



BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDIO DE LOS PRICIPALES POLIMORFISMOS DE UN
SOLO NUCLEÓTIDO
DEL GEN CARD15/NOD2 ASOCIADOS CON LA
ENFERMEDAD DE CROHN EN DISTINTAS POBLACIONES

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA:

JESÚS AZAHEL PIÑA LOPEZ

DIRECTORA: WENDY ARGELIA GARCÍA SUASTEGUI

CODIRECTORA: CARLA GARZA LOMBO



JUNIO 2021

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a Dios Elohim por la culminación de esta tesis.

Me gustaría poder agradecer a todas y cada una de las personas que me apoyo no solo en mi formación académica sino también en mi formación como persona, pero me tomaría más páginas que las de la propia tesis.

Agradezco a la doctora Wendy Argelia García Suastegui por haberme brindado la oportunidad de trabajar bajo su dirección en el departamento de toxicología y biología de la reproducción del ICUAP, por guiarme en la realización de esta tesis y dado su tiempo y apoyo en todo momento. Doctora sé que no fui el mejor alumno que haya tenido bajo su dirección, pero aun así muchas gracias por permitirme trabajar con usted.

A la doctora Carla Garza Lombo quien tomo de su valioso tiempo para ser mi codirectora y poderme dar correcciones y observaciones objetivas para la elaboración de la tesis.

Agradezco también a mi familia por todo el apoyo y amor incondicional a lo largo de todos estos años.

Me gustaría agradecer también a mis amigos en la carrera en especial a los primeros y los últimos que hice estando en el servicio social. A Brenda Ratoni, a Brenda Solís y a Normita con quienes compartí no solo risas sino también muchos proyectos en la carrera, no sé qué habría sido de mi sin ustedes.

A todos los estudiantes del laboratorio de biología molecular: Ricardo, Etssuri, Mónica, Triny, Amaury, Jessie, Itzel, Alba, Paola, Esteban, Fernando, Agus y Adriana. No se puede pedir mejores compañeros y amigos que ustedes. Por su puesto también agradezco a la doctora Rocío Pérez y Terrón quien me abrió las puertas de ese laboratorio.

A todos los profesores de la licenciatura por haber hecho que amase la biología gracias a sus clases, en especial a la maestra Monserrat Vázquez Balbuena y a la bióloga Saira

Dedicatoria

A mi familia: mi madre Patricia, mi abuela Petra, mis hermanas Miriam, Karen y Jaqueline y mis tías Angelica, Claudia, Maricela y Martha. A mi tía María Trinidad y mis tíos Guillermo y Gerardo, se las dedico por todo el apoyo que me dieron, por animarme cuando yo pensaba que era demasiado complicado, por corregirme cuando era obvio que estaba equivocado y por creer en mi hasta el final.

Índice

Índice de figuras	4
Índice de tablas	5
1. Resumen	6
2. Introducción	7
3. Antecedentes	9
3.1 Gen CARD15/NOD2	9
3.2 Señalización y Funciones de la proteína NOD2	11
3.3 Principales polimorfismos de un solo nucleótido del gen NOD2/CARD15 y su asociación con la enfermedad de Crohn	14
3.3.1 Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)	14
3.3.2 Colitis ulcerosa	15
3.3.3 Enfermedad de Crohn	16
3.3.4 SNP´s de CARD15/NOD2 asociados a la enfermedad de Crohn	18
4. Justificación	21
5. Hipótesis	22
6. Objetivos	22
6.1 Objetivo general	22
6.2 Objetivos específicos	22
7. Material y Métodos	23
8. Resultados	25
8.1 Polimorfismos de CARD15/NOD2 en otras enfermedades	25
8.2 Diferencias en las frecuencias en distintos países	27
8.3 Genes involucrados en la enfermedad de Crohn en poblaciones no caucásicas	31
9. Discusión	34
10. Conclusiones	37
11. Perspectivas	38
12. Bibliografía	39
13. Abreviaturas	50
14. Anexos	52

Anexo 1 PCR-RFLP en la detección de frecuencias polimórficas y Análisis <i>in silico</i> de los polimorfismos R702W, G908R y L1007fsinc	52
Anexo 2 Protocolo de extracción ADN de sangre entera por método de gradiente de sacarosa	55

Índice de figuras

Figura y descripción	Página
<i>Fig. 1.</i> Se ejemplifica la clasificación de los SNP de acuerdo con su posición en el genoma.	9
<i>Fig. 2.</i> Estructura de NOD2 tanto lineal como tridimensional en la que se observan los tres dominios principales. En la figura también se observa el sitio de unión del ligando, la interacción entre los subdominios WHD y NBD mediada por ADP. Imagen tomada de Maekawa <i>et al</i> , 2016.	11
<i>Fig. 3.</i> Vía de señalización de NOD2 activado por la interacción con MDP. En la forma inactiva hay una interacción entre NDB y WH medida por ADP que permite el empaquetamiento; una vez unido el ligando HD2 media cambios conformacionales en las regiones antes mencionadas y HD1 a fin de permitir un intercambio de ADP por ATP, la auto oligomerización y la exposición del dominio CARD. En su forma activa NOD2 recluta a la proteína adaptadora RIPK2, que terminara con la activación de las vías de MAPK y del NF-κB. Imagen tomada de Al Nabhani <i>et al</i> , 2017	14
<i>Fig. 4.</i> Además de sensor MDP, NOD2 es capaz también de participar en diversos procesos como la detección de ssRNA vírico, activando vías de inflamación en respuesta al estrés del retículo endoplásmico y en la autofagia al interactuar con ATG16L1. Imagen obtenida de Negroni <i>et al.</i> , 2018	15
<i>Fig. 5.</i> Factores de riesgo en el desarrollo de la colitis ulcerosa, aunque estos factores también están presentes en la enfermedad de Crohn y en general en la EII. Tomada de Gajendran <i>et al.</i> , 2016	16
<i>Fig. 6.</i> Se muestran las posiciones donde se encuentran los tres polimorfismos: R702W se encuentra en el exón 4, G908R está ubicado en el exón 8 y L1007fsinC en el exón 11. Imagen obtenida y modificada de Bonen y Cho, 2003.	20
<i>Fig. 7.</i> Esquema donde se muestra el proceso de selección de los artículos usados para esta investigación bibliográfica, los criterios de selección se muestran arriba.	25
<i>Fig. 8.</i> Muestra en cuatro categorías la frecuencia de portadores de los polimorfismos en pacientes con enfermedad de Crohn, se observa que en muchos países de Latinoamérica se desconoce la frecuencia de estos, por lo que existe una gran diferencia con respecto a los países europeos, el mayor porcentaje de portadores se encuentra en las poblaciones caucásicas: europeas y en Canadá y Estados Unidos	32

Índice de tablas

Numero de tabla	Pagina
Tabla 1	18
Tabla 2	19
Tabla 3	26
Tabla 4	30
Tabla 5	34

1. Resumen

Los polimorfismos de un solo nucleótido son variaciones que involucran el cambio de una base nitrogenada por otra o bien la inserción de una sola base en una posición dada, se encuentran distribuidos a lo largo de todo nuestro genoma y su presencia en él, los hace de gran importancia tanto medica como biológica pues se ha descubierto su asociación con diversas enfermedades, tal es el caso de los polimorfismos del gen CARD15/NOD2 asociados a un mayor riesgo de padecer la enfermedad de Crohn. Aunque se sabe con seguridad que los polimorfismos R702W, G908R y L1007fsinC son un factor de riesgo en poblaciones caucásicas también se ha demostrado que existen diferencias marcadas entre distintas poblaciones. Esta revisión bibliográfica tiene como objetivo conocer la situación actual de las variantes en el gen CARD15/NOD2 y otros genes (polimorfismos de un solo nucleótido) con respecto al riesgo de padecer la enfermedad de Crohn en distintas poblaciones. Para ello se realizó una búsqueda exhaustiva de la información en buscadores especializados como PUDMED y Google scholar. Las palabras clave incluyeron: IBD, Crohn´s disease, CARD15/NOD2, polymorphisms, Asian, African, Latin-American, populations etc. La información se obtuvo de artículos de revisión, metaanálisis y artículos experimentales, se elaboraron tablas para resumir la información de las frecuencias de los portadores en distintas poblaciones y sobre polimorfismos de un solo nucleótido en genes distintos a CARD15/NOD2 en poblaciones no caucásicas. También se elaboro un mapa que con la información de la tabla de frecuencia de portadores en diversas poblaciones. La información que se tiene con respecto a la frecuencia de los portadores, genes asociados y datos epidemiológicos sobre EC es escasa en Latinoamérica, África y Asia. CARD15/NOD2 sigue siendo uno de los genes con una fuerte asociación al riesgo de padecer EC en la actualidad se han reportado distintos genes que tienen mayor importancia en otras poblaciones y que también tienen diferencias por lo que la genética de poblaciones es muy importante para poder dilucidar esta diferencias

2. Introducción

Se considera a los polimorfismos de un solo nucleótido o SNP (por sus siglas en inglés) como variaciones en una secuencia genética en las que existe sustitución o inserción de un solo nucleótido por otro en una posición dada (Vignal et al, 2002; Thavamanikumar et al; 2011), no obstante no todas las variaciones que involucran este tipo de cambios pueden ser consideradas como SNP ya que deben estar presente en al menos 1% de la población (Brooks, 1999; Vignal et al, 2002; Checa-Caratachea, 2007). La mayoría de los SNP son bialélicos, lo que significa que tienen 2 alelos (Checa-Caratachea, 2007; Rao y Gu, 2008; Ramírez-Bello y Jiménez-Morales, 2017).

Los SNP se encuentran distribuidos a lo largo de todo nuestro genoma y tienen una frecuencia de 1 por cada 1000 pares de bases (pb) (International HapMap consortium, 2005) por esta razón una de las clasificaciones más conocidas de estos polimorfismos se da en dependencia de la posición que ocupan dentro del genoma, por lo que podemos tener: cSNP si el polimorfismo se encuentra en regiones codificantes, iSNP si está presente en regiones intrónicas, rSNP si se presenta en regiones reguladoras y gSNP si el polimorfismo está en regiones intergenómicas (Cargill, 1999). Por su parte los SNP en regiones codificantes se dividen de la siguiente manera (Hernández-Romano, 2009): si genera una alteración en la secuencia aminoacídica de una proteína y por lo tanto afecta su función se le denomina polimorfismo no sinónimo (nsSNP) pero si no altera la secuencia se le denomina SNP sinónimo (sSNP) (figura 1).

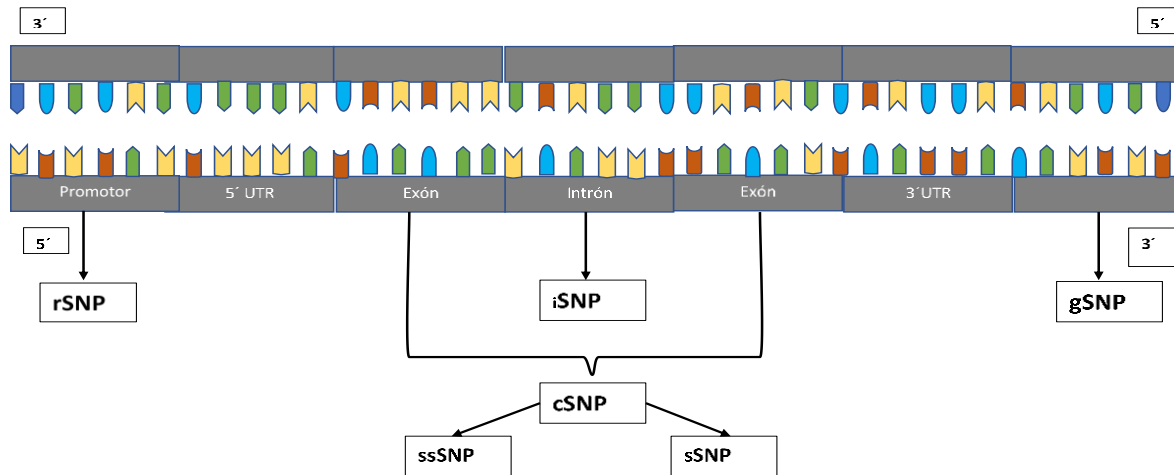


Fig. 1. Se ejemplifica la clasificación de los SNP de acuerdo con su posición en el genoma.

La presencia de los SNP a lo largo de nuestro genoma los hace de gran importancia tanto medica como biológica ya que como se mencionó anteriormente la alteración de uno de los nucleótidos puede generar alteraciones en la proteína que se traduzca en un funcionamiento nulo o exacerbado; otras variantes funcionales en regiones promotoras pueden alterar la actividad transcripcional del gen o en regiones intrónicas afectar la estabilidad del gen. De cualquiera de las alteraciones mencionadas se puede correr el riesgo de que los individuos portadores de algún SNP puedan desarrollar alguna enfermedad o bien tener un mayor riesgo de padecerla; así diversos estudios asocian a los SNP con alguna enfermedad como el Alzheimer o la ataxia de Friedrich (Iniesta, Guinó y Moreno, 2005), un claro ejemplo también son los diversos polimorfismos del gen CARD15/NOD2 asociados a enfermedades inflamatorias, y específicamente a un mayor riesgo de padecer la enfermedad de Crohn.

3. Antecedentes

3.1 Gen CARD15/NOD2

El gen NOD2/CARD15 fue identificado y caracterizado en monocitos en el año 2001 por el equipo de investigación de Ogura, la razón de su nombramiento como NOD2 fue la homología estructural que compartía con el gen NOD1 anteriormente descubierto, aunque a diferencia de este, poseía dos dominios CARD (Ogura *et al.*, 2001). Poco tiempo después fue renombrado como CARD15 por el comité de nomenclatura HUGO y el término NOD2 se usó para referirse al receptor intracelular codificado por este gen (Gómez-García, 2009). El gen se encuentra ubicado en el cromosoma 16 (16q12) y contiene 12 exones y una secuencia genómica de 35.9 kb (Vermeire, 2004; Croucher *et al.*, 2003). Su estructura es similar a los reguladores de apoptosis celular APAF1/CED4/NOD1 y al gen R de resistencia contra patógenos de las plantas que de acuerdo con Leong *et al.* (2003) y Ogura *et al.* (2001). Aunque en un principio se pensaba que se expresaba solo en monocitos ahora se sabe que está también expresado en una gama mayor de células, las cuales incluyen células T, células B, macrófagos, células dendríticas, mastocitos, células de Paneth, células madre, células caliciformes y enterocitos (Al Nabhani *et al.*, 2017).

