alcanzo una mortalidad del 90%. Actualmente la mortalidad por peritonitis se reporta entre el 13 y 43 %, a pesar de los avances quirúrgicos, tratamiento antimicrobiano y medidas de apoyo. Por lo tanto, es necesario dilucidar la participación de posibles marcadores genéticos en el proceso de la peritonitis como son, el gen de la leptina y su receptor, dado que están involucrados en la modulación de la respuesta inmune celular, al activar la cascada de las citoquinas así como regular la proliferación de linfocitos T, la fagocitosis en los macrófagos y la expresión de moléculas de adhesión en los neutrofilos, componentes de la respuesta inmune celular. Además la leptina estimula la secreción de factores pro y anti-inflamatorios. El $PPAR\gamma$, que está involucrado en la respuesta inflamatoria aguda, atravez de su mediación para la formación de tejido adiposo, que es la fuente principal de leptina. Es pues pertinente dilucidar la posible intervención del gen de la leptina y su receptor así como del gen $PPAR\gamma$, en la respuesta inflamatoria y por tanto en la sobrevida.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La peritonitis secundaria no apendicular, ofrece un campo de investigación amplio, dado que la respuesta inflamatoria de fase aguda es toral para un desenlace favorable, donde el estado nutricional, el gen de la leptina, su receptor y el gen *PPAR γ* , tienen un papel central en el proceso inflamatorio. Dado que la leptina a través de su receptor regula la respuesta inmune celular mediante la activación de linfocitos T, macrófagos y neutrófilos. La relevancia de identificar posibles marcadores genéticos, como los polimorfismos de el gen de la leptina, su receptor y el polimorfismo del gen *PPAR γ* , en la peritonitis secundaria no apendicular, permitirá una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en la respuesta inflamatoria de fase aguda, además de servir como posibles predictores de sobrevida, en pacientes con esta condición.

V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe asociación entre los polimorfismos G-2548A del gen *LEP*, A223G del gen *LEPR* y el polimorfismo C34G del gen *PPAR γ* , con desenlace desfavorable en pacientes con peritonitis secundaria no apendicular, con y sin trastornos de la nutrición?

VI. HIPÓTESIS

Los polimorfismos G-2548A del gen *LEP*, A223G del gen *LEPR* y C34G del gen *PPAR γ* , están asociados con un desenlace desfavorable en pacientes con peritonitis secundaria.

VII. OBJETIVOS

7.1 Objetivo General

Determinar si los polimorfismos G-2548A del gen *LEP*, A223G del gen *LEPR* y C34G del gen *PPAR γ* , son factores genéticos de riesgo para un desenlace desfavorable en peritonitis secundaria.

7.2 Objetivos Específicos

- Identificar los polimorfismos G-2548A del gen *LEP*, A223G del gen *LEPR* y el C34G del gen *PPAR γ* , en pacientes con peritonitis secundaria.
- Describir las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en la población estudiada según su desenlace (favorable o desfavorable).
- Describir las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en la población estudiada según su estado nutricional (con y sin trastornos de la nutrición).

- Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en la población estudiada según su desenlace (favorable o desfavorable).
- Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en la población estudiada según su estado nutricional (con y sin trastornos de la nutrición).
- Estimar el riesgo de asociación de cada polimorfismo.
- Evaluar cuantos de los pacientes con desenlace desfavorable o favorable presentan trastornos nutricionales.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Diseño Metodológico

Cohorte prospectiva.

8.1.2 Grupos de Estudio

Sobrevivientes y desenlace desfavorable (En ambos grupos se identificara el estado nutricional).

8.1.3 Tamaño de la muestra

Se incluyeron 75 pacientes del servicio de cirugía general, del Hospital General de Durango, SSA con peritonitis secundaria no apendicular, confirmada quirúrgicamente.

8.2 Criterios de Selección

8.2.1 Criterios de Inclusión

- Pacientes con peritonitis secundaria no apendicular confirmada quirúrgicamente del 1° de Enero de 2009 al 30 septiembre de 2010.
- Hombres y mujeres mayores de 18años.

8.2.2 Criterios de Exclusión

- Pacientes con peritonitis apendicular.
- Pacientes con peritonitis pancreática.
- Mujeres embarazadas.
- Pacientes con enfermedades adrenales, hipofisarias.
- Pacientes con uso crónico de cortico esteroides
- Pacientes bajo tratamiento inmunosupresor.
- Pacientes con antecedentes quirúrgicos abdominales.

8.2.3 Criterios de Eliminación

- Muestra contaminada.
- Muestra que por errores en la manipulación se pierda y que no sea posible su recuperación.
- Que el paciente decida retirarse del estudio.

8.3 Variables

8.3.1 Variable Independiente

Polimorfismos G-2548A del gen *LEP*, A223G del gen *LEPR* y C34G del gen *PPAR γ*

Tipo de Variable: Cualitativa nominal

Definición: Se define como polimorfismo a la presencia de por lo menos un alelo el cual es diferente a la secuencia silvestre o considerada normal, a este cambio se le denomina polimórfico cuando se presenta en más del 1% de la población y que no representa enfermedad, aun cuando puede estar asociada a esta.

8.3.2 Variable Dependiente

Desenlace desfavorable (muerte)

Tipo de Variable: Nominal dicotómica

Definición: Se considera desenlace desfavorable a la presencia de muerte, entendido como ausencia de constantes vitales (pulso, presión arterial, respiración y frecuencia cardiaca) medida por médico la cual ocurra posterior al acto quirúrgico y dentro de los 30 días de seguimiento.

8.3.3 Variable Confusora

Obesidad

Tipo de Variable: variable cuantitativa continua

Definición: De acuerdo a la fórmula de Quetelet para el índice de masa corporal (IMC); se consideró peso normal al IMC de 18.5-24.9 kg/m², sobrepeso al presentar un IMC de 25-29.9 kg/m² y obesidad al IMC igual o mayor de 30 kg/m² (49).

8.3.4 Variables Intervinientes

Bajo peso.

Tipo de variable: Cuantitativa continúa.

Definición: Se considera bajo peso a un IMC menor a 18.49 kgs/mts².

Edad

Tipo de Variable: variable cuantitativa discreta

Definición: Para realizar el cálculo de los años; se restó de la fecha actual su fecha de nacimiento.

Género

Tipo de Variable: variable cualitativa dicotómica

Definición: Hombre o Mujer.

8.4 Procedimientos.

Si el paciente fue intervenido del abdomen, de urgencia, con datos de irritación peritoneal y durante el acto quirúrgico se encuentra líquido de irritación peritoneal, se cultivará dicho líquido.

Una vez egresado el paciente de quirófano, se requirió el IPM, mediante el uso del anexo A y C, aplicados por el cirujano que realizó la intervención.

Si el paciente cumple con los criterios de inclusión y de exclusión, se le invitara a ser parte del estudio, si acepta se le dará a conocer y explicara el consentimiento informado por el médico a cargo (Anexo B).

Una vez obtenido su consentimiento en un intervalo de 18 a 24hrs, posteriores a el acto quirúrgico, se procede a recolectar dos muestras de sangre total, en tubo Vacutainer por medico responsable, una para determinación de citoquinas (IL-6, IL-10, proteína C reactiva, leptina, TNF α), sin anticoagulante, la determinación de citoquinas se realizo mediante inmuno-ensayo enzimático. Una con EDTA para extracción de ADN.

