



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO "EL HOMBRE Y SU AMBIENTE"
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**Evaluación de los polimorfismos de la citosina pro inflamatoria IL8 (-251), en
pacientes con Síndrome de Colón Irritable**

QUE PRESENTA LA ALUMNA

Areli Gudiño Ramírez

MATRICULA: 206344616

ASESORES:

Interno: Dra. Aida Hamdan Partida

Departamento de Atención a la Salud

N.º Económico 26343

Externo: Dra. Angélica Olivo Díaz

Jefa de Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad

Del Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

Lugar de realización: Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

Fecha de terminación: Mayo , 2023

Tabla de contenido

Introducción	3
Planteamiento del problema.....	4
Justificación	5
Objetivos.....	5
Objetivo general.....	5
Objetivos específicos	5
Marco de referencia	6
Definición, diagnóstico y subtipos	6
Fisiopatología	7
Relación con patógenos.....	7
Relación con sistema inmunológico	8
Tratamiento	9
Las terapias no farmacológicas	9
Relación médico-paciente.....	9
Medidas higiénico-dietéticas.....	9
Tratamiento farmacológico.....	10
Epidemiología.....	11
Prevalencia e Incidencia en México.....	11
Metodología	12
Diseño metodológico.....	12
Obtención y purificación del ADN.....	13
Amplificación por PCR.....	14
Amplificación de la muestra	14
Dot-Blot del producto del PCR.....	15
Preparación de las muestras.....	15
Desnaturalización y fijación de ADN	15
Hibridación por el método de quimioluminiscencia.....	16
Prehibridación e hibridación de las membranas.....	16
Quimioluminiscencia	16
Análisis estadístico.....	17

Resultados	18
Discusión	21
Conclusión	23
Referencias.....	24

Introducción

El síndrome de colon irritable (SCI) ó intestino irritable (SII) es una enfermedad gastrointestinal crónica, que se caracteriza por el dolor, así como distensión abdominal y cambios en el intestino (Valenzuela et al, 2004).

El síndrome del intestino irritable es un trastorno muy frecuente, que de acuerdo a las investigaciones realizadas, han sugerido que lo padece más del 22 % de la población occidental, siendo también la causa de consulta más frecuente en gastroenterología repercutiendo en la economía de la población (González et al, 2005).

En México, la prevalencia informada por los doctores Schmulson y Valdovinos es de 18%; la afectación que se reporta es entre 15 y 50 años (40%); en los niños y adolescentes es poco diagnosticada (Fragoso & Milan, 2018).

Algunos estudios han descrito una posible asociación de protozoarios como *Blastocystis hominis* y *Dientamoeba fragilis* en la etiología de SCI (Stark et al, 2007). El parásito *Blastocystis* se ha detectado en muestras fecales humanas, se le reconoce como agente etiológico de desórdenes intestinales como diarrea, enfermedad inflamatoria intestinal y colitis ulcerosa, aunque la patogenicidad de este parásito no ha sido probada (Boorum et al. 2008; Clark et al, 2013).

Muchos procesos inflamatorios pueden llevar a cambios en la sensibilidad visceral y en la motilidad. Estos cambios parecen ser mediados al menos en una parte por mecanismos locales inmunológicos (Ortiz, 2010).

Se ha observado que las citocinas tienen un papel importante en la patología de la enfermedad mediante la determinación de la naturaleza de la respuesta inmune; Mucosa como la IL1, IL6, IL8, IL10 (Mazzucchelli et al, 1994; Mitselou et al, 2020), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y beta (TNF- β) junto con el interferón gamma pueden ser empleados como marcadores de inflamación intestinal cuyos polimorfismos en pacientes con SSI han sido poco estudiados (Barkhordari et al, 2010).

La interleucina-8 (IL-8) es una citosina importante para el reclutamiento, de igual modo a la activación de los neutrófilos polimorfonucleares (PMN), células que son abundantes en las lesiones intestinales de la colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (CD) (Nielsen et al, 1997).

También está asociado a depresión, ansiedad, además a un menor desempeño laboral, teniendo un impacto económico negativo en el individuo, la sociedad y el Sistema de Salud.

Planteamiento del problema

El síndrome de colon irritable (SCI) o síndrome de intestino irritable es uno de los trastornos gastrointestinales más frecuentes en la consulta hospitalaria y en la población se presenta en todos los grupos de edades, aunque se presenta en mayor frecuencia entre las edades de 30 a 50 años, afecta tanto hombres y mujeres, no obstante, afectando mayormente a las mujeres, presenta dolor abdominal con cambios en el tránsito intestinal. Aunque la fisiopatología sigue incierta, algunas publicaciones la han asociado con la presencia de distintos protozoarios como *Blastocystis hominis* y *Dientamoeba fragili*, *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum*. Sumado a esto la variabilidad del perfil genético, las citocinas proinflamatorias podrían influir en las manifestaciones clínicas.

En diversos estudios se han identificado distintos alelos y genotipos asociados a su patogenia y virulencia. A si mismo se han asociado diversas citocinas (IL6, IL8, IL12), Factor de Necrosis Tumoral alfa y beta como marcadores de respuesta a la inflamación y que han sido poco estudiadas en relación al síndrome de colon irritable (SCI).

Justificación

Ante la limitada información de la fisiopatología y la asociación significativa entre los síntomas clínicos de los portadores sintomáticos y los asintomáticos de ambos protozoos, aunado a que estos estudios se han realizado principalmente en pacientes asiáticos y nunca en pacientes mexicanos, por lo que llevar a cabo este estudio permitirá aclarar aspectos de virulencia, además de factores de susceptibilidad o resistencia por parte de los hospederos para desarrollar síntomas clínicos; por ello, el estudio sobre los alelos de la citocina proinflamatoria IL-8 El hallazgo de posibles asociaciones del SCI con agentes patógenos gastrointestinales y con moléculas importantes de la respuesta inmune, motivará al personal médico para mejorar el diagnóstico de la enfermedad.

De aquí surge la necesidad de esclarecer la conexión de las citocinas con el síndrome de intestino irritable con y sin infección por *Blastocystis*.

Objetivos

Objetivo general

Identificar la expresión de los polimorfismos de la citocina pro inflamatoria IL8-251 en pacientes con/ sin Síndrome de Colon irritable infectados con *Blastocystis*: personas sanas y con SCI en el hospital Dr. Manuel Gea González.

Objetivos específicos

- Obtención y purificación del DNA de controles sanos, pacientes con y sin síndrome de colon irritable asociados a *Blastocystis*.
- Estandarización de las técnicas de PCR y *dot-blot* para la evaluación de asociación de los polimorfismos de la citocina pro inflamatoria IL 8 en todos los participantes.
- Identificación y análisis de polimorfismos de la citocina IL8 mediante un análisis de riesgo y medidas de asociación.

Marco de referencia

Definición, diagnóstico y subtipos

El síndrome de colon irritable (SCI) o intestino irritable (SII) se acepta como un síndrome del aparato neuro-endocrino-gastrointestinal que puede expresarse de forma extradigestiva y estrechamente vinculado con determinados patrones de personalidad (Córdova et al, 2008).

