



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO. División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Formato SS-T

SOLICITUD DE TÉRMINO DE SERVICIO SOCIAL

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE



Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
--------------------	-----	-----	-----	---------------------	-----	-----	-----

Datos del Alumno

Nombre : Gabriela Fuentes Moreno	
Matrícula : 2153059835	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica
Domicilio : calle Santa Cruz No. 11, San Miguel Topilejo, Tlalpan	
Teléfono : 5558480114	Celular : 5528906834
Correo Electrónico : gabyfm6@gmail.com	CURP : FUMG951128MDFNRB08

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : Identificación de genes involucrados en la susceptibilidad a desarrollar artritis reumatoide: modelo de análisis transcriptómico en población mexicana							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra"							
Dependencia : Pública							
Entidad Federativa : Distrito Federal							
Municipio : Tlalpan	Localidad : Colonia Arenal de Guadalupe						
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	13	1	2020		13	7	2020

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 3.- Público	Tipo: 1.- Externo
Orientación: 10.- Otros	

FIRMAS

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez No. Económico: 37622

Asesor Interno
Nombre, firma y No. Económico

Dra. María del Refugio Denisse Cornejo Clavijo

Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico

Gabriela Fuentes Moreno
Alumno
Nombre, firma

Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza
Dra. María Angélica Gutiérrez Nava



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

Instituto Nacional
de Rehabilitación
Luis Guillermo Ibarra Ibarra

Subdirección de Educación Paramédica
Coordinación de Servicio Social

Ciudad de México a 13 de julio de 2020.

INRLGII/CSS/13/07/2020
ASUNTO: Término Servicio Social

MTRO. JESÚS OBDULIO LOPEZ MURILLO
COORDINADOR DIVISIONAL DE SERVICIO SOCIAL
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
P R E S E N T E

Por este conducto informo a usted que la **C. FUENTES MORENO GABRIELA**, alumna de la carrera de Química Farmacéutica Biológica, con número de matrícula: **2153059835**, concluyó satisfactoriamente su **Servicio Social**, en este **INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN LGII**, en el Área de Investigación dentro del programa: *"Identificación de genes involucrados en la susceptibilidad a desarrollar artritis reumatoide: Modelo de análisis transcriptómico en población mexicana"*, bajo la supervisión de la Dra. Ma. del Refugio Denise Clavijo Cornejo. Durante el periodo comprendido del **13 de enero de 2020 al 13 de julio de 2020**, con un horario de lunes a viernes de 09:00 a 13:00 hrs. Cubriendo un total de 480 hrs.

Sin otro particular, hago propicia la ocasión para enviar un cordial saludo.

Atentamente



Dra. Matilde L. Enriquez Sánchez
Directora de Educación en Salud

C.c.p. Alumno

MLES/GGV/DSL/MPS/mps*

Calzada México Xochimilco No. 289 Col. Arenal de Guadalupe, Alcaldía Tlalpan
Ciudad de México., C.P. 14389 Tel. 55 59 99 10 00 ext. 13308





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Ciudad de México a 8 de Enero del 2021

**MTRA. MARÍA ELENA CONTRERAS GARFIAS
DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y DE LA SALUD**

P R E S E N T E

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que la alumna: **Gabriela Fuentes Moreno** con **matricula 2153059835** concluyó el proyecto del Servicio Social: **“Identificación de genes involucrados en la susceptibilidad a desarrollar artritis reumatoide: modelo de análisis transcriptómico en población mexicana”**, que se realizó en la División de Enfermedades Musculoesqueléticas y Reumáticas del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra. Ubicado en: Arenal de Guadalupe, Tlalpan, CDMX, del 13 de Enero al 13 de Julio del 2020 bajo mi asesoría cubriendo un total de 480 horas.

Agradeciendo de antemano su atención a la presente, le envió un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sanchez Nombre y


firma del asesor

Número económico 37622

Ciudad de México a 8 de Enero del 2021

MTRA. MARÍA ELENA CONTRERAS GARFIAS
DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTE

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que la alumna: Gabriela Fuentes Moreno con matrícula 2153059835 concluyó el proyecto del Servicio Social: “Identificación de genes involucrados en la susceptibilidad a desarrollar artritis reumatoide: modelo de análisis transcriptómico en población mexicana”, que se realizó en la División de Enfermedades Musculoesqueléticas y Reumáticas del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra. Ubicado en: Arenal de Guadalupe, Tlalpan, CDMX. Del 13 de Enero al 13 de Julio del 2020 bajo mi asesoría cubriendo un total de 480 horas.

Agradeciendo de antemano su atención a la presente, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE



Dra. María del Refugio Denisse Cornejo Clavijo
Nombre y firma del asesor
Cédula profesional
11192323



Hospital Certificado:
Consejo de Salubridad General
2012-2015



División de Rehabilitación Ortopédica
Centro Colaborador de la OPS/OMS para
la Investigación y Rehabilitación Médica
2015-2019



Certificado ROC-015-15
ISO 9001:2008
2015-2018



**Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Sistemas Biológicos**

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Presenta:

**Gabriela Fuentes Moreno
Matrícula: 2153059835**

Proyecto:

Identificación de genes involucrados en la susceptibilidad a desarrollar artritis reumatoide: modelo de análisis transcriptómico en población mexicana

Proyecto genérico correspondiente:

**Evaluación de productos relacionados con la salud.
Etapa: Desarrollo de reactivos analíticos y de diagnóstico**

Asesor Interno:

Doctor Jorge Ismael Castañeda Sánchez

Asesora Externa:

Doctora María del Refugio Denise Clavijo Cornejo

Lugar de realización:

División de Enfermedades Musculoesqueléticas y Reumáticas, piso 0 de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación LGII.

Fecha de inicio: 13 de Enero del 2020

Fecha de término: 13 de Junio del 2020

**Teléfono: 5528906834
Correo: gabyfm6@gmail.com**

Índice

1. Introducción	3
1.1 Artritis Reumatoide.....	3
1.1.1 Definición.....	3
1.1.2 Causas.....	3
1.1.3 Síntomas	3
1.1.4 Diagnóstico.....	4
1.1.5 Tratamiento	4
1.2 Incidencia y prevalencia	5
1.3 Etiología.....	6
1.4 Fisiopatología.....	7
1.5 Inflamasomas	7
2. Objetivos	9
3. Justificación.....	9
4. Metodología	9
5. Actividades realizadas.....	15
6. Objetivos y metas alcanzadas.....	15
7. Resultados	15
8. Discusión.....	18
9. Conclusiones	20
10. Recomendaciones	20
12. Bibliografía.....	25
13. Vo.Bo. de los asesores respecto a los contenidos académicos	27

1. **Introducción**

1.1 Artritis Reumatoide

También se denomina artritis inflamatoria. Es una enfermedad autoinmune y más grave (NSH, 2008). Esta, es la causa más frecuente de consulta en el servicio de reumatología (Fontanelli, 2015), ya que puede afectar a la población en general.