Todos los datos se recolectaron en una hoja de cálculo Excel donde se concentro toda la información para su posterior análisis.

Todos los pacientes serán seguidos por 30 días para determinar desenlace desfavorable (muerte).

Extracción de ADN

1. Se realizó extracción de ADN a partir de sangre total por el método DTAB/CTAB (Gustincich, 1991). Anexo 1.
2. Posteriormente se amplificaron los genes *PPAR γ* , *LEP* y *LEPR*
 - a. Para la identificación del polimorfismo C34G del gen *PPAR γ* , se realizó la técnica de SM-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa específica para mutación) utilizando los siguientes iniciadores:
 - i. P1 5'- GTG TAT CAG TGA AGG AAT CGC TTT CTT G -3'
 - ii. P2 5' – TTG TGA TAT GTT TGC AGA CAA GGT ATC AGT GAA GGA ATC GCT TTG TGC – 3'
 - iii. P3 5' – TTT CTG TGT TTA TTC CCA TCT CTC CC – 3'

iv. Las condiciones de amplificación fueron:

1. Reactivos	Concentración	μL/Rx
2. Buffer	5x	5
3. dNTP'S	10pM	1
4. P1	10pM	1
5. P2	10pM	1
6. P3	10pM	1
7. Taq polimerasa	5U	0.4
8. ADN	100ng/μL	1
9. Agua		12.6
10. MgCl₂	25mM	2
Total		25

v. Siguiendo el siguiente programa de amplificación:

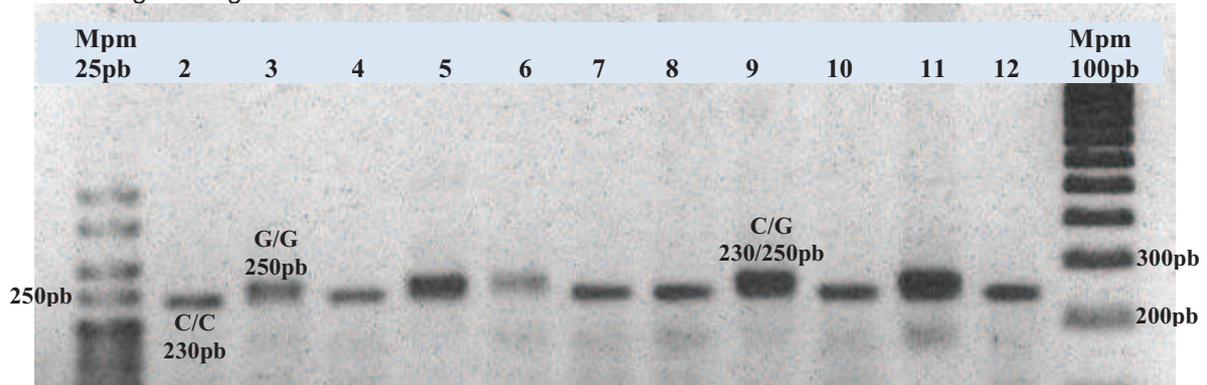
1. Desnaturalización inicial	94°C por 3 minutos	
2. Desnaturalización	94°C por 45 segundos	} 35 ciclos
3. Alineación	62°C por 45 segundos	
4. Extensión	72°C por 45 segundos	
5. Extensión final	72°C por 3 segundos	

vi. La obtención del fragmento génico mediante SM-PCR se realizó utilizando el termociclador de gradiente TECHENE TC-3000

1. Productos esperados: 230pb – Alelo C (Pro)
250pb – Alelo G (Ala)

vii. Posterior a la amplificación por SM-PCR, se identificaron los fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio (fig. 1).

Figura1. Identificación del polimorfismo C34G del gen *PPAR γ* mediante los productos de SM-PCR en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio



Carriles 2, 4, 7, 8, 10, 12 homocigoto silvestre. Carriles 3, 5, 6, Heterocigoto mutado. Carriles 9, 11, homocigoto mutado.

- b. Para la identificación del polimorfismo G-2548A del gen *LEP*, se realizó la técnica de PCR punto final utilizando los siguientes iniciadores:

- i. Sentido 5' TTTCTGTAAATTTCCCGTGAG 3'
- ii. Antisentido 5' AAAGCAAAGACAGGCATAAAAA 3'
- iii. Las condiciones de amplificación fueron:

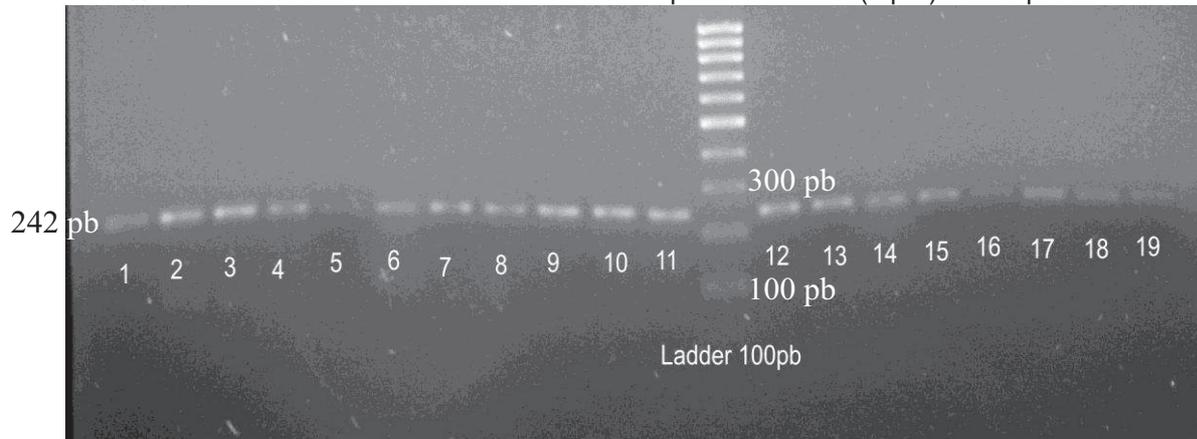
Reactivo	Concentración	$\mu\text{L/Rx}$
1. Buffer	10x	2.5
2. dNTP'S	250mM	1
3. Primer Sen	10pM	1
4. Primer Ant	10pM	1
5. Taq Polimerasa	1U	1.2
6. ADN	100ng	2
7. Agua		16.05
8. MgCl_2	30mM	1.25
Total		25

- iv. Siguiendo el siguiente programa de amplificación:

1. Desnaturalización	95°C por 5 minutos	} 30 ciclos
2. Desnaturalización	94°C por 1 minuto	
3. Alineación	58°C por 1 minuto	
4. Extensión	72°C por 1 minuto	
5. Extensión final	72°C por 5 minutos	

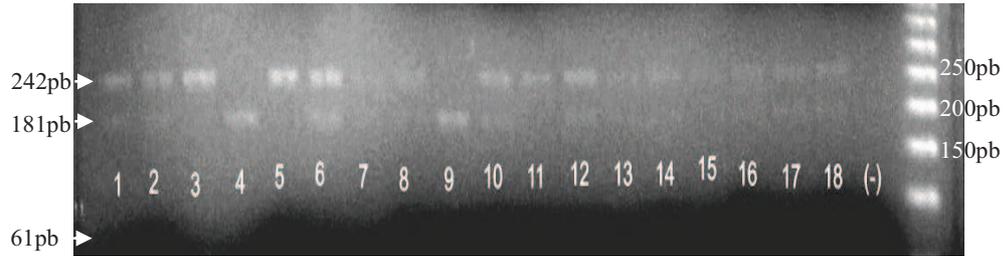
- v. La obtención del fragmento génico mediante PCR punto final se realizó utilizando el termociclador Applied Biosystems 9600 buscando obtener un producto amplificado de 242 pb y sin evidencia de bandas inespecíficas en la electroforesis la cual se realizó en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio (fig. 2).

