



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO
PRESENTES EN LOS GENES DE IL-10 E IL-23R EN POBLACIÓN
MEXICANA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

RITA SARAI QUIROZ CRUZ

ASESOR: DR. SALVADOR FONSECA CORONADO

COASESORA: M. EN C. KARINA RUIZ TOVAR

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO, 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Frecuencia de polimorfismos de nucleótido único presentes en los genes de IL-10 e IL-23R en población mexicana

Que presenta la pasante: Rita Sarai Quiroz Cruz

Con número de cuenta: 406012272 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de marzo de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Dr. Andrés Romero Rojas	
SECRETARIO	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
1er. SUPLENTE	QFB. Ladislao Palomar Morales	
2do. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

DEDICATORIAS

*A toda mi familia les agradezco por compartir mis éxitos y mis fracasos. A ti **Papá** gracias por todo el esfuerzo que hiciste para sacarme adelante por darme todo lo que necesite en mi búsqueda por superarme y llegar hasta este momento, gracias por siempre confiar en mí, por tu apoyo, comprensión, por darme ánimos y por nunca dejarme sola, gracias por tus grandes consejos y por ser la persona que más admiro en la vida, eres mi mejor ejemplo a seguir. **Ma** gracias por siempre estar conmigo en las buenas y en las peores porque a pesar de verme caer has confiado en mí y has estado para mí, cuidándome y apoyándome incondicionalmente, eres una gran mujer. Los amo.*

***Anílu** gracias por ser mi hermana, mi amiga, mi confidente, mi cómplice, por desvelarte conmigo, por estudiar conmigo aunque no supieras ni de que hablaba pero siempre estabas ahí escuchándome hablar en un idioma raro para tí, me viste llorar y cuando ya no podía más y siempre me repetiste “tu puedes”, gracias por estar siempre cerca. Te amo brujís.*

*A mis hermanos **Noe y Cheche** gracias por ser mi apoyo, por ser mis confidentes, por hacerme reír y por todas las aventuras locas que hemos pasado juntos, a **Héctor** por ser mi hermano mayor por guiarme y por darme a esos pequeños angelitos que iluminaron mi vida.*

***Nanís, Khary, Daniel** y a todos mis primos que a lo largo de mi vida siempre han estado conmigo que me han dado alegrías y buenos momentos, hemos compartido tantas cosas y ahora quiero compartir este logro con ustedes.*

*A mis amigos de la facultad en especial a **Belen, Clau, Pablo y Toño** por compartir conmigo esta loca aventura de ser químicos gracias por vivir conmigo el estrés y la presión, por hacer más divertidos y ligeros nuestros días en la FES siempre serán parte de mi vida gracias por su gran amistad.*

Les agradezco a todas esas personas especiales e importantes en mi vida que me apoyaron siempre, por creer en mí y por darme su cariño y amor.

Finalmente le agradezco a Dios por las grandes bendiciones que ha puesto en mi vida, por permitirme llegar hasta aquí, por rodearme siempre de grandes personas y por darme la fuerza de siempre seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Karina Ruiz Tovar y al Dr. Salvador Fonseca Coronado por acercarme a este grupo de trabajo, gracias por su apoyo, confianza, disponibilidad, tolerancia, enseñanzas, su dedicación y por creer en mí para sacar adelante este proyecto de verdad muchísimas gracias los aprecio mucho.

A mis compañeras de laboratorio por hacer más ameno el trabajo, por su apoyo, su amistad y sus consejos.

A mis profesores de toda la carrera quienes sus enseñanzas hicieron que mi interés hacia la ciencia acrecentarán.

A los profesores que forman parte de mi jurado por su disponibilidad y amabilidad para compartir su experiencia y conocimiento.

A mi casa de estudios la FESC UNAM por darme la oportunidad de adquirir nuevos conocimientos por darme la oportunidad de vivir esta nueva experiencia profesional y personal, además de gozar el formar parte de tan amada Institución, me siento orgullosa de ser parte de ella: "Por mi raza hablará el espíritu"

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Inmunobiología de Enfermedades Infecciosas de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Salvador Fonseca Coronado.

Este trabajo de investigación fue financiado por La Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México a través del Programa PAPIIT TA200214 “Desarrollo de un modelo predictivo de evolución de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal basado en polimorfismos de nucleótido único presentes en genes relacionados con la respuesta inmune”.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
RESUMEN	vi
1. Introducción	1
1.1 Polimorfismos de Nucleótido Único	1
1.2 Clasificación de los SNPs	1
1.3 SNPs y susceptibilidad genética a enfermedades	4
1.4 Identificación de los SNPs	5
2. Antecedentes	8
2.1. Enfermedad Inflamatoria Intestinal	9
2.2. Epidemiología de la EII	11
2.3. Etiología	13
2.3.1. Factores ambientales	13
2.3.2. Factores inmunológicos	16
a) Integridad de la Barrera Intestinal	17
b) Inmunidad Innata	18
c) Inmunidad Adaptativa	19
d) Células Presentadoras de Antígeno	19
e) Células Treg	20
2.3.3. Factores genéticos	21
2.4. Equilibrio de Hardy-Weinberg	26
3. Justificación	28

4. Hipótesis	28
5. Objetivos	28
5.1. Objetivo general	28
5.2. Objetivos Particulares	28
6. Plan General de Trabajo	29
7. Metodología	29
8. Resultados	32
9. Discusión	40
10. Conclusiones	47
11. Perspectivas	48
12. Referencias	49
13. Anexo I	55

ABREVIATURAS

A	Adenina, base púrica.
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i> . Células Presentadoras de Antígeno.
ASA	Aminosalicilatos.
ASP	Ácido Aspártico.
ATG16L1	<i>Autophagy related 16 like 1</i> . Gen que codifica proteínas de autofagia.
AUG	Codón de inicio de la transcripción.
C	Citocina, base pirimidínica.
CD	Células Dendríticas.
CI	Colitis Indeterminada.
cSNP	Polimorfismo de nucleótido único en región codificante.
CU	Colitis Ulcerativa.
DL	Desequilibrio de Ligamento.
DMT2	Diabetes Mellitus tipo 2.
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> . Ácido desoxirribonucleico.
DSS	Sulfato de Dextrano Sódico.
D/TGGE	Gel de electroforesis en gradiente desnaturalizante/ térmico.
EC	Enfermedad de Crohn.
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético.
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal.
FAM	Fluorocromo 5-Carboxyfluoresceína.
G	Guanina, base púrica.
GLI	Glicina.
gSNP	Polimorfismo de nucleótido único en región intergenómica.
GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i> . Estudios de Asociación de Genoma Completo.
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> . Antígeno humano leucocitario.
HTA	Hipertensión arterial.
HWE	Equilibrio de Hardy-Weinberg.