La primera vez que se intentó de definir los síntomas capaces de establecer un diagnóstico fue en 1978 por Manning y colaboradores, en el que se establecieron seis síntomas como criterios diagnósticos del SCI. En estudios posteriores se observó que, de estos seis criterios, los tres primeros tienen un mayor valor predictivo diagnóstico mientras que los tres últimos son de menor utilidad. Posteriormente, en 1989, y mediante un proceso de consenso entre expertos reunidos en la ciudad de Roma, se establecieron los llamados criterios de Roma, posteriormente modificados en 1992. En 1999, nuevamente por consenso, y en la misma ciudad se concretaron los criterios diagnósticos actualmente vigentes, los criterios de Roma II (Thompson et al, 1999).

En los criterios Roma II modificados se definen los siguientes síntomas:
Síntomas durante 12 semanas, no necesariamente consecutivas en los últimos 12 meses, de malestar y/o dolor abdominal y 3 de los criterios siguientes:

1. Dolor que mejora con la defecación
2. Inicio asociado con cambios en la frecuencia de la defecación
3. Inicio con cambios en la consistencia de la materia fecal

Síntomas que apoyan el diagnóstico en forma acumulativa

1. Deposición anormal con una frecuencia superior a 3 al día o menos de tres a la semana
2. Consistencia anormal (dura o blanda-líquida)

3. Urgencia para defecar y evacuación incompleta
4. Deposición con moco
5. Sensación de plenitud, distensión abdominal

Criterios de Roma III

Dolor abdominal recurrente o disconfort como mínimo 3 días por mes en los últimos 3 meses, asociado con dos o más de los criterios siguientes:

1. Mejora con la detección
2. Su inicio está asociado con cambios en la frecuencia de las heces
3. Su inicio está asociado con cambios en la forma de las heces (Gunn et al, 2003).

Es importante considerar los síntomas primarios de presentación e identificar los factores precipitantes y otros síntomas gastrointestinales asociados. La historia es fundamental y comprende tanto la identificación de características típicas del IBS.

Fisiopatología

El SII es un trastorno multifactorial. Es una alteración a la que puede aplicarse un enfoque biopsicosocial a causa de los múltiples factores que participan en su desarrollo. Estos factores pueden ser trastornos de la motilidad; hipersensibilidad visceral y el concepto del eje cerebro-intestino; inflamación de la pared intestinal, factores psicológicos, relación con agentes infecciosos y probablemente tenga una influencia genética (Castañeda, 2010; Boorom et al, 2008).

Relación con patógenos.

Existen algunos protozoarios asociados con el desarrollo de SCI: *Blastocystis hominis*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia intestinalis* (Ibarra et al, 2016).

Blastocystis es un protozoario que se encuentra con mayor frecuencia en muestras de heces de personas sintomáticas, asintomáticas, inmunocompetentes e inmunosuprimidos (Dogruman et al, 2009).

Este parásito es reconocido como un agente etiológico de numerosos desórdenes intestinales (diarrea, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome de intestino irritable, colitis ulcerosa) y extraintestinales (urticaria y anemia ferropénica) (del Coco et al, 2017).

En recientes estudios moleculares se han hallado 17 subtipos (ST), de los cuales 9 (ST1-ST9) (linajes ribosomales) colonizan al humano (Fonte et al, 2014), roedores, mamíferos y aves (Taylor et al, 2016), mientras el resto (ST10-ST17) a hospedadores no humanos.

Relación con sistema inmunológico

La inflamación puede ser resultante de la activación del sistema inmunológico en la que intervienen la producción de citocinas pro inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF) α , las interleucinas IL6, e IL8 (Gonsalkorale et al, 2003; Liebregts et al, 2007).

Además de las citocinas pro inflamatorias, la respuesta inmunitaria sistémica puede estar impulsada por la liberación de citocinas Th2, incluidas la IL5, IL6, IL8. La citosina IL13 e IL10 tiene propiedades antiinflamatorias provocando la generación de linfocitos en la mucosa intestinal (Barbara et el, 2011; Vázquez et al, 2015).

La citocina IL8 es un potente quimioatrayente y quimiotáctica (Qazi et al, 2011), importante en la migración y activación de linfocitos y neutrófilos, lo que amplifica la respuesta inflamatoria (Koch et al, 1992). El gen que codifica para IL-8 presenta varios polimorfismos y uno de estos ha sido asociado con un mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico, gastritis atrófica y úlcera gástrica (Zhang et al, 2016). Varios polimorfismos de un solo nucleótido y haplotipos como IL8 -251 (T/A), +678(T/C) +396(T/G), +781(C/T), +1633 (C/T) están asociados a colitis ulcerativa, cáncer gástrico y otros cánceres (Li,et al, 2009;Zhang et al,2016, Liang et al, 2011).

Tratamiento

El tratamiento de los pacientes con IBS debe comenzar con el establecimiento de una relación entre el paciente y el tiempo dedicado a explicar la naturaleza de la enfermedad, las opciones de tratamiento, el impacto de la ansiedad.

Las opciones de tratamiento pueden ser farmacológicas y no farmacológicas, este último en cuanto a la dieta y la psicoterapia parecen tener los mejores resultados a largo plazo.

Las terapias no farmacológicas

Relación médico-paciente.

La relación médico-paciente positiva conduce a una mejor evolución de pacientes con SCI. Es muy importante que el médico tenga una actitud empática hacia el paciente, para que sea participe del manejo de su enfermedad (Palma, 2002).

Medidas higiénico-dietéticas.

Se debe realizar una educación para la salud con consejos como: comer despacio, mantener un horario fijo de comidas, evitar el consumo de bebidas gaseosas y de alimentos irritantes o flatulentos, todo ello con el fin de disminuir la distensión abdominal., y de deben evitar otro tipo de alimentos que empeoren los síntomas.

La dieta debe ser pobre en grasas, para evitar el estímulo de la motilidad colónica. Algunos han usado la fibra en los alimentos para el tratamiento del SCI, su acción mejora las heces de retención de agua, la formación de gel para proporcionar lubricación, aumenta el volumen de las heces (Hadley, 2005).

Tratamiento farmacológico.

Debido a su compleja fisiopatología el tratamiento farmacológico ha sido inadecuado para algunos pacientes, en consecuencia, aumenta la frustración tanto del paciente como el médico (Otero et al, 2005).

La Asociación Mexicana de Gastroenterología publicó la siguiente tabla en la cual se emiten las recomendaciones específicas para el tratamiento de los pacientes con SCI (Tabla 1) (Remes et al, 2010).

Guías clínicas de la Asociación Mexicana de Gastroenterología.		
Intervención terapéutica	Nivel de evidencia	Grado de recomendación
Fibra y agentes formadores de bolo fecal	II	A
Antiespasmódicos solos	11	B
Combinaciones con dimeticona	11	B-C
Antiflatulentos	ND	D
Menta piperita	ND	D
Antidiarreicos	11	B
Loperamida	ND	D
Colestiramina		
Serotoninérgicos	I	A
Alosetrón	I	A
Tegaserod		
Psicofarmacos	I	B
Antidepresivos tricíclicos	II-III	C
Inhibidores de la recaptación de serotonina		
Antibióticos	I	B
Rifaximina		
Probióticos	I	B
Activadores de los canales del cloro	I	B
Lubiproston		

Epidemiología.

Es uno de los trastornos digestivos que afecta a EE.UU., Europa y Asia del 10-20% y del 17% en la población hispana residentes en EE: UU (Valenzuela, 2004; Veitia, 2013), con un patrón de distribución mundial con un gran impacto en la calidad de vida (Díaz et al, 2010).