Figura 2. Fragmento del gen *LEP* amplificado mediante PCR y evidenciado en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular (Mpm) de 100pb.



- vi. Posteriormente se realizó digestión enzimática con la enzima *Cfo* I para identificar mediante *RFLP* los polimorfismos buscados :
1. Secuencia polimórfica 242 pb (G)
 2. Secuencia silvestre 181 y 61 pb (A)
- vii. Los fragmentos esperados se visualizaron mediante geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de Etidio (fig. 3).

Figura 3. Identificación del polimorfismo G-2548A del gen *LEP* mediante la técnica de RFLP y evidenciado por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio.



Carriles 1, 2, 6-8, 10, 12-14 y 17-18 muestras heterocigotas. Carriles 3, 5, 11, 15 y 16 muestras homocigotas mutadas. Carriles 4 y 9 muestras homocigotas silvestres, carril 19 control negativo y carril 20 Mpm de 50 pb.

- c. Para la identificación del polimorfismo A223G del gen *LEPR*, se realizó la técnica de PCR punto final utilizando los siguientes iniciadores:

- i. Sentido 5' AA ACTCAACGACACTCTCCT 3'
- ii. Antisentido 5' TGA ACTGACATTAGAGGTGAC 3'
- iii. Las condiciones de amplificación fueron:

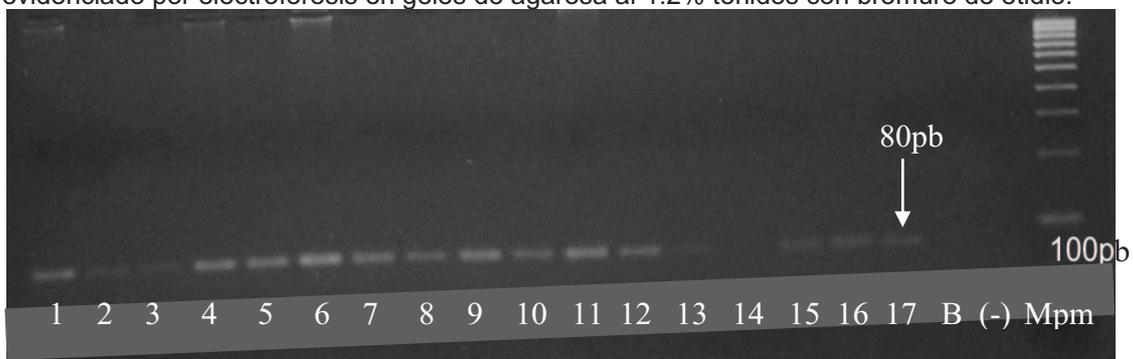
	Reactivo	Concentración	µL/Rx
1.	Buffer	10X	1.3
2.	dNTP'S	250mM	1
3.	Primer Sen	10pM	0.8
4.	Primer Ant	10pM	0.8
5.	Taq Polimerasa	1U	0.1
6.	ADN	100ng	4
7.	MgCl₂	30Mm	4
8.	Agua		13.0
	Total		25

- iv. Siguiendo el siguiente programa de amplificación.

1.	Desnaturalización	94°C	por 5 minutos	} 32 ciclos
2.	Desnaturalización	94°C	por 1 minuto	
3.	Alineación	50°C	por 45 segundos	
4.	Extensión	72°C	por 30 segundos	
5.	Extensión final	72°C	por 7 minutos	

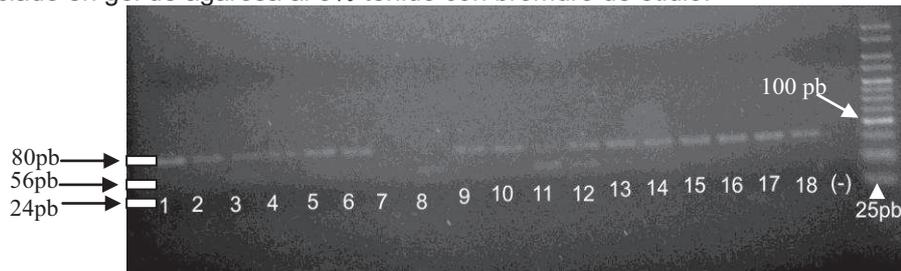
- v. La obtención del fragmento génico mediante PCR punto final se realizó utilizando el termociclador Applied Biosystems 9600, se amplificaron las muestras buscando obtener un producto de 80pb y sin evidencia de bandas inespecíficas (fig.4).

Figura 4. Fragmento del gen *LEPR* obtenido por amplificación mediante PCR de punto final evidenciado por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% teñidos con bromuro de etidio.



- vi. Posteriormente se realizó digestión enzimática con *Msp I* para identificar mediante RFLP el polimorfismo buscado:
1. Secuencia polimórfica: 80pb (A)
 2. Secuencia silvestre: 56 y 24 pb(G)
- vii. Posterior a la amplificación con PCR punto final y digestión enzimática, se identificaron los fragmentos buscados mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio, con un corrimiento a 100 v por 60 minutos. Posteriormente se revisaron en cámara de luz UV (Fig. 5).

Fig.5 Identificación del polimorfismo A223G del gen *LEPR* mediante la técnica de RFLP evidenciado en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio.



En los carriles 1, 2, 4, 6, 9, 10, 14, 15, 16, 17 se identifica al homocigoto silvestre (G), en los carriles 8 y 11 se identifica el homocigoto mutado, en los carriles 3,12, 13, heterocigoto. En el carril 19 control negativo y carril 20 Mpm de 25pb.

8.5 Análisis Estadístico.

1. Se utilizó el software STATISTICA 7
2. Las variables cualitativas fueron calculadas con la prueba de *Ji cuadrada*.
3. Se determinó diferencia estadísticamente significativa con un intervalo de confianza (IC) del 95% y una $p < 0.05$.
4. Para medir la fuerza de asociación, se realizó razón de momios.
5. Se realizó el equilibrio de Hardy-Weinberg.

IX. RESULTADOS

Se captaron 75 pacientes con una edad promedio del grupo de hombres sobrevivientes fue de 43 años ($Ds \pm 19.5$) y para las mujeres de 55 años ($Ds \pm 20.25$). Un IMC ($24.20_{\text{♀}} Ds \pm 3.67$ y $23.6_{\text{♂}} Ds \pm 4.09$). Con un peso promedio para los hombres de 72kgs ($Ds \pm 10.68$) y de 66kgs ($Ds \pm 8.04$) para las mujeres sobrevivientes. De los 75 pacientes, 22 fallecieron y 53 sobrevivieron.

De los 22 pacientes que fallecieron 5(1♂ y 4♀) tuvieron obesidad, que representan el 22.8% y sobrevivieron 53, de estos 12♂ y 11♀ presentaron obesidad o sobrepeso, que representan 43.4%.