1.1.1 Definición

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria, crónica, autoinmune y sistemática de etiología desconocida; su principal órgano blanco es la membrana sinovial; se caracteriza por inflamación poliarticular y simétrica de pequeñas y grandes articulaciones, con posible compromiso sistémico en cualquier momento de su evolución (Secretaría de Salud, 2010). Una enfermedad autoinmune es aquella en la cual el cuerpo libera enzimas que atacan sus propios tejidos sanos. En la AR, estas enzimas destruyen los revestimientos de las articulaciones. Esto causa dolor, hinchazón, rigidez, malformación y reducción del movimiento y la función (NIH, 2016).

1.1.2 Causas

Las causas que originan este proceso inflamatorio sinovial son múltiples: traumatismos, agentes infecciosos como bacterias, virus, hongos y parásitos, factores inmunológicos o depósito de microcristales. En algunos casos este proceso es autolimitado, es decir, desaparece en cuanto se elimina el agente causal y se habla entonces de una artritis aguda. En otras ocasiones se produce una respuesta específica mediada por el propio sistema inmunitario de defensa del individuo, lo que favorece la perpetuación del proceso, constituyendo entonces una artritis crónica. En ambos casos, si la reacción inflamatoria es muy intensa puede producirse destrucción articular. Este proceso puede aparecer en una única articulación o en varias al mismo tiempo (Giménez, 2006).

1.1.3 Síntomas

Las personas con AR pueden presentar síntomas sistémicos, como fatiga, fiebre, pérdida de peso, inflamación ocular, anemia, nódulos subcutáneos (bultos debajo de la piel) o pleuritis (inflamación pulmonar) (NIH, 2016). Estas manifestaciones pueden llegar a acortar la esperanza de vida de los pacientes (Secretaría de Salud, 2010).

1.1.4 Diagnóstico

a. Análisis diferencial

Durante la exploración física, el médico revisará las articulaciones para detectar hinchazón, enrojecimiento y temperatura. El médico también puede evaluar tus reflejos y fuerza muscular.

b. Criterios de clasificación ACR/EULAR

El objetivo de los criterios de clasificación de la ACR/EULAR (Anexo 1) fue distinguir a los pacientes con alto riesgo de desarrollar enfermedad erosiva y / o inflamatoria persistente de aquellos con artritis inflamatoria indiferenciada (Batlle et al., 2013;).

c. Análisis de sangre

Las personas con AR suelen tener una velocidad elevada de eritrosedimentación o proteína C reactiva, lo cual puede indicar la presencia de un proceso inflamatorio en el cuerpo. Otros análisis de sangre frecuentes buscan detectar anticuerpos reumatoides y anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados.

d. Pruebas de diagnóstico por imágenes

Tu médico podría recomendar realizar radiografías para ayudar a hacer un seguimiento de la progresión de la artritis reumatoide en tus articulaciones con el tiempo. Las resonancias magnéticas y las ecografías pueden ayudar al médico a determinar la gravedad de la enfermedad en tu cuerpo.

1.1.5 Tratamiento

Para el tratamiento de la AR se encuentran las terapias no farmacológicas y farmacológicas (Secretaría de Salud, 2010). Sin embargo, en conjunto, las medidas terapéuticas disponibles no sólo permiten aliviar los síntomas, sino también mejorar de forma muy notable el pronóstico, lo que supone un impacto muy positivo en la calidad de vida de los afectados (Romero, 2010).

a. No farmacológicos

Consisten en una serie de medidas generales relacionadas con el estilo de vida, fundamentalmente con el reposo y el ejercicio (Romero, 2010); tales como ejercicios dinámicos, físicos, aeróbicos y de fortalecimiento muscular, terapia ocupacional e hidroterapia, y en algunos casos rehabilitación, los cuales son intervenciones de utilidad en la atención integral del paciente con AR (Secretaría de Salud, 2010).

b. Farmacológicos

Consisten en la utilización de antiinflamatorios no esteroideos (AINE), los cuales constituyen uno de los grupos de fármacos más consumidos en el mundo; que controlan el dolor y la inflamación (Secretaría de Salud, 2010), y su prescripción está aumentando con el paso de los años debido al aumento en la esperanza de vida y en la prevalencia de enfermedades reumáticas (Marcéna, 2016). Es importante que se administren después de evaluar el riesgo individual a nivel gastrointestinal, renal y cardiovascular. Sin embargo, cualquier AINE debe utilizarse a dosis máxima durante al menos una semana antes de considerar que existe un fracaso terapéutico. Una vez controlados los síntomas, los AINEs deben utilizarse a la dosis mínima eficaz, ya que, los efectos adversos son dependientes de la dosis y de la duración del tratamiento. Estos no deben usarse como un fármaco único y no reemplazan a los fármacos modificadores de la enfermedad (FARME) como cloroquina, leflunomida, metotrexato, ciclosporina A, penicilina y sulfasalazina, los cuales reducen los signos y síntomas de la AR, mejoran la función física y los marcadores de actividad de la enfermedad (Secretaría de Salud, 2010).

c. Intervención quirúrgica

Se recurre a la cirugía para reducir el dolor, ampliar la movilidad o corregir una deformidad esquelética (Romero, 2010).

1.2 Incidencia y prevalencia

La prevalencia de la artritis reumatoide puede fluctuar de 0.5 a 2% en la población de países industrializados con una incidencia anual de 12-1,200 por 100,000 habitantes. La relación mujer: hombre es 3:1 y la mayoría de casos se da entre 30 y 55 años, pero puede presentarse a cualquier edad. En México afecta al 1.6% de la población en general

(Mendoza, 2013), siendo el principal motivo de consulta en el Servicio de Reumatología y cada tres mujeres por cada hombre padecen AR de acuerdo con datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), más de seis millones de hogares en México dependen de una mujer, por lo que no sólo afecta a quienes la padecen sino todo su entorno (Fontanelli, 2015).