Con respecto al sexo, es más frecuente en mujeres. Tiene una distribución del 14-24% en mujeres y 5-19% en hombres siendo la edad reproductiva la predominante, con una disminución de la prevalencia en adultos mayores (Álvarez et al, 2008).

En países industrializados se observa una prevalencia del 10 al 15 %. En Estados Unidos es una de las causas más frecuentes de ausentismo laboral después de la gripe y genera de entre 2,4 a 3,5 millones de consultas médicas y más de dos millones de prescripciones, produciendo costos superiores a 33 mil millones de dólares (Díaz et al, 2010).

Se estima que en Europa y América del norte la tasa es de 10 a 15 %. En Suecia, es del 13.5%. La prevalencia en los países en desarrollo va en aumento, además varían en la región Asia—pacífico. Estudios en Begin muestran 0.82%, 5.7 en el sur de China, 6.6% en Hong Kong, 8.6 % en Singapur, 14 % en Pakistán, y 22.1% en Taiwán.

En Latinoamérica, la prevalencia fue 24,8% de acuerdo con los criterios de Manning, 20,4% por Roma II y 15,2% por Roma III. Algunos de los principales países son Venezuela, Chile, Perú, México Colombia (Pontet y Olano C, 2021)

Prevalencia e Incidencia en México.

En México solo existen pocos trabajos. Uno realizado en el 2011 con voluntarios universitarios del Distrito Federal, utilizando un cuestionario con los

criterios de Roma II, se encontró una prevalencia de 24.7% (Bautista et al, 2011). Otro estudio, se realizó en población abierta del estado de Tlaxcala y mostro una prevalencia de 16.0% (López et al, 2009) y otro aplicado a población abierta de la ciudad de Veracruz, la cual reporta una prevalencia de 16.9% (Valerio et al, 2010).

Estudios más recientes muestran una prevalencia de 4.4 utilizando los criterios Roma III al 35% basando en los criterios Roma II (Carmona et al, 2016)

Metodología

Diseño metodológico

Se propuso un estudio de casos y controles, transversal, abierto, observacional y prospectivo. Para ello, con previo consentimiento informado, se seleccionaron secuencialmente a 45 pacientes con SCI con una edad media de 46.5 ± 14.3 , diagnosticados de acuerdo a los criterios Roma III, así como, 137 controles no relacionados con una edad media de 52.2 ± 14.4 . Los criterios de selección para todos los participantes fueron: hombres y mujeres, cuyo hogar de residencia por más de 1 año ha sido en el Distrito Federal y siendo estos referidos de la División de Gastroenterología del Hospital General Dr. Manuel Gea González entre 2008 y 2010, además de que clínicamente presenten: A) Síndrome de Colon Irritable esto bajo los principios actuales de Roma III (presencia de malestar o dolor abdominal al menos 3 días por mes, en los últimos 3 meses, con al menos dos de las siguientes características: 1) alivio con la defecación, 2) cambio en la frecuencia de las deposiciones, 3) cambio en la consistencia o forma de las heces), 4) alguna otra alteración gastrointestinal distinta a Roma III (colitis microscópica, pólipos, divertículos, Síndrome de Crohn, etc). Para fines prácticos, se siguieron las recomendaciones de Longstreth, et al (2006); los criterios de exclusión para ambos grupos fueron la presencia de virus, bacterias intestinales o parásitos distintos de *Blastocystis*, colitis ulcerativa, diverticulosis, enfermedad de Crohn, tumores y hemorroides, dependencia de analgésicos, embarazo.

Se diagnosticó *Blastocystis* mediante PCR (Stensvold et al, 2006) a todos los participantes, de los cuales 14 pacientes (31%) y 6 controles (13%) fueron positivos. También se diagnosticaron los subtipos (ST) de *Blastocystis*, fueron detectados ST1, ST3, estos distribuidos de forma similar entre el grupo de SCI y control: la presencia de SCI no se correlacionó con ningún ST en particular (Taylor et al, 2016).

Para el grupo de los casos se llevó a cabo un escrutinio previo a la selección, en el que los pacientes que presentaron una frecuencia de dolor o malestar abdominal de al menos dos días a la semana fueran candidatos para continuar con el interrogatorio y establecer si cumplieron con los criterios de selección establecidos. Para el grupo de control sin relación se reclutaron donadores sanos del Banco de Sangre interesados en participar en el proyecto de manera altruista. Todos los controles se parearon con los casos por sexo, edad (± 5 años) y fecha de examen clínico.

El tamaño de muestra requerido se calculó con el software Epi-info 6.0 con base en un modelo de casos y controles; considerándose el 7% de exposición de los controles (no enfermos), con un nivel de significancia del 95%, así como, una potencia del 80%.

Obtención y purificación del ADN

A todos los participantes se les tomaron 15 ml de sangre completa, 3 muestras seriadas de heces, además de realizar su historia clínica. De las muestras sanguíneas se obtuvieron los paquetes de leucocitos por centrifugación a 4°C. Los eritrocitos se eliminaron con dos o tres lavados con MgCl 1M, centrifugando cada vez hasta obtener el paquete de leucocitos libre de eritrocitos. El paquete se trató con proteinasa K y se incubaron durante 12 hrs. A 53°C. El DNA se extrajo con la técnica convencional de fenol- cloroformo (Sambrook et al. 2001) y se precipito con isopropanol. Una vez precipitado, se lavó con etanol al 70%, se dejó secar, además,

se suspendió en el amortiguador de Tris-EDTA. Esto se realizó previamente a la estandarización.

Amplificación por PCR.

Para observar la expresión de los alelos, genotipos y frecuencias alélicas de la citocina IL8, se utilizaron las 45 muestras de pacientes con síndrome de SCI ya mencionados (7 masculinos, 38 femeninos), siendo seleccionadas al azar 137 muestras sanas, no relacionadas con la enfermedad, se utilizaron los mismos criterios de exclusión anteriormente mencionados.

Una vez estandarizada la técnica de PCR, se llevó a cabo el análisis de las muestras sanguíneas para identificar los polimorfismos de IL8 (251 A/T), IL8+396 (G/T) (C7T), IL8+1633((T/C) empleando las condiciones de amplificación y los iniciadores documentados en la literatura (Van der Veek et al, 2005; Taguchi et al, 2006).

Para la amplificación de polimorfismos IL8 se requirieron los siguientes primers:

IL8(-251)F (5'-TCTAACACCTGCCACTCTAG-3'),

IL8(-251)R (5'-CCTGAGTCATCACACTTCCT-3'),

IL8(+396)F (5'-CTCTGTGTGAAGGTAAGCAC-3'),

IL8(+396)R (5'-TATCAACAGGCACAGCTCTG-3'),

IL8(+1633)F (5'-GGAAGAGAGCTCTGTCTGGA-3') y

IL8 (+1633)R (5'GATCCTGGCTAGCAGACTAG-3'), estos generan fragmentos de 211 bp (pares de bases), 798 bp y 988 bp.

Amplificación de la muestra

Antes de amplificar las muestras de ADN se estandarizó la concentración de MgCl₂, así como, la temperatura de alineación de forma que se obtuvo el máximo rendimiento con la mayor especificidad. La cantidad de MgCl₂ dependió de cual haya sido la concentración óptima para esa amplificación.