Para el polimorfismo G-2548A del gen *LEP*, existe predominio en la frecuencia alélica del alelo mutado (A) el cual corresponde a un 19.4% del grupo de desenlace desfavorable, comparado con el 10% del alelo silvestre (G). En el grupo de sobrevida se observó una frecuencia alélica mayor para el alelo silvestre, correspondiente a un 43.3%. Con una diferencia estadísticamente significativa, ($p= 0.021$) para el grupo de desenlace desfavorable (Tabla 1).

Tabla.1 Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo G-2548A del gen *LEP* comparando los dos grupos de estudio.

	<i>LEP G-2548A</i>						Comparación de frecuencias genotípicas
	Frecuencia Genotípica n (%)			Frecuencia Alélica n (%)			
	GG	GA	AA	G	A		
Sobrevida	22 (29.3)	21 (28)	10 (13.15)	43.3	27.3	$\chi^2= 7.750$	
Desenlace desfavorable	3 (4)	9 (11.84)	10 (13.15)	10	19.4	$p= 0.021$	
	n= 75			Alelos= 150			
	$FG= p^2 + \frac{1}{2} 2pq$			$FA= (2xAA + Aa) / 2n$			

No se observan diferencias estadísticamente significativas que permitan asociar el polimorfismo G-2548A con trastornos de la nutrición, considerando tanto genotipos como alelos $p < 0.938$ (tabla 2).

Tabla 2. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo G-2548A del gen *LEP* comparando variables analizadas.

	Frecuencia Genotípica n (%)			Frecuencia Alélica n (%)		Comparación frecuencias genotípicas	
	G/G	G/A	A/A	G	A	X ²	p
STN	15 (20)	19 (25.3)	13 (17.3)	32.7	30	X ² = 0.128	p=0.938
CTN	10 (13.3)	11 (14.7)	7 (9.4)	20.7	16.6		
IPM >22	12(16)	8(10.7)	13 (17.3)	21.3	22.7	X ² = 5.235	p=0.073
IPM ≤22	18(24)	17(22.7)	7 (9.3)	35.3	20.7		
Leucos >13.83	17(22.7)	9(12)	9(12)	28.7	18.0	X ² =0.760	p= 0.684
Leucos ≤13.83	13(17.3)	16(21.3)	11(14.7)	28.0	25.3		
Con complicaciones	10(13.3)	5(6.7)	11(14.7)	17.4	18.7	X ² = 6.723	p=0.035
Sin complicaciones	18(24)	20(26.7)	8(10.7)	38.9	25.0		

STN= Sin trastornos de la nutrición. CTN= Con Trastornos de la nutrición. IPM= Índice de Peritonitis de Mannheim

Para el polimorfismo G-2548A del gen *LEP*, existe predominio en la frecuencia alélica del alelo mutado (G) el cual corresponde a un 35.3% del grupo de Índice de Peritonitis de Mannheim (IPM) menor o igual de 22, comparado con el 20.7% del alelo silvestre (A) (tabla 2). Aun cuando no hay diferencia significativa $p=0.073$, si se modifica el índice de confianza puede ser significativo.

Se obtuvo un valor de grados de probabilidad de 1.31 lo que representa que IPM está asociado al gen *LEP*.

Considerando los leucos, no se observan diferencias estadísticamente significativas $p<0.684$, sin embargo si se modificara el intervalo de confianza podría ser significativo.

Cuando se consideran las complicaciones, se encuentra frecuencia alélica del 38.9 y con una diferencia significativa a favor del polimorfismo mutado (G) del grupo sin complicaciones, con una $p>0.035$. (Tabla 2)

Efectuando el cálculo para el equilibrio de Hardy-Weinberg (HW), para el polimorfismo G-2548A del gen *LEP*, la chi cuadrada presenta un valor de 2.893 y una $p=0.235$ mostrando que esta población está en equilibrio (Tabla 3).

Tabla.3 Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg considerando cada uno de los polimorfismos analizados.

	p	q	p ²	2pq	q ²	Eq. H-W	X ²	P
LEP G-2548A	0.533	0.467	0.284	0.467	0.218	1	2.893	0.235
LEPR A223G	0.56	0.44	0.386	0.347	0.267	1	6.95	0.036
PPAR γ C34G	0.526	0.474	0.276676	0.498648	0.224676	1	8.236	0.016

En el polimorfismo A223G se evidencia una mayor frecuencia del homocigoto silvestre (A/A) en el grupo con sobrevida (44.7), mientras que los genotipos heterocigoto y homocigoto mutado son mayores al homocigoto silvestre en el grupo de desenlace desfavorable con una $p < 0.04$ que se puede asociar como un factor protector (RM= 3.56 Intervalo 0.95-14.55 IC 95%) (Tabla 4).

Tabla.4 Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo A223G del gen LEPR comparando los dos grupos de estudio.

	LEPR A223G					Comparación frecuencias genotípicas
	Frecuencia genotípica n (%)		Frecuencia Alélica n (%)			
	AA	GA	GG	A		
Sobrevida	25 (33.3)	17(22.7)	11(14.7)	44.7	26	X ² = 6.097
Desenlace desfavorable	4 (5.3)	9 (12)	9 (12)	11.3	18	p= 0.04
	n=75			Alelos 150		

El polimorfismo A223G del gen LEPR, tampoco presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al estado nutricional $p < 0.543$ (Tabla 5).

Tabla.5 Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo A223G del gen LEPR comparando variables analizadas.

	Polimorfismo A223G del gen LEPR					Comparación frecuencias genotípicas	
	Frecuencia Genotípica n (%)			Frecuencia Alélica n (%)		X ²	p
	A/A	G/A	G/G	A	G		
STN	13 (17.3)	18 (24)	16 (21.3)	29.3	33.3	X ² =1.222	p=0.543
CTN	7 (9.4)	8 (10.7)	13 (17.3)	14.7	22.7		
IPM >22	8 (10.7)	11 (14.7)	14 (18.7)	20.0	24.0	X ² =5.176	p=0.075
IPM <0=22	21(28)	9(12)	12(16)	36.0	20.0		
Leucos >13.83	15(20)	10(13.3)	10(13.3)	26.7	20.0	X ² =0.375	p=0.829
Leucos <=13.86	14(18.7)	10(13.3)	16(21.3)	29.3	24.0		
Con complicaciones	6(8)	11(14.7)	9(12)	14.0	20.7	X ² =5.351	p=0.069
Sin complicaciones	21(28)	9(12)	16(21.3)	38.7	22.7		

STN= Sin trastornos de la nutrición. CTN= Con Trastornos de la nutrición. IPM= Índice de Peritonitis de Mannheim

Considerando el IPM no se observa una diferencia estadísticamente significativa, sin embargo si se modificara el índice de confianza, podría ser significativo con una $p < 0.075$ (Tabla 5).

Analizando los leucos, no se observa una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.829$ (Tabla 5).

El grupo de complicaciones no se observa una diferencia estadísticamente significativa $p < 0.069$, sin embargo si se bajara el índice de confianza a un 90%, sería significativa (tabla 5).

El análisis del equilibrio de HW para el polimorfismo A223G del gen *LEPR* con una chi cuadrada con un valor de 6.95 con un valor de $p = 0.036$ mostro que esta población está en equilibrio (Tabla 3)

Con respecto al polimorfismo C34G del gen *PPAR γ* , no se evidencian diferencias estadísticamente significativas, considerando tanto las frecuencias genotípicas y alélicas, siendo predominante el alelo silvestre (C) en el grupo de sobrevida $p < 0.30$ (Tabla 6).