La proteína codificada por el gen CARD15/NOD2 tiene una longitud de 1040 aminoácidos y su estructura básica consta de 3 regiones (figura 2) (Ogura *et al.*, 2001; Inohara *et al.*, 2002)

- 1- **Región amino terminal:** Contiene dos dominios CARD (dominio de reclutamiento de caspasas) involucrados en la apoptosis celular y la activación de NF-KB (factor nuclear potenciador de las cadenas kappa de las células B activadas). Este dominio le permite interactuar con diversas proteínas corriente abajo
- 2- **Región NOD:**(dominio de oligomerización de nucleótidos): es esta región la que se encarga de la auto-oligomerización de la proteína. Está compuesta a su vez de cuatro partes (Maekawa *et al.*, 2016; Al Nabhani *et al.*, 2017): el

dominio de unión de nucleótidos (NBD), una hélice alada (HW) y dos dominios hélice (HD1 y HD2)

- 3- **Región carboxilo terminal:** esta región contiene 10 secuencias repetidas ricas en leucina (LRR) similar a los receptores tipo Toll. Es este dominio el que participa en el reconocimiento del muramil dipéptido y otros patrones moleculares asociados a patógenos

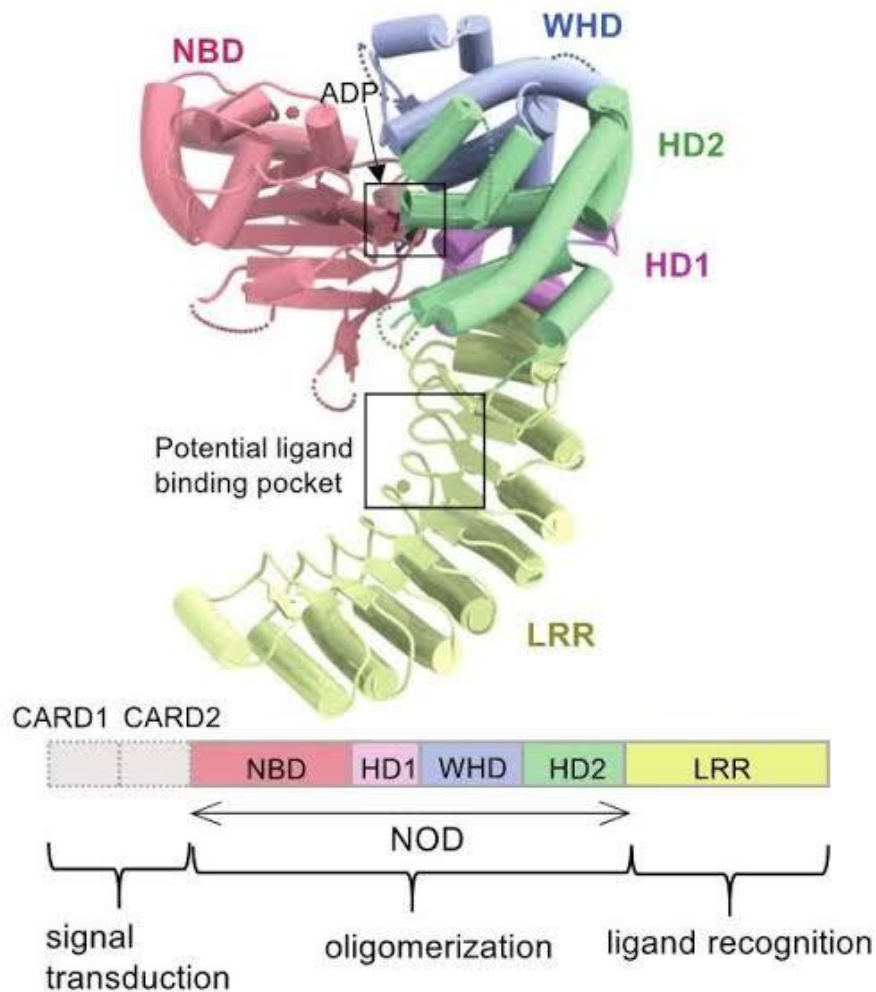


Fig. 2. Estructura de NOD2 tanto lineal como tridimensional en la que se observan los tres dominios principales. En la figura también se observa el sitio de unión del ligando, la interacción entre los subdominios WHD y NBD mediada por ADP. Imagen tomada de Maekawa *et al*, 2016.

3.2 Señalización y Funciones de la proteína NOD2

La proteína NOD2 funciona como un receptor citosólico que detecta muramil dipéptido o MDP, un componente de la pared bacteriana (Girardin *et al*, 2003; Inohara *et al*, 2003 y Eckmann y Karin, 2005). La unión de NOD2 con su ligando el MDP produce una secuencia de señalizaciones que desencadena la activación de NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas kappa de las células activadas B)(Correa *et al*, 2012), MAPK (proteína quinasas activadas por mitógeno), JNK (quinasas c-Jun N-terminal) (Ebrahimiadib *et al.*, 2016, Keestra-Gounder y Tsohis, 2017), además de esto la interacción de MDP con NOD2/CARD15 estimula la liberación de citocinas, péptidos antimicrobianos o AMPs, mucinas y la activación de sistema inmune innato y adaptativo (Ferrand *et al.*, 2019).

La interacción ligando-receptor de NOD2-MDP se da a través del dominio LRR (Rogler, 2007). En su forma inactiva NOD2 se encuentra empaquetado gracias a la interacción entre los subdominios WHD y NBD mediada por ADP, tras la unión de MDP con el dominio LRR el subdominio HD2 va a mediar cambios en HD1 para permitir la auto oligomerización y en la interacción WHD-NBD para permitir el intercambio de ADP por ATP y así exponer los dominios CARD dando lugar a la forma activa de la proteína (Strober y Watanabe, 2011), la oligomerización provee un andamio para el reclutamiento de RIPK2 (Serina/Treonina proteína cinasa 2 que interactúan con el receptor) (Maekawa *et al*, 2016) ambas proteínas van a interactuar de manera hemofílica debido a que las dos poseen dominios CARD.

Una vez unida la proteína adaptadora RIPK2, se van a reclutar proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) con función E3 ubiquitina ligasa como XIAP, cIAP y cIAP2 que van a generar una poliubiquitinación en RIPK2 para que esta sea capaz de reclutar dos complejos más: el primero es el complejo TAK1, formado por TAK1(factor de crecimiento transformante- β - cinasa activada 1), TAB1(TGF- β cinasa activada proteína de unión 2) y TAB3(TGF- β cinasa activada proteína de unión 3) una vez formado el complejo este va a activar la vía de señalización de MAPK (Zhong *et al*, 2013; Trinidad & Chen, 2020). Además de esto el complejo TAK1 activa al segundo complejo (IKK) al conducir la ubiquitinación de NEMO y fosforilar al complejo IKK en la unidad β .

El segundo complejo reclutado por RIPK2 como ya se mencionó se denomina IKK y está compuesto a su vez por la cinasa IKK α , la cinasa IKK β y el modulador esencial del NF- κ B (NEMO) o también llamado IKK γ . Una vez activado el complejo IKK por acción del complejo TAK1, se va a inactivar a IKB α (inhibidor α del NF- κ B) al fosforilarlo permitiendo así la activación del NF- κ B (Domínguez-Martínez *et al.*, 2018). La activación de las vías mencionadas causa la estimulación de la actividad transcripcional necesaria para la activación de la respuesta inmune (Thiébaud *et al.*, 2016), incluida la producción de citocinas proinflamatorias (Tattoli *et al.*, 2007).

Lo anterior describe la principal cascada de señalizaciones por la cual la interacción de MDP con el dominio LRR de NOD2/CARD15 activa al NF- κ B y se esquematiza de manera sencilla en la figura 3

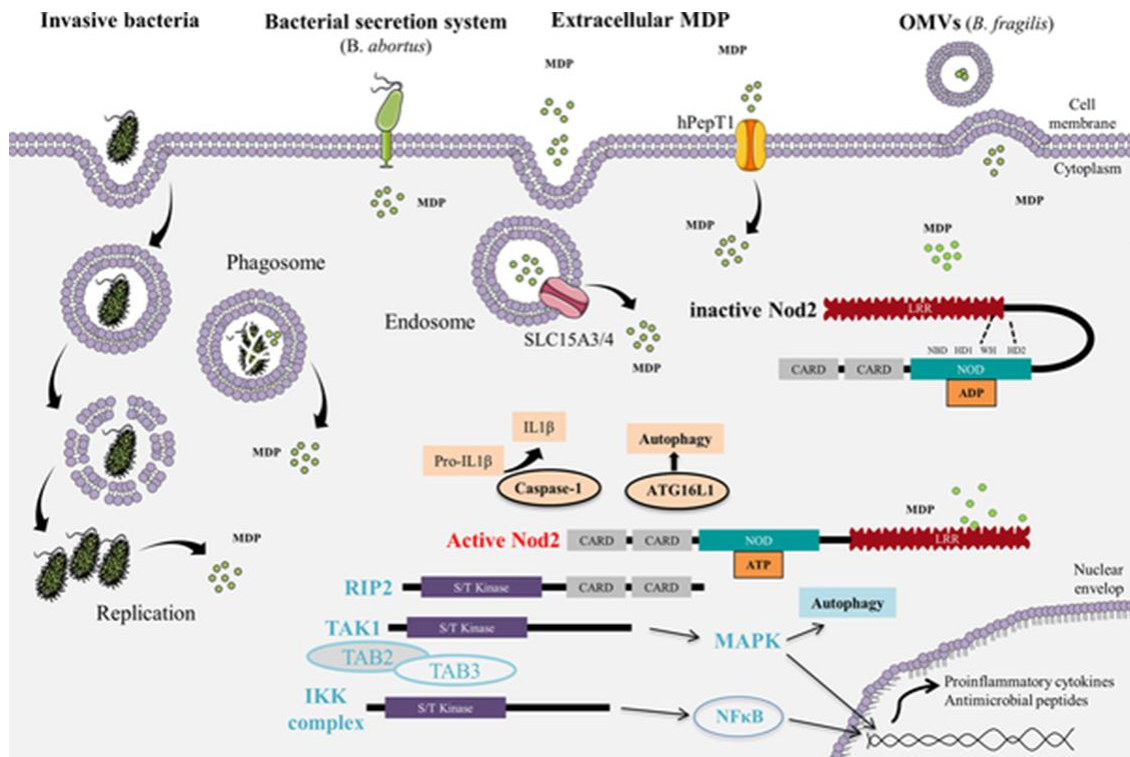


Fig. 3. Vía de señalización de NOD2 activado por la interacción con MDP. En la forma inactiva hay una interacción entre NDB y WH medida por ADP que permite el empaquetamiento; una vez unido el ligando HD2 media cambios conformacionales en las regiones antes mencionadas y HD1 a fin de permitir un intercambio de ADP por ATP, la auto oligomerización y la exposición del dominio CARD. En su forma activa NOD2 recluta a la proteína adaptadora RIPK2, que terminara con la activación de las vías de MAPK y del NF- κ B. Imagen tomada de Al Nabhani *et al.*, 2017

A pesar de que el MDP es el principal ligando de NOD2, este receptor citosólico es capaz también interactuar con diversas proteínas en otros procesos moleculares como la respuesta inflamatoria ante el estrés del retículo endoplásmico (Strober y Watanabe, 2011) (figura 4) e incluso es capaz de detectar en algunas infecciones víricas como la de SRV (virus sincitial respiratorio) ARN vírico monocatenario (ssARN) (Sabbah *et al*, 2010), a diferencia de su activación por MDP, al ser activado por ssRNA NOD2 interactúa con la proteína de señalización antiviral mitocondrial o MAVS con la finalidad de activar al factor regulador de interferón 3 (IRF3) y la expresión de interferón 1 (Keestra-Gounder y Tsolis, 2017). Otros estudios demuestran la participación de NOD2 ante infecciones por protozoarios parasíticos (Silva *et al*, 2010; Corbett *et al*, 2015), en la detección de estrés en el retículo endoplásmico (Byndloss *et al*, 2016), en el proceso de autofagia en conjunto con el complejo de proteína 16 similar a 1 de autofagia o ATG16L1 (Domínguez-Martínez, *et al*, 2018), e inclusive activación de NOD2 puede llevarse a cabo por factores de virulencia (Keestra *et al*, 2011)