1.3 Etiología

Los factores etiológicos de la AR son poco conocidos, se sabe que dicha enfermedad es multifactorial y se le asocian los siguientes factores:

1.3.1 Factores ambientales

Factores de riesgo genético no explican en su totalidad la aparición de esta patología, por lo que se han postulado teorías que sugieren que, además de la predisposición genética, puede haber influencia de factores ambientales como agentes infecciosos, tales como: Virus Epstein-Barr (EBV), retrovirus, virus Ross River, parvovirus B19, virus de la hepatitis C, Mycobacterium tuberculosis y el micoplasma proteus los cuales desencadenan la manifestación de la enfermedad (Morales, 2013). Otros factores de riesgo son la exposición al humo del cigarrillo, contaminación del aire, insecticidas y exposiciones ocupacionales al aceite mineral y sílice. Sin embargo, hasta ahora, fumar es el único factor de riesgo ambiental que ha sido ampliamente estudiado y ampliamente aceptado (Merih et al., 2017).

1.3.2 Factores genéticos

Estudios epidemiológicos indican que es un padecimiento con predisposición genética (Mendoza et al., 2013). P. Stastny, demostró la relación entre la artritis reumatoide y los genes de los antígenos específicos leucocitarios humanos (HLA-DR) del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC); siendo HLA la llave molecular responsable para la presentación del antígeno por medio de la célula presentadora (APC) a la célula T, lo cual origina la primera señal de activación y coestimulación en el inicio de la respuesta inmune adaptativa o específica (Acevedo, 2012), se asocia con una predisposición genética del alelo HLA DR4, y/o los alelos relacionados del complejo de histocompatibilidad clase II (7, 8, 10, 11) (Morales, 2013). La artritis reumatoide se observa hasta cuatro veces más en familiares de primer grado de pacientes con la enfermedad y de 15 a 20% de gemelos

homocigotos, además, guarda relación con ciertos grupos étnicos como israelíes, hindúes, mexicanos y de la región de sur de china (Mendoza et al., 2013).

1.4 Fisiopatología

La alteración inicial parece ser una reacción inflamatoria inespecífica que se desencadena por un estímulo desconocido. Se manifiesta como una inflamación autoinmune sinovial, la cual se da por la infiltración de células inflamatorias, predominantemente células T y macrófagos a la membrana sinovial, lo que conlleva a una lesión microvascular y un aumento en el número de células de revestimiento sinovial e inflamación perivascular por células mononucleares, posteriormente este proceso inflamatorio se extiende hacia el cartílago adyacente y el hueso ocasionando así el daño articular (Morales, 2013).

1.5 Inflamasomas

La reacción inflamatoria esta mediada por un inflamasoma. El inflamasoma representa un complejo de alto peso molecular que activa las caspasas inflamatorias y activa las citocinas de la familia IL-1. Se han descrito varios inflamasomas y hasta ahora estaban definidos por la proteína NLR que contienen: el inflamasoma NLRP1 (NALP1), el inflamasoma IPAF (NLRC4) y el inflamasoma NLRP3 (NALP3) (Buelvas et al., 2015).

1.5.1 NLRP3

El inflamosoma más estudiado hasta la fecha es el NLRP3, también conocido como criopirina. Este inflamosoma está formado por la proteína NLRP3, la proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein*) y una procaspasa-1. La estructura de la proteína NLRP3 contiene 3 dominios, un dominio de pirina N-terminal (PYD), en el carboxilo-terminal se encuentra un dominio que posee repeticiones ricas en leucina (dominio LRR), y una zona central que se conoce como dominio NACHT (*nucleotide binding and oligomerization domain*), el cual se une a nucleótidos y es el responsable del proceso de oligomerización del inflamosoma. El dominio de pirina, que también se le llama TRIM20, censa la perturbación inducida por las toxinas bacterianas de la familia de las RhoGTPasas. Cuando no existen las moléculas activadoras de la formación del inflamosoma el dominio NACHT y el dominio LRR de NLRP3 interactúan entre sí

suprimiendo así la interacción entre el NLRP3 y la proteína adaptadora ASC, inhibiendo la formación del inflamosoma (Imagen 1) (Montaño et al., 2017).

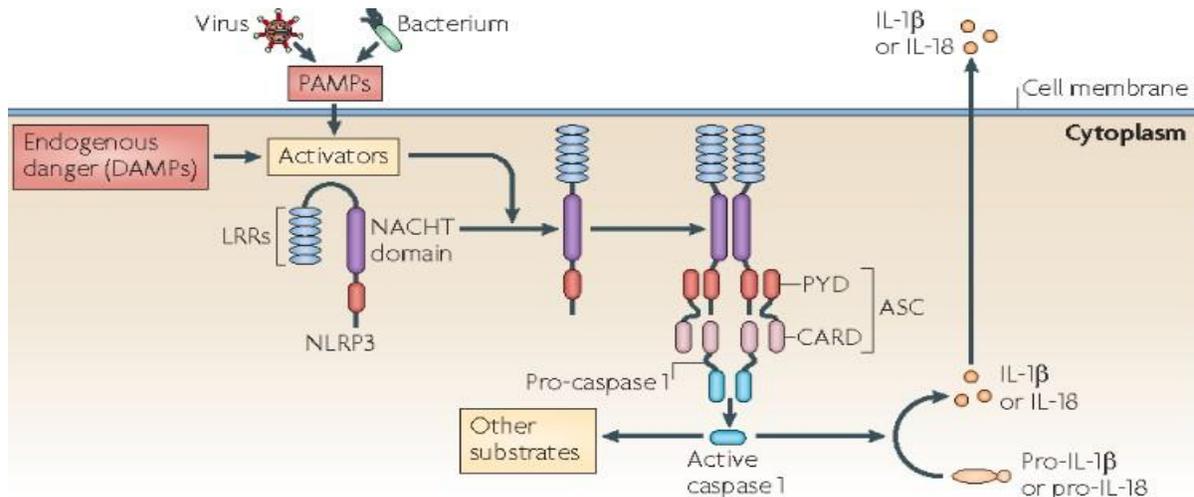


Imagen 1. Mecanismo de formación del complejo inflamosoma de NLRP3

Se han descrito distintos mecanismos para su activación:

- Variación en las concentraciones intracelulares y extracelulares de K^+ .
- Mediante el reconocimiento de un incremento en la concentración de ATP extracelular por los receptores P2X7 y P2X4 purinérgico.
- Con la generación de especies ROS derivadas de la mitocondria.
- Mediante la desestabilización fago-lisosomal que lo activa por medio de moléculas como cristales de urato monosódico, asbestos y sílica.

A pesar de las diversas composiciones moleculares de los activadores, se ha descrito una enzima que participa como mediador en los distintos mecanismos de activación de los inflamosomas, la proteína-quinasa activada por ARN (PKR) también conocida como EIF2AK2 (Buelvas et al., 2015).