Tabla.6 Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C34G del gen *PPAR γ* comparando los dos grupos de estudio.

	<i>Polimorfismo PPARγ del gen C34G</i>					Comparación Frecuencias Genotípicas
	Frecuencia Genotípica n (%)			Frecuencia Alélica n (%)		
	C/C	C/G	G/G	C	G	
Sobrevida	22 (29.3)	16 (21.3)	15 (20)	40	30.7	$\chi^2 = 2.389$
Desenlace desfavorable	5 (6.7)	9 (12)	8 (10.7)	12.6	16.7	$p = 0.30$
	n=75			Alelos= 150		

Estratificando por el estado nutricional, no se evidencia diferencia estadísticamente significativa que permita asociar al polimorfismo C34G del gen *PPAR γ* con alguno de los grupos $p < 0.624$ (con trastornos de la nutrición y sin trastornos de la nutrición) (Tabla 7).

Tabla.7 Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C34G del gen *PPAR γ* comparando variables analizadas.

	polimorfismo C34G del gen <i>PPARγ</i>						Comparación frecuencias genotípicas	
	Frecuencia Genotípica n (%)			Frecuencia Alélica n (%)			X ²	p
	C/C	C/G	G/G	C	G			
STN	17 (22.7)	14 (18.7)	16 (21.3)	32.0	30.7			
CT N	11 (14.7)	10 (13.3)	7 (9.3)	21.3	16.0	X ² =0.944	P=0.624	
IPM >22	11 (14.7)	10 (13.3)	12 (16)	21.3	26.7			
IPM <0=22	16 (21.3)	15 (20)	11 (14.7)	31.3	24.7	X ² =0.902	P=0.637	
Leucos >13.83	11(14.7)	11(14.7)	13(17.3)	22.0	24.7			
Leucos <=13.86	12(16)	14(18.7)	14(18.7)	24.0	28.0	X ² =0.404	P=0.817	
Con complicaciones	10(13.8)	10 (13.8)	6(8.3)	15.5	21.3			
Sin complicaciones	12(16.7)	14(19.4)	20(27.8)	38.0	25.4	X ² =3.068	P=0.216	

STN= Sin trastornos de la nutrición. CTN= Con Trastornos de la nutrición. IPM= Índice de Peritonitis de Mannheim

Tampoco se encuentran diferencias estadísticamente significativas en los grupos de IPM, en ningún grupo $p < 0.637$ (Tabla 6).

Comparando el grupo de leucos no se observan diferencias estadísticamente significativas $p < 0.817$ (tabla 6).

Analizando el grupo de complicaciones no se observan diferencias significativas con un valor de $p = 0.216$

La chi cuadrada del equilibrio de Hardy- Weinberg (HW) para el polimorfismo C34G del gen *PPAR γ* , con un valor de 8.236 con un valor de $p = 0.016$ mostro que esta población está en equilibrio (Tabla 3).

Realizando el análisis de riesgos mediante el modelo de razón de momios, se observa que el alelo mutado A del polimorfismo G-2548A del gen *LEP* representa 4.64 veces más riesgo de desenlace desfavorable con respecto a los individuos que presentan el alelo silvestre (G).

Con respecto al polimorfismo A223G del gen *LEPR*, la presencia del alelo mutado (G), sugiere la posibilidad de un factor protector 3.5 veces, sin embargo el intervalo de confianza no es definitivo. El polimorfismo C34G del gen *PPAR γ* no representa un factor de riesgo para desenlace desfavorable (Tabla 8).

Tabla 8. Estimación de riesgos mediante Razón de momios (R.M.), para los alelos mutados especificando intervalo de confianza y diferencia estadística.

			R.M.	I.C. 95%	p
<i>LEP</i>	-2548	A	4.64	1.1-22.61	<0.05
<i>LEPR</i>	223	G	3.56	0.95-14.55	<0.05
<i>PPARγ</i>	34	G	1.71	0.63-4.65	<0.05

Se realizó un análisis con las variables bioquímicas, sin embargo y dado que no todos los pacientes poseen las mediciones correspondientes, hay que interpretarlos con cautela. Se evidencia que los polimorfismos genéticos de los tres genes estudiados (*LEP*, *LEPR*, y *PPAR γ*) cuando se comparan contra sobrevida, mediante una tabla ANOVA, no presentan diferencias, significativas.

Cuando se comparan las citocinas proinflamatorias con sobrevida, se encuentra una diferencia estadísticamente significativa a favor de la RCP, en ambos grupos de estudio (sobrevida y desenlace desfavorable) con una $p < 0.05$ para hombres y mujeres (Tabla 9).

Tabla 9. Diferencias entre las interleucinas, TNF, RCP y leptina en ambos grupos, comparadas por género.

	Hombres con sobrevida Media \pm DS	Hombres con desenlace desfavorable Media \pm DS	Mujeres con sobrevida Media \pm DS	Mujeres con desenlace desfavorable Media \pm DS
Leptina	1.5 \pm 2.4	1.7 \pm 2.6	16.6 \pm 15.1	3.7 \pm 3.9
IL-10	12.0 \pm 14.6	12.8 \pm 3.8	11.1 \pm 11.2	25.4 \pm 49.3
IL-6	7.3 \pm 3.2	8.9 \pm 3.1	9.9 \pm 1.6	9.2 \pm 2.4
IL-13	17.9 \pm 14.2	26.7 \pm 22.6	9.8 \pm 14.2	12.2 \pm 17.6
TNF	19.1 \pm 15.5	26.1 \pm 16.7	21.0 \pm 12.2	27.4 \pm 6.9
PCR	172.2 \pm 14.8	140.2 \pm 80.9	129.8 \pm 68.6	169.7 \pm 17.3

X. DISCUSIÓN

El polimorfismo G-2548A del gen de leptina y el polimorfismo A223G del gen del receptor de leptina, se han asociado con un mayor riesgo de Diabetes tipo 2 y obesidad (Sida, 2009; Meyers, 2010; Hinuy, 2010) al igual que el *PPAR γ* (Parachí, 2005; Gracia, 2009), sin embargo para el estado de respuesta inflamatoria aguda, como es el caso de la peritonitis, hay poca evidencia de su asociación.

En el presente estudio se encontró asociación del polimorfismo G-2548A del gen *LEP* con desenlace desfavorable (R.M.=4.64; IC 95%=1.1 - 22.61), Mientras que los polimorfismos A223G del gen *LEPR* y el C34G del gen *PPAR γ* hay que tomarlos con cautela dado que cuentan con un intervalo de confianza que involucra la unidad (*LEPR* R.M.=3.56; IC 95%=0.95 – 14.55. *PPAR γ* R.M.=1.71; IC 95%=0.63 – 4.65), asociando la presencia del alelo silvestre como un factor protector. Estos hallazgos están de acuerdo con que la leptina juega un papel preponderante en la respuesta inflamatoria, dado que la leptina es sintetizada y secretada principalmente por el tejido adiposo, para ejercer una función autocrina, paracrina y endocrina en toda la economía, tanto a nivel local como sistémico, además de ser regulada por el sistema nervioso central, donde existen gran cantidad de receptores (Tschöp, 2010; Neng, 2010).