IBD	<i>Inflammatory Bowel Disease.</i>
IFN	Interferón.
IL	Interleucina.
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social.
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
IRGM	<i>Inmmunity related GTPase family M.</i> Gen que codifica proteínas de autofagia.
iSNP	Polimorfismo de nucleótido único en región intrónica.
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado.
LEG	Lupus Eritematoso Generalizado.
LOD	Logaritmo de odds.
LPS	Lipopolisacarido.
NF- κ β	<i>Nuclear Factor.</i> Factor Nuclear.
NK	<i>Natural Killer cells.</i> Células Asesinas Naturales.
NKX2-3	<i>Transcription factor related, locus 3.</i> Factor de transcripción.
NOD	<i>Nucleotide Oligomerization Domain.</i> Dominio de oligomerización de nucleótidos.
nsSNP	Polimorfismo de nucleótido único no sinónimo.
OCTN1-2	Gen codificante de transportadores de cationes orgánicos.
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Patterm.</i> Patrón molecular asociados a patógenos.
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction.</i> Reacción en cadena de la polimerasa.
PCR-RFLP	<i>Restriction Fragments Lenght Pattern.</i> Reacción en cadena de la polimerasa con fragmentos de restricción.
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor.</i> Receptor de reconocimiento de patógenos.
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.
RNA	<i>Ribonucleic Acid.</i> Ácido ribonucleico.
RNA _m	Ribonucleic Acid. Ácido ribonucleico mensajero.
rSNP	Polimorfismo de nucleótido único en región reguladora.
SASP	Sulfasalazina.
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism.</i> Polimorfismo de nucleótido único.

SSCP	Polimorfismo de conformaciones de cadena sencilla.
sSNP	Polimorfismo de nucleótido único sinónimo.
srSNP	Polimorfismo de nucleótido único que afecta estructura.
T	Timina, base pirimidínica.
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> . Factor de Crecimiento Transformante.
Th	<i>Cell T helper</i> . Células T cooperadoras.
TLR	<i>Toll Like Receptor</i> . Receptor tipo Toll.
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral α .
Treg	Células T reguladoras.
UAG	Codón de paro.
UTR	<i>Untranslated Region</i> . Región no traducida.
VIC	Marca registrada.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquematización de un SNP.	1
Figura 2.	Clasificación de los SNPs de acuerdo a su localización.	2
Figura 3.	Clasificación de los SNPs.	3
Figura 4.	Efecto funcional de los SNPs.	3
Figura 5.	Genes que contienen SNPs asociados al desarrollo de diferentes enfermedades.	5
Figura 6.	Clasificación y localización anatómica de la EII.	9
Figura 7.	Frecuencia de la EII en México.	12
Figura 8.	Factores involucrados en la patogénesis de la EII.	13
Figura 9.	Sistema inmunológico. Tolerancia e inflamación.	17
Figura 10.	Patogénesis de la EII.	20
Figura 11.	Clasificación de la EII según la susceptibilidad genética.	23
Figura 12.	Mapa del Distrito Federal y Zona Metropolitana del Valle de México.	30
Figura 13.	Diagrama representativo de la genotipificación del SNP rs11209026.	33
Figura 14.	Frecuencia genotípica del SNP rs11209026 [A/G] presente en el gen de IL-23R. Frecuencia alélica en población abierta del SNP	33
Figura 15.	rs11209026.	34
Figura 16.	Diagrama representativo de la genotipificación del SNP rs1800896.	34
Figura 17.	Frecuencia genotípica del SNP rs1800896 [A/G] presente en el gen de IL-10.	35
Figura 18.	Frecuencia alélica en población abierta del SNP rs1800896.	35
Figura 19.	Diagrama representativo de la genotipificación del SNP rs3024505.	36
Figura 20.	Frecuencia genotípica del SNP rs3024505 [T/C] presente en el gen de IL-10.	37
Figura 21.	Frecuencia alélica en población abierta del SNP rs3024505.	37
Figura 22.	Frecuencia genotípica del SNP rs11209026 [A/G] presente en el gen de IL-23R (EII).	38
Figura 23.	Frecuencia genotípica del SNP rs1800896 [A/G] presente en el gen de IL-10 (EII).	39
Figura 24.	Frecuencia genotípica del SNP rs3024505 [T/C] presente en el gen de IL-10. (EII).	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación de Montreal 2005 de la EII.	10
Tabla 2.	Secuencias de sondas comerciales para los SNP de IL-23R e IL-10	31
Tabla 3.	Frecuencias genotípicas de los SNPs en población abierta.	32
Tabla 4.	Frecuencias genotípicas de los SNPs en pacientes con EII.	38

RESUMEN

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) es una enfermedad caracterizada por la presencia de inflamación crónica sin tratamiento definitivo. Existen dos formas clínicas de la EII: la Enfermedad de Crohn (EC) y la Colitis Ulcerativa (CU). En México, no existen datos concluyentes aunque se cree que la incidencia de CU esta entre 0.2 % a 4.89 %, mientras que la EC se estima entre 0.0008 % y 1.11 %.

La EII incluye síntomas digestivos como diarrea, dolor abdominal, sangrado rectal o manifestaciones extra intestinales que dificultan y retrasan el diagnóstico, condicionando en ocasiones una mayor extensión de la enfermedad o la presencia de complicaciones.

La etiopatogenia es compleja y no bien conocida, sin embargo, se propone que la inflamación crónica es desencadenada por una respuesta inmunológica en contra de la microbiota, que a su vez podría ser promovida por factores ambientales en individuos genéticamente susceptibles.

Entre los factores genéticos involucrados, se encuentran diversos polimorfismos de nucleótido único (SNP) que han mostrado relevancia en la susceptibilidad de padecer esta enfermedad y su progresión. Se ha observado, por ejemplo, la asociación de SNPs presentes en la región promotora del gen que codifica para IL-10, en la posición -1082 [G/A] y en una región intergénica [C/T]. También se han realizado estudios de un SNP en el gen que codifica para IL-23R en la posición 381 [G/A], que sugiere cierta protección en la progresión de la enfermedad. Adicionalmente, se han encontrado diferencias en la expresión de estas proteínas de acuerdo al genotipo presentado.

Así, en éste trabajo se realizó el análisis de los SNPs presentes en los genes que codifican IL-10 tanto en la región promotora como en la región intergénica (rs1800896, rs3024505, respectivamente) y en la región codificante del receptor de

IL-23 (IL-23R) (rs11209026) por medio de PCR en tiempo real (sondas TaqMan). Se genotipificaron 400 donadores del Distrito Federal y Área Metropolitana para establecer la frecuencia de estos SNPs en la población mexicana.

Para el SNP rs1800896 en el gen de IL-10, el genotipo AA fue el más frecuente (59.25 %) en la población abierta, seguido del genotipo AG (39.5 %) y el genotipo GG (6.25 %). Para el rs3024505 del mismo gen se analizaron 292 donadores encontrándose que el genotipo CC fue el más frecuente (94.863 %), seguido del genotipo CT (5.1374 %), no se encontró el genotipo TT. Por último, para el gen de IL-23R (rs11209026), el genotipo más frecuente fue el GG (68.5 %), seguido del AG (29 %) y el GG (2.5 %) en la población abierta. De acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg, los SNPs rs11209026 ($p=0.58$) del gen IL-23R y el rs1800896 ($p=0.41$) del gen IL-10, son buenos candidatos para ser utilizados como marcadores biológicos en la implementación de un modelo predictivo del desarrollo de la EII en población del Distrito Federal y Área Metropolitana. El rs3024505 ($p=0.65$) del gen de IL-10 no cumple con tal equilibrio, sin embargo, el tamaño de la muestra deberá incrementarse en trabajos futuros para confirmar estas observaciones.