Se amplificaron las muestras en un termociclador Tecne, posteriormente se verificaron las amplificaciones en un gel de agarosa al 2% al TAE 1X con bromuro de etidio. Se incluyó un marcador de peso molecular ADN del fago ϕ X174 digerido con HaeIII. Se corrió a 90 V durante una hora, después se observó la banda del tamaño esperado. Con el transiluminador se observó una sola banda cuyo tamaño debió corresponder a lo esperado (Fig. 1).

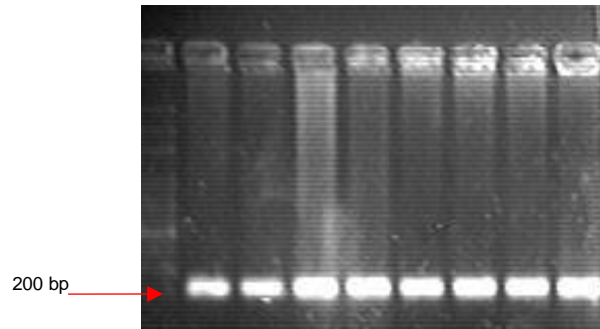


Figura 1. Amplificación IL8 (-251). Marcador 50bp (Invitrogen).

Dot-Blot del producto del PCR.

Preparación de las muestras.

Las muestras se colocaron en cajas de hemaglutinación de 96 pozos 40 μ L del producto amplificado (o más dependiendo de la eficiencia de la amplificación).

Añadió 160 μ L de TE con azul de bromofenol o agua, enseguida se humedeció la membrana en SSPE 10X, se montó en la cámara de Dot-Blot con papel filtro Whatman 3 mm, la membrana y finalmente la tapa, después se conectó al vacío agregando la muestra para dejar secar las membranas a temperatura ambiente desconectando el vacío en un papel filtro.

Desnaturalización y fijación de ADN

Las membranas se incubaron en NaOH 0.4, 10 minutos a temperatura ambiente, para después neutralizarlas con SSPE 10X 10 min a temperatura ambiente, enseguida las membranas secaron a 80°C durante dos horas (sin vacío).

Después de iluminar cada membrana con luz UV, 3 min a temperatura ambiente y almacenarlas en una bolsa de plástico hasta su uso.

Hibridación por el método de quimioluminiscencia

La hibridación se realizó con un oligonucleótido marcado (DIG-dd-UTP) (Fajardo-Dolci et al, 2006) después de los lavados convenientes, este se identifica empleando el fragmento FAB de un anticuerpo anti-DIG. El anticuerpo se unirá en el sitio donde se haya hibridado el oligonucleótido. La visualización se llevó a cabo empleando CSPD (disodium 3-(-4-methoxispiro {1,2, dioxetano3,2'-(5'chloro) tricycle[3.1.13,7]decan}-4yl)phenyl phosphate) con substrato (Roche, Alemania) para emitir la quimioluminiscencia.

La enzima desfosforila al CSPD e inmediatamente se descompone emitiendo luz a 477 nm. La membrana se expone y se obtiene una autoradiografía. La presencia de una señal en la placa indica hibridación positiva.

Prehibridación e hibridación de las membranas.

Cada membrana se incubó con la mezcla de prehibridación a 42°C, se añadió 20 pmol de SSO marcado con ddUTP-digoxigenina. Las membranas se incuban durante 12 h a 42°C.

Quimioluminiscencia

Las membranas se lavaron con SSPE 2X y SDS al 1% a temperatura ambiente durante 10 minutos, luego a la T_m de cada SSO ($T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$) con 6X SSPE y SDS al 1%. Posteriormente se lavan con AMORTIGUADOR 1 (Tris-HCl 100 mM, pH 7.5; NaCl 150 mM; Tween 20 al 0.3%), a continuación se incubaron con reactivo bloqueador (AMORTIGUADOR 2, Boehringer), Fab anti-digoxigenina (Boehringer), se adicionó otra incubación con AMORTIGUADOR 3 (Tris-HCl 100 mM, pH 9.5; NaCl 100 mM; $MgCl_2$ 50 mM) y finalmente se agregó CSPD eliminando el exceso e (Boehringer) incubándolas en bolsas de plástico a 37°C. Se expusieron en placas de rayos X para llevar a cabo varias exposiciones (5, 10, 15 y 20 minutos) para el análisis correcto de los resultados. (Bignon y Fernández-Viña 1995). La

hibridación fue interpretada a ojo, considerando el positivo como un punto negro fuerte y marcado como en Jiménez et al (2012). En la tabla 2 se muestra las sondas empleadas para la tipificación.

Tabla 2. Polimorfismos de IL8 y sondas.

Polimorfismo	Sondas
IL8(-251)	IL8(-251)A (5'CATACATTTGATAATTCA-3') IL8(-251)T (5'CATACAATTGATAATTCA-3')
IL8(+396) (los primers amplificaron 2 polimorfismos)	IL8(+396)G (5'-ATGCATGCTACATGGTATAA-3') IL8(+396)T (5'-ATGCATGCTAAATGGTATAA-3')
	IL8(+781)C (5'ACATTGAACGACTTCCTAT-3') IL8(+781)T (ACATTGAACAACCTTCCTAT-3')
IL8(+1633)	IL8(+1633)T (5'GACATGAGTACAACAAACT-3') IL8(+1633)C (5'-GACATGGGTACAACAAACT-3')

Análisis estadístico

Las frecuencias de alelos, así como genotipos, se calcularon mediante conteo directo comparándose entre pacientes y controles; la fracción etiológica (FE) se calculó según Olivo Díaz et al. (2004). Las frecuencias entre grupos se compararon utilizando prueba Mantel-Haenszel, X^2 o prueba exacta de Fisher y tablas de contingencia, considerando $P < 0.05$ como nivel mínimo significativo. La razón de momios (OR) con un intervalo de confianza del 95% (IC del 95%) se calculó para estimar el riesgo relativo conferido por un determinado alelo y genotipo utilizando Epi-Info versión 6.0 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). Se aplicaron para ambos estudios.

La corrección de Boferonni para comparaciones múltiples para cada conjunto de datos (alelos, genotipos y haplotipos). Los haplotipos de determinaron basándose en el algoritmo esperanza-maximización (EM) con el programa SNPStats (http://bioinfo.iconcologia.net/es/SNPStats_web).

Resultados

Los resultados pertenecen a la Dra. Olivo Díaz María Angélica, jefa del Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad, del Hospital General Dr. Manuel Gea González.

En la siguiente tabla se muestran las asociaciones entre alelos o genotipos y otras comparaciones observadas en pacientes con SCI y/o *Blastocystis* o sin SCI y/o *Blastocystis* frente a los SNP IL-8.