1.5.2 IL-1 β

La IL-1 β está sintetizada como una proteína precursora (Pro-IL-1 β), que no es segregada en la forma activa hasta ser metabolizada por la enzima caspasa-1; se expresa en neuronas nociceptivas del ganglio de la raíz dorsal 1, 3, 5. El IL-1RI se considera el receptor activo, mientras que el IL-1RII no posee una molécula de transducción y es funcionalmente inactivo. La IL-1 β produce una inflamación sistémica por medio de la activación de la

ciclooxigenasa-2, con la formación de PGE2 en el hipotálamo anterior causando fiebre. También produce la sustancia-P (SP), óxido nítrico (activando la enzima óxido nítrico sintetasa) y moléculas de adherencia endotelial (Barros et al., 2011).

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Identificar sujetos con alto riesgo a desarrollar AR, mediante el análisis de la expresión génica del inflammasoma.

2.2. Objetivos específicos

- a) Identificar la expresión de NLRP3 e IL-1b en familiares sanos de pacientes con diagnóstico de AR.

3. Justificación

La AR es una enfermedad inflamatoria crónica con una progresión continua que si no es adecuadamente manejada, conlleva rápidamente a elevados grados de discapacidad. Habitualmente el diagnóstico de dicha afección se basa en síntomas y signos clínicos principalmente dolor crónico, hinchazón y alteraciones en algunos exámenes de sangre (secretaría de salud, 2010).

No obstante se hayan hecho esfuerzos para realizar el diagnóstico oportunamente aún persiste un retraso en el diagnóstico de 3-5 años para que el paciente acuda esto incide negativamente en el pronóstico y la calidad de vida en el paciente. Actualmente se sabe que identificar y tratar la enfermedad dentro de los primeros 12 meses evita la progresión y por consiguiente la discapacidad (Cordero Moreno A., 2019).

Tomando en cuenta lo anterior se hacen necesarias estrategias que permiten detectar a personas en riesgo de desarrollar la enfermedad pudiendo de esta manera incidir en la detección temprana del padecimiento. Por ello nos abocaremos a estudiar la predisposición genética de los familiares (sin enfermedad) de pacientes con AR. Para ello se utilizará la técnica de extracción de ARN, así como PCR-RT y genotipificación.

4. Metodología

4.1 Definición del grupo control

Grupo 1 Pacientes AR: Pacientes previamente diagnosticados con AR. Que tengan al menos un familiar de primer o segundo grado de consanguinidad, sin datos de la enfermedad.

Grupo 2 control negativo: Sujetos sanos, sin diagnóstico de AR y sin antecedentes familiares de la enfermedad.

Grupo de Familiares sin AR: Familiares de pacientes con AR (primero o segundo grado de consanguinidad), que no presenten diagnóstico o síntomas de esta enfermedad.

4.2 Criterios de inclusión

421 Para todos los grupos se incluyeron, individuos mayores de 18 años que aceptaron participar y firmaron el consentimiento informado.

422 Para el grupo control 1, pacientes que cumplieron el diagnóstico de AR de acuerdo al criterio del ACR/EULAR.

423 Para el grupo control 2, sujetos sanos valorados por un reumatólogo del INRLGII.

424 Para el grupo de estudio, sujetos sanos valorados por el personal médico con al menos un familiar con diagnóstico de AR.

4.3 Criterios de eliminación

431 Participantes con muestras contaminadas o insuficientes.

432 Participantes que pidan su retiro voluntario del estudio, aún después de tomar la muestra y de firmar un consentimiento inicial.

1.4 Criterios de exclusión

Se excluyeron aquellos pacientes con diagnóstico de otras enfermedades crónicas de carácter autoinmune.

1.5 Selección de las fuentes, métodos, técnicas y procedimientos de recolección de la información

La invitación para participar en esta investigación médica, se hizo a los pacientes evaluados por médicos del Servicio de Reumatología y la División de Enfermedades Musculoesqueléticas y Reumáticas (DEMÉR) del Instituto Nacional de Rehabilitación

³Luis Guillermo Ibarra Ibarra con diagnóstico de AR y a ellos mismos se les pidió

invitarán a sus familiares. Para comparar los hallazgos se analizaron una población sana sin familiares con diagnóstico de AR. Todos los participantes en esta investigación debieron firmar un Consentimiento Informado (CI), que nos permitió hacer uso de su muestra de sangre e información clínica y personal. El CI especifica que su participación es libre y voluntaria y describe los términos para participar en esta investigación médica. Se procedió, además, con la recolección de los datos clínicos, antropométricos y demográficos (edad, género, etnia, peso, talla, enfermedades concomitantes, anamnesis farmacológica, tiempo de enfermedad), garantizando que su información se manejó de manera confidencial. Con las muestras se creó una base de datos con la integridad y concentración del ácido ribonucleico (ARN) y el ácido desoxirribonucleico (ADN) obtenidos de la sangre periférica de cada participante y otra base de datos para preservar evidencias clínicas encontradas en los tres grupos de estudio. Las muestras de los pacientes se mantuvieron almacenadas en un biobanco a -80°C .

4.5.1 Procesamiento de muestras

Una vez que el paciente aceptó y firmó el consentimiento informado, se procedió a la extracción del fluido sanguíneo, se obtuvieron 6 mL en Tubos BD Vacutainer® que contenían anticoagulante (EDTA K_2 aplicado por aspersion en las paredes del tubo) para el análisis de sangre total. Se obtuvieron 4 mL de sangre en un Tubo BD Vacutainer® SST™ adicional para Suero con Gel Separador el cual contenía un activador de coagulación aplicado por aspersion en la pared del tubo, el cual se utilizó en la obtención del suero, para la generación de las pruebas sanguíneas.

Se vertió el contenido de los Tubos BD Vacutainer® a tubos falcón de 15 mL, a los cuales se les agregó 4 mL de Buffer de lisis (QIAGEN), las muestras se refrigeraron a 4°C durante 10 minutos, en dicho periodo se sometieron a vortex en dos ocasiones cada 5 minutos antes de ser centrifugadas.

Se realizó la centrifugación de los tubos falcón que contenía la sangre y el buffer de lisis, por 10 minutos a 3000g, posteriormente se procedió a retirar el exceso de reactivo y se agregó 1 mL más de Buffer de lisis a la nueva solución, se colocó nuevamente a refrigeración por 10 minutos, en los cuales las muestras se sometieron a vortex en dos

ocasiones más cada 5 minutos. Posteriormente se llevó a centrifugación a 3000g por 10 minutos, para genera la visualización del pellet de células blancas.