1. Introducción

1.1 Polimorfismos de Nucleótido Único

Un polimorfismo de nucleótido único (**SNP**; *Single Nucleotide Polymorphisms*) se define como la variación que se presenta en una secuencia del DNA y que afecta solo a una base nitrogenada (figura 1). Para que estas variaciones sean consideradas como **SNP**, deben presentarse por lo menos en el 1 % de la población, de lo contrario, se considerara una mutación. A pesar de que todos los individuos compartimos el 99.9 % de la secuencia genómica, cada persona tiene un genoma único. Un **SNP** no es más que una mutación puntual con un éxito evolutivo importante que le ha hecho tener una incidencia significativa en la población, por lo que tiene la capacidad de funcionar como marcador biológico (Ramírez y cols., 2013).

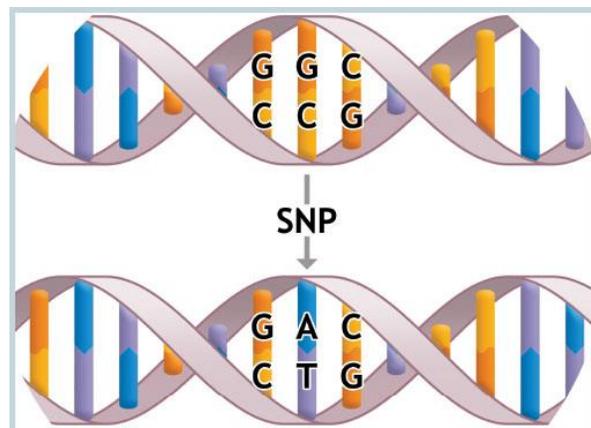


Figura 1. Esquematización de un SNP.

1.2 Clasificación de los SNPs

Los SNPs pueden estar presentes en regiones codificantes (cSNP), los cuales se subdividen en sinónimos (silenciosos), cuando el cambio de nucleótido no da lugar a un cambio de aminoácido y en no sinónimos, cuando el cambio de nucleótido modifica la secuencia de aminoácidos. Estos últimos afectan directamente la

función de la proteína, ya que se generan cambios que pueden estar localizados en la región promotora del gen, influenciando su actividad transcripcional y modulando la unión de factores de transcripción, en intrones (modulando la estabilidad de la proteína) o en sitios de splicing (sitios donde ocurre la eliminación de intrones y unión de exones) o en regiones intragénicas (Checa, 2007; Ramírez y cols., 2013) (figura 2).

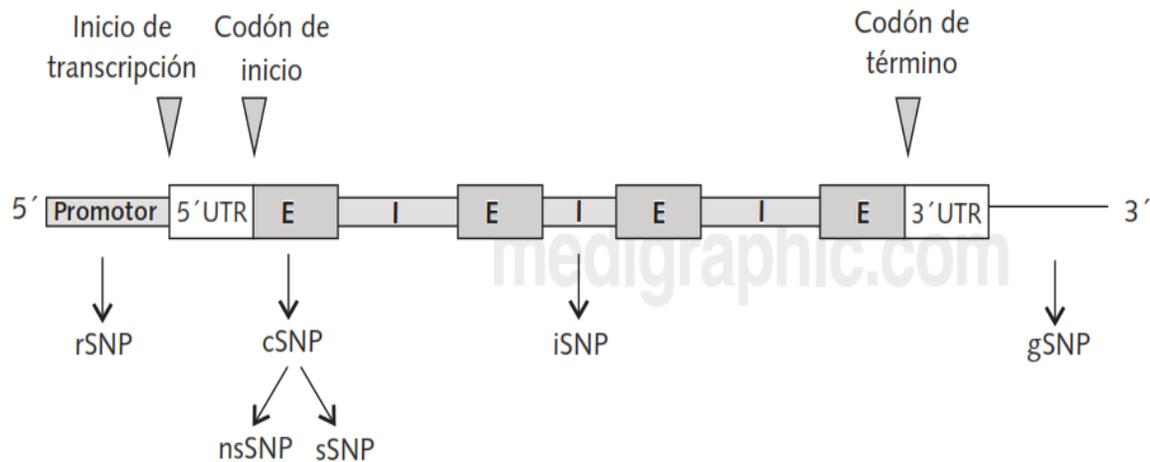


Figura 2. Clasificación de los SNPs de acuerdo a su localización (E: Exones; I: Intrones; UTR: Regiones no codificantes) (Checa, 2007).

Según su localización en el genoma, los SNPs se clasifican en: iSNP, si están localizados en regiones intrónicas; rSNP, si se presentan en regiones reguladoras; srSNP si afectan a la estructura y función de los RNAm (Ramírez y cols., 2013); cSNP, aquellos presentes en regiones codificantes (exones); y en gSNP, localizados en regiones intergenómicas. Cada uno de ellos puede afectar, en último término, a la cantidad y actividad de las proteínas codificadas en los respectivos genes. Los cSNP pueden estar representados por SNP's sinónimos (sSNP) o no sinónimos (nsSNP) (Checa, 2007) (figuras 3 y 4).

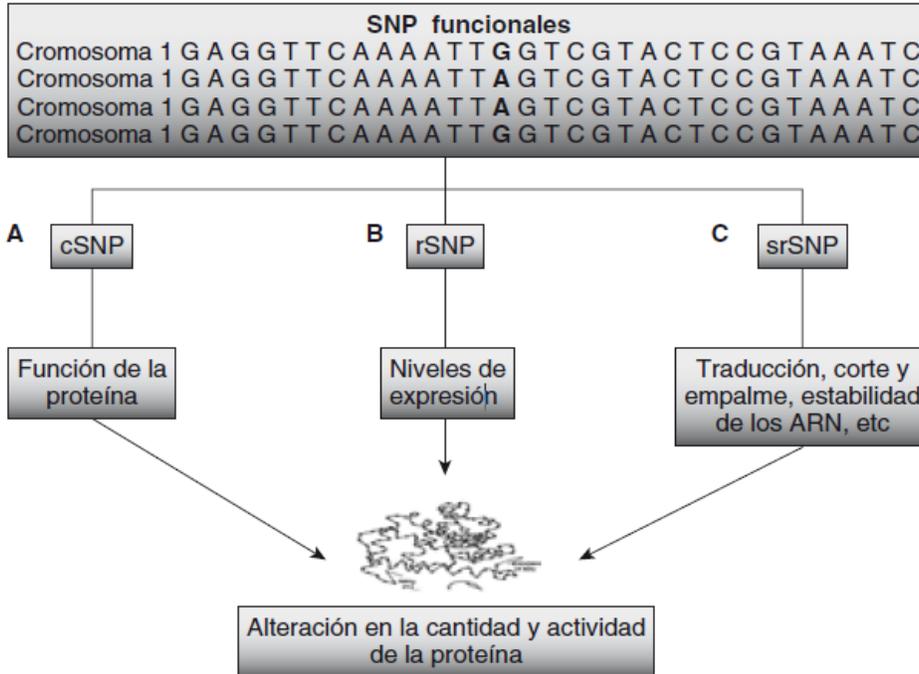


Figura 3. Clasificación de los SNPs (Ramírez y cols., 2013).