Tabla 3. Asociación entre SCI, *Blastocystis*, y polimorfismos genéticos de IL8

Relaciones	Alelo o genotipo	Valor <i>P</i> ^a	QR(95%CI) ^b	EF ^c
SCI vs Controles	Alelo			
	IL8+396(G)	0.0437	1.78(1.01-3.12)	0.291
	Genotipo			
	IL8+396(GG)	<0.0001	10.13(2.73-37.55)	0.313
Presencia o ausencia de <i>Blastocystis</i>	IL8+781(CT)	0.0248	2.45(1.11-5.39)	0.348
	Alelo			
	IL8+781(T)	0.0448	2.00(1.01-3.97)	0.228
SCI con portadores de <i>Blastocystis</i> vs SCI con ausencia de <i>Blastocystis</i>	Genotipo			
	IL8+396(GG)	0.0025	4.64 (1.63-13.19)	0.29
	Genotipo			
	IL8+396(GG)	0.0272	4.22(1.15-15.5)	0.429

^a Prueba dw Mantel-Haenszel; ^b Razón de momios (Odds ratio) (95%intervalo de confianza); ^c Fracción etiológica (EF)

Los polimorfismos para IL-8 en la posición +396 y +781, fueron SNPs asociados al desarrollo de SCI, mientras que los alelos de IL8+781 (T) se asoció a ser portador de *Blastocystis*, el primero en todos los participantes, el segundo sólo en el grupo con SCI, respectivamente. No se encontró ninguna asociación con respecto a *Blastocystis* y el grupo de control.

Tabla 4. Frecuencia alélica de IL8 en casos de SCI y controles. Modelo Co-dominante.

Alelos	Grupo SCI (n=45;%)	Grupo control (n=137;%)	Valor <i>P</i>	Valor* <i>P</i> _c	OR (95%CI) ^a
IL8-251A	54.08	43.67	0.073	0.146	1.52(0.94-2.47)
IL8-251T	45.92	56.33	0.073	0.146	0.66(0.41-1.07)
IL8+396G	66.04	52.80	0.019	0.038	1.74 (1.07-2.84)
IL8+396T	33.96	47.20	0.019	0.030	0.58 (0.35-0.94)
IL8+781C	67.92	66.20	0.748	1.495	1.08 (0.65-1.79)
IL8+781T	32.08	33.80	0.748	1.495	0.92 (0.56-1.53)
IL8+1633C	31.11	32.42	0.819	1.638	0.94 (0.54-1.63)
IL8+1633T	68.89	67.58	0.819	1.638	1.06 (0.61-1.84)

*Corrección de Bonferroni. ^a Razón de momios (OD) (95% intervalo de confianza)

Tabla 5. Frecuencia genotípica de polimorfismos de IL8 en casos de SCI y controles. Modelo Co-dominante.

Genotipos	Grupo SCI (n=45;%)	Grupo control (n=137;%)	Valor <i>P</i>	Valor* <i>P</i> _c	OR (95%CI) ^a
-251(A/A)	22.45	16.00	0.248	0.745	1.52(0.75-3.09)
-251(T/T)	14.29	28.67	0.014	0.041	0.41(0.20-0.84)
-251(A/T)	63.27	55.33	0.255	0.764	1.39(0.79-2.45)
+396(G/G)	33.96	5.59	<0.001	<0.001	8.68(3.36-22.39)
+396(T/T)	1.89	0.00	0.100	0.301	-
+396(G/T)	64.15	94.41	<0.001	<0.001	0.11(0.04-0.27)
+781(C/C)	39.62	46.48	0.329	0.986	0.76(0.43-1.32)
+781(T/T)	3.77	14.08	0.010	0.032	0.24(0.07-0.77)
+781(C/T)	56.60	39.44	0.015	0.046	2.00(1.14-3.52)
+1633(T/T)	37.78	35.16	0.700	1.402	1.12(0.63-1.99)
+1633(C/T)	62.22	64.84	0.700	1.402	0.89(0.50-1.59)

*Corrección de Bonferroni. ^a Razón de momios (OD) (95% intervalo de confianza)

Los portadores del genotipo IL8+396(GG) mostraron un EF>42%, lo que significa que estas variantes tienen una elevada contribución al desarrollo del SCI en portadores de *Blastocystis*; mientras que otros alelos y genotipos para el SCI o para la presencia de *Blastocystis*, mostraron, independientemente, valores bajos de EF (<35%).

Tabla 6. Modelo dominante y recesivo de los polimorfismos de IL8 en casos de SCI y controles.

Modelo	Genotipo	Grupo SCI (n=45;%)	Grupo control (n=137;%)	Valor P	Valor* Pc	OR (95%CI) ^a
IL8-251						
Dominante	A/T-A/A	85.71	71.33	0.01342	0.02685	2.41 (1.19-4.89)
	T/T	14.29	28.67	0.01342	0.02685	0.41 (0.20-0.84)
IL8+396						
Recesivo	G/G	33.96	5.59	<0.001	<0.001	8.68 (3.37-22.39)
	G/T-T/T	66.04	94.41	<0.001	<0.001	0.12 (0.04-0.29)
IL8+781						
Dominante	C/C-C/T	96.22	85.92	0.01093	0.02186	4.16 (1.29-13.38)
	T/T	3.77	14.08	0.01093	0.02186	0.24 (0.07-0.78)

*Corrección de Bonferroni. ^a Razón de momios (OD) (95% intervalo de confianza)

En el segundo estudio para esclarecer el rol de los polimorfismos de IL8 con SCI se observa que no hay diferencias estadísticas en edad o género entre los controles y los casos. Las frecuencias alélicas así como, genotípicas se muestran en la Tabla 4 y 5.

EL alelo IL8+396G, y el genotipo IL8+396(G/G) están incrementados significativamente en SCI. El alelo IL8-251A mostro solo una tendencia, mientras el genotipo IL8-251(TT) mostro una asociación protectora con SCI, sin embargo, en ambas la significancia relativa se pierde después de la corrección.

Los resultados en el análisis del genotipo para el modelo dominante y recesivo están en la tabla 6. Los genotipos IL8-251(A/T, A/A), IL8+396(G/G), IL8+781(C/C, C/T) están asociados con la susceptibilidad a SCI. Se identificaron 7 diferentes haplotipos; IL8 ATCC está asociado con la susceptibilidad a desarrollo SCI, sin embargo, este no es significativo después de la corrección de Bonferroni.

Tabla 7. Frecuencia de haplotipos de los polimorfismos de IL8 en casos de SCI y controles.

Haplotipos	Grupo SCI (n=45;%)	Grupo control (n=137;%)	Valor <i>P</i>	Valor* <i>P</i> _c	OR (95%CI) ^a
AGCT	21.34	22.16	0.896	6.272	0.95 (0.47-1.94)
TTCC	3.48	19.09	0.003	0.025	0.15 (0.03-0.63)
AGTT	8.24	9.02	0.898	6.289	0.93 (0.32-2.68)
TGCT	12.71	9.64	0.402	2.814	1.47 (0.59-3.63)
ATCC	16.54	6.87	0.031	0.218	2.62 (1.06-6.42)
TTCT	6.91	8.48	0.689	4.829	0.79 (0.25-2.50)
TGTT	11.4	9.96	0.727	5.092	1.18 (0.46-3.00)

*Corrección de Bonferroni. ^a Razón de momios (OR) (95% intervalo de confianza)

Discusión

El síndrome de colon irritable (SCI) sigue siendo un trastorno multifactorial digestivo frecuentemente diagnosticado en la práctica clínica repercutiendo en la economía del paciente y la sociedad (El-Salhy et al, 2014), caracterizado por dolor o malestar abdominal que se asocia con alteraciones del hábito intestinal, así como con otros síntomas gastrointestinales como distensión o sensación de inflamación abdominal, evacuación incompleta, urgencia, pujo, provocando el deterioro de la vida calidad de vida de los pacientes (Ibarra et al, 2016; López et al, 2009).