Analizando las variables bioquímicas, mediante un análisis ANOVA, se evidencia que hay diferencia significativa solo para RCP, cuando se contrasta con las otras citocinas (IL-6, IL-10, FNT). Se ha demostrado que el tejido adiposo secreta y sintetiza citoquinas que regula la respuesta inflamatoria ejerciendo su función sobre los linfocitos y monocitos, activándolos en la respuesta inflamatoria, además de controlar la secreción de leptina y su receptor a nivel local en el caso de peritonitis inducida y aguda (Neng, 2010).

Los trastornos de la nutrición en el grupo de hombres sobrevivientes fueron 32, de estos 12 presentaron obesidad (37.5%), en el grupo de mujeres sobrevivientes fueron 21 y de estas 11 presentaron obesidad (52.3 %).

Cuándo se contrastan los polimorfismos de los genes *LEP*, *LEPR* y *PPAR γ* con el estado nutricional, no se observan diferencias estadísticamente significativas. Quizás esto se debió a que no obtuvimos de todos los pacientes las variables bioquímicas.

Con respecto al análisis de asociación considerando el IPM y la presencia del polimorfismo G-2548A del gen *LEP*, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con sobrepeso y los que presentaron desenlace desfavorable.

Efectuando el análisis de asociación con relación a la presencia de complicaciones la presencia del polimorfismo G-2548A del gen *LEP* se evidencia una diferencia estadísticamente significativa asociándose la presencia del alelo mutado a favor del grupo sin complicaciones.

Los polimorfismos A223G del gen *LEPR* y C34G del gen *PPAR γ* con respecto al IPM no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

El equilibrio de HW mostró que los genes de estudio, *LEP*, *LEPR* y *PPAR γ* , se encuentran en equilibrio y por tanto son comparables.

XI. CONCLUSIONES

El alelo mutado A del polimorfismo G-2548A del gen *LEP* representa 4.64 veces más riesgo de desenlace desfavorable en presencia de peritonitis secundaria no apendicular. Dado que la leptina interviene en la respuesta inmune sistémica, y niveles bajos de leptina se asocian con un peor pronóstico (Bracho, 2008; Tschop, 2010). Además se ha reportado que pacientes con déficit congénito de leptina, son propensos a infecciones (Tschop, 2010). Dado que la leptina contribuye a la modulación del infiltrado celular y producción de citoquinas en la peritonitis inducida (Pini, 2008)

En polimorfismo A223G del receptor de leptina representa un factor protector relativo (R.M= 2.72; p=0.04) asociándose a sobrevida, cuando está presente el alelo silvestre (A) sin embargo el intervalo de confianza no es definitivo.

El polimorfismo C34G del gen *PPAR γ* no representa un factor de riesgo para el desenlace desfavorable.

XII. SUGERENCIAS PARA ESTUDIOS POSTERIORES

Realizar estudios de expresión génica involucrados en la respuesta inflamatoria aguda y crónica, considerando precursores y efectores de citocinas y prohormonas estimuladoras de la cascada de señalización como son Jack-STAT, TNF y proteína C reactiva.

XIII. AGRADECIMIENTOS

Agradezco al IPN CIIDIR unidad Durango, y al Hospital General de Durango, SSA, instituciones que hicieron posible la realización del presente trabajo de tesis.

XIV. BIBLIOGRAFÍA

Ajaz, AM. Khurshid, AW. Latif, AD. Mehmood, AW. Rauf, AW. Fazl, QP. 2010. Mannheim Peritonitis Index and APACHEII – Prediction of outcome in patients with peritonitis. *Ulus Trayma Acil Cerrahi Derg.*16, pp. 27-32

Bendlova, B. Vejrazkova, D. Vcelak, J. Lukasova, P. Burkonova, D. Kunesova, M. Vrbikova, J. Dvorakova, K. Vondra, K. Vankova, M. 2008. PPAR γ 2 Pro12Ala Polymorphism in Relation to Free Fatty Acids Concentration and Composition in Lean Healthy Czech Individuals with and without Family History of Diabetes Type 2. *Physiol.Res.* 57 Suppl 1. Pp 77-90

Bracho, RR. Melero, VA. Torres, RA. 2002. Mannheim Peritonitis Index Validation Study at The Hospital General Durango (México) *Cir Ciruj* 70, pp. 217-225

Celmo, CP. 1999. *Semiología médica* (3rd ed.), McGraw-Hill Interamericana, México, DF, MÉXICO, pp. 613-615

Copeland, GP. Jones, D. Walters, M. 1991. POSSUM: a scoring system for surgical audit. *Br J Surg.* 78, pp. 355-360.

Dixit, DV. 2008. Adipose – immune interactions during obesity and caloric restriction: reciprocal mechanisms regulating immunity and health span. *J. Leukoc. Biol.* 84, pp. 882-892

Fraccalvieri, D. and Biondo, S. 2009. Índices pronósticos de mortalidad postoperatoria en la peritonitis del colon izquierdo. *Cir Es* 86, pp. 272-277

Frühbeck, G. 2006. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem. J* 393, pp. 7-20.

Gallicchio, L. Chang, HH. Christo, DK. Thuita, L. Huang, HY. Stricklanda, P. Ruczinski, I. Clipp, S. Helzlsouer, K. 2009. Single nucleotide polymorphisms in obesity-related genes and all-cause and cause-specific mortality: a prospective cohort study. BMC Medical Genetics. 10 pp

Garcia, BT. Pelask, SA. Baglole, CJ. Maggirwar, SB. Bernstein, SH. Phipps, RP. 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma overexpression and knockdown: Impact on human B cell lymphoma proliferation and survival. Cancer Immunol Immunother

Gomollón, F. 2004. Medicina interna Farreras. Elsevier. ESPAÑA. pp. 283-288.

Gustincich, S. Manfidetti, G. Del sal, G. Schneider, C. Carnici, P. 1991. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. Biotechniques. 11, pp. 298-300

Guyton & hall. 2006. Tratado de fisiología médica. Elsevier, España, pp. 598-609.

Hinuy, HM. Hirat, MH. Sampaio, MF. Armagannijan, D. Arazi, SS. Salazar, LA. Hirata, RDC. 2010. Relationship between variants of the leptin gene and obesity and metabolic biomarkers in Brazilian individuals. Arq Bras Endocrinol Metab.54, pp. 282-288.

Huaman, MM.1999.

http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/libros/Medicina/cirugia/Tomo_I/Cap_12_Peritonitis.htm. Peritonitis. Consultado el 2 de junio de 2011.

Latarjet, RL. 2008. Anatomía Humana. Medica Panamericana. ARGENTINA, pp. 1333-1338.

Meirhaeghe, A. Fajas, L. Helbecque, N. Cottel, D. Lebel, P. Dallongeville, J. Deeb, S. Auwerx, J. Amouyel, P. 1998. A genetic polymorphism of the peroxisoma proliferator-activated receptor γ gene influences plasma leptin levels in obese humans. Human Molecular Genetics 7, pp. 435-440.

Myers, MGJr. 2010. Outstanding Scientific Achievement Award Lecture 2010:Deconstructing Leptin: From Signals to Circuits. DIABETES. 59, pp 2708–2714

Neng, KL. Leung, JCK. 2010. Peritoneal Adipocytes and Their Role in Inflammation during Peritoneal Dialysis. Hindawi Publishing Corporation. pp 1-10

O'rouke, RW. 2009. Molecular Mechanisms of Obesity and Diabetes: At the intersection of Weight Regulation, Inflammation, and Glucose Homeostasis. World J Surg. 33, pp.2007-13

Oreste, G. 2010. Mediators of Inflammation in Obesity and Its Comorbidities. Editorial. Hindawi Publishing Corporation.