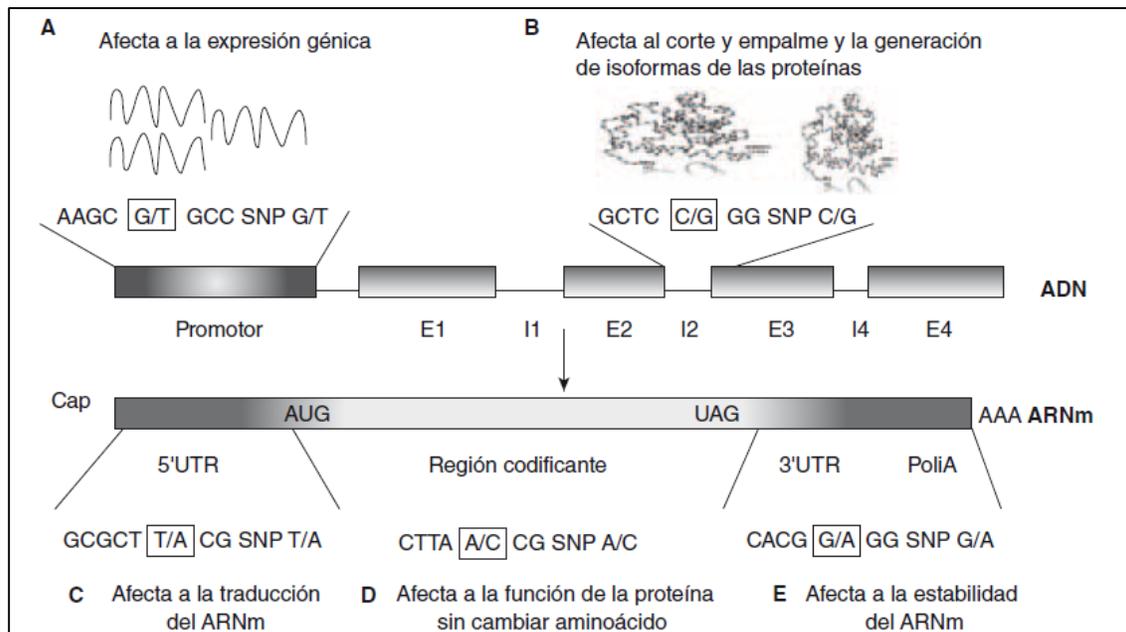


Figura 4. Los rSNP pueden afectar a los niveles de expresión si están en el promotor (**A**). Si se encuentran en la estructura de los RNAm pueden afectar al corte y empalme (**B**), la traducción del RNAm a proteínas (**C**) en la región 5'UTR se ha observado tienen un papel importante en la función de la proteína (**D**) en la región 3'UTR pueden afectar a la estructura y estabilidad del RNAm (**E**). UTR: región no traducida; E: exón; I: intrón; AUG: sitio de inicio de la traducción; UAG: codón de paro (Ramírez y cols., 2013).

1.3 SNPs y susceptibilidad genética a enfermedades

La variabilidad fenotípica de cada individuo, así como la susceptibilidad o la resistencia individual a distintas enfermedades radica principalmente en los SNPs y en menor grado a otras variaciones en el genoma, como inserciones, deleciones o secuencias repetidas (Checa, 2007).

Algunas enfermedades como la Hipertensión Arterial (HTA), Síndrome Metabólico, Obesidad, Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2), Asma y ciertas enfermedades autoinmunes, como Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) y la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), tienen un origen multifactorial, es decir, que para que se desarrollen se requiere de la participación e interacción de múltiples genes de baja penetrancia y tanto de factores genéticos, como de factores ambientales que dependen de cada población. Estas patologías complejas no tienen un patrón de herencia definido como las enfermedades mendelianas, sin embargo, se sabe que el componente genético y variantes comunes de SNP, desempeñan un papel determinante en el desarrollo de estas (Ramírez y cols., 2013).

Los estudios genéticos para conocer las causas de ciertas enfermedades, han pasado por diferentes fases a medida que han evolucionado las técnicas de Biología molecular. En este sentido, el desarrollo de la tecnología necesaria para realizar estudios de asociación de genoma completo (GWAS; Genome Wide Association Studies) ha supuesto un punto de inflexión en el estudio de la genética de las enfermedades complejas y han facilitado la descripción de numerosas regiones que estudios previos no habían tenido en consideración (Norrsgard, 2008).

Los GWAS pueden explorar la variabilidad de todo el genoma sin realizar una selección de los genes a estudiar. Este tipo de estudios permite encontrar asociaciones entre el desarrollo de patologías y genes cuya función aún no se conoce y además de que se analizan una gran cantidad de SNP a lo largo de todo el genoma (Norrsgard, 2008) (figura 5).

La base de datos de SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) constantemente se actualiza con nuevos genomas secuenciados, muestra el número de SNPs ubicados en el genoma humano, el cambio de alelo de cada polimorfismo, su distribución alélica y genotípica en las diferentes poblaciones (caucásica, africana, asiática, mexicana, entre otras) (Ramírez y cols., 2013).

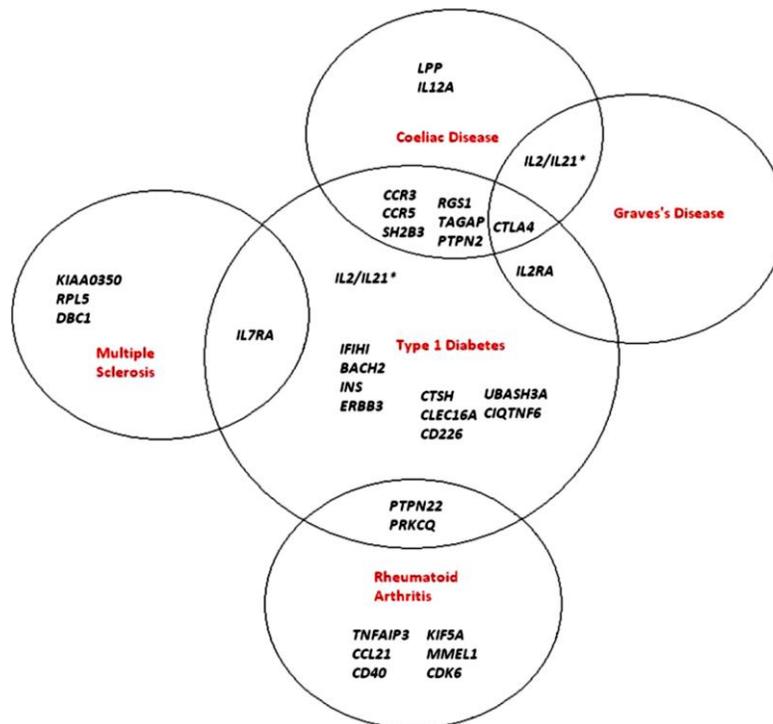


Figura 5. Genes que contienen SNPs asociados al desarrollo de diferentes enfermedades (Heap y Heel, 2009).