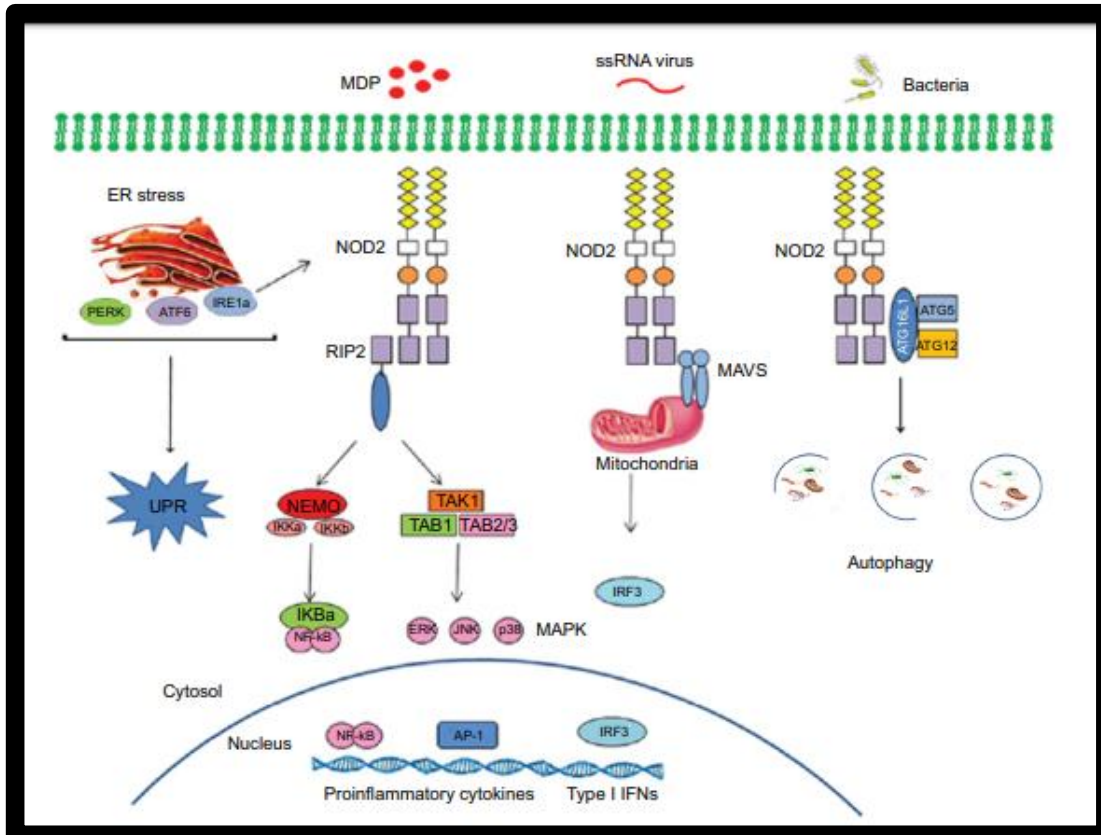


Fig. 4. Además de sensar MDP, NOD2 es capaz también de participar en diversos procesos como la detección de ssRNA vírico, activando vías de inflamación en respuesta al estrés del retículo endoplásmico y en la autofagia al interactuar con ATG16L1. Imagen obtenida de Negroni *et al.*, 2018

3.3 Principales polimorfismos de un solo nucleótido del gen NOD2/CARD15 y su asociación con la enfermedad de Crohn

3.3.1 Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)

Se trata de una enfermedad idiopática crónica caracterizada por la inflamación del tracto digestivo, en ella se incluyen principalmente 3 subtipos de esta: La colitis ulcerosa (CU), la colitis indeterminada (CI) y la enfermedad de Crohn (EC) (Gómez-García, 2009; Graham & Xavier, 2020). La etiología de la EII se desconoce, pero se considera que se debe a múltiples factores como los ambientales, inmunológicos y genéticos. (Yamamoto-Furusho *et al.*, 2017; Flynn & Eisenstein, 2019)

En cuanto a la epidemiología la EII es más común en poblaciones caucásicas como las del norte de Europa y Norteamérica, no existen diferencias con relación al sexo y el inicio de la enfermedad se da generalmente entre los 20 y 40 años (Flynn & Eisenstein ,2019)

3.3.2 Colitis ulcerosa

La colitis ulcerosa se caracteriza por afectar principalmente al intestino grueso y causa la inflamación de la mucosa que recubre desde el recto hasta el colon más proximal, su incidencia es de 1.2 a 20.3 por cada 100,000 personas, los factores de riesgo incluyen factores ambientales, inmunológicos, de la microbiota y genéticos (Gajendran et al., 2019; Rubin et al., 2019).

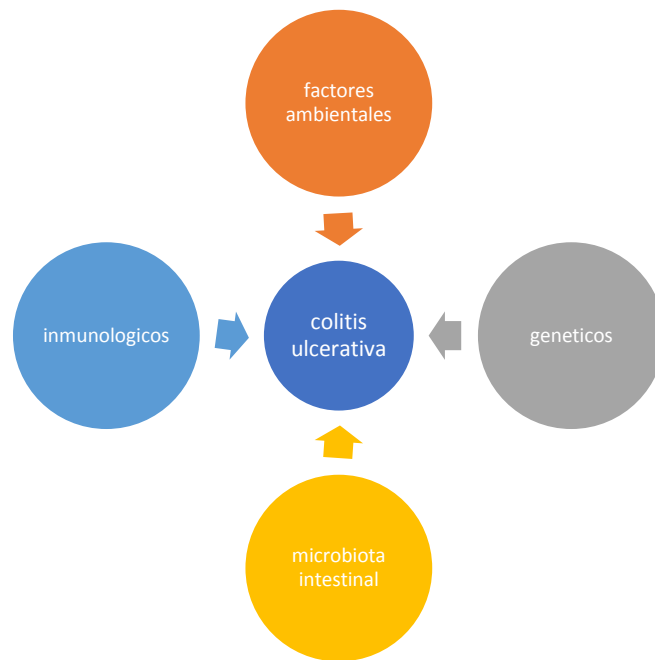


Fig. 5. Factores de riesgo en el desarrollo de la colitis ulcerosa, aunque estos factores también están presentes en la enfermedad de Crohn y en general en la EII. Tomada de Gajendran *et al.*, 2016

3.3.3 Enfermedad de Crohn

A diferencia de la CU la enfermedad de Crohn puede afectar a cualquier parte del tracto digestivo (Desde la boca hasta el ano) (ACCU, 2019), aunque las regiones afectadas más comunes son el íleon terminal y el colon. Los síntomas, aunque variables pueden incluir diarrea, dolor abdominal, pérdida de peso, náuseas, fiebre y escalofríos. El curso de la EC se va a dar en periodos de remisiones y brotes. (Monrroy & Ibáñez, 2013)

La incidencia de la enfermedad de Crohn hasta 2012 se estimaba de 3 a 20 casos por cada 100,000 personas por año (Molodecky *et al.*, 2012), como es de esperarse al ser parte de la EII no hay diferencias en el riesgo de padecerla cuando se habla del sexo. La edad de inicio se estima en promedio entre los 20 y 30 años, pero muchas veces sucede antes. (Feuerstein *et al.*, 2017)

Aunque la EC fue descrita desde el año 1932 la etiología continua sin estar del todo clara, pero se considera que participan factores ambientales, inmunológicos, alteraciones en la microbiota intestinal y factores genéticos. También se ha observado que las poblaciones caucásicas son más propensas a padecerla y que en poblaciones asiáticas, africanas e hispanas representa un menor riesgo, sin embargo, con la occidentalización de países asiático y la urbanización acelerada de países en vías de desarrollo la incidencia en estas poblaciones se ha visto considerablemente aumentada. (Torres *et al.*, 2017)

El diagnóstico de esta enfermedad al igual que las otras variantes de la EII es difícil de realizar ya que en muchas ocasiones la EC puede ser confundida con otras enfermedades tales como la apendicitis, la enfermedad de Behcet, la tuberculosis intestinal y también con la colitis ulcerosa (Feuerstein *et al.*, 2017; Mosquera-Klinger & Ucroz, 2018). A continuación, se muestra una tabla donde se compara el diagnóstico de la EC y la CU:

Tabla 1. Comparación en el diagnóstico de la UC y la EC. Tomada y traducida de Sairenji *et al.*, 2017

Características evaluadas	Enfermedad de Crohn	Colitis ulcerosa
Historial		
Inicio	Más abrupta (día/semana)	Más indolente (semana/mes)
Localización	En cualquier parte del tracto gastrointestinal	Comienza en el recto y avanza proximalmente
Dolor abdominal	Común	Raro
Sangrado rectal	+	++
Síntomas no gastrointestinales	Comunes	Raros
Fatiga	+++	++
Pérdida de peso	+++	+
Examen físico		
Fiebre	+++	+
Sensibilidad abdominal	+++	+
Enfermedad perianal	+++	+
Cambios en los ojos, las articulaciones o la piel	++	-
Laboratorio		
Anemia	+++	++
Proteína reactiva C elevada y/o rango de sedimentación de eritrocitos	+++	+
Anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	++	-
Anticuerpo citoplasmático anti neutrofílico perinuclear	+	+++
Observaciones por endoscopia		
Afectación rectal	+/-	+++
Afectación continua de la mucosa	+	+++
Cambio transmural en la biopsia	+++	-
Granulomas	+++	+

Como se observa en la tabla 1 el diagnóstico toma varios aspectos como lo son el historial, un examen físico, observaciones endoscópicas y de radiología y el análisis en laboratorio de algunos biomarcadores como la proteína reactiva C (PCR no confundir con la reacción en cadena de la polimerasa) y el ASCA (Anti-*Saccharomyces cerevisiae*). También se puede notar que varios de los síntomas son compartidos por

estas enfermedades por lo que el diagnóstico puede demorar mucho tiempo o incluso ser incorrecto en algunas ocasiones. (Yamamoto-furusho et al., 2017)

Para facilitar el estudio de EII y sus subtipos se han elaborado diversas clasificaciones, la más utilizada actualmente es la clasificación de Montreal (PANCCO, 2020) en la que se evalúa para la enfermedad de Crohn aspectos como la edad de inicio de la enfermedad, la localización y las manifestaciones fenotípicas esto con la finalidad de facilitar la comparación entre distintas poblaciones y para homogeneizar criterios (Gompertz & Sedano, 2019)

Tabla 2. Clasificación de Montreal para la Enfermedad de Crohn

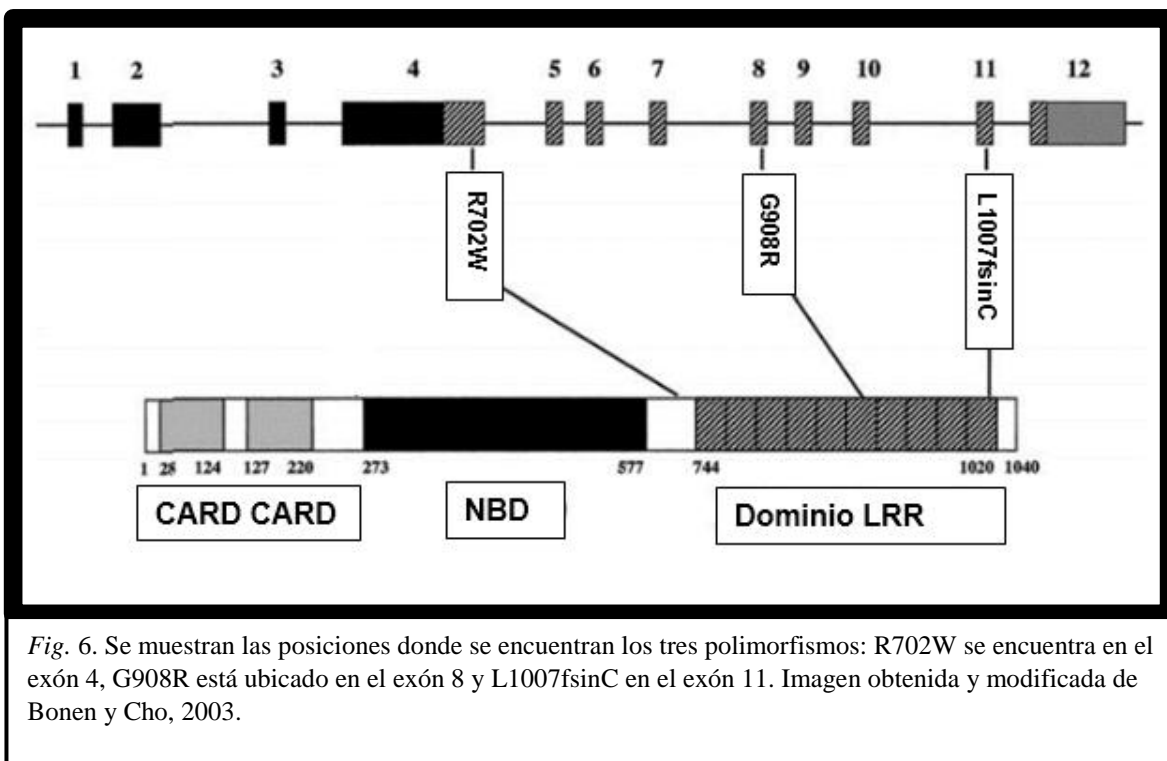
Edad (cuando fue diagnosticada) A	<ul style="list-style-type: none"> - A1 = 16 años o menos - A2 = 17 a 40 años - A3 = 40 años o mas
Localización L	<ul style="list-style-type: none"> - L1= íleon terminal - L2 = Colon - L3 = Ileocolónico - L4 = Tracto digestivo alto
Comportamiento de la enfermedad B	<ul style="list-style-type: none"> - B1 = Inflamatoria - B2 = Estenosante - B3 = Fistulizante - P = enfermedad perianal

3.3.4 SNP's de CARD15/NOD2 asociados a la enfermedad de Crohn

Poco tiempo después del descubrimiento del gen CARD15/NOD2 variantes polimórficas del gen fueron asociadas a un mayor riesgo de padecer la enfermedad de Crohn (Ogura *et al.*, 2001; Hugot *et al.*, 2001). Se trata de los polimorfismos R702W (Arg702Trp), G908R (Gly908Arg) y L1007fsinC (Leu1007fsinC), los cuales se describen a continuación (imagen 6):

- R702W: Existe un cambio de nucleótido dentro del exón 4 del gen, este cambio es una sustitución de citosina por timina en la posición 14,272 causando así el cambio de arginina por triptófano en la posición 702 de la proteína
- G908R: En este SNP hay un cambio de guanina por citosina en la posición 25,368 dentro del exón 8 esto se traduce en el cambio de glicina por arginina en el aminoácido 908.
- L1007fsinC: A diferencia de los polimorfismos anteriores donde hay una sustitución de una base por otra, en este SNP hay una inserción de una citosina en la posición 32,629 que está en el exón 11. Esta inserción genera un codón de paro después de la leucina de la posición 1007; como consecuencia del codón de paro se genera una proteína que solo consta de 1007 aminoácidos de un total de 1040

Algo que se debe destacar es que los tres polimorfismos afectan a la región LRR (Mukherjee et al, 2019).



Otro punto importante es la relación entre los tres principales polimorfismos de CARD15/NOD2 y la etiología de la enfermedad de Crohn, hasta ahora tanto CD como colitis ulcerosa permanecen sin tener una etiología clara (ACCU, 2019). Además de los diversos estudios sobre frecuencias alélicas en distintas poblaciones otros se han enfocado en como el ser portador de los polimorfismos R702W, G908R y L1007fsinC contribuye al proceso patológico de la enfermedad de Crohn.