Otero, M. Lago, R. Lago, F. Casanueva, FF. Dieguez, C. Gomez, RJ. Oreste, G. 2005. Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. FEBS Letters. 579, pp. 295-301.

Paracchini, V. Pedotti, P. Taioli, E. 2005. Genetics of Leptin and Obesity: A HuGe Review. Am J Epidemiol. 162, pp. 101-114.

Pini, M. Gove, ME. Sennello, JA. Van Baal, JWPM. Chan, L. Fantuzzi, G. 2008. Role and Regulation of Adipokines during Zymosan-Induced Peritoneal Inflammation in Mice.

Ragin, CC. Dallal, C. Okobia, M. Modugno, F. Chen, J. Garte, S. Taioli, E. 2009. Leptin levels and leptin receptor polymorphism frequency in healthy populations. Infectious Agents and Cancer. 4(suppl 1).

Sida, MR. 2010. Asociación de los polimorfismos G-2548A y A223G en el gen de leptina y su receptor con Diabetes tipo 2 en la ciudad de Durango. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR. Durango, Mexico. Pp 17

Swarbick, MM. Chapman, C. McQuillan, BM. Hung, J. Thompson, PL. Beilby, JP. 2001. A Pro12Ala polymorphism in the human peroxisoma proliferator-activated receptor-g2 is associated with combined hyperlipidaemia in obesity. *European Journal of Endocrinology*. 144, pp. 277-282

Tschöp, J. Nogueiras, R. Haas-Lockie, S. Kasten, K. Castañeda, RT. Huber, N. Guanciale, K. Perez, TD. Habegger, K. Ottaway, N. Woods, SC. Oldfield, B. Clarke, L. Chua, S. Farroqui, IS. O’Rahily, S. Caldwell, CC. Tschöp, M. 2010. CNS leptin action modulates immune response and survival in sepsis. *J neurosci*. 30 pp 6036-6047

Várkonyi, T. Lázár, L. Molvarec, A. Gábor, N. János, Tjr. Nagy, B. 2010. Leptin receptor(LEPR) SNP polymorphisms in HELLP syndrome patients determined by quantitative real-time PCR and melting curve analysis. *BCM*.11, pp.25

Wacha, H. Linder, MM. Feldman, U. Wesch, G. Gundlach, E. Steifensand, RA. 1987. Mannheim peritonitis index prediction of risk of death from peritonitis: construction of statistical and validation of an empirically based index. *Theoretical Surgery*. 1 pp 169-77

Ye J, Keller JN. 2010. Regulation of energy metabolism by inflammation: A feedback response in obesity and calorie restriction. *AGING*. 6, pp. 361-368.

XV. ANEXOS

Anexo 1

Extracción de ADN a partir de sangre total por el método DTAB/CTAB

S. Gustincich, G. Manfredetti, G. Del Sal, C. Schneider and P. Carninci. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*. 1991; 11(3):298-300, 302.

1. Se realiza la extracción de ADN tomando a partir de 300 μ L de la sangre obtenida en EDTA (pureza 99% SIGMA-ALDRICH) como anticoagulante en un tubo eppendorf de 2.0 mL, cuidando el no tocar la pared del tubo para evitar la contaminación de la muestra; proceso realizado por duplicado.
2. Posteriormente se agregan 600 μ L de solución de DTAB al 8%, se mezcla suavemente durante 15 minutos, hasta obtener lisis eritrocitaria.
3. Posteriormente se coloca a una temperatura de 68°C con diferencia de 30 segundos entre una y otra por 5 minutos.
4. Se retiran del incubador y se agregan 550 μ L de Cloroformo grado biología molecular. Se agita vigorosamente por 5 minutos.
5. Después se centrifuga a una velocidad de 13,000 rpm por 10 minutos, se decanta recuperando el sobrenadante o fase acuosa en un tubo eppendorf de 1.5 mL con tapa de presión.
6. Se agregan 100 μ L de solución de CTAB y mezclar suavemente.
7. A continuación se adicionan 750 μ L de agua inyectable y se mezclan suavemente.
8. Se deja reposar por 12 minutos a temperatura ambiente.
9. Se centrifuga a 10,000 rpm durante 10 minutos, se decanta con micropipeta hasta dejar 50 μ L del centrifugado.
10. Se agregan 200 μ L de solución NaCl 1.2 M y se agita para soltar el botón de ADN formado.
11. Se agregan 850 μ L de etanol absoluto a una temperatura de -20°C y se mezcla suavemente.
12. Se centrifuga a 10,000 rpm por 5 minutos. Se decanta el líquido, vaciando el contenido del tubo cuidando el botón de ADN obtenido.
13. Se agregan 850 μ L de etanol al 70 % y se agita hasta soltar el botón. Se centrifuga por 5 minutos a 10,000 rpm. Se decanta el líquido de un golpe, cuidando el botón obtenido.
14. Se repiten los lavados con etanol al 70% en dos ocasiones más.
15. A continuación las muestras se someten a un proceso de liofilización para retirar el exceso de etanol que pudiera haber quedado después de decantar.
16. Las muestras liofilizadas, se reconstituyen en 100 μ L de agua inyectable o Ultra-Pure.
17. Las muestras se almacenan a temperaturas entre -1°C y -4°C.

ANEXO A**Identificación de marcadores genéticos asociados a un desenlace desfavorable en pacientes con peritonitis secundaria no apendicular con y sin trastornos de la nutrición.**

HOJA DE RECOLECCIÓN

I. Ficha de identificación:

1. Nombre (apellido paterno, apellido materno, nombre[s]): _____

2. Número de expediente: _____

3. Fecha de Ingreso: día [] mes [] año []

4. Edad en años cumplidos (mínimo 18): _____

5. Domicilio: poblado y municipio _____, calle (#ext e int.) _____, colonia _____

6. Teléfono para contacto futuro: (lada) _____ (#) _____

II. Criterios de exclusión:

7. Antecedente de padecimiento adrenal: si [] no []

8. Antecedente de padecimiento pituitario: si [] no []

9. Antecedente de toma de esteroides (dos últimos meses): si [] no []

10. Antecedente de cirugía abdominal en los dos últimos meses: si [] no []

III. Datos de cirugía:

11. Número de caso (secuencial): _____

12. Fecha y hora de intervención quirúrgica (t=0): día [] mes [] año [] Hora _____

13. Diagnósticos: _____

14. Hallazgos: _____

15. Procedimientos quirúrgicos realizados: _____

IV. Datos nutricionales:

16. Peso (kg): _____

17. Talla (m): _____

18. Índice de masa corporal (kg/m²): _____

19. Proteínas totales (g/dL): _____

20. Albúmina sérica (g/dL): _____

21. Globulinas séricas (g/dL): _____

22. Relación A/G: _____

V. Índice de Peritonitis de Mannheim:

23. Rango de edad: < 50 años -0 pts- [] > 50 años -5 pts- []
 24. Sexo: masculino -0 pts- [] femenino -5 pts-[]
 25. Falla orgánica múltiple: ausente -0 pts- [] presente -7 pts-[]
 26. Malignidad: ausente -0 pts- [] presente -4 pts- []
 27. Evolución preoperatoria < 24 h -0 pts- [] >24 h -4 pts- []
 28. Origen: colónico -0 pts- [] no colónico -6 pts-[]
 29. Extensión de la peritonitis localizada -0 pts- [] generalizada -6 pts- []
 30. Exudado: claro -0 pts- [] purulento -6 pts- [] fecal-12 pts-[]
 31. Total índice de peritonitis de Mannheim -0 a 47 puntos: _____