Sin embargo su causa no está bien definida por algún agente, existen varios factores que intervienen en la fisiopatología del SCI, como la genética, la dieta, la microbiota intestinal, las células endocrinas intestinales, el estrés y la inflamación de bajo grado (El-salhy et al, 2020), así mismo se asocia a *Blastocystis sp* ya que es un protozooario asociado a una amplia gama de trastornos gastrointestinales y

extraintestinales (Méndez et al, 2020), aunado a su variabilidad genética y la diversidad de los subtipos (Fonte et al, 2014), los pacientes pueden manifestar una amplia gama de síntomas que dependen de la integridad y del estado de salud del mismo (Sanchez et al, .

La reacción inflamatoria está relacionada con la respuesta inmunitaria ya que la actividad inflamatoria está regulada por citocinas IL4, IL6,IL8, factor de necrosis tumoral α así como por citocinas antiinflamatorias como IL10 (Vázquez, 2015). IL-8 (o también conocida como Quimiocina CXCL8) está envuelta en los procesos inflamatorios teniendo un papel vital en muchas enfermedades inflamatorias (Zhu et al, 2021). El gen que codifica para IL8 presenta varios polimorfismos, uno de estos, asociado a desarrollar cáncer gástrico, gastritis atrófica, así como, úlcera gástrica (Taguchi et al, 2005).

En el primer estudio, se encontró que el alelo G y la variante homocigota para IL-8 en la posición +396; eran relevantes para desarrollar SCI. Un estudio realizado en una población del centro-norte de China reveló que el genotipo IL8+396(T/T) tiene un riesgo relativo 2 veces mayor de adenocarcinoma gástrico (Savage et al. 2004), en cambio, aunque este estudio mostro que también IL8 (-251) se relacionaba, en el primer estudio no se encontró asociación.

El genotipo IL-8+396 (GG) fue relevante, porque sólo se encontró asociado a portadores de *Blastocystis* y en portadores de SCI-*Blastocystis*, en estos últimos la influencia del genotipo fue mayor, teniendo en cuenta los valores de OR y EF. Los alelos IL-8+781 (T) también se asociaron a los portadores de *Blastocystis* y a los portadores de SCI-*Blastocystis*. Las cisteín-proteasas están presentes en numerosos parásitos, como *Blastocystis*. (Roberts, 2014) Estas enzimas cumplen un papel activo en la infección, interviniendo en procesos de daño tisular, evasión inmunitaria. La cisteín-proteasa de *Blastocystis* estimula la producción de IL-8 por las células epiteliales del colon a través de un mecanismo dependiente del factor nuclear kB. Dicho mecanismo sería el responsable de la pérdida de fluidos y la inflamación intestinal en los individuos afectados. Esto sugiere que la infección por *Blastocystis*. Estimula la respuesta específica local e involucra a los linfocitos T, los

monocitos/macrófagos y las células NK3. Un estudio demostró la posible relación entre *Blastocystis* y el SII (con 95 pacientes con SII y 55 casos de control) en el que se observó una tasa de infección del 46% en los pacientes con SII y sólo del 7% en el grupo de control (Yakoob et al, 2004).

Un estudio en la población de Japón demostró que el genotipo IL8 -251 (A/A) tiene un mayor riesgo de desarrollar gastritis atrófica y cáncer gástrico (Ohyachi et al, (2005; Taguchi et al, 2005) en comparación con el genotipo (T/T): estudios similares en población mexicana y etnias asiáticas encontraron que el alelo IL8-251A estaba asociado a cáncer gástrico (Garza et al, 2007; Moghimi et al, 2020).

Un caso-cohorte realizado en una población de norte de China reveló que los variantes homocigotas de IL8-251(T/T) y +396(T/T) tiene un riesgo dos veces mayor de adenocarcinoma gástrico (Savage et al, 2004); En otro estudio realizado en niños las variantes heterocigotas -251(A/T) y +781(C/T) tienen un mayor riesgo de desarrollar gastritis por infección de *Helicobacter pylori* (Supriatmo et al, 2020). En el presente estudio IL8 +396 (G/G) y +781 presentan un alto riesgo a desarrollar el SCI, mientras que IL8-251(T/T) está asociado con protección, ya sea en el modelo co-dominante y dominante (Tabla 4 y 5), mientras que en el modelo dominante son más los pacientes que los controles para el alelo IL8-251A (genotipos A/T –A/A), teniendo una asociación significativa de susceptibilidad. En los modelos co-dominante, dominante y recesivo, el genotipo IL8+396(G/G) tiene la misma razón de probabilidad (OD 8.68), estos resultados apoyan el modelo recesivo, ya que tiene dos dosis del alelo G para ser susceptible a SCI.

El haplotipo IL8 TTCC aumentó significativamente en el grupo control, mientras que el haplotipo ATCC se asoció con susceptibilidad a desarrollar SCI.

Conclusión

Finalmente, el polimorfismo de IL8 -251 aunque no está asociado con el síndrome de colon irritable causado por *Blastocystis*, si está asociado solo a SCI, sin embargo esta posición tiene un rol relevante y significativo en diversas enfermedades como cáncer gástrico y gastritis.

Referencias.

1. Álvarez, D. F. G., Medina, L. M. A. R., Vargas, J. G. M., & Oviedo, S. C. M. (2008). Síndrome de intestino irritable: Una perspectiva actualizada. *MedUNAB*, 11(1), 50-60.
2. Barbara, G., Cremon, C., Carini, G., Bellacosa, L., Zecchi, L., De Giorgio, R., ... & Stanghellini, V. (2011). The immune system in irritable bowel syndrome. *Journal of neurogastroenterology and motility*, 17(4), 349-359.
3. Barkhordari, E, Rezaei, N, Ansaripour, B, Larki, P, Alighardashi, M, Ahmadi-Ashtiani HR, Mahmoudi, M, Mohammad-Reza, Habibollahi, P and Bashashati, M. (2010). Proinflammatory Cytokine Gene Polymorphisms in Irritable Bowel Syndrome. *Journal of Clinical Immunology*. Vol. 30, (1), 74-79.
4. Bautista Cerecedo, Ranulfo, Ortiz Espinosa, Rosa María, & Muñoz Juárez, Sergio. (2011). Síndrome de intestino irritable en estudiantes de medicina. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 54(3), 4-11.
5. Boorom KF, Smith H, Nimri L, Viscogliosi E, Spanakos G, Parkar U, Li LH, Zhou XN, Ok UZ, Leelayoova S, Jones MS. (2008). Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasites & Vectors*. Oct 21;1(1):40
6. Carmona-Sánchez, R., Icaza-Chávez, M.E., Bielsa-Fernández, M.V., Gómez-Escudero, O., Bosques-Padilla, F., Coss-Adame, E., Esquivel-Ayanegui, F., Flores-Rendón, Á.R., González-Martínez, M.A., Huerta-Iga, F., López-Colombo, A., Méndez-Gutiérrez, T.H., Noble-Lugo, A., Nogueira-de Rojas, J.R., Raña-Garibay, R.H., Remes-Troche, J.M., Roesch-Dietlen, F., Schmulson, M.J., Soto-Pérez, J.C., Tamayo, J.L., Uscanga, L.F., Valdovinos, M.Á., Valerio-Ureña, J., Zavala-Solares, M.R. (2016). *Consenso mexicano sobre el síndrome de intestino irritable*. *Revista de Gastroenterología de México*. 81(3);149-167.
7. Castañeda Sepúlveda, R. (2010). Síndrome de intestino irritable. *Medicina universitaria*, 12(46), 39-46.