Estudios muestran que en la etiología de IBD existe una tolerancia disminuida componentes del microbioma presente en el intestino (Maloy y Powrie, 2011), otra de las observaciones es el hecho de que existe una desregulación en la microbiota del intestino (Pascal *et al.*, 2017)

Actualmente existen 2 teorías importantes de sobre la participación de los polimorfismos R702W, G908R y L1007fsinC contribuyen a la patología de la enfermedad de Crohn (Strober *et al.*, 2014). La primera de las propuestas es la asociada al tener una reducción en la expresión de péptidos antimicrobianos o AMPs, como α -defensinas y parte del hecho de que NOD2 se expresa en células de Paneth, cuya función incluye liberar AMPs y participar en la respuesta inmune del intestino (Bevins *et al.*, 2011); ya en el 2004 se había señalado que las tres principales mutaciones en CD están asociadas con una reducción de α -defensinas en específico HD5 y HD6 (Wekhamp *et al.*, 2004), de esta manera las mutaciones de NOD2 estarían asociadas a una reducción en la actividad microbiana en el intestino y la invasión de bacterias patógenas (Coretti *et al.*, 2017). Pese a los diversos estudios que demuestran la relación entre la reducción de defensinas y las mutaciones en NOD2, se ha sugerido que las mutaciones no explicarían totalmente el decremento de defensinas HD5 por lo que se ha propuesto que la reducción de estas sería provocada más bien por la pérdida de tejido en la inflamación y no a las mutaciones de NOD2 (Simms *et al.*, 2008).

La segunda teoría está siendo evaluada y propone que el mecanismo por el cual las mutaciones de NOD2 están involucradas en la CD sería principalmente a través de la regulación de NOD2 sobre los mecanismos del sistema inmune innato. Esto parte de observaciones en modelos murinos a los que se les induce la colitis y se les

suministra MDP libre, los ratones tratados de ésta manera muestran mejoras al reducir la respuesta inflamatoria, esto se debe a que al parecer que NOD2 regula la respuesta posterior de receptores TLR, sin embargo cuando están presentes alguno de los 3 polimorfismos ésta regulación por parte de NOD2 hacia los TLR no se da de manera adecuada conduciendo así a respuestas exageradas de TLR y la inflamación sostenida. (Strober et al, 2014).

4. Justificación

La enfermedad de Crohn es un padecimiento crónico e incurable para el que los tratamientos se basan principalmente en reducir los síntomas o disminuir su progreso, no obstante, en muchos casos es necesario que los pacientes sean intervenidos quirúrgicamente. Si bien es cierto que en poblaciones no caucásicas la enfermedad representa un menor riesgo, es bien sabido que la incidencia y prevalencia de esta enfermedad continua aumentando en poblaciones asiáticas, africanas y latinas. Aunado a esto la etiología de la enfermedad no está del todo clara al ser una enfermedad multifactorial y entre los factores genéticos que se han descrito existen diferencias en dependencia de los rasgos étnicos, por lo cual es necesario conocer la situación actual de estas diferencia y de los avances en el conocimiento de los polimorfismos implicados en la enfermedad de Crohn.

5. Hipótesis

Se ha demostrado la diferencia que existe en las frecuencias de los polimorfismos del gen CARD15/NOD2 en distintas poblaciones por lo que se espera que mediante la revisión bibliográfica estas diferencias sean notables en países de Latinoamérica también se esperan diferencias en polimorfismos en otros genes asociados a la enfermedad de Crohn

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

- Conocer la situación actual de la enfermedad de Crohn, los polimorfismos involucrados en el riesgo de desarrollarla y las diferencias que existen entre distintas poblaciones

6.2 Objetivos específicos

- Revisar la información de artículos experimentales, metaanálisis y artículos de revisión sobre la enfermedad de Crohn y los factores genéticos de riesgo como los polimorfismos de un solo nucleótido usando motores de búsqueda especializados como PUDMED y Google scholar
- Comparar las frecuencias de los portadores de los polimorfismos de un solo nucleótido del gen CARD15/NOD2 (R702W, G908R y L1007fsinC) en distintas poblaciones
- Conocer los polimorfismos de un solo nucleótido en poblaciones donde no se encontró asociación entre los polimorfismos R702W, G908R y L1007fsinC mediante la elaboración de una tabla

7. Material y Métodos

Para esta investigación bibliográfica se usaron distintos buscadores especializados como PUDMED y Google scholar, la primera parte de la búsqueda consistió en la revisión de artículos sobre el gen CARD15/NOD2 comenzando desde el año 2001 en el que se descubrió este gen, las palabras clave para realizar dichas búsquedas consistieron en las siguientes: Polymorphisms, Crohn disease, IBD o inflammatory bowel disease, gen CARD15, NOD2 principalmente estas dos se utilizaban en conjunto para obtener mejores resultados, los artículos seleccionados en esta primera parte podían ser tanto de revisión como experimentales.

La segunda búsqueda realizada consistió en la selección de aquellos artículos experimentales donde se genotiparan los polimorfismos de CARD15/NOD2 en pacientes con la enfermedad de Crohn. La tercera parte de la búsqueda consistió en buscar artículos experimentales donde se demostrara la relación existente entre los 3 polimorfismos mayormente relacionados con la enfermedad de Crohn y se utilizaban las palabras clave: R702W, G908R y L1007fsinC junto con diseases. Además de esto se buscaron artículos de revisión y metaanálisis recientes (antigüedad no mayor a seis años) donde se sintetizaran la incidencia y prevalencia de la enfermedad de Crohn.

Por último, la busque más extensiva se realizó en las frecuencias de estos polimorfismos en poblaciones no caucásicas como la asiática y principalmente la latinoamericana, otras poblaciones también revisadas fueron africanas y árabes. Las palabras clave para estas búsquedas fueron: Latinamerica, Asian, population, Crohn´s disease polymorphisms, Mexico, Mexican, Argentinian, Brazilian, African, Turkish, Chinese, Peruvian, etc., todas aquellas que hicieran referencia a los gentilicios de poblaciones no caucásicas, para complementar se buscaron otro polimorfismos y genes diferentes a NOD2 que estuvieran presentes en esas poblaciones y que estuvieran relacionados con la enfermedad de Crohn o con EII.

Criterios de inclusión y exclusión

1. Los estudios deben centrarse en pacientes con enfermedad de Crohn, su genotipificación con respecto a los polimorfismos en pacientes pertenecientes a una misma población
2. Los estudios de revisión sobre lo que se sabe del receptor NOD2 debe ser lo más reciente posible para que ya se haya descartado información que ha sido corregida
3. Los artículos sobre las mutaciones de NOD2 y su participación en otras enfermedades deben ser sobre los polimorfismos R702W, G908R y L1007fsinC

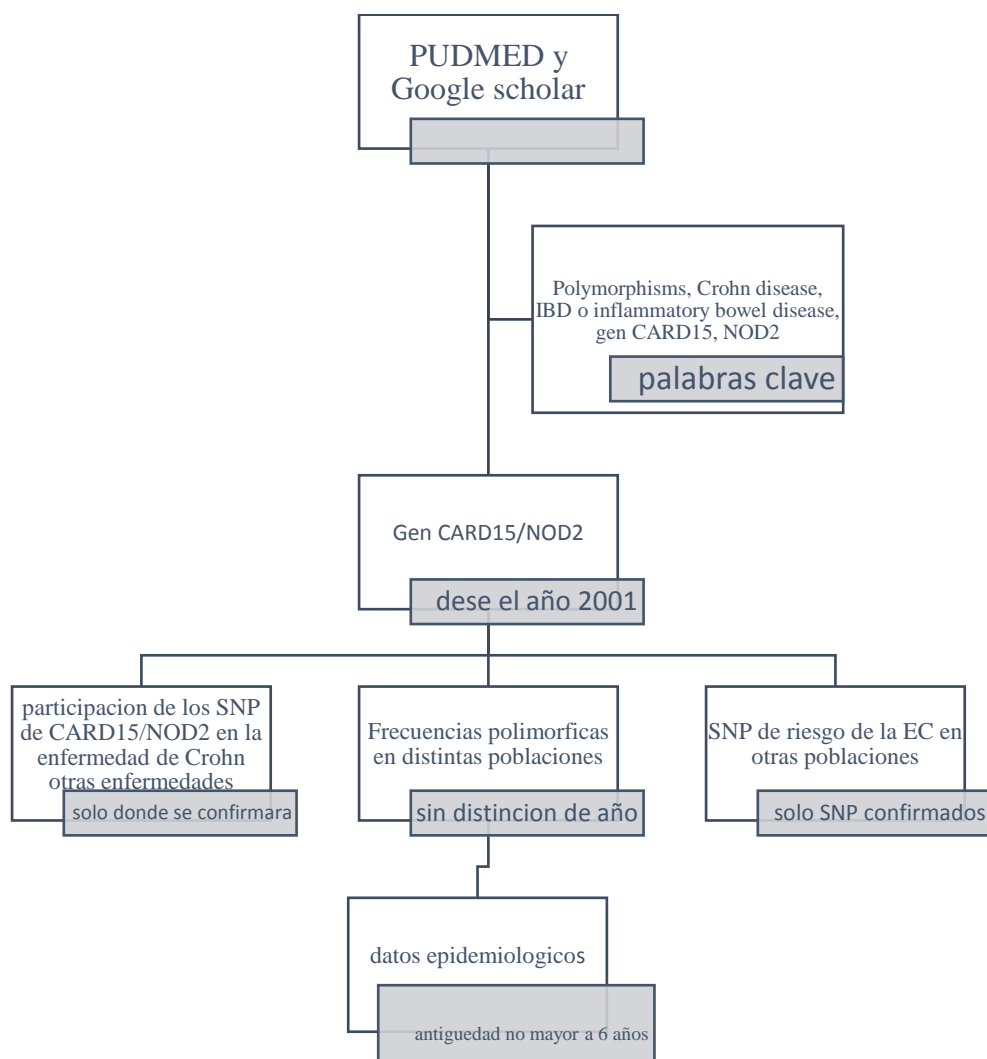


Fig. 7. Esquema donde se muestra el proceso de selección de los artículos usados para esta investigación bibliográfica, los criterios de selección se muestran arriba.

8. Resultados

8.1 Polimorfismos de CARD15/NOD2 en otras enfermedades

Además de la enfermedad de Crohn existen otros padecimientos también asociados con SNPs del gen CARD15/NOD2 el síndrome de Blau (BS) es un ejemplo, este síndrome está caracterizado por artritis granulomatosa, uveítis y erupción cutánea con camptodactilia, aunque no está asociada a los tres principales polimorfismos de CARD15/NOD2 si está asociada a polimorfismos de este gen en la región NBD (R334W, R334Q y L469F) (Miceli-Richard et al, 2001)

También la colitis ulcerosa UC que es parte de IBD parece tener una asociación con los principales polimorfismos de CARD15/NOD2 pese a no estarlo de manera directa como en la enfermedad de Crohn podría estar actuando en sinergia junto con un locus de susceptibilidad a IBD el locus IBD5 (McGoven et al.,2003)

En 2007 se realizó un estudio donde se resumía la información hasta ese momento sobre la asociación entre los SNPs de CARD15/NOD2 y diversas enfermedades principalmente inflamatorias (Henckaerts y Vermeire, 2007), a continuación, se muestran la información obtenida por ellos:

Tabla 3. Estudios sobre la relación de las variantes polimórficas de CARD15/NOD2 en distintas enfermedades. Traducida y modificada de Henckaerts & Vermeire, 2007.

Tipo de enfermedad	Enfermedad	n	Variantes estudiadas	Efecto de las variantes	Referencia
Enfermedad inflamatoria intestinal (IBD)	Enfermedad de Crohn (CD)	-235 familias -53familias; 416	L1007fsinsC, G908R, R702W	Gen de susceptibilidad	Ogura <i>et al.</i> , 2001 Hugot <i>et al.</i> , 2001
	Colitis ulcerativa (UC)	186 tríos	L1007fsinsC, G908R, R702W	Susceptibilidad en sinergia con el gen IBD5	Giallourakis <i>et al.</i> , 2003
Desordenes granulomatosos	Síndrome de Blau	-278 - 4 familias - 1 familia	-R334W, R334Q, L496F -E383K	Gen causante de la enfermedad	McGovern <i>et al.</i> , 2003 Miceli-Richard <i>et al.</i> , 2001

					Van Duist <i>et al.</i> , 2005
	Granulomatosis de Wegener	25——— 73	L1007fsinsC, G908R, R702W	Sin asociación	Newman <i>et al.</i> , 2003
	Sarcoidosis	138 familias	G908R, R702W	Sin asociación	Schurmann <i>et al.</i> , 2003
Desordenes autoinmunes	Enfermedad alérgica	-1872 -1875	-L1007fsinsC, G908R, R702W - G908R, R702W, Maldi-TOF	-Asociación con rinitis y dermatitis alérgicas -susceptibilidad/protección contra el asma, IgE sérica y rinoconjuntivitis alérgica	Kabesch <i>et al.</i> , 2003 Weidinger <i>et al.</i> , 2005
Desordenes reumatológicos	Espondilitis anquilosante	229——— 197	L1007fsinsC, G908R, R702W, P268S	Posiblemente cause susceptibilidad	Crane <i>et al.</i> , 2002
	Espondilartropatía	104	L1007fsinsC, G908R, R702W	Asociación con inflamación intestinal microscópica crónica	Laukens <i>et al.</i> , 2005
	Artritis psoriásica	187	L1007fsinsC, G908R, R702W	Gen de susceptibilidad (principalmente R702W)	Rahman <i>et al.</i> , 2003
Neoplasias	Cáncer de mama	-462 -4107	L1007fsinsC	- Inicio temprano del cáncer de mama ductal - Gen de susceptibilidad	Huzarski <i>et al.</i> , 2005 Lener <i>et al.</i> , 2005
	Cáncer pulmonar	389	L1007fsinsC	Gen de susceptibilidad	Lener <i>et al.</i> , 2005
	Linfoma no hodgkiniano	-3586 - 78——— 225	L1007fsinsC	-Asociación cuando se encuentra de manera homocigota Asociación	Rothman <i>et al.</i> , 2006 Forrest <i>et al.</i> , 2006
Problemas relacionados a trasplantes	Trasplante de células madre hematopoyéticas	- 78——— 225 - 59 - 403	L1007fsinsC, G908R, R702W	Asociación con enfermedad aguda de injerto contra hospedero (GVHD) tanto intestina como aguda Asociación con GVHD cuando el receptor o ambos poseen las mutaciones	Holler <i>et al.</i> , 2006 Hassan <i>et al.</i> , 2005 Elmaagacli <i>et al.</i> , 2006
Problemas relacionados a infecciones	Septicemia	-356 -132	L1007fsinsC	Asociación con septicemia en niños	Ahrens <i>et al.</i> , 2004 Brenmoehl <i>et al.</i> , 2005

			Incrementa la mortalidad	
Infección por <i>Helicobacter pylori</i>	428— 83	L1007fsinsC, G908R, R702W	Asociación de R702W con linfoma gástrico	Rosentiel <i>et al.</i> , 2006
Patología asociada a <i>Chlamydia trachomatis</i>	39 de 227	L1007fsinsC	Tendencia al incremento de la patología tubéarica	Den Hartog <i>et al.</i> , 2006

8.2 Diferencias en las frecuencias en distintos países

Se sabe ahora que los portadores que son heterocigotos para alguno de los polimorfismos son de 1.75 a 4 veces más propensos a padecer CD mientras que los individuos homocigotos portadores de alguno de los polimorfismos son de 11 a 27 veces más propensos a padecerla (Wang, 2016), aunque esto parece no aplicar a todas las poblaciones, pues pese a que está bien documentada la participación de los polimorfismos de NOD2 en un riesgo mayor a padecer CD en poblaciones caucásicas otros estudios han demostrado la ausencia de estos polimorfismos o una relación no significativa.