VI. Niveles plasmáticos de citocinas y proteínas de fase aguda:

32. Concentración sérica de la leptina (pg/mL): _____
 33. Concentración sérica de la IL-6 (pg/mL): _____
 34. Concentración sérica de el TNF (pg/mL): _____
 35. Concentración sérica de la CRP (ug/mL): _____
 36. Concentración sérica de la IL-10 (pg/mL): _____
 37. Concentración sérica de la IL -13 (pg/mL): _____

VII. Laboratorio adicional:

38. Eritrocitos (x 1,000,000): _____
 39. Hemoglobina (g/%): _____
 40. Hematocrito (%): _____
 41. Leucocitos totales (x 1000): _____
 42. Neutrófilos segmentados (%): _____
 43. Neutrófilos en banda(%): _____
 44. Linfocitos (%): _____
 45. Eosinófilos (%): _____
 46. Basófilos (%): _____
 47. Monolitos (%): _____
 48. Plaquetas (x 1000): _____
 49. Bilirrubinas totales (mg/dL): _____
 50. Bilirrubina directa (mg/dL): _____
 51. Bilirrubina indirecta (mg/mL): _____
 52. Tiempo de protombina y actividad (segundos y % act): _____

VIII. Desenlace:

53. Fecha de egreso: día [] mes [] año []
 54. Días de estancia: _____
 55. Reingreso día [] mes [] año []
 56. Complicaciones (inicial o reingreso): sí [] no []
 57. Desarrollar: _____

 58. Sobreviva a 30 días: sí [] no []

REALIZÓ: _____

ANEXO B

CONSENTIMIENTO INFORMADO

NOMBRE DEL ESTUDIO: Identificación de marcadores genéticos asociados a un desenlace desfavorable en pacientes con peritonitis secundaria no apendicular con y sin trastornos de la nutrición.

INVESTIGADORES RESPONSABLES: Dr. Rodolfo Bracho Riquelme
Dra. Verónica Loera Castañeda

TESISTA: Dr. Alejo Macías Salas

Esta forma de consentimiento pudiera contener palabras que usted no entienda. Por favor, pregunte al doctor o a un miembro del equipo del estudio que le expliquen las palabras o información que no entienda claramente.

INTRODUCCIÓN: El propósito de esta forma de consentimiento es darle información para que pueda decidir si quiere proporcionar una muestra(s) de sangre y los datos que se le piden. Esta muestra de sangre se utilizará en investigación genética que se explicará en seguida. La participación en esta investigación es voluntaria.

ANTECEDENTES: La peritonitis es una complicación grave de muchos problemas abdominales. La peritonitis severa puede llevar al paciente a la muerte. La causa de las complicaciones de la peritonitis es que la respuesta inflamatoria del paciente es inadecuada, ya sea insuficiente o excesiva. Las citocinas son sustancias del propio enfermo que regulan esta respuesta inflamatoria. La leptina es una citocina que juega un papel central en la regulación adecuada de la respuesta inflamatoria en la peritonitis. Hay variaciones individuales en los genes, llamadas polimorfismos, que pueden presentarse en la leptina y su receptor. Estos polimorfismos se han asociado con diversas enfermedades. De ahí que el fin de este estudio es ver si éstos polimorfismos influyen en la posibilidad de complicaciones en pacientes con peritonitis.

En el estudio se incluirá a todos los pacientes operados en el Hospital General de peritonitis y que acepten participar, en el periodo comprendido de abril del 2009 a enero del 2010. El estudio es observacional, es decir, nosotros le solicitaremos información pertinente y una muestra de sangre, pero no intervendremos en lo absoluto en el manejo que establece su médico tratante.

PROCEDIMIENTO: Si usted está de acuerdo en participar, el personal del estudio le tomará muestra(s) de sangre de su brazo de aproximadamente cinco mililitros (menos de una cucharada) durante el desarrollo del estudio.

RIESGOS: Los riesgos asociados con la toma de sangre de su brazo incluyen dolor y moretones. Se tomarán precauciones para evitar estas dificultades. Siempre que sea posible, la sangre para la investigación genética discutida arriba se tomará al mismo tiempo que las muestras para otras pruebas de laboratorio requeridas.

BENEFICIOS: No habrá un beneficio directo para usted como resultado de la

investigación genética realizada por el material obtenido de su muestra de sangre. Un

posible beneficia indirecto es que su participación pudiera contribuir al conocimiento de las causas de la condición médica que usted tiene, o pudiera ayudar a desarrollar métodos de diagnóstico temprano o nuevos tratamientos.

RETIRO DEL CONSENTIMIENTO: Usted puede retirar su consentimiento y discontinuar su participación en la investigación genética descrita arriba en cualquier momento sin afectar su participación en el estudio clínico.

DESTRUCCIÓN DE LAS MUESTRAS: El investigador conservará los registros relacionados a su identidad con su muestra de sangre por el periodo de tiempo requerido por la ley aplicable. Hasta que esos registros se destruyan, usted puede pedir que su muestra de sangre y el material obtenido de esta se destruyan. En tal caso, usted debe notificar al investigador o persona designada por este, que usted quiere que se destruya su muestra de sangre y el material obtenido de esta.

CONFIDENCIALIDAD: Su nombre y datos personales (número de teléfono, domicilio o cualquier otra información que lo identifique claramente) no estarán escritos en, o asociados con, las muestras que usted done. El investigador es la única persona que conoce su información personal.

PREGUNTAS / INFORMACIÓN: Si tiene preguntas con relación a la recolección de muestras o investigación genética o si experimenta una lesión causada por el procedimiento de recolección de muestras, usted debe ponerse en contacto con:

Dr. Rodolfo L. Bracho Riquelme

Número de teléfono durante el día: 8130011

Número para comunicarse las 24 h: cel. 618-2999229

CONSENTIMIENTO: He leído la información precedente describiendo la recolección de muestra(s) y me han sido contestadas todas las preguntas con relación a la recolección de la(s) muestra(s) de sangre de mi persona para investigación genética a mi entera satisfacción. Estoy de acuerdo en proporcionar muestra(s) de sangre para la investigación genética como se describió anteriormente.

Fecha _____ Firma voluntaria _____

Firma del investigador o persona designada que obtuvo el consentimiento.

ANEXO C

INDICE DE PERITONITIS DE MANNHEIM

FACTORES DE RIESGO	PUNTAJE	PALOMAR SI ESTÁ PRESENTE
Edad > 50 años	5	
Sexo Femenino	5	
Falla Orgánica	7	
Malignidad	4	
Evolución >24h.	4	
Origen no colónico	4	
Peritonitis difusa/generalizada	6	
Exudado Claro	0	
Exudado Purulento	6	
Exudado Fecal	12	
Total		

Falla orgánica:

Renal.- Creatinina > 1.5 mg/dl, urea >40 mg/dl, oliguria <20 ml/hr

Pulmonar.- PO₂<50 mmHg, PCO₂>50 mmHg

Choque.- Hipodinámico o hiperdinámico.

Obstrucción Intestinal.- Parálisis >24 hrs. O íleo mecánico completo.