8. Clark, C. G., van der Giezen, M., Alfellani, M. A., & Stensvold, C. R. (2013). Recent developments in *Blastocystis* research. *Advances in parasitology*, 82, 1-32.
9. Córdova PVH, Ibarrola CJL, Hegewisch OME, Argüelles DP, Vargas GM, Torre SMC, Castillo GFA, Maldonado VMA, Cornejo LG, León MG, Alemán OG, Díaz GE, Rodríguez WFL, Escarela SM, Cabrera JR, Orzechowsky RA, Akaki BJL, Betancourt GJR, Garza VM, Burgos A Frecuencia de síndrome de intestino irritable en la consulta de medicina interna y cirugía general en tres centros de atención médica de la Ciudad de México. *Med Int Mex*. 2008; 24(2):120-124.
10. Díaz Cárdenas, S., Díaz Caballero, A., & Arrieta Vergara, K. M. (2010). Factores psicosociales, sociodemográficos, culturales y familiares asociados a Síndrome de Intestino Irritable. *Revista Clínica de Medicina de Familia*, 3(2), 78-82.
11. Dogruman-Al, F., Kustimur, S., Yoshikawa, H., Tuncer, C., Simsek, Z., Tanyuksel, M., Araz, E. & Boorum, K. (2009). *Blastocystis* subtypes in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(5), 724-727.
12. Del Coco, V. F., Molina, N. B., Basualdo, J. A., & Córdoba, M. A. (2017). *Blastocystis* spp.: avances, controversias y desafíos futuros. *Revista argentina de microbiología*, 49(1), 110-118.
13. El-Salhy, M., Gundersen, D., Gilja, O. H., Hatlebakk, J. G., & Hausken, T. (2014). Is irritable bowel syndrome an organic disorder?. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(2), 384.
14. El-Salhy, M. (2020). Possible role of intestinal stem cells in the pathophysiology of irritable bowel syndrome. *World journal of gastroenterology*, 26(13), 1427.
15. Fajardo-Dolci, G., Solorio-Abreu, J., Romero-Álvarez, J. C., Zavaleta-Villa, B., Cerezo-Camacho, O., Jiménez-Lucio, R., & Olivo-Díaz, A. (2006). DQA1 and DQB1 association and nasal polyposis. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 135(2), 243-247.

16. Fonte Galindo, L., Fong González, A., Méndez Sutil, Y., & Moreira Perdomo, Y. (2014). Patogenicidad de *Blastocystis* sp. Evidencias y mecanismos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 66(3), 312-321.
17. Fragoso Arbelo, T., & Milán Pavón, R. (2018). El síndrome de intestino irritable como causa de dolor abdominal crónico. *Revista Cubana de Pediatría*, 90(3), 1-18.
18. Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, Mendoza-Ibarra SI, Flores-Gutierrez JP, Maldonado-Garza HJ, Perez-Perez GI (2007). Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer. *BMC Cancer* 7(1), 1-5.
19. Gonsalkorale, W. M., Perrey, C., Pravica, V., Whorwell, P. J., & Hutchinson, I. V. (2003). Interleukin 10 genotypes in irritable bowel syndrome: evidence for an inflammatory component?. *Gut*, 52(1), 91-93.
20. González M, de Ascencao M. (2005). Síndrome de Intestino Irritable. Aspectos Psicológicos. *Facultad de Medicina*, 28(2):139-145.
21. Gunn, M. C., Cavin, A. A., & Mansfield, J. C. (2003). Management of irritable bowel syndrome. *Postgraduate medical journal*, 79(929), 154-158.
22. Hadley, S. K., & Gaarder, S. M. (2005). Treatment of irritable bowel syndrome. *American family physician*, 72(12), 2501-2506..
23. Ibarra, C., Herrera, V., Pérez de Arce, E., Gil, L. C., Madrid, A. M., Valenzuela, L., & Beltrán, C. J. (2016). Parasitosis y síndrome de intestino irritable. *Revista chilena de infectología*, 33(3), 268-274.
24. Jimenez –Gonzalez, D.E., Martinez-Flores, W.A., Reyes-Gordillo, J., Ramirez-Miranda, M.E., Arroyo-Escalante, S., Romero-Valdovinos, M., Stark, D., Souza-Saldivar, V., Martinez-Hernandez, F., Flisser, A., Olivo-Diaz, A., Maravilla, P. (2012). *Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. *Parasitology research*, 110, 1269-1275.
25. Koch, A.E., Poverini, P.J., Kunkel, S.L., Harlow, L.A., DiPietro, L.A., Elnor, V.M., Elnor, S.G., Strieter, R.M. (1992). Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*, 258(5089), 1798-1801.

26. Li K, Yao S, Liu S, Wang B, Mao D. (2009). Genetic polymorphisms of interleukin 8 and risk of ulcerative colitis in the Chinese population. *Clinica Chimica Acta*, 405(1-2):30-34.
27. Liang, W.D., Li, J.S., Li, K.S., Jin, J., Yan, J., Yang, J.F., Bi, Y.T. (2011). Association of IL-8 gene polymorphisms with inflammatory bowel disease in Chinese patients. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 91(26),:1825-1829.
28. Liebrechts, T., Adam, B., Bredack, C., Roth, A., Heinzl, S., Lester, S., Downie, D.S., Smith, E., Drew, P., Talley, N.J., Holtmann, G. (2007). Immune activation in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 132(3), 913-920.
29. Longstreth, G.F., Thompson, W.G., Chey, W.D., Houghton, L.A., Mearin, F., Spiller, R.C. (2006). Functional bowel disorders. *Gastroenterology*, 130(5):1480-1491.
30. López Colombo, A., Rivera Ramos, J. F., & Sobrino Cossio, S. (2009). Guías clínicas de diagnóstico y tratamiento en gastroenterología del síndrome de intestino irritable. *Rev Gastroenterol Mex*, 74, 56-7.
31. Manning, A.P., Thompson, W.G., Heaton, K.W. & Morris, A.F. (1978). Towards positive diagnosis of the irritable bowel. *Br Med J*. 2(6138), 653-654.
32. Mazzucchelli, L., Hauser, C., Zgraggen, K., Wagner, H., Hess, M., Laissue, J.A., Mueller, C. (1994). Expression of interleukin-8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histological grade of active inflammation. *The American journal of pathology*, 144(5), 997.
33. Méndez Bustelo, M.A., Muiño Joga, M. do, Garabal Sánchez, S., Ben López, E., & Llovo Taboada, J.. (2015). *Blastocystis hominis*, un gran desconocido. *Pediatría Atención Primaria*, 17(65), e39-e44
34. Mitselou, A., Grammeniatis, V., Varouktsi, A., Papadatos, S.S., Katsanos, K., Galani, V. (2020). Proinflammatory cytokines in irritable bowel syndrome: a comparison with inflammatory bowel disease. *Intestinal Research*, 18(1),115-120.
35. Moghimi, M., Dastgheib, S.A., Heiranizadeh, N., Zare, M., Sheikhpour, E., Neamatzadeh, H. (2020). Association of IL-8 -251T>A (RS4073)

polymorphism with susceptibility to gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on 33 case-control studies. *Archivos de Gastroenterología*, 57(1):91-99.