En 2002 el estudio realizado en Japón por Yamazaki y colaboradores mostró que de los 483 pacientes ninguno portaba alguno de los 3 principales polimorfismos de NOD2 lo que lleva a pensar que hay diferencias genéticas en dependencia de la etnia de procedencia. El mismo año y en el mismo paíes el equipo de Inoue y colaboradores reportaron la ausencia de los tres polimorfismos en las 350 muestras analizadas en su estudio. Otra población asiática en la que no se encontró ninguno de los tres polimorfismos asociados con CD es la coreana (Croucher *et al.* 2003; Hyung Lee *et al.*, 2005).

India es otro de los países donde los principales SNP's de CARD15/NOD2 parecen estar ausentes o ser poco frecuentes (Juyal *et al.*, 2007; Pugazhendi *et al.*, 2008). En diversas poblaciones chinas tampoco se encontró asociación entre los tres

principales polimorfismos de CARD15/NOD2, aunque otros polimorfismos menos frecuentes si fueron asociadas con CD lo que sugiere la distribución de este gen tiene importantes diferencias étnicas (Long *et al.*, 2014; Leong *et al.*, 2003).

Aun entre poblaciones caucásicas también se ha reportado diferencias en la frecuencia y el porcentaje de contribución de los SNPs al riesgo de padecer CD así por ejemplo en 2004 se reportó en población escocesa un porcentaje de contribución de 11% que, aunque significativo es más bajo que cuando se le compara con el 27% en Oxford y Los Ángeles y el 33.2% de Hugot *et al.* (Arnott *et al.*, 2004). En población húngara se encontró que el polimorfismo G908R no es común pero los otros dos si muestra asociación con CD (Lakatos *et al.*, 2005). Estudios en países europeos pero escandinavos que cuentan con poblaciones más homogéneas como Suiza, Finlandia y Dinamarca han mostrado un porcentaje de prevalencia de portadores más bajo que los obtenidos en Europa central mientras que países con poblaciones más heterogéneas como Estados Unidos y Cánada son similares a Europa central (Barreiro de Acosta *et al.*, 2010). España es otro país donde estudios en distintas comunidades han mostrado gran prevalencia de portadores, sin embargo, en la región de Asturias no se encontró diferencia significativa entre controles y pacientes (Martínez Borra *et al.*, 2007).

Por su parte en Latinoamérica hasta 2010 se habían reportado solo dos estudios uno en Chile y otro en Brasil, el estudio de Chile poseía un bajo número de muestras por la cual no fue concluyente pero el de Brasil mostro una frecuencia de 30% cuya población es muy heterogénea (Barreiro de Acosta *et al.*, 2010). En el estudio se encontró también que el polimorfismo un Leu1007fsinC tiene una frecuencia baja (Baptista *et al.*, 2008). En el caso de nuestro país recientemente se publicó un artículo donde no se encontró asociación entre los polimorfismos R702W y G908R y ningún homocigoto mutante se encontró por lo que ellos concluyen que no son marcadores moleculares para usar en población mexicana (Quiroz-Cruz *et al.*, 2019). Como se mencionó anteriormente parece haber diferencias marcadas en la distribución de las frecuencias alélicas en dependencia de diferencias étnicas, sin

embargo, poblaciones más heterogéneas parecen tener mayor porcentaje de portadores. La información anterior se resume en la siguiente tabla:

Tabla 4. Diferencias entre distintas poblaciones con respecto a la frecuencia de los portadores y porcentaje de contribución a CD			
Continente	País	Resultados	Referencia
Asia	Japón	- En 2002 de 483 pacientes ninguno portaba alguno de los polimorfismos - Ausencia de los tres polimorfismos en las 350 muestras analizadas en su estudio	Yamazaki <i>et al.</i> 2002 Inoue <i>et al.</i> 2002
	India	- Los polimorfismos están ausentes o son poco frecuentes	Juyal <i>et al.</i> , 2007 Pugazhendi <i>et al.</i> , 2008
	China	- En diversas poblaciones chinas tampoco se encontró asociación, aunque otros polimorfismos menos frecuentes si fueron asociadas	Leong <i>et al.</i> , 2003 Long <i>et al.</i> , 2014
	Corea	- No se encontró asociación con los tres polimorfismos	Croucher <i>et al.</i> 2003 Hyung Lee <i>et al.</i> , 2005
Europa	Escocia	- Se encontró un porcentaje de portadores de 11%	Arnott <i>et al.</i> , 2004
	Gran Bretaña (Oxford)	- Porcentaje de portadores de 38.5% con un porcentaje de contribución de 27 %	Ahmad <i>et al.</i> , 2002 Arnott <i>et al.</i> , 2004
	Dinamarca	- La frecuencia de los portadores fue de 21%	Ernst <i>et al.</i> , 2007
	Suecia	- Frecuencia de portadores de 15.2%	Törkvist <i>et al.</i> , 2006
	Finlandia	- Frecuencia de portadores de 15.5%	Heliö <i>et al.</i> , 2003
	Alemania	- Frecuencia de portadores de 36.5%	Büning <i>et al.</i> , 2004
	Italia	- Frecuencia de portadores de 38.2%	Annese <i>et al.</i> , 2005
	Republica Checa	- Frecuencia de portadores de 46%	Hradsky <i>et al.</i> , 2008
	Bélgica	- Frecuencia de portadores de 46.3%	Esters <i>et al.</i> , 2004

	Francia	- Frecuencia de portadores de 38%	Heresbach <i>et al.</i> , 2004
	España	- En España se han encontrado frecuencias de los portadores de 27.3-32.8 % - En la región de Asturias no se encontró diferencias significativas entre los controles y las muestras	Martínez Borra <i>et al.</i> , 2007 Barreiro de Acosta <i>et al.</i> , 2010
Norteamérica	Estados Unidos	- Porcentaje de contribución de 27% con un porcentaje de portadores de 36.5-45%	Arnott <i>et al.</i> , 2004 Abreu <i>et al.</i> , 2002 Kugathasan <i>et al.</i> , 2004
	Canadá	- La frecuencia de los portadores fue de 32.5-45%	Vermeire <i>et al.</i> , 2002 Newman <i>et al.</i> , 2004
Latinoamérica	México	- No se encontró asociación entre CD y los polimorfismos R702W y G908R	Quiroz-Cruz <i>et al.</i> , 2019
	Chile	- El estudio poseía pocas muestras aun así las mutaciones encontrada parecen no estar asociadas	Figuroa <i>et al.</i> , 2006
	Brasil	- Porcentaje de portadores de 30 %	Baptista <i>et al.</i> , 2008
Oceanía	Australia	- La frecuencia de portadores fue de 36.7 %	Cavanaugh <i>et al.</i> , 2003
África	Turquía	- Se encontró una frecuencia baja de 10.7%	Uyar <i>et al.</i> , 2006
	Túnez	- Sin asociación entre CD y los polimorfismos	Zouiten-Mekki <i>et al.</i> , 2005
	Sudáfrica	- No se encontraron prácticamente los polimorfismos	Zaahl <i>et al.</i> , 2005
	Marruecos	- Sin diferencias significativas entre pacientes y controles. No se encontró asociación	Serbati <i>et al.</i> , 2014

La información de la tabla anterior se resume en el siguiente mapa donde las frecuencias de portadores se agrupan en cuatro categorías

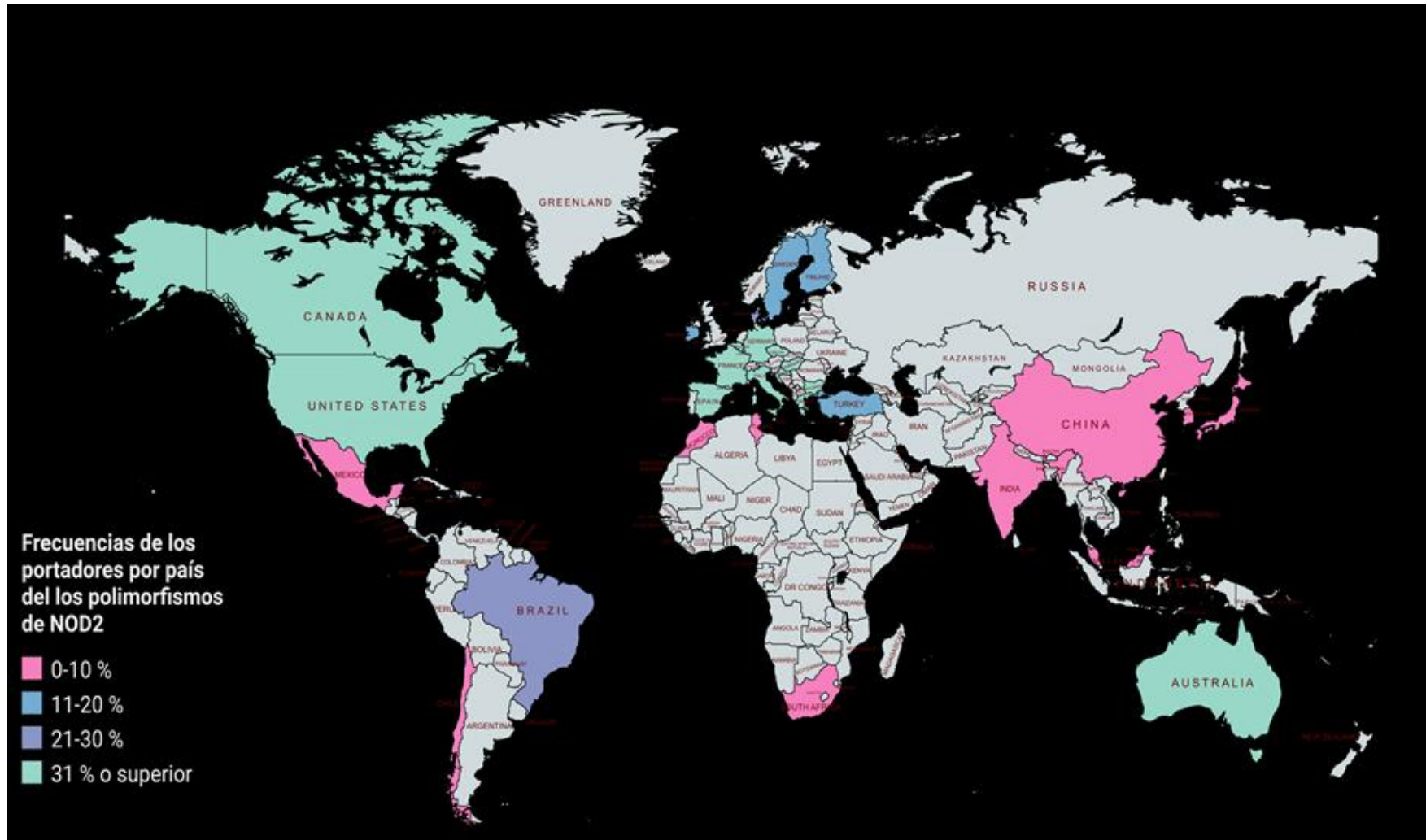


Fig. 8. El mapa muestra en cuatro categorías la frecuencia de portadores de los polimorfismos en pacientes con enfermedad de Crohn, se observa que en muchos países de Latinoamérica se desconoce la frecuencia de estos, por lo que existe una gran diferencia con respecto a los países europeos, el mayor porcentaje de portadores se encuentra en las poblaciones caucásicas: europeos y en Canadá y Estados Unidos

8.3 Genes involucrados en la enfermedad de Crohn en poblaciones no caucásicas

Como ya se mencionó antes los polimorfismos R702W, G908R y L1007fsinC no parecen estar relacionados con un mayor riesgo de padecer la enfermedad de Crohn en poblaciones no caucásicas ya que diversos estudios muestran que son pocos frecuentes o no están presentes, sin embargo el factor genético de a la enfermedad de Crohn sigue estando presente por lo que estudios más recientes han dedicado esfuerzos a conocer cuáles son estos genes que tiene mayor relevancia en poblaciones no europeas o caucásicas y sobre todo son los países asiáticos como Japón, China y Corea del sur los que han reportado estos genes.

En el caso de Japón han sido varios los genes a la enfermedad de Crohn (Sewel et al., 2012); en cuanto a los polimorfismos de un solo nucleótido que han mostrado asociación con la enfermedad de Crohn tenemos el polimorfismo rs3810936 en del gen TNFSF15 (Miembro 15 de la superfamilia de ligando del factor de necrosis tumoral) reportado por Nakagome *et al* en el 2010, el polimorfismos rs488200 contenido en el gen RAP1A (Proteína Rap-1A relacionada con Ras) (Kakuto *et al.*, 2018) entre otros.