Se agregaron 500 μ L de Buffer al pellet para retirar los excedentes de células rojas, se centrifugó a 400g por 5 minutos y se procedió a retirar el excedente, se repitió el mismo procedimiento dos veces más con la finalidad de obtener una muestra con alta pureza de leucocitos.

La muestra de sangre presente en el Tubo BD Vacutainer® SST™ se mantuvo por un periodo de una hora a temperatura ambiente para que se formara el coagulo, después se centrifugo por 5 minutos a 3500rpm, para la separación y obtención del suero, el cual se colocó en 3 tubos Eppendorf con los siguientes volúmenes 200 μ L, 1 mL y 800 μ L, los cuales fueron utilizados para realizar pruebas bioquímicas de 4 elementos (glucosa, ácido úrico, triglicéridos y colesterol).

4.5.2 Extracción de RNA

Se agregó 500 mL de Trizol en el pellet, se sometió a vórtex hasta desintegrar por completo el pellet, se dejo reposar la muestra por 5 minutos a temperatura ambiente.

Se agregó 100 μ L de cloroformo, se sometió a vórtex por 15 segundos, se dejó reposar la mezcla por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se llevó a Centrifugación a 13,300g por 15 minutos a 4°C.

Se recuperó la fase acuosa, teniendo cuidado de tomar solo la parte translucida, y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL nuevo, se le adicionó 500 μ L de isopropanol frio, se homogenizó por inversión y se dejo reposar toda la noche a -20°C.

Se llevó a centrifugación a 14000g por 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante, se agregó 1 mL de etanol al 70%, se sometió a vórtex por 15 segundos, se llevó a centrifugación a 14000g por 5 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante.

Nota. Se repitieron los cuatro pasos anteriores de 2 a 3 veces.

Se secó todo residuo de etanol en el tubo para evitar residuos no deseados, se agregaron 26 μ L de agua libre de DNAasas y RNAasas y se almacenó a -70°C.

Nota. Se rotuló cada tubo con las iniciales del paciente, clave según el estudio y fecha

4.5.3 síntesis de cDNA

La transcripción reversa (RT-PCR) es una técnica que permite sintetizar ADN complementario (cDNA, por sus siglas en inglés) a partir de moléculas de RNA usando para ello la enzima transcriptasa reversa, por lo tanto, el cDNA obtenido es la cadena complementaria de la cadena molde de RNA.

Se usó el kit '3QuantiTect Reverse Transcription' de la marca Qiagen siguiendo el protocolo del proveedor y utilizando un equipo '3PCR cycler Rotor-Gene Q 5plex HRM system', este kit tiene 2 pasos principales:

- Eliminación de ADN genómico

La muestra de ARN purificada se incuba brevemente en solución amortiguadora de eliminación de gADN a 42 ° C durante 2 minutos para eliminar eficazmente el ADN genómico contaminante. A diferencia de otros métodos, la muestra de ARN se usa directamente en la transcripción inversa.

Los resultados precisos de la RT-PCR en tiempo real dependen del uso de cebadores o sondas diseñadas para eliminar o minimizar la detección de ADN genómico. Si tales cebadores o sondas no están disponibles, entonces se debe eliminar la contaminación por ADN genómico en las muestras de ARN.

- Transcripción inversa

Después de la eliminación del ADN genómico, la muestra de ARN está lista para la transcripción inversa utilizando una mezcla maestra preparada a partir de Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer y RT Primer Mix. Toda la reacción tiene lugar a 42 ° C y luego se inactiva a 95 ° C. A diferencia de otros métodos, no son necesarios pasos adicionales para la desnaturalización del ARN, la hibridación del cebador y la digestión con ARNasa H.

La transcriptasa inversa Quantiscript tiene una alta afinidad por el ARN y está optimizada para una síntesis de cADN eficiente y sensible de 10 pg a 1 µg de ARN. Esta alta afinidad de ARN, en combinación con Quantiscript RT Buffer, permite altos rendimientos de cADN, incluso a partir de plantillas con alto contenido de GC o estructura secundaria compleja.

RT Primer Mix asegura la síntesis de cADN de todas las regiones de las transcripciones de ARN, incluso de las regiones 5'. Esto permite altos rendimientos de plantilla de cADN para análisis de PCR en tiempo real, independientemente de dónde se encuentre la región objetivo en la transcripción.

4.5.4 Análisis de expresión Génica

La amplificación de RT-PCR se llevó a cabo con el equipo ³PCR cycler Rotor-Gene Q 5plex HRM system'. El RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR) en tiempo real se realizó con el kit ³RT- SYBR Green qPCR Mastermix' con 10 nM de oligonucleótidos (primers) sentido y antisentido y 100 ng/µl de ARN para un volumen final de 20 µl por reacción. Las condiciones del qRT-PCR fueron las siguientes; 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de PCR por 15 segundos a 95°C para la desnaturalización y 47 segundos a 60°C para la anillación y extensión. Los genes analizados fueron la il-1β y nlrp3 y se usó actina como gen de referencia. También se realizó una curva de análisis ³Melting' para verificar la amplificación del producto amplificado. La cuantificación relativa se hizo en el software REST-08 (Relative Expression Software Tool 2008).

4.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Prism Graphpad versión 8. Para la comparación de los parámetros demográficos, clínicos, clinimétricos, bioquímicos y ultrasonográficos se utiliza una prueba de T de Student para muestras independientes, debido a que no seguían una distribución gaussiana, se usó una prueba no paramétrica (U de Mann-Whitney). Para la comparación en la expresión entre los grupos, se usó una ANOVA de una vía para múltiples comparaciones. Los valores de P menores o iguales a 0.05, se consideraron estadísticamente significativos.

5. Actividades realizadas

- ✓ Capacitación en equipos de laboratorio de biología molecular
- ✓ Reclutamiento de pacientes, toma y procesamiento de muestras biológicas
- ✓ Extracción y procesamiento de material genómico
- ✓ Análisis de material genético
- ✓ Revisión bibliográfica
- ✓ Elaboración y revisión del reporte final

6. Objetivos y metas alcanzadas

Se cumplió con el objetivo que se planteó inicialmente en este trabajo; así como las metas de realizar pruebas bioquímicas y aprender la técnica de RT-PCR.

7. Resultados

7.1 Descripción de la población de estudio

La cohorte que incluye este proyecto está conformado por 41 familias. El estudio incluyó 106 sujetos mexicanos, de los cuales 65 pertenecen al grupo de estudio (familiares) y 41 son del grupo control positivo (pacientes con AR). El 78.46% representa el centro del país (Guanajuato, Michoacán, Ciudad de México, Estado de México, Hidalgo, Morelos, Puebla, Querétaro y Tlaxcala) y el 21.54% al resto de la República Mexicana. Todos los padres y abuelos de los sujetos del estudio son nacidos en el estado de reclutamiento.