1.4 Identificación de los SNPs

Las estrategias a seguir para la identificación de los SNPs varían en función del ensayo y el conocimiento previo acerca de la base genética de la patología de interés. El genotipado de los SNPs puede plantearse mediante el gen candidato y la elaboración de mapas de ligamiento a partir del genoma completo (López y cols., 2005).

La aproximación del gen candidato requiere del conocimiento previo de la patogénesis de la enfermedad para poder identificar los genes relevantes. Esta

identificación se consigue por medio de fuentes variadas como literatura científica, herramientas bioinformáticas o incluso técnicas de análisis de expresión génica como pueden ser los microarreglos de DNA. Se hace el genotipado del SNP de la región del genoma que contiene los genes candidatos con el objetivo de identificar SNPs relevantes en la patología de la enfermedad. La ventaja es que este método va dirigido a zonas específicas en el genoma y su principal limitación es que los SNPs que se encuentren en regiones del genoma, fuera de los genes, quedan excluidos al no tenerse en cuenta desde la primera etapa (López y cols., 2005).

El segundo método es el análisis del genoma completo mediante mapas genéticos, en este estudio no se necesita conocimiento previo acerca del papel que juegan distintos genes en la patología de estudio. Se necesitan datos procedentes de grandes poblaciones de individuos, así como el genotipado de cientos de miles de SNPs para conseguir resultados relevantes. La identificación de los SNPs relacionados con genes de interés se realiza por medio de estudios de asociación genética, esta es más apropiada para el análisis genético de enfermedades complejas en las que están implicados múltiples genes. Esta estrategia consiste en la medición del Desequilibrio de Ligamento (DL) entre un marcador y una enfermedad determinada, mediante el análisis de una población de individuos afectados e individuos control. Se considera que existe DL en una región cromosómica cuando se observan grupos de marcadores genéticos o haplotipos que tienden a transmitirse conjuntamente a la siguiente generación. La estrategia permite refinar la localización de un gen. La principal limitación de esta estrategia es que debido a que la fuerza del equilibrio de ligamento disminuye con la distancia entre marcadores genéticos, es necesario genotipar cientos de individuos para obtener un gran número de SNPs que avalen la asociación genética (López y cols., 2005).

Identificar a los SNPs que estén relacionados con la enfermedad usando un número reducido de SNPs es una estrategia que emplea el proyecto internacional de HapMap iniciado en el 2002, con el objetivo de caracterizar patrones de DL y

haplotipos a lo largo del genoma humano, así como identificar SNPs que capturen la mayoría de información que permitan asociación genética a gran escala (López y cols., 2005).

Las técnicas que permiten el genotipado de los SNPs son diversas y pueden ser empleadas de manera conjunta:

1. Geles de electroforesis en gradiente desnaturizante/térmico (D/TGGE):

Con esto se puede analizar el polimorfismo a través de la estabilidad, a distintas condiciones desnaturizantes o a diferentes temperaturas del DNA amplificado.

2. Polimorfismo de conformaciones de cadena sencilla (SSCP):

Es una técnica basada en el análisis del polimorfismo a través de las diferencias conformacionales de fragmentos de DNA de cadena sencilla. Las distintas conformaciones son detectables como un cambio de movilidad en geles de poliacrilamida no desnaturizante. Es especialmente útil cuando las reacciones de PCR producen bandas de DNA de gran tamaño, o bien, bandas de tamaño muy parecido; puede llegar a distinguir cambios de pocos nucleótidos.

3. Secuenciación por hibridación:

Cuando se conoce la secuencia de un fragmento de DNA, es posible colocar un juego de oligonucleótidos cortos representando el fragmento completo de DNA o “chip” de DNA. Debido a que se conoce la secuencia de los oligonucleótidos en cada posición, se puede inferir la secuencia de DNA de una prueba de DNA marcada con fluorescencia, analizando el patrón de hibridación.

4. Discriminación alélica:

No existe el método ideal, sin embargo, los usados actualmente emplean cuatro mecanismos generales para llevar a cabo la discriminación alélica: a) hibridación alelo-específica; b) ligación de oligonucleótidos alelo-específicas; c) incorporación de oligonucleótidos alelo-específica y d) corte enzimático alelo-específico.

Algunos ejemplos de estas técnicas son:

- a) Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP). Se usan enzimas de restricción que cortan secuencias específicas de ADN; es decir, un fragmento de DNA amplificado por PCR se somete a digestión con una endonucleasa, ésta tendrá un sitio de corte específico y las variaciones alterarán este patrón de corte; dando como resultado un patrón diferente de migración que puede ser visualizado mediante el corrimiento de estos fragmentos en geles de agarosa, comparando y distinguiendo los distintos genotipos.

- b) Hibridación. En ésta se diseñan dos pruebas alelo-específicas para hibridar a una secuencia blanco, solamente cuando éstas sean totalmente complementarias. Cuando las sondas alelo-específicas son inmovilizadas sobre un soporte, se capturan las muestras de DNA y se visualizan los eventos de hibridación detectando una marca fluorescente.

5. PCR en tiempo real:

Método basado en la aplicación de la técnica de PCR y en la creación de dos sondas alelo-específicas, las cuales emiten una señal fluorescente al unirse al templado. Este tipo de análisis es más utilizado hoy en día porque ya existen sondas prediseñadas para un sinnúmero de polimorfismos, ya descritos (Checa, 2009).

2. Antecedentes

Como se ha mencionado anteriormente el estudio de los SNPs permite encontrar asociaciones de diferentes genes que pueden o no estar vinculados con la patología de una enfermedad, pero se ha observado que juegan un papel importante en el desarrollo, prevención y tratamiento de la misma. Una de estas enfermedades que ha sido objeto de muchos estudios es la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII).

2.1. Enfermedad Inflamatoria Intestinal

La EII incluye varias manifestaciones clínicas cuya característica principal es el proceso inflamatorio crónico e idiopático del tubo digestivo en diferentes localizaciones y posee etiología multifactorial (Yamamoto, 2007; Sepúlveda y cols., 2008). Su importancia radica en el deterioro de la calidad de vida de quienes la padecen y el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal.

La EII posee dos formas clínicas: la Enfermedad de Crohn (EC) y la Colitis Ulcerativa (CU), dos entidades que a pesar de ser diferentes entre sí, tienen características comunes que no permiten diferenciarlas aproximadamente en un 10 % de los casos (Aguilera, 2004), los cuales son denominados como Colitis Indeterminada (CI). Los síntomas y la gravedad de cada una de estas enfermedades dependen de la extensión, localización, comportamiento, grado de inflamación y de las manifestaciones extraintestinales (figura 6) (Gassull y cols., 2007).