36. Nielsen, O.H., Rüdiger, N., Gaustadnes, M., Horn, T. (1997). Intestinal interleukin-8 concentration and gene expression in inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 32(10), 1028-1034.
37. Ohyauchi, M., Imatani, A., Yonechi, M., Asano, N., Miura, A., Iijima, K., Koike, T., Sekine, H., Ohara, S., Shimosegawa, T. (2005). The polymorphism interleukin 8 -251 A/T influences the susceptibility of Helicobacter pylori related gastric diseases in the Japanese population. *Gut*, 54(3):330-335.
38. Olivo-Díaz A, Debaz H, Alaez C, Islas VJ, Pérez-Pérez H, Hobart O, Gorodezky C (2004). Role of HLA class II alleles in susceptibility to and protection from localized cutaneous leishmaniasis. *Human Immunology*, 65(3), 255-261
39. Ortiz Lucas, M., Saz Peiró, P., & Sebastián Domingo, J. J. (2010). Hipótesis inmune del síndrome del intestino irritable: Primera parte: papel de los linfocitos y mastocitos. *Revista Española de enfermedades digestivas*, 102(11), 637-647.
40. Otero Regino, W. & Gómez Zuleta, M. (2005). Síndrome de Intestino Irritable: diagnóstico y tratamiento farmacológico Revisión concisa. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 25(2), 189-197
41. Palma, R. (2002). El paciente digestivo funcional refractario: un desafío a la relación médico-paciente. *Revista médica de Chile*, 130(2), 219-225.
42. Pontet, Y., & Olano, C. (2021). Prevalencia de síndrome de intestino irritable en América Latina. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 41(3), 144-149
43. Qazi, B. S., Tang, K., Qazi, A. (2011): Recent advances in underlying pathologies provide insight into interleukin-8 expression-mediated inflammation and angiogenesis. *International Journal of Inflammation*, 2011. 132-138.
44. Remes-Troche, J. M., Gómez-Escudero, O., Nogueira-de Rojas, J. R., Carmona-Sánchez, R., Pérez-Manauta, J., López-Colombo, A., Sanjurjo-

- García, J. L. (2010). Tratamiento farmacológico del síndrome de intestino irritable: revisión técnica. *Rev Gastroenterol Mex*, 75(1), 42-66.
45. Roberts, T., Stark, D., Harkness, J. & Ellis, J. (2014). Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathogens*, 6(1),1-9.
46. Sánchez-Vega, J.T., Morales-Galicia, A.E., Tapia-Castor, A.C., Sánchez-Aguilar, D.I., Navez-Valle, A., Coquis-Tellez, B., Hernández-López, R., Morales-Reyes, E.G. & Hernández-Covarrubias, R.I. (2022). Análisis retrospectivo de un protozoo emergente en México: *Blastocystis* spp. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 20(2), 101-110.
47. Savage, S.A., Abnet, C.C., Mark, S.D., Qiao, Y.L., Dong, Z.W., Dawsey, S.M., Taylor, P.R., Chanock, S.J. (2004). Variants of the IL8 and IL8RB genes and risk for gastric cardia adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 13(12),2251-2257
48. Stark, D., van Hal, S., Marriott, D., Ellis, J., Harkness, J. (2007). Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. *International journal for parasitology*, 37(1), 11-20.
49. Stensvold, R., Brillowska-Dabrowska, A., Nielsen, H.V., Arendrup, M.C. (2006). Detectio of *Blastocystis* hominis in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *Journal of Parasitology*, 92(5),1081-1087
50. Supriatmo, D., Siregar, G. A., Pahlevi Adeputra Nasution, I., & Ramayan, O. R. (2020). Interleukin-8 heterozygous polymorphism (-251 T/A and+ 781 C/T) increases the risk of Helicobacter pylori-infection gastritis in children: a case control study. *Med Glas (Zenica)*, 17(2), 383-388.
51. Taguchi, A., Ohmiya, N., Shirai, K., Mabuchi, N., Itoh, A., Hirooka, Y., Niwa, Y. & Goto, H. (2005). Interleukin-8 promoter polymorphism increases the risk of atrophic gastritis and gastric cancer in Japan. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 14(11), 2487-2493.

52. Taylor-Orozco, V., López-Fajardo, A., Muñoz-Marroquín, I., Hurtado-Benítez, M., & Ríos-Ramírez, K. (2016). *Blastocystis* sp: EVIDENCE OF ITS PATHOGENIC ROLE. *Biosalud*, 15(2), 69-86.
53. Thompson, W. G., Longstreth, G. F., Drossman, D. A., Heaton, K. W., Irvine, E. J., & Müller-Lissner, S. A. (1999). Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gut*, 45(suppl 2), II43-II47.
54. Valerio-Ureña, J., Vásquez-Fernández, F., Jiménez-Pineda, A., Cortazar-Benitez, L. F., Azamar-Jácome, A. A., & Duarte-Velázquez, M. E. (2010). Prevalencia del síndrome de intestino irritable en población abierta de la ciudad de Veracruz, México. *Rev Gastroenterol Mex*, 75(1), 36-41.
55. Valenzuela, J., Alvarado, J., Cohen, H., Damiao, A. O. M. C., Francisconi, C., Frugone, L., ... & Zalar, A. (2004). Un consenso latinoamericano sobre el síndrome del intestino irritable. *Gastroenterología y hepatología*, 27(5), 325-343.
56. Vázquez-Frias, R., Gutiérrez-Reyes, G., Urbán-Reyes, M., Velázquez-Guadarrama, N., Fortoul-van der Goes, T. I., Reyes-López, A., & Consuelo-Sánchez, A. (2015). Perfil de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en pacientes pediátricos con síndrome de intestino irritable. *Revista de Gastroenterología de México*, 80(1), 6-12.
57. Van Der Veek, P. P., Van Den Berg, M., De Kroon, Y. E., Verspaget, H. W., & Masclee, A. A. (2005). Role of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG*, 100(11), 2510-2516.
58. Veitia, G., Pernalete, B., Cachima, L., Manuitt, J., La Cruz, M., Da Farias, A., ... & Angulo, D. (2013). Prevalencia del síndrome intestino irritable en la población adulta venezolana. *Gen*, 67(3), 139-144.
59. Yakoob, J., Jafri, W., Jafri, N., Khan, R., Islam, M., Beg, M.A., Zaman, V. (2004). Irritable bowel syndrome: in search of an etiology: role of *Blastocystis hominis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 70(4), 383-385.

- 60.** Zhang, M., Fang, T., Wang, K., Mei, H., Lv, Z., Wang, F., Cai, Z., & Liang, C. (2016). Association of polymorphisms in interleukin-8 gene with cancer risk: a meta-analysis of 22 case–control studies. *OncoTargets and Therapy*, 3727-3737.
- 61.** Zhu, Y., Yang, S., Zhao, N., Liu, C., Zhang, F., Guo, Y., & Liu, H. (2021). CXCL8 chemokine in ulcerative colitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 138, 111427.