La población total está conformada por 73 mujeres (71.56%) y 29 hombres (28.44%), en la Tabla 2 se describen las características demográficas. La mayor parte de la población analizada eran mujeres en ambos grupos (62% en el grupo de estudio y 85% en el control positivo). En el análisis se puede apreciar que los únicos valores significativos que se obtuvieron fueron la edad (grupo estudio 53.46 ± 13.46 versus el grupo control positivo 39 ± 17.15 , $P < 0.0001$) y el ácido úrico (grupo estudio 4.788 ± 1.402 versus el grupo control positivo 7.966 ± 6.398 , $P = 0.0153$), mientras que los demás valores (peso, $P = 0.2895$;

estatura, P=0.1520; BMI, P=0.9578; glucosa, P=0.5756; triglicéridos, P=0.4276 y colesterol, P=0.9910) no son significativos debido a que la P es mayor a 0.05.

Tabla 2. Características demográficas de la población de estudio

Población de estudio			
(n= 106)			
Variable	Familiares (%) 65 (60.18)	Pacientes (%) 41 (39.82)	P value
Hombre (%) / Mujer (%)	27 (44.62) / 38 (55.38)	5 (12.2) / 36 (87.80)	
Edad (años)	53.46±13.46	39±17.15	<0.0001*
Peso (kg)	66.35±9.407	70.41±14.91	0.2895
Estatura (m)	160±6.845	157.3±33.47	0.1520
IMC (kg/m ²)	0.4118±0.05268	0.378±0.1597	0.9578
Ácido Úrico (mg/dl)	4.788±1.402	7.966±6.398	0.0153*
Glucosa (mg/dl)	80.71±27.07	74.87±27.45	0.5756
Triglicéridos (mg/dl)	135.3±80.14	144.7±68.81	0.4276
Colesterol total (mg/dl)	188.8±41.77	193±37.35	0.9910
IMC: Índice de Masa Corporal. Los datos son medias ± DE y el valor * P fueron calculados por de U de Mann-Whitney (I = 0,05).			

7.2 Expresión de NLRP3 e IL-1 β

La expresión de NLRP3 e IL-1 β fueron examinados en sangre periférica de pacientes con AR (grupo de pacientes) y sus familiares asintomáticos (grupo de estudio) y comparados con sujetos sanos sin antecedentes familiares de AR (grupo negativo). Los productos de los dos genes fueron analizados mediante RT-PCR en tiempo real.

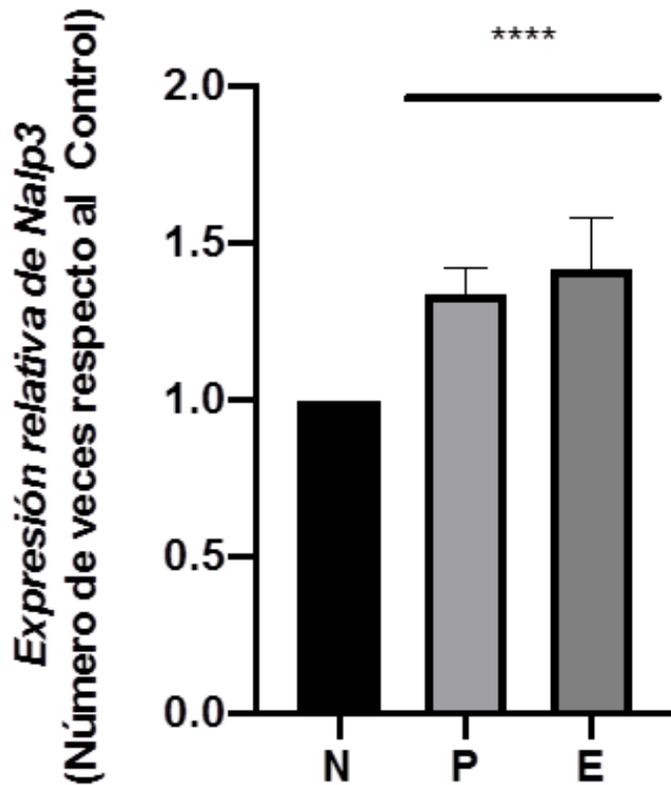


Figura 1. La gráfica muestra la expresión relativa del gen NALP3, comparando el grupo de pacientes (P) respecto al control negativo (N) y los sujetos de estudio (E) respecto al control negativo (N), $P < 0.0001$.

Los resultados muestran que, en comparación con el grupo negativo, la expresión de NLRP3 fue significativamente mayor tanto en el grupo de pacientes, así como de sus familiares ($P < 0.0001$), mostrado en la figura 1. En particular, la expresión de NLRP3 fue más alto por 0.34 veces en pacientes y 0.42 veces en sus familiares respecto a el grupo control. Interesantemente, no se encontró diferencia estadísticamente significativa del gen NLRP3 entre el grupo de pacientes con AR y el grupo conformado con sus familiares asintomáticos.

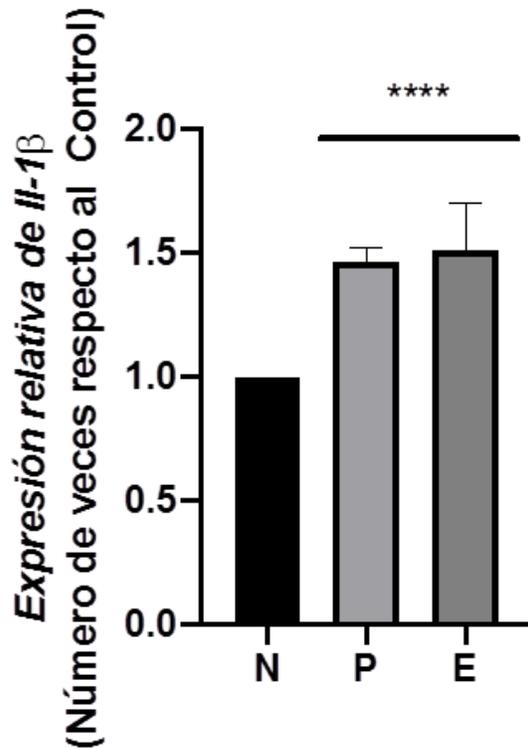


Figura 2. La gráfica muestra la expresión relativa del gen de IL-1 β , comparando el grupo de pacientes (P) respecto al control negativo (N) y los sujetos de estudio (E) respecto al control negativo (N), $P < 0.0001$.