Para el caso de China se reportaron los polimorfismos Gly149Arg en el gen IL-23R y un SNP en CAR15/NOD2 distinto a los tres más estudiados el polimorfismos P268s también se reportaron los polimorfismos rs17525495 en el gen LTA 4H (Yu *et al.*, 2019) y el polimorfismo rs11235604 en el gen ATG16L2 (Ma *et al.*, 2016).

En Corea del sur se reportaron los polimorfismos rs686616 y rs11235604 en los genes Sox-5 y ATGL1 respectivamente, por Yang *et al.* (2013). También en el gen CARD8 se reportó el polimorfismo rs1972619 como factor de riesgo a padecer la enfermedad de Crohn (Yang et al., 2011) y en el gen IL-23 se reportaron los polimorfismos rs1004819 y rs1495465 (Yang et al.,2009)

En el caso de Latinoamérica desafortunadamente no se encontraron estudios donde se reporten nuevos genes o polimorfismos asociados al riesgo de padecer la

enfermedad de Crohn, solo en México el equipo de Quiroz-Cruz (2020) reporto asociación entre la EII y los polimorfismos rs30245505 y el rs1800896 del gen IL-10

Tabla 5. Genes y sus polimorfismos asociados con la enfermedad de Crohn en poblaciones no caucásicas

País	Gen o región	SNP	Referencia
China	LTA4H	- rs17525495	Yu <i>et al.</i> , 2019
	ATG16L2	- rs11235604	Ma <i>et al.</i> , 2016
	IL-23R	- rs11465788	Bin <i>et al.</i> , 2009
	CARD15/NOD2	- rs2066842	Long <i>et al.</i> , 2007
Japón	RAP1A	- rs488200	Kakuta <i>et al.</i> , 2018
	TNFSF15	- rs3810936	Nakagome <i>et al.</i> , 2010
	4p14 (región)	- rs1487630	Yamazaki <i>et al.</i> , 2013
	ELF1	- rs7329174	
Corea	Sox-5	- rs6856616	Yang <i>et al.</i> , 2014
	ATGL1	- rs11235604	Yang <i>et al.</i> , 201
	CARD8	- rs1972019	Yang <i>et al.</i> , 2011
	IL-23R	- rs1004819 - rs1495465	Yang <i>et al.</i> , 2009
India	IRGM	- rs1000113 - rs9637876 - rs13361189	Baskaran <i>et al.</i> , 2014
México	IL-10	- rs3024505 - rs1800896	Quiroz-Cruz <i>et al.</i> , 2020 (EII)

9. Discusión

A pesar de que ya han pasado casi 100 años del primer reporte de la enfermedad de Crohn su etiología no esta del todo clara; como ya se ha mencionado anteriormente se trata de una enfermedad multifactorial en la que su desarrollo depende de factores ambientales, inmunológicos, de la microbiota intestinal y genéticos que van a variar de muchas maneras en distintas poblaciones.

En esta revisión comparamos mediante la elaboración de tablas que concentran la información de diversos estudios sobre las diferencias que existen en las frecuencias de portadores en poblaciones de distinto origen etnico y los polimorfismos de un solo nucleótido en genes distintos a CARD15/NOD2 asociados a un mayor riesgo de padecer EC en poblaciones no caucásicas. En cuanto a los polimorfismos en otros genes trabajos como los del Ng *et al.*, (2012) y el de Park & Jeen (2019) han elaborado tablas similares sobre genes y polimorfismos; el presente trabajo tiene la limitación de centrarse exclusivamente en polimorfismos de un solo nucleótido asociados a EC, sin embargo, esta revisión ofrece una actualización a la información que se tenía hasta el 2012 en el trabajo de Siew *et al.* y amplia la de la obtenida por Park & Jeen (2019) quienes se centran en Japón y Corea del sur. En esta revisión y en las otras dos anteriormente citadas se ponen de manifiesto que la actualización de la información se da casi siempre en los mismos países y no se amplía a otras poblaciones.

A partir de la información contenida en las tablas 4 y 5 de esta revisión bibliográfica se hace evidente que los factores genéticos y en específico las variantes polimórficas que representan un riesgo de padecer la EC son variables cuando se compara entre distintas poblaciones. De tal manera que, aunque está bien documentado que las variantes polimórficas de CARD15/NOD2 juegan un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad en caucásicos (Kúsulas-Delint, 2016) la mayoría de los reportes en asiáticos demuestran que estos son poco frecuentes o no están presentes (Yamazaki *et al.* 2002; Inoue *et al.* 2002; Juyal *et al.*, 2007; Pugazhendi *et al.*, 2008; Leong *et al.*, 2003; Long *et al.*, 2014; Croucher *et*

al. 2003 y Hyung Lee *et al.*, 2005). Pero las variaciones no solo se dan con los polimorfismos del gen CARD15/NOD2 sino también en otros genes, en el caso de poblaciones japonesas se reportaron polimorfismos en el gen TNFSF15 que tienen gran asociación con el riesgo de desarrollar la EC y que en poblaciones caucásicas no tiene un efecto tan significativo como en Japón (Naser *et al.*, 2012). IL-23R es otro gen cuyos polimorfismos tienen asociación con la enfermedad de Crohn en Corea del Sur y Japón, aunque las variantes polimórficas no son las mismas ya que en el primero las variantes reportadas son rs1004819 y rs1495465 (Yang *et al.*, 2009) y para Japón se reportó la variante rs11465788 (Bin *et al.*, 2009), de esta manera podemos ver que incluso entre poblaciones con un origen más cercano existen variaciones en los SNP asociados al riesgo de padecer la enfermedad. Pero no solo los factores genéticos parecen tener variación en entre poblaciones ya que dentro de los factores ambientales existen diferencias por ejemplo en el caso de europeos fumar se considera un factor de riesgo bien establecido en esa población pero en los reportes asiáticos fumar no parece tener un efecto o inclusive tener una función protectora contra la colitis ulcerosa: el consumo de antibióticos también marca una diferencia en esas poblaciones ya que mientras que para los europeos es un factor de riesgo para los asiáticos también funciona como preventivo (Kaplan & Ng, 2016)

En el caso de poblaciones latinoamericanas en cuanto a las frecuencias polimórficas también existen diferencias puesto que mientras Chile y nuestro país reportan frecuencias no significativas de los polimorfismos del gen CARD15/NOD2 (Quiroz-Cruz *et al.*, 2019 y Figueroa *et al.*, 2006) en Brasil la frecuencia de portadores es del 30 % (Baptista *et al.*, 2008) similar a la de países europeos y el norte de América. Aunque no se encontró suficiente información sobre la frecuencia de los portadores de los polimorfismos de NOD2 en países de Latinoamérica se sabe que la diferencia en la incidencia de estas mutaciones que hay entre hispanos y caucásicos es de 4.4:9.1 y se propone que el desarrollo de la enfermedad dependería más de factores ambientales que genéticos (Vargas *et al.*, 2010).

Aunque no específicamente sobre la enfermedad de Crohn sino mas bien en la enfermedad inflamatoria intestinal en Chile se realizó una investigación para encontrar una posible asociación con polimorfismos de IL-23 que se han asociado a la enfermedad de Crohn en población asiática, no obstante, los resultados fueron negativos y la posible asociación se descartó (Venegas *et al.*, 2008)

En nuestro país en el año 2010 un estudio trato de encontrar una posible asociación entre IL-10 con la EII, sin embargo, tampoco se encontraron resultados significativos, pero dado que ellos consideraron tener una muestra pequeña no descartaban la posible asociación (Garza-Gonzales *et al.*, 2010). Para 2020 el equipo de Quiroz-Cruz reportaron asociación con los polimorfismos rs3024505 y rs1800896 del IL-10 por lo que cabe la pregunta de a que se debió la diferencia en estos resultados, fue el tamaño de la muestra, los fragmentos analizados o la diferencia de la población estudiada, ya que mientras el primero fue realizado en el norte de país el segundo se realizó en el centro.

Otro punto que tomar en cuenta es que quizás la escasa información sobre frecuencias en los portadores se deba a que en nuestro país y en general en Latinoamérica, con excepción de algunas regiones de Brasil (Kotze *et al.*, 2020), dentro de la EII el subtipo menos frecuente en cuanto a la incidencia y prevalencia es precisamente la enfermedad de Crohn que tiene una incidencia de 0.66 por cada 100,000 habitantes por año mientras que la de la colitis ulcerosa es de 2-3 (Ciapponi *et al.*, 2020), en nuestro país por ejemplo la EC es 4 veces menos frecuente que la CU (Yamamoto-Furusho *et al.*, 2019).

Con los datos obtenidos en la presente revisión se elaboró un mapa donde se simplificaba el contenido de la tabla 4 que hasta donde se sabe es el primero en su tipo (que reporta las frecuencias); al observarlo podemos notar que existen muchos países de Latinoamérica, Asia, África y de origen árabe donde no se tiene un registro de las frecuencias de portadores, debido a la escases de estos artículos basados en el estudio de poblaciones. En parte esto puede deberse a las limitaciones de la revisión, sin embargo, los datos son similares a los obtenidos por Ng *et al* (2017) quienes realizaron una revisión sistemática sobre la epidemiología

de la enfermedad de Crohn basándose en estudios sobre poblaciones. En los mapas elaborados por ellos se observa un patrón similar al del mapa elaborado en esta revisión donde gran parte de la información de países no europeos o de raza caucásica permanecen desconocidos. En este estudio también se trato de realizar una actualización sobre las frecuencias reportadas en Latinoamérica sin embargo no se encontraron artículos suficientes para realizar un mapa exclusivo de estos países, esto es consistente con los resultados de Kotze *et al.* en el 2020 en cuyo meta-análisis revisan el progreso epidemiológico de la enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa) ellos concluyen que los artículos basados en el estudio de poblaciones son escasos y que es necesario un mejor registro de los mismos, otros autores habían discutido también este problema (Calderón *et al.*, 2018; Yamamoto-Fushuro *et al.*, 2019).

10. Conclusiones

Existen diferencias notables en cuanto a las frecuencias de los portadores de los polimorfismos R702W, G908R y L1007fsinC en poblaciones con orígenes étnicos distintos

Aunque CARD15/NOD2 sigue siendo uno de los genes con una fuerte asociación al riesgo de padecer EC en la actualidad se ha reportado distintos genes que tienen mayor importancia en otras poblaciones y que también tienen diferencias por lo que la genética de poblaciones es muy importante para poder dilucidar estas diferencias

A pesar de que la enfermedad de Crohn es una enfermedad emergente en con poblaciones no caucásicas existe una gran falta de investigación sobre los aspectos genéticos de países asiáticos, pero especialmente en Latinoamérica

La información obtenida mediante investigación se actualiza normalmente en los mismos países

11. Perspectivas

Como perspectivas para este trabajo se propones analizar muestras clínicas para determinar la frecuencias polimórficas de los polimorfismos R702W, G908R y L1007fsinC, así como los polimorfismos rs30245505 y rs1800896 del gen IL-10

La determinación puede realizarse mediante la técnica de PCR-RFLP y la extracción de ADN se puede realizar mediante gradiente de sacarosa (anexos 1 y 2)

Una búsqueda más exhaustiva para recopilar la información sobre genes distintos a CARD15/NOD2 países de Latinoamérica a fin de poder elaborar tablas y mapas donde se resuma la información.

12. Bibliografía

1. Al Nabhani, Z., Dietrich, G., Hugot, J. P., & Barreau, F. (2017). Nod2: The intestinal gate keeper. *PLoS pathogens*, 13(3), e1006177.
2. Altshuler, D., Donnelly, P., & International HapMap Consortium. (2005). A haplotype map of the human genome. *Nature*, 437(7063), nature04226.
3. Arnott, I. D. R., Nimmo, E. R., Drummond, H. E., Fennell, J., Smith, B. R. K., MacKinlay, E., ... & McManus, R. (2004). NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes & Immunity*, 5(5), 417-425.
4. Baptista, M. L., Amarante, H., Picheth, G., Sdepanian, V. L., Peterson, N., Babasukumar, U., ... & Kugathasan, S. (2008). CARD15 and IL23R influences Crohn's disease susceptibility but not disease phenotype in a Brazilian population. *Inflammatory bowel diseases*, 14(5), 674-679.
5. Barreiro-de-Acosta, M., Mendoza, J. L., Lana, R., Domínguez-Muñoz, J. E., & Díaz-Rubio, M. (2010). NOD2/CARD15: geographic differences in the Spanish population and clinical applications in Crohn's disease. *Revista española de enfermedades digestivas: organo oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva*, 102(5), 321-326.
6. Baskaran, K., Pugazhendhi, S., & Ramakrishna, B. S. (2014). Association of IRGM gene mutations with inflammatory bowel disease in the Indian population. *PLoS One*, 9(9), e106863.
7. Bevins, C. L., & Salzman, N. H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 9(5), 356-368.
8. Bin, C., Zhirong, Z., Xiaoqin, W., Minhu, C., Mei, L., Xiang, G., ... & Pinjin, H. (2009). Contribution of rs11465788 in IL23R gene to Crohn's disease susceptibility and phenotype in Chinese population. *Journal of genetics*, 88(2), 191-196.