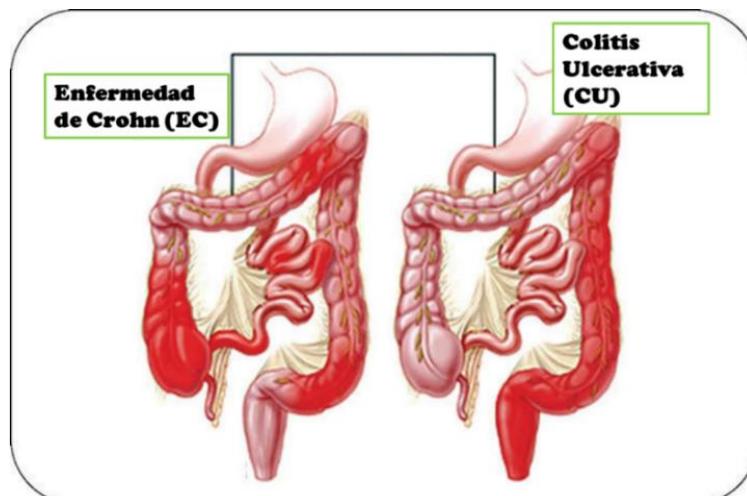


Figura 6. Clasificación y localización anatómica de la EII (Rubio,2013).

Su clasificación fenotípica es de gran utilidad para la toma de decisiones terapéuticas, el comportamiento de la enfermedad, su respuesta al tratamiento y predice las necesidades quirúrgicas. Se ha tratado de clasificar a la EII con el fin de unificar criterios y uniformar grupos de pacientes para la comparación entre poblaciones y etnias así como ensayos clínicos de forma que los grupos sean

comparables. La clasificación más aceptable es la de Montreal (2005) cuya base central es integrar marcadores serológicos y genéticos asociados con la susceptibilidad y el fenotipo en la EII (Saro, 2008) (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de Montreal 2005 de la EII (Saro, 2008).

ENFERMEDAD DE CROHN			
A (Age) Edad al Diagnostico	L (Location) Localización		B (Behavior) Comportamiento
A1: Menos de 17 años	L1: Íleon terminal	L1+L4	B1: No estenosante-no penetrante B1+p
A2: De 17 a 40 años	L2: Colon	L2+L4	B2: Estenosante B2+p
A3: Más de 40 años	L3: Íleo-Colon	L3+L4	B3: Penetrante B3+p
	L4: Tracto gastrointestinal superior		p: Enfermedad fistulosa perianal y ulcera anal
COLITIS ULCERATIVA			
E (Extensión)		S (Gravedad)	
E1: Proctitis ulcerosa	Afección limitada al recto	S0: Colitis en remisión	Sin síntomas
E2: Colitis izquierda o colitis distal	Afección limitada al colon izquierdo	S1: Colitis leve	Menos de 4 deposiciones con sangre, sin fiebre
E3: Colitis extensa o pancolitis	Afección que se extiende más allá del ángulo esplénico	S2: Colitis moderada	Siempre con signos de afección leve
		S3: Colitis grave	6 o más deposiciones con sangre, fiebre
** Índice Truelove-Witts: Clasificación para medir gravedad clínica de CU, evaluando número de evacuaciones sangre en heces, temperatura, pulso, hemoglobina y velocidad de sedimentación. Clasificando en leve, moderada o grave.			

La EC es una enfermedad inflamatoria paraintestinal crónica, granulomatosa y transmural con una distribución discontinua que puede afectar a cualquier punto del tracto digestivo desde la boca hasta el ano. La CU, por su parte, es una enfermedad inflamatoria crónica no granulomatosa, tiene una distribución continua y se

caracteriza por presencia de ulceraciones en la mucosa y submucosa del intestino grueso, preferentemente en la zona distal del colon. Ambas patologías cursan con mala absorción, diarrea, sangrado rectal, fiebre, dolor abdominal y pérdida de peso. Tanto EC como CU pueden tener síntomas extraintestinales, que consisten fundamentalmente en artritis, dolor lumbar, aftas bucales, úlceras cutáneas y alteraciones hepáticas (Aguilera, 2004).

Aproximadamente el 50 % de los pacientes con EII presentan una enfermedad leve con una baja prevalencia de recaídas, hospitalizaciones y complicaciones (Aguilera, 2004). Otros pacientes tienen un curso más grave y pueden desarrollar complicaciones que requieren cirugía. Actualmente, su tratamiento se basa en el uso de moduladores de la inflamación, como mesalazina o ácido 5-aminosalicílico, esteroides e inmunosupresores, que son de elevado costo y en muchos casos de evolución clínica desfavorable (Sepúlveda y cols., 2008). Por estas razones, el estudio de los mecanismos que participan en su patogénesis es relevante y prioritario, y puede orientar hacia el desarrollo de mejores herramientas diagnósticas y de tratamiento.

2.2. Epidemiología de la EII

El estudio epidemiológico de la EII no se limita a la incidencia y prevalencia sino que trata de identificar los factores de riesgo asociados a su aparición o que modifican su historia natural. La incidencia de la EII varía enormemente dependiendo de la localización geográfica y grupos étnicos (Aguilera, 2004). Tradicionalmente se mencionaba un gradiente norte-sur con mayores tasas de incidencia en los países escandinavos, seguidos del Reino Unido y Norteamérica, mientras que la incidencia del centro y sur de Europa parecía ser menor; sin embargo un estudio europeo confirma una mayor incidencia en el norte de Europa pero muestra unas diferencias escasas, apuntando que la EII constituye un problema frecuente en países del sur de Europa. Así globalmente las tasas de incidencia de la CU en países occidentales

se estima en 5-18 pacientes por 100,000 habitantes; mientras que la incidencia para la EC se estima en 3.9-7 pacientes por 100,000 habitantes (Gassull y cols., 2007). Entre grupos étnicos, los Judíos Ashkenazis tienen el riesgo más alto de desarrollar EII. Hasta hace poco tiempo, la EII se consideraba rara en afroamericanos, hispanos y asiáticos, sin embargo, la incidencia y prevalencia no se han evaluado con exactitud (Aguilera, 2004).

Los datos de esta enfermedad en nuestro país son escasos, aunque se ha observado una tendencia a incrementar el número de pacientes con CU, 50 % más en comparación con el 2004, observando una tasa ajustada al número de ingresos de 2.3/1,000 pacientes hospitalizados con EII en el 2004 a 3.6/1,000 pacientes en el 2007. Se analizó la base de datos de registros del departamento de patología por considerar que no necesariamente se hospitalizan a todos los casos de EII, ya que algunos de ellos acuden de manera ambulatoria a la consulta externa, de esta manera se observó un total de 95 casos de CU en el mismo periodo del 2004 al 2007, además se encontró el reporte de otros 20 casos de pacientes que fueron calificados como CI (Sandoval y Padilla, 2008) (figura 7).