En comparación con el grupo negativo, la expresión de IL-1 β fue significativamente mayor tanto en el grupo de pacientes, así como de sus familiares ($P < 0.0001$), mostrado en la figura 2. La expresión de IL-1 β fue más alta por 0.465 veces en pacientes y 0.512 veces en sus familiares respecto al grupo control. Al igual que el gen de NLRP3, no se encontró diferencia estadísticamente significativa del gen IL-1 β comparando el grupo de pacientes con AR y el grupo conformado con sus familiares asintomáticos.

8. Discusión

Nuestro estudio incluye principalmente a personas pertenecientes al centro del país debido a que solo se han encontrado reportes de la CDMX donde Pelaez et al. Reporto que la prevalencia en AR es considerablemente menor (CI=1) en comparación con el sur (CI= 2.8) y norte (CI=0.7, 1.8, 1.9) del país (Pelaez et al, 2011).

Nuestro estudio incluyó principalmente a personas pertenecientes al centro del país debido a que los pacientes que asisten al INRLGII en su mayoría pertenecen a los estados cercanos a la CDMX, Pelaez et al. (Pelaez et al., 2011) reportó que la prevalencia en AR es de 1.6% (95% CI 1.4±1.8) en el país y que aproximadamente el 1 % (95% CI 0.7±1.4) de la población que conforman el centro del país padece la enfermedad, mientras que la prevalencia varía en otros estados.

Nuestro análisis muestra que la población de estudio está conformada mayormente por la presencia de mujeres, estos resultados coinciden con lo reportado por Mendoza et al (Mendoza, 2013) donde se menciona que la enfermedad se presenta en mayor proporción en mujeres comparado con hombres teniendo una relación de 3:1.

La edad promedio para el grupo de estudio fue de 39 años, mientras que el grupo de familiares fue de 53.46 años, ambos caen dentro del rango de 30-55 años donde se presenta la mayoría de casos (Mendoza, 2013); el hecho de que el grupo de estudio sea menor comparado con el otro, se le puede atribuir a que por lo general los hijos de los pacientes, están más interesados en saber si tienen una predisposición genética a desarrollar AR y por lo tanto ellos participaron en mayor proporción en el estudio.

Como dato interesante nuestro análisis reveló que el ácido úrico está más elevado en el grupo de pacientes (7.966 mg/dl) comparado con el grupo de familiares (4.788 mg/dl), esto se puede explicar por la desregulación metabólica que presentan los pacientes. Agudelo et al. (Agudelo et al., 2004) menciona que la hiperuricemia puede proteger o prevenir la AR en aquellos individuos predispuestos o disminuir la expresión de la enfermedad en quienes ya la sufren; esto nos deja la incógnita de saber si la hiperuricemia en los pacientes está relacionada con la protección contra la enfermedad.

El estudio de la expresión genética de dos de las proteínas más importantes en la generación de inflamación nos dio datos muy interesantes. En primer lugar al comparar el grupo de pacientes contra el grupo negativo (sin antecedentes familiares de AR) se observa una diferencia estadísticamente significativa que es lo que se esperaba, que tanto NLRP3 como IL-1 β estuvieran elevados en los pacientes; sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa de los genes entre el grupo de pacientes con AR y el grupo

conformado con sus familiares asintomáticos, lo que nos hace suponer que los familiares asintomáticos ya presentan marcadores de inflamación a nivel sistémico, en la actualidad el estudio de la AR en familias no ha sido muy reportado, pero hay reportes de estos genes en el tejido. Rosengren et al. (Rosengren S. et al., 2005) realizó un estudio con tejido sinovial de cadera y rodilla donde señaló que había un aumento de NLRP3 en la membrana sinovial de pacientes con AR y que esto se debía a la infiltración de un mayor número de macrófagos tisulares demostrando así la regulación transcripcional de NLRP3 en esta enfermedad. Por otro lado Kolly et al. (Kolly L. et al 2009) reportó que en líneas de fibroblastos sinoviales (FLS) la expresión de NLRP3 no era detectable en tanto en ARN como proteína, por lo que no se lograría inducir la secreción de IL-1 β ; esto se debía a que en los FLS no se ensamblaba el complejo del inflamasoma para que este sea completamente funcional. Se obtenían niveles detectables de ARNm de IL-1 β tras la estimulación de TNF- α pero esta interleucina no era bioactiva. Nuestros resultados difieren de lo anteriormente mencionado debido a que la expresión en ambos genes es muy similar; sin embargo, se debe recalcar que estos datos son a nivel sistémico.

Lo anterior es importante ya que la IL-1 β juega un papel importante en inflamación sinovial y destrucción de cartílago y los datos sugieren que los familiares de primer grado de los pacientes con AR tienen niveles parecidos a sus familiares con AR, insinuando que los sujetos sanos con familiares diagnosticados con AR pueden tener mayor riesgo de desarrollar AR al igual como lo menciona Gomez et al. (Gomez et al., 2020).

9. Conclusiones

Se logró identificar la expresión de NLRP3 e IL-1 β , siendo significativamente mayor tanto en el grupo de pacientes, así como de sus familiares ($P < 0.0001$); al ser la IL-1 β más elevada en el grupo de estudio con respecto al grupo de familiares, estos se identifican como sujetos con alto riesgo a desarrollar AR. Cabe destacar que no hay muchos artículos sobre este tema que trabajen con la sangre periférica para realizar estos estudios.

10. Recomendaciones

- Analizar posteriormente las demás muestras.

- Realizar un estudio en México sobre la perspectiva de la población con respecto a modificar el estilo de vida e intervenciones farmacológicas para reducir el riesgo de desarrollar AR.

11. Anexos

Anexo 1

En la tabla 1 se muestran los criterios a tomar para poder hacer un diagnóstico de AR.