9. Brookes, A. J. (1999). The essence of SNPs. *Gene*, 234(2), 177-186. Rao, D. C., & Gu, C. C. (Eds.). (2008). *Genetic dissection of complex traits*. Academic Press.
10. Byndloss, M. X., Keestra-Gounder, A. M., Bäumlér, A. J., & Tsohis, R. M. (2016). NOD1 and NOD2: new functions linking endoplasmic reticulum stress and inflammation. *DNA and cell biology*, 35(7), 311-313.
11. Calderón, M., Minckas, N., Nuñez, S., & Ciapponi, A. (2018). Inflammatory bowel disease in Latin America: a systematic review. *Value in health regional issues*, 17, 126-134.
12. Caratachea, M. A. C. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 20(3), 213-221.
13. Ciapponi, A., Virgilio, S. A., Berrueta, M., Soto, N. C., Ciganda, Á., Rojas Illanes, M. F., ... & Bardach, A. (2020). Epidemiology of inflammatory bowel disease in Mexico and Colombia: Analysis of health databases, mathematical modelling and a case-series study. *PloS one*, 15(1), e0228256.
14. Coretti, L., Natale, A., Cuomo, M., Florio, E., Keller, S., Lembo, F., ... & Pero, R. (2017). The interplay between defensins and microbiota in Crohn's disease. *Mediators of inflammation*, 2017.
15. Correa, R. G., Milutinovic, S., & Reed, J. C. (2012). Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2 (NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases. *Bioscience reports*, 32(6), 597-608.
16. Croucher, P. J., Mascheretti, S., Hampe, J., Huse, K., Frenzel, H., Stoll, M., ... & Kim, W. H. (2003). Haplotype structure and association to Crohn's disease of CARD15 mutations in two ethnically divergent populations. *European journal of human genetics*, 11(1), 6-16.
17. Domínguez-Martínez, D. A., Núñez-Avellaneda, D., Castañón-Sánchez, C. A., & Salazar, M. I. (2018). NOD2: Activation during bacterial and viral

- infections, polymorphisms and potential as therapeutic target. *Revista de Investigación Clínica*, 70(1), 18-28.
18. Ebrahimiadib, N., Samra, K. A., Domina, A. M., Stiles, E. R., Ewer, R., Bocian, C. P., & Foster, C. S. (2018). A novel NOD2-associated mutation and variant blau syndrome: Phenotype and molecular analysis. *Ocular Immunology and Inflammation*, 26(1), 57-64.
 19. Eckmann, L., & Karin, M. (2005). NOD2 and Crohn's disease: loss or gain of function? *Immunity*, 22(6), 661-667.
 20. Ferrand, A., Al Nabhani, Z., Tapias, N. S., Mas, E., Hugot, J. P., & Barreau, F. (2019). NOD2 expression in intestinal epithelial cells protects toward the development of inflammation and associated carcinogenesis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 7(2), 357-369.
 21. Feuerstein, J. D., & Cheifetz, A. S. (2017, July). Crohn disease: epidemiology, diagnosis, and management. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 92, No. 7, pp. 1088-1103). Elsevier.
 22. Flynn, S., & Eisenstein, S. (2019). Inflammatory bowel disease presentation and diagnosis. *Surg Clin N Am*, 99(6), 1051-62.
 23. Gajendran, M., Loganathan, P., Jimenez, G., Catinella, A. P., Ng, N., Umopathy, C., ... & Hashash, J. G. (2019). A comprehensive review and update on ulcerative colitis. *Disease-a-month*, 65(12), 100851.
 24. Garza-González, E., Pérez-Pérez, G. I., Mendoza-Ibarra, S. I., Flores-Gutiérrez, J. P., & Bosques-Padilla, F. J. (2010). Genetic risk factors for inflammatory bowel disease in a North-eastern Mexican population. *International journal of immunogenetics*, 37(5), 355-359.
 25. Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., & Sansonetti, P. J. (2003). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 8869-8872.
 26. Gómez García, M. (2009). Estudio de los genes NOD2 y HLA en la enfermedad inflamatoria intestinal.

27. Gompertz, M., & Sedano, R. (2019). Manifestaciones clínicas y endoscópicas en enfermedad inflamatoria intestinal. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 30(4), 273-282.
28. Graham, D. B., & Xavier, R. J. (2020). Pathway paradigms revealed from the genetics of inflammatory bowel disease. *Nature*, 578(7796), 527-539.
29. Henckaerts, L., & Vermeire, S. (2007). NOD2/CARD15 disease associations other than Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*, 13(2), 235-241.
30. Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J. P., Belaiche, J., ... & Binder, V. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411(6837), 599-603
31. Iniesta, R., Guinó, E., & Moreno, V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gaceta Sanitaria*, 19(4), 333-341.
32. Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., & Foster, S. J. (2003). Host recognition of bacterial Muramyl dipeptide mediated through NOD2 IMPLICATIONS FOR CROHN' S DISEASE. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 5509-5512.
33. Inoue, N., Tamura, K., Kinouchi, Y., Fukuda, Y., Takahashi, S., Ogura, Y., ... & Shimosegawa, T. (2002). Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 123(1), 86-91.
34. Juyal, G., Amre, D., Midha, V., Sood, A., Seidman, E., & Thelma, B. K. (2007). Evidence of allelic heterogeneity for associations between the NOD2/CARD15 gene and ulcerative colitis among North Indians. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 26(10), 1325-1332.
35. Kakuta, Y., Kawai, Y., Naito, T., Hirano, A., Umeno, J., Fuyuno, Y., ... & Masamune, A. (2019). A genome-wide association study identifying RAP1A as a novel susceptibility gene for Crohn's disease in Japanese individuals. *Journal of Crohn's and Colitis*, 13(5), 648-658.
36. Kaplan, G. G., & Ng, S. C. (2017). Understanding and preventing the global increase of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 152(2), 313-321.

37. Keestra, A. M., Winter, M. G., Klein-Douwel, D., Xavier, M. N., Winter, S. E., Kim, A., ... & Bäumlér, A. J. (2011). A Salmonella virulence factor activates the NOD1/NOD2 signaling pathway. *MBio*, 2(6).
38. Keestra-Gounder, A. M., & Tsohis, R. M. (2017). NOD1 and NOD2: beyond peptidoglycan sensing. *Trends in immunology*, 38(10), 758-767.
39. Kotze, P. G., Underwood, F. E., Damião, A. O. M. C., Ferraz, J. G. P., Saad-Hossne, R., Toro, M., ... & Kaplan, G. G. (2020). Progression of inflammatory bowel diseases throughout Latin America and the Caribbean: a systematic review. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 18(2), 304-312.
40. Kristjansson, R. P., Benonisdottir, S., Oddsson, A., Galesloot, T. E., Thorleifsson, G., Aben, K. K., ... & Walters, G. B. (2017). Sequence variant at 4q25 near PITX2 associates with appendicitis. *Scientific reports*, 7(1), 1-7.
41. Kúsulas-Delint, D., González-Regueiro, J. A., Rodríguez-Aldama, J. C., García-Miranda, F. S., García-Santos, R. A., Lizardo, A. E., & Gutiérrez-Grobe, Y. (2017). Crohn's disease. Review and current concepts. *Médica Sur*, 23(1), 10-20.
42. Lakatos, P. L., Lakatos, L., Szalay, F., Willheim-Polli, C., Österreicher, C., Tulassay, Z., ... & Ferenci, P. (2005). Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World journal of gastroenterology: WJG*, 11(10), 1489.
43. Lee, G. H., Kim, C. G., Kim, J. S., Jung, H. C., & Song, I. S. (2005). Frequency analysis of NOD2 gene mutations in Korean patients with Crohn's disease. *The Korean journal of gastroenterology= Taehan Sohwagi Hakhoe chi*, 45(3), 162.
44. Leong, R. W. L., Armuzzi, A., Ahmad, T., Wong, M. L., Tse, P., Jewell, D. P., & Sung, J. J. Y. (2003). NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 17(12), 1465-1470.

45. Leong, R. W. L., Armuzzi, A., Ahmad, T., Wong, M. L., Tse, P., Jewell, D. P., & Sung, J. J. Y. (2003). NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 17(12), 1465-1470.
46. Li, J., Moran, T., Swanson, E., Julian, C., Harris, J., Bonen, D. K., ... & Cho, J. H. (2004). Regulation of IL-8 and IL-1 β expression in Crohn's disease associated NOD2/CARD15 mutations. *Human molecular genetics*, 13(16), 1715-1725.
47. Long, W. Y., Chen, L., Zhang, C. L., Nong, R. M., Lin, M. J., Zhan, L. L., & Lv, X. P. (2014). Association between NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in Chinese Zhuang patients. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(16), 4737.
48. Ma, T., Wu, S., Yan, W., Xie, R., & Zhou, C. (2016). A functional variant of ATG16L2 is associated with Crohn's disease in the Chinese population. *Colorectal Disease*, 18(11), O420-O426.
49. Maekawa, S., Ohto, U., Shibata, T., Miyake, K., & Shimizu, T. (2016). Crystal structure of NOD2 and its implications in human disease. *Nature communications*, 7(1), 1-11.
50. Maloy, K. J., & Powrie, F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351), 298-306.
51. McGovern, D. P., van Heel, D. A., Negoro, K., Ahmad, T., & Jewell, D. P. (2003). Further evidence of IBD5/CARD15 (NOD2) epistasis in the susceptibility to ulcerative colitis. *The American Journal of Human Genetics*, 73(6), 1465-1466.
52. Miceli-Richard, C., Lesage, S., Rybojad, M., Prieur, A. M., Manouvrier-Hanu, S., Häfner, R., ... & Hugot, J. P. (2001). CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nature genetics*, 29(1), 19-20.
53. Monrroy, H., & Ibáñez, P. (2013). Clasificación de la gravedad de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterol. latinoam*, 24(2), 85-90.

54. Mosquera-Klinger, G. A., & Benavides, A. U. (2018). Enfermedad de Crohn vs tuberculosis intestinal: un diagnóstico diferencial desafiante. Revisión de tema. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 33(4), 423-430.
55. Mukherjee, T., Hovingh, E. S., Foerster, E. G., Abdel-Nour, M., Philpott, D. J., & Girardin, S. E. (2019). NOD1 and NOD2 in inflammation, immunity and disease. *Archives of biochemistry and biophysics*, 670, 69-81.
56. Nakagome, S., Takeyama, Y., Mano, S., Sakisaka, S., Matsui, T., Kawamura, S., & Oota, H. (2010). Population-specific susceptibility to Crohn's disease and ulcerative colitis; dominant and recessive relative risks in the Japanese population. *Annals of human genetics*, 74(2), 126-136.
57. Naser, S. A., Arce, M., Khaja, A., Fernandez, M., Naser, N., Elwasila, S., & Thanigachalam, S. (2012). Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 18(5), 412.
58. Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., ... & Kaplan, G. G. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*, 390(10114), 2769-2778.
59. Ng, S. C., Tsoi, K. K., Kamm, M. A., Xia, B., Wu, J., Chan, F. K., & Sung, J. J. (2012). Genetics of inflammatory bowel disease in Asia: systematic review and meta-analysis. *Inflammatory bowel diseases*, 18(6), 1164-1176.
60. Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F. F., Yamaoka, S., & Núñez, G. (2001). Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- κ B. *Journal of Biological Chemistry*, 276(7), 4812-4818.
61. Park, S. C., & Jeen, Y. T. (2019). Genetic studies of inflammatory bowel disease-focusing on Asian patients. *Cells*, 8(5), 404.
62. Pascal, V., Pozuelo, M., Borruel, N., Casellas, F., Campos, D., Santiago, A., ... & Manichanh, C. (2017). A microbial signature for Crohn's disease. *Gut*, 66(5), 813-822.

63. Pugazhendhi, S., Amte, A., Balamurugan, R., Subramanian, V., & Ramakrishna, B. S. (2008). Common NOD2 mutations are absent in patients with Crohn's disease in India. *Indian J Gastroenterol*, 27(5), 201-203.
64. Ramírez-Bello, J., & Jiménez-Morales, M. (2017). Implicaciones funcionales de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes codificantes de proteínas y no codificantes en enfermedades multifactoriales. *Gaceta médica de México*, 153(2), 238-250.
65. Rodrigo, L., Martínez-Borra, J., Garrote, J. A., Niño, P., León, A. J., Riestra, S., ... & Arranz, E. (2007). CARD15 mutations are poorly related to Crohn's disease phenotypes in Asturias. *REVISTA ESPANOLA DE ENFERMEDADES DIGESTIVAS*, 99(10), 570.
66. Rubin, D. T., Ananthakrishnan, A. N., Siegel, C. A., Sauer, B. G., & Long, M. D. (2019). ACG clinical guideline: ulcerative colitis in adults. *American Journal of Gastroenterology*, 114(3), 384-413.
67. Sabbah, A., Harnack, R., Frohlich, V., Tominaga, K., Dube, P. H., Xiang, Y., & Bose, S. (2009). Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nature immunology*, 10(10), 1073.
68. Sairenji, T., Collins, K. L., & Evans, D. V. (2017). An update on inflammatory bowel disease. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 44(4), 673-692.
69. Simms, L. A., Doecke, J. D., Walsh, M. D., Huang, N., Fowler, E. V., & Radford-Smith, G. L. (2008). Reduced α -defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut*, 57(7), 903-910.
70. Strober, W., & Watanabe, T. (2011). NOD2, an intracellular innate immune sensor involved in host defense and Crohn's disease. *Mucosal immunology*, 4(5), 484-495.
71. Tattoli, I., Travassos, L. H., Carneiro, L. A., Magalhaes, J. G., & Girardin, S. E. (2007, September). The Nodosome: Nod1 and Nod2 control bacterial infections and inflammation. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 29, No. 3, p. 289). Springer-Verlag.

72. Thavamanikumar, S., McManus, L. J., Tibbits, J. F., & Bossinger, G. (2011). The significance of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *Eucalyptus globulus* breeding programs. *Australian Forestry*, 74(1), 23-29.
73. Thiébaud, R., Esmiol, S., Lecine, P., Mahfouz, B., Hermant, A., Nicoletti, C., ... & Hugot, J. P. (2016). Characterization and genetic analyses of new genes coding for NOD2 interacting proteins. *PLoS One*, 11(11), e0165420.
74. Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J. F., & Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *The Lancet*, 389(10080), 1741-1755.
75. Trindade, B. C., & Chen, G. Y. (2020). NOD1 and NOD2 in inflammatory and infectious diseases. *Immunological Reviews*, 297(1), 139-161.
76. Vargas, R. D. (2010). Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal: ¿ por qué las diferencias entre Norteamérica y Latinoamérica?. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 25(2), 103-105.
77. Venegas, M., Beltrán, C. J., Álvarez, L., Castro, A., Torres, T., Leal, A. D., ... & Quera, R. (2008). IL-23R Arg381Gln polymorphism in Chilean patients with inflammatory bowel disease. *European cytokine network*, 19(4), 190-195.
78. Vermeire, S. (2004). NOD2/CARD15: relevance in clinical practice. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18(3), 569-575.
79. Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., & Eggen, A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*, 34(3), 275-305.
80. Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schäffeler, E., Schlee, M., ... & Schröder, J. M. (2004). NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal α -defensin expression. *Gut*, 53(11), 1658-1664.
81. Yamamoto-Furusho, J. K., Bosques-Padilla, F., De-Paula, J., Galiano, M. T., Ibañez, P., Juliao, F., ... & Zaltman, C. (2017). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal: Primer Consenso Latinoamericano de la Pan American Crohn's and Colitis Organisation. *Revista de Gastroenterología de México*, 82(1), 46-84.