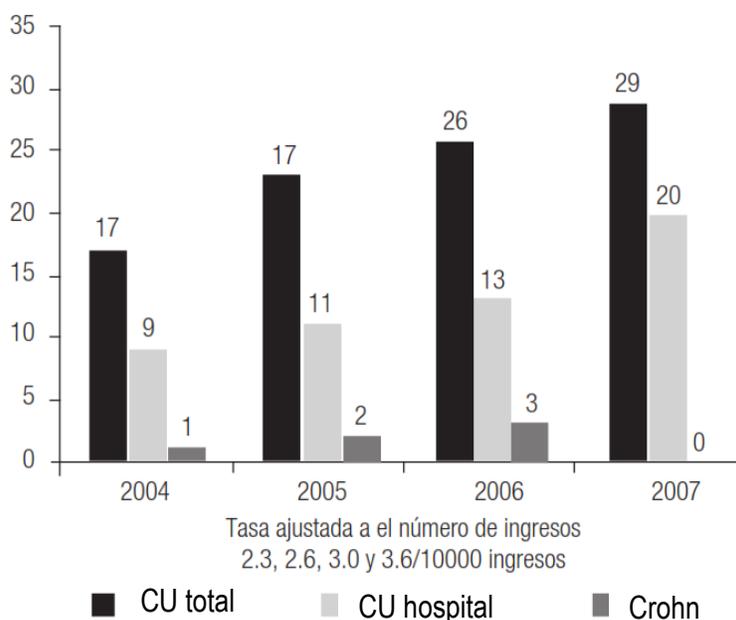


Figura 7. Frecuencia de la EII en México (Sandoval y Padilla, 2008).

En México, no existen datos concluyentes aunque la incidencia de CU se cree estar entre 0.2 % a 4.89 %, mientras que para la EC se calcula de 0.0008 % a 1.11 %. También se ha observado que dentro de un mismo país, la presencia de la enfermedad es más común en el norte de esos países que en el sur (Sandoval y Padilla, 2008). No existen otros datos publicados acerca de incidencia y/o prevalencia en el país.

2.3. Etiología

La etiología de la EII es desconocida, no obstante, los estudios epidemiológicos sugieren que en la patogenia de la EII están implicados factores ambientales, inmunológicos y una predisposición individual genéticamente determinada (figura 8).

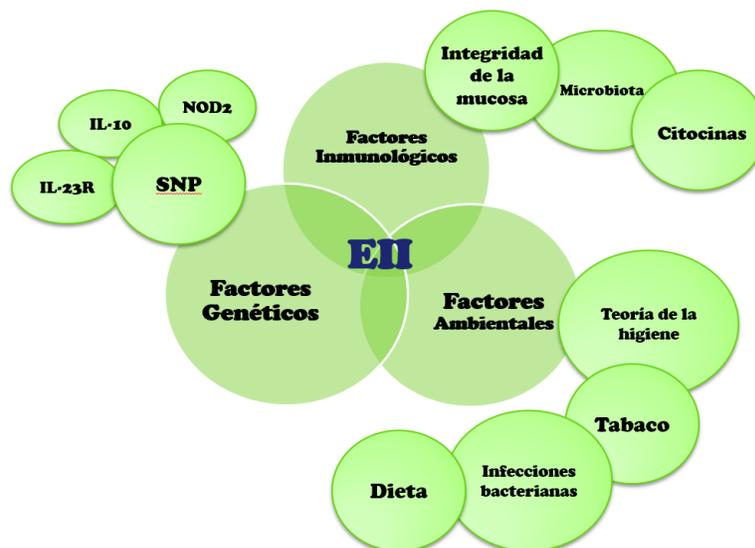


Figura 8. Factores involucrados en la patogénesis de la EII (adaptado de Sepulveda y cols., 2008).

2.3.1. Factores ambientales

Muchos han sido hasta ahora los factores ambientales relacionados con EII, algunos de estos se comportan de manera diferente en la CU y en la EC. Los agentes infecciosos, la dieta, el tabaco, la apendicetomía y la toma de anticonceptivos orales

son los factores que más frecuentemente se han asociado con la etiología de esta enfermedad (Gassull y cols., 2007).

En términos generales se puede señalar que la EII es más frecuente en los países del norte siendo más comunes en los Estados Unidos, Inglaterra, Noruega y Suecia y menos frecuentes en los países del sur de Europa, Sudáfrica, Australia y Latinoamérica. La incidencia varía desde 0.5 % en Japón, hasta 12.8 % en Noruega para CU, y de 0.08 % a 6 % para la EC en esos mismos países (Aguilera, 2004).

La variación en las tasas de incidencia puede ser explicada por diferencias en los diseños de los estudios, los datos sugieren que estas enfermedades aparecen más frecuentemente en residentes que habitan en zonas de baja incidencia y que emigran a zonas de alta incidencia.

La EII tiende a ser una enfermedad que afecta principalmente a adolescentes y adultos jóvenes, con un pico de incidencia entre los 15 y los 30 años de edad y se ha observado un segundo pico de frecuencia después de los 60 años (Aguilera, 2004). Hay ligeramente más mujeres afectadas que hombres con EC, pero la distribución es más uniforme en la CU. Se considera que la aparición de la enfermedad en niños y jóvenes se debe más a una predisposición genética y a la mala respuesta inmune ante los antígenos de la luz intestinal, mientras que en los adultos, la aparición de la enfermedad puede ser ocasionada por una exposición ambiental crónica (Aguilera, 2004).

Al parecer estas enfermedades son más comunes en las ciudades que en el campo, aunque esta tendencia puede deberse a que existen mayores recursos de detección en las áreas urbanas, sin poder descartarse exposiciones ambientales o diferencias en los estilos de vida. Varios datos epidemiológicos apoyan la implicación de factores ambientales en la etiopatogenia de la EII, como la mayor frecuencia en países industrializados, el aumento de la incidencia paralelo al aumento del desarrollo de un país, la frecuencia creciente al adoptar costumbres occidentales,

la aparición de la enfermedad 10 años después de haber emigrado de un país del tercer mundo a un país desarrollado, y la mayor frecuencia en áreas urbanas que rurales (Aguilera, 2004).

Parece ser que el factor ambiental más fuertemente relacionado con la EII es el tabaco; este lleva a un diagnóstico a temprana edad y a una mayor probabilidad de requerir terapia con inmunomoduladores o cirugía en las personas con EC. Por lo contrario, fumar lleva a un diagnóstico tardío de CU y generalmente el curso clínico es mejor. Los mecanismos del porqué el tabaco predispone a la frecuencia y al curso de las enfermedades, no se conoce. Los mecanismos propuestos incluyen alteraciones en la producción de moco intestinal, reducción en el flujo sanguíneo rectal y alteraciones en el sistema inmune y en la producción de citocinas (Gassull, 2004).