Tabla 1. Criterios de clasificación ACR/EULAR

Los nuevos criterios de AR sólo se aplicarán sobre una determinada población diana que debe tener las siguientes características:	
1) presentar al menos una articulación con sinovitis clínica (al menos una articulación inflamada)	
2) dicha sinovitis no se pueda explicar por el padecimiento de otra enfermedad	
Un paciente será clasificado de AR si la suma total de las siguientes variableV eV •6:	Puntuación
A. Afectación articular*.	
1 articulación grande afectada	0
2-10 articulaciones grandes afectadas	1
1-3 articulaciones pequeñas afectadas (con o sin afectación de grande articulaciones)	2
4-10 articulaciones pequeñas afectadas (con o sin afectación de grande articulaciones)	3
>10 articulaciones (al menos una pequeña)	5
B. Serología (al menos se necesita un resultado)	
FR y anti-PCC negativos	0
FR y/o anti-PCC positivos bajos (<3 valor normal)	2
FR y anti-PCC FR y/o anti-PCC positivos altos (>3 valor normal)	3
C. Reactantes de fase aguda	
VSG y PCR normales	0
VSG y/o PCR elevadas	1
D. Duración de los síntomas	
<6 semanas	0
•6 semanas	1

Anexo 2

Significancia estadística de NALP3

Tabla 2. Significancia estadística de NALP3

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Diferencia de medias.	Diferencia de intervalo de confianza al 95.00%	Significativa?	Resumen	Valor de P ajustado
P vs. N	0.3400	0.2108 to 0.4691	Yes	****	<0.0001
E vs. N	0.4196	0.2875 to 0.5516	Yes	****	<0.0001
E vs. P	0.07958	-0.04085 to 0.2000	No	ns	0.2438
Detalles de la prueba	Media 1	Media 2	Diferencia de medias	SE of diff.	
P vs. N	1.340	1.000	0.3400	0.05158	
E vs. N	1.420	1.000	0.4196	0.05274	
E vs. P	1.420	1.340	0.07958	0.04809	

Anexo 3
Significancia estadística de IL-1 β

Tabla 3. Significancia estadística de IL-1 β

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Diferencia de medias	Diferencia de intervalo de confianza al 95.00%	Significativa?	Resumen	Valor de P ajustado
P vs. N	0.4652	0.2854 to 0.6450	Yes	****	<0.0001
E vs. N	0.5122	0.3457 to 0.6786	Yes	****	<0.0001
E vs. P	0.04697	-0.1050 to 0.1989	No	ns	0.7223
Detalles de la prueba	Media 1	Media 2	Diferencia de medias	SE of diff.	Detalles de la prueba
P vs. N	1.465	1.000	0.4652	0.07179	P vs. N
E vs. N	1.512	1.000	0.5122	0.06647	E vs. N
E vs. P	1.512	1.465	0.04697	0.06067	E vs. P

12. Bibliografía

- Acevedo, E. (2012). *Algunos aspectos de la artritis reumatoide en Perú*. Revista De La Sociedad Peruana De Medicina Interna, Vol.: 25(1), 31.
- Agudelo C., Wise C., Turner R. et al. (2004). *Posible efecto de la Hyperuricemia en la artritis reumatoidea*. Acta Médica Colombiana, Vol.:10 (2), págs. 75-78
- Barros M., Kimiko R., Machado A. et al. (2011). *Citocinas y dolor*. Revista Bras Anesthesiol, Vol.: 61(2), págs. 137-142.
- Batlle E., Minguez M., Bernabeu P., et al. (2013) *Artritis Reumatoide*. Unidad de Reumatología, Hospital Clínico de Sant Joan, págs. 13-20.
- Buelvas Jiménez N., Suárez Useche R. (2015) *Regulación del inflammasoma NLRP3: bioquímica y más allá de ella*. SCIELO, Vol.: 28(2), págs. 170-180
- Cordero Moreno A. (2019). *Artritis Reumatóide*. Revista médica de Costa Rica y centro América, Vol.: 2, págs. 523-528
- AMEPAR. (2019). *Cifras en México*. Obtenido de: <https://amepar.org.mx/cifras-en-mexico/>. Revisado: 15/JUN/2020
- Fontanelli, P. (2015). *Ataca artritis reumatoide más a mujeres que hombres*. Pfizer.
- Giménez, S. (2006). El paciente con artritis. ELSEVIER, Vol.: 20(I).
- Gomez M., Ramos E., Castañeda J., et al. (2020). *Subclinical inflammation in the preclinical phase of rheumatoid arthritis might contribute to articular joint damage*. Huma Immunology, Vol.:81 (12), págs. 726-731.
- Kolly L., Busso N., Palmer G., et al. (2009). *Expression and function of the NALP3 inflammasome in rheumatoid synovium*. Immunology, Vol.:129, págs. 178-185.
- Lozano A. (2004). Hiperuricemia y gota. Clasificación, clínica y tratamiento. OFFARM, Vol.: 23 (5), págs. 82-89.
- Marcéna B., Sostres C & Lanás A. (2016). *AINE y riesgo digestivo*. Aten Primaria, Vol.: 48(2), págs 73-76.
- Mendoza, G., Rocha, A., Guerra, A., Ramírez, M., González, A & Gámez, J. (2013). *Artritis reumatoide y dislipidemias*. El Residente, Vol.: 8(1), 12,14.

- Merih, B., Ayúe, K & Duygu, H. (2017). *Role of MicroRNAs in Rheumatoid Arthritis, New Developments in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis*, Prof. Lazaros Sakkas (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/67081.
- Montañó L., Fortoul T., Rendón P. (2017) *what are inflammasomes? The NLRP3 as an example*. Ciudad de México, Revista SCIELO, Vol.: 60(1), págs. 42-48.
- Morales, A, A. (2013). *Artritis Reumatoide. Revista Médica De Costa Rica Y Centroamérica*, (XXL), págs. 607, 524.
- National Institutes of Health (NIH). (2016). *National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases: Osteoporosis and Arthritis: Two Common but Different Conditions*. Revisado 09/OCT/2020. Disponible en: <https://www.bones.nih.gov/health-info/bone/osteoporosis/conditions-behaviors/osteoporosis-arthritis#a>
- NSH, Choises. (2008). *Arthritis*. Revisado 09/OCT/2020. Disponible en: https://www.nhs.uk/translationspanish/Documents/Arthritis_Spanish_FINAL.pdf
- Peláez I., Sanin L., Moreno J., Alvarez J, et al. (2011) *Epidemiology of the Rheumatic Diseases in Mexico. A Study of 5 Regions Base on the COPCORD Methodology*. J Rheumatol, Vol.: 86, págs. 3-8.
- Romero, M. (2010). *Artritis reumatoide: Información para pacientes y familiares*. España. Ed. Conartritis., pág 10.
- Rosengren S., Hoffman H., Bugbee W., et al. (2005) *Expression and regulation of cryopyrin and related proteins in rheumatoid arthritis synovium*. Ann Rheum Dis, Vol.: 64, págs. 708-714.
- Secretaría de Salud. (2010). *Guía de práctica clínica: Diagnóstico y tratamiento de artritis reumatoide del adulto*. México, ed.; Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud., págs. 7-11.

13. **Vo.Bo. de los asesores respecto a los contenidos académicos**



Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez

Profesor Investigador C

No. Económico: 37622



Dra. María del Refugio Denisse Cornejo Clavijo

Investigadora en Ciencias Médicas C

INRLGII