82. Yamamoto-Furusho, J. K., Sarmiento-Aguilar, A., Toledo-Mauriño, J. J., Bozada-Gutiérrez, K. E., Bosques-Padilla, F. J., Martínez-Vázquez, M. A., ... & Bermudez-Villegas, E. F. (2019). Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Mexico from a nationwide cohort study in a period of 15 years (2000–2017). *Medicine*, 98(27).
83. Yamazaki, K., Takazoe, M., Tanaka, T., Kazumori, T., & Nakamura, Y. (2002). Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. *Journal of human genetics*, 47(9), 469-472.
84. Yamazaki, K., Umeno, J., Takahashi, A., Hirano, A., Johnson, T. A., Kumasaka, N., ... & Kubo, M. (2013). A genome-wide association study identifies 2 susceptibility loci for Crohn's disease in a Japanese population. *Gastroenterology*, 144(4), 781-788.
85. Yang, S. K., Hong, M., Zhao, W., Jung, Y., Baek, J., Tayebi, N., ... & Song, K. (2014). Genome-wide association study of Crohn's disease in Koreans revealed three new susceptibility loci and common attributes of genetic susceptibility across ethnic populations. *Gut*, 63(1), 80-87.
86. Yang, S. K., Hong, M., Zhao, W., Jung, Y., Tayebi, N., Ye, B. D., ... & Song, K. (2013). Genome-wide association study of ulcerative colitis in Koreans suggests extensive overlapping of genetic susceptibility with Caucasians. *Inflammatory bowel diseases*, 19(5), 954-966.
87. Yang, S. K., Kim, H., Hong, M., Lim, J., Choi, E., Ye, B. D., ... & Song, K. (2011). Association of CARD8 with inflammatory bowel disease in Koreans. *Journal of human genetics*, 56(3), 217-223.
88. Yang, S. K., Park, M., Lim, J., Park, S. H., Ye, B. D., Lee, I., & Song, K. (2009). Contribution of IL23R but not ATG16L1 to Crohn's disease susceptibility in Koreans. *Inflammatory bowel diseases*, 15(9), 1385-1390.
89. Yu, Z. Q., Wang, W. F., Zhu, C. Z., Zhang, K. H., Chen, X. C., & Chen, J. Y. (2019). The Polymorphism rs17525495 of LTA4H Is Associated with Susceptibility of Crohn's Disease instead of Intestinal Tuberculosis in a Chinese Han Population. *BioMed research international*, 2019.

90. Zhong, Y., Kinio, A., & Saleh, M. (2013). Functions of NOD-like receptors in human diseases. *Frontiers in immunology*, 4, 333.

13. Abreviaturas

ACCU: asociación de enfermos de Crohn y colitis ulcerosa

ADP: Adenosin difosfato

ARN: Ácido ribonucleico

ASCA: *Anti-Saccharomyces cerevisiae*

ATG16L1: proteína relacionada con autofagia 16 similar a 1

ATP: Adenosin trifosfato

CARD: Dominio de reclutamiento de caspasas

CI: colitis indeterminada

CU: Colitis ulcerosa. Se abrevia en inglés como UC

EC: Enfermedad de Crohn. La abreviatura en inglés es CD

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal o en inglés IBD (Inflammatory bowel disease)

HD: dominio en hélice

IAP: proteínas inhibidoras de apoptosis

IKB α : inhibidor α de NF- κ B

IKK: cinasa I κ B

IL: interleucina

IRF: interferón

IRGM: Proteína M de la familia GTP-asa relacionada con la inmunidad

Kb: kilo pares de bases

LRR: Dominio de repeticiones ricas en leucina

LTA4H: Leucotrieno-A4 hidrolasa

MAPK: proteína cinasa activada por mitógenos

MAVS: proteína mitocondrial de señalización antiviral

MDP: muramil dipéptido

NBD: Dominio de unión de nucleótidos

NEMO: Modulador esencial de NF- κ B

NF- κ B: factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de las células activadas B

NOD2: Dominio 2 de oligomerización por unión de nucleótidos

PCR: proteína reactiva C

PCR: rección en cadena de la polimerasa

RAP1A: proteína Rap-1A relacionada con RAS

RIPK2: Serina/Treonina- proteína cinasa que interactúa con el receptor

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido

SOX 5: factor de transcripción 5 de la caja SRY (región Y determinante del sexo)

SRV: virus sincitial respiratorio

TAK1: cinasa 1 activada por factor de crecimiento transformante β

TLR: receptor tipo Toll

TNFSF15: Miembro 15 de la superfamilia de ligando del factor de necrosis tumoral

WHD: dominio en hélice alada (Winged helix domain)

14. Anexos

Anexo 1 PCR-RFLP en la detección de frecuencias polimórficas y Análisis *in silico* de los polimorfismos R702W, G908R y L1007fsinc

La técnica de PCR-RFLP (Reacción en cadena de la polimerasa- polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) se basa en la premisa de que los microindels, MNP (polimorfismo de múltiples nucleótidos) y SNP están asociados frecuentemente con la creación o la eliminación de un sitio de reconocimiento de alguna enzima de restricción por lo que el tratamiento con alguna de ellas generaría fragmentos de distintas longitudes en dependencia de si está presente o no cualquiera de las llamadas variaciones genéticas a baja escala (microindels, MNP y SNP) por lo que la resolución de los alelos sería fácilmente realizada mediante una electroforesis (Rasmussen, 2012).

Dentro de las ventajas que ofrece la PCR-RFLP se encuentra la alta sensibilidad en la identificación de las mutaciones y la correcta identificación de los alelos (Solarte et al., 2012)

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de las PCR *in silico* del polimorfismo R702W, en el recuadro que sigue aparece la secuencia donde se detectaron mediante BLAST los primers usados en este estudio, se marcan la secuencia donde se encuentran los primers, los sitios de corte, así como la base que se modifica debido a la mutación

```
TgCGTgCCAAAGGTgTcGTgCCAGGGAGTAcGGGCGCCcCTgGAATtCcttCacatCactttccagTgcttctt
tgccgcgttctacctggcactcagtgctgatgtgccaccagctttgctcagacacctcttcaattgtggcagg
ccaggcaactcaccaatggccaggctcctgcccacgatgtgcatccaggcctcggagggaaaggacagcagcg
tggcagctttgctgcagaaggccgagccgcacaaccttcagatcacagcagccttcctggcagggctgtttgtc
ccggggagcactggggcctgctggctgagtccagacatctgagaaggccctgctccgggcgccaggcctgtgcc
cgctggtgtctggcccgagcctccgcaagcacttccactccatcccggcagctgcaccggggtgaggccaaga
gCGTgcatgCCatgCccggggttcatctggctcatccgggagcctgtacgagatgcaggaggagcggctggctcg
gaaggctgcacgtggcctgaatgttgggcacctcaagttgacattttgcagtggtgggccccactgagtgT
```

Figura. Se muestra el fragmento de la secuencia que contiene polimorfismo R702W: en amarillo se encuentran marcados los fragmentos correspondientes al primer forward y reverse, en verde las secuencias reconocidas por la enzima MspI y la base en rojo muestra el sitio donde se encuentra el cambio de base debido a esta mutación, como se observa la mutación se encuentra en uno de los sitios de corte de la enzima de restricción lo que provoca la diferencia de fragmentos en a realizar la PCR-RFLP

Tras el análisis *in silico* pudimos observar que el tamaño aproximado del amplicón de 313 pb y se determinaron los tres genotipos para el polimorfismo R702W obteniéndose lo siguiente:

Genotipo silvestre: 38 pb+54 pb+76 pb+31 pb+19 pb+95 pb. Un total de seis fragmentos con esa longitud de pares de bases

Genotipo heterocigoto: 38 pb+54 pb+76 pb+31 pb+19 pb+95 pb+130 pb. Para este genotipo se determinó que habría 7 fragmentos como resultado de la digestión con MspI

Genotipo mutante: 38 pb+130 pb+31 pb+19 pb+95 pb. El genotipo mutante parece ser el más sencillo de determinar dado que cuenta con 5 fragmentos.

La razón de la obtención de aquellos fragmentos se explica de la siguiente manera: en el fragmento obtenido de la PCR originalmente existen 5 sitios de corte reconocidos por MspI dando un total de seis fragmentos, esto en un individuo sin mutación, sin embargo en un individuo con el polimorfismo R702W hay un cambio de citosina por timina en uno de los sitios de corte reduciéndose entonces a solo 4 sitios reconocidos por MspI por lo que si el individuo es homocigoto mutante solo se tendrán 5 fragmentos sin embargo si se trata de un individuo con genotipo heterocigoto habrá 7 fragmentos de distinto pb ya que los alelos son diferentes

Para el polimorfismo G908R en el análisis por BLAST se obtuvo un fragmento de un total de 352 pares de bases ya la igual que con R702W se muestra el fragmento que contiene la mutación

```

tgtaaAGCCACTGAAAACTCTTGGGTTAAGTTTGGCCATCCCACCCAAAAGATGGAGGCAGGTCCACT
TTGCTGGGACCAGGAGCCCCAGTGAGGCCACTCTGGGATTGAGTGGTCCTGCCCTCTGGCTGGGACT
GCAGAGGGAGGAGGACTGTTAGTTCATGTCTAGAACACATATCAGGTACTIONACTGACACTGTCTGTTG
ACTCTTTTGGCCTTTTCAGATTCTGGGCAACAGAGTGGGTGACGAGGGGGCCAGGCCCTGGCTGAA
GCCTTGGGTGATCACCAGAGCTTGAGGTGGCTCAGGTAAGCTTCAGAGTCTATCCTGCAGTTTTTC TTG
GGGAGATCAGGTGAAGA gggaggag

```

Figura. Fragmento perteneciente a la fracción delimitada por los primers del polimorfismo G908R. en amarillo se marcan los primers que delimitan el fragmento, en azul la guanina que es sustituida por citosina en el polimorfismo y la parte verde delimita el sitio de corte de la enzima HhaI que no está presente a menos que exista esta mutación.

A diferencia del polimorfismo anterior no existe sitio de corte en los individuos donde la mutación no está presente, el sitio de corte esta aparece cuando existe el polimorfismo G908R y en todo el amplicón solo hay uno de estar presente la mutación por lo que se obtienen los siguientes genotipos:

Genotipo silvestre: 352 pb. Al no existir mutación no hay sitio de corte para que la enzima HhaI pueda actuar y de esta manera se conserva el fragmento original

Genotipo heterocigoto: 352 pb +227 pb + 125pb. Al poseer dos alelos distintos se obtienen tres fragmentos uno del tamaño original del amplicón ya que es alelo o presenta el polimorfismo y otros dos fragmentos resultado del alelo que contiene la mutación

Genotipo mutante: 227 pb + 125pb. Debido a que ambos alelos están mutados se crean solo dos fragmentos.

Finalmente, para el análisis *in silico* de la tercera mutación

```

gtgtctaagggacaggtgggcttcagtagactggctaactCctgcagtctctttaaactggacag
tttcaagaggaaaaccaagaatccttgaagctcaccattgtatcttctttccaggtgtgcaa
taactgcatcacctacctaggggcagaagccctcctgcaggccc. ttgaaaggaatgacac cat
cctggaagtctggttaag gcccctgggcaggcctgttttagctctccgaacctcagttttctat
ctgtaaaatggggtgacgggagagaggaatggcagaattttgaggatcccttctgattctgaca
ttcagtgagaatgattctgcatgtgaaggatctgattctctgtctaagaaa

```

Fig. Fragmento correspondiente al amplicón delimitado por los primers seleccionados para este estudio

Anexo 2 Protocolo de extracción ADN de sangre entera por método de gradiente de sacarosa

A partir de 5ml de sangre:

- 1) Preparar núcleos agregando a 5mL de sangre, 35mL de solución de lisis (320mM Sacarosa, 5mM MgCl₂, 1% Tritón X-100, 10mM Tris-HCl pH 7.4) y mezclar con vortex.
- 2) Centrifugar a 2000g durante 20 minutos a 4°C.
- 3) Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 2mL de solución de suspensión (150mM NaCl, 60mM EDTA, 1% Dodecil Sulfato de Sodio, 400mM Tris-HCl, pH 7.4)
- 4) Agregar 0.5mL de 5M Perclorato de Sodio
- 5) La suspensión se mezcla oscilando a T. Ambiente por 15 minutos y después se incuba a 65°C durante 30 minutos.
- 6) Se agregan 2mL de Cloroformo frío a -20°C y se mezcla por rotación a Temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 7) Centrifugar a 1400g durante 15 minutos
- 8) Transferir la fase acuosa (la más alta) que contiene el DNA a otro tubo
- 9) Agregar 2 volúmenes de Etanol absoluto frío (4°C).
- 10) Invertir el tubo varias veces para precipitar el DNA
- 11) Tomar la hebra de DNA con micropipeta, colocarlo en un tubo Eppendorf y lavarlo dos veces con etanol 70%
- 12) Retirar el etanol y dejar secar el DNA a Temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 13) Resuspender el DNA en 200µL de buffer TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.4), se incuba toda la noche a 60°C.
- 14) Almacenar a -20°C hasta su uso.

<p>Solución de Lisis 1 Litro</p> <p>320mM Sacarosa _____</p> <p>5mM MgCl₂ _____</p> <p>1% Tritón X-100 _____</p> <p>10mM Tris-HCl _____</p>	<p>Solución de Suspensión (200mL)</p> <p>150mM NaCl _____</p> <p>60mM EDTA _____</p> <p>1% SDS _____</p> <p>400mM Tris-HCl _____</p>
<p>Perclorato de Sodio (100mL)</p> <p>5M Perclorato de Sodio _____</p>	<p>Buffer TE (100mL)</p> <p>100mM Tris-HCl _____</p> <p>1mM EDTA _____</p>