Numerosos estudios tratan de la relación entre la composición de la dieta, el tiempo de exposición a antígenos dietéticos y el posterior desarrollo de EII. Los alimentos más estudiados han sido el azúcar refinado, los ácidos grasos saturados y las fibras vegetales. Según varios trabajos, existe un mayor consumo de hidratos de carbono, en particular azúcar refinado, en pacientes con EC. Sin embargo, estos descubrimientos podían reflejar estilos de vida comunes en poblaciones con EII, más que una verdadera relación de causa-efecto que refleje un verdadero factor de riesgo. Otros autores sugieren efectos terapéuticos de los ácidos grasos omega 3 en EC y CU, lo cual hace pensar en un posible papel de los lípidos en la EII. Aunque, en este caso, tampoco se ha establecido un papel claro para las grasas de la dieta como causante real del desarrollo de EII. Tampoco proporcionan resultados concluyentes los estudios sobre el efecto de frutas y verduras sobre la EII, aunque algunos han sugerido una relación negativa entre el consumo de alimentos que contienen fibra y el desarrollo de la enfermedad. En general, los estudios epidemiológicos dietéticos no han sido muy útiles, principalmente porque se basan en métodos imprecisos como historias dietéticas, cuestionarios y recuerdos, que no

permiten la identificación de verdaderos antígenos dietéticos relevantes (Gassull y cols., 2007).

De los factores infecciosos, la exposición al *virus del sarampión*, fue la primera en señalarse como causal de la EC, cuando en Suecia en 1945 y 1954 se observó una epidemia de sarampión que coincidió con un aumento de casos de EC. Otros agentes infecciosos que se han señalado como asociados a la EII son *E. coli* y *Mycobacterium tuberculosis* (Gassull y cols., 2007).

Por otra parte, se ha investigado la exposición a agentes infecciosos en la infancia. Se postula que las infecciones, principalmente intestinales, podrían actuar como posibles efectos activadores de la EII en individuos genéticamente predispuestos, o bien, que las infecciones lleven a un Sistema Inmunológico no completamente desarrollado a generar respuestas cruzadas frente a autoantígenos (Gassull y cols., 2007).

2.3.2. Factores inmunológicos

Varias observaciones experimentales indican que una respuesta alterada de la mucosa es de importancia en la patogénesis de la EII; esta reacción alterada del sistema inmune de la mucosa está dirigida contra antígenos producidos por microorganismos que residen normalmente en el intestino. La mucosa del intestino con sus 400 m² de superficie representa el área más amplia de contacto con antígenos externos del organismo; esta estimulación antigénica masiva da lugar a una infiltración extensa de la mucosa intestinal por células mononucleadas que desarrollan un estado de inflamación. Esta infiltración inmunológica controlada está dirigida de forma precisa y es capaz de diferenciar entre antígenos inofensivos y antígenos patógenos. La mucosa del intestino ha desarrollado un sistema inmune altamente organizado que le permite evaluar constantemente los antígenos de la luz intestinal generando tolerancia o respuesta de protección ante antígenos potenciales (figura 10). En el caso de la EII la respuesta de tolerancia está dañada

generando una respuesta inmune hacia antígenos normalmente tolerados. Durante mucho tiempo esta respuesta anormal ha sido motivo de estudio para identificar el mecanismo por el cual no existe tolerancia intestinal y se han identificado varios procesos inmunológicos (Gassull y cols., 2007) (figura 9).

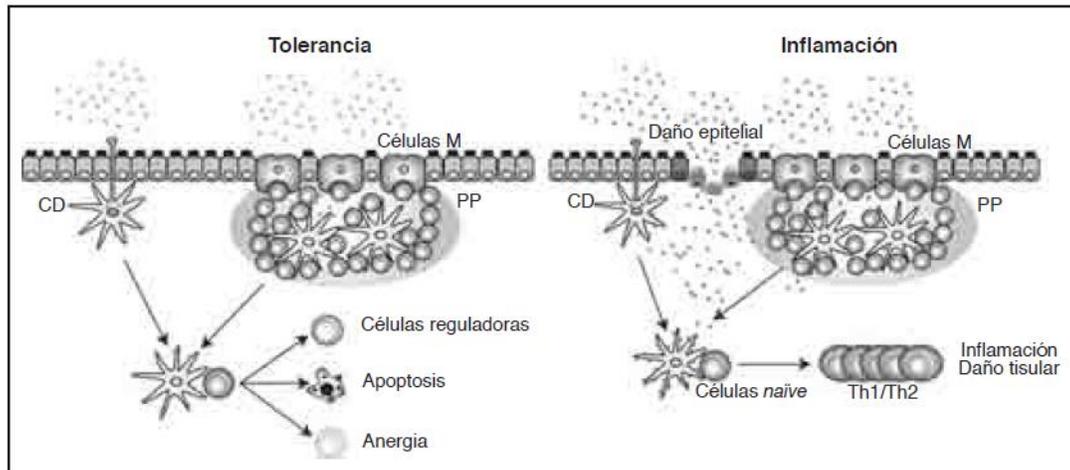


Figura 9. Respuesta inmune vs generación de tolerancia. En condiciones normales los antígenos son captados por las células dendríticas (CD) dispersas a lo largo del intestino. Los antígenos presentados por las CD en estas condiciones no activan el sistema inmune a través de apoptosis y anergia de los clones de células T que reaccionan contra antígenos inofensivos del intestino. Cuando los patógenos entran en la barrera intestinal, el sistema inmune de la mucosa se activa dando lugar al inicio de la respuesta inmune correspondiente (perfil Th1/Th2) (Gassull y cols., 2007).

a) Integridad de la Barrera Intestinal

Se ha estudiado la barrera epitelial como un factor importante que puede influir en el inicio o mantenimiento de un proceso inflamatorio. La luz intestinal contiene gran cantidad de microorganismos, la mayoría implicados en el proceso de absorción de nutrientes, sin embargo, los antígenos potencialmente capaces de provocar una respuesta inmune se mantienen aislados del sistema inmunológico a través de una barrera eficaz que impide que estos entren en contacto con las células inmunes. Entre los elementos que constituyen esta barrera tenemos la capa epitelial, el moco superficial producido por células especializadas intercaladas entre las células epiteliales y la secreción de factores protectores. Debido a un defecto en la barrera intestinal o a una respuesta epitelial a la microbiota, llevan a un aumento en la

permeabilidad intestinal y por tanto a un exceso de presentación antigénica (Podolsky, 2002).

Se ha observado en modelos murinos a los que se les administró Sulfato de Dextrano Sódico (DSS), que se induce un efecto tóxico sobre las células epiteliales alterando la permeabilidad de la barrera epitelial a los antígenos de la luz intestinal, esto activa la respuesta inmune innata y si se mantiene la administración de DSS, la respuesta adaptativa actúa y se observa una inflamación crónica de la mucosa intestinal (Gassull y cols., 2007).

Recientemente se ha demostrado la asociación de genes implicados en el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial y la susceptibilidad a la EII. Entre estos se ha estudiado el gen que codifica un transportador de cationes orgánicos (OCTN1-2) cuya alteración daña su función (Khor y cols., 2011).

b) Inmunidad Innata

La inmunidad innata se basa en una serie de receptores (Receptores de Reconocimiento de Patrones; PRR) que reconocen estructuras altamente conservadas que se encuentran en los microorganismos (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos; PAMPs). Los PAMPs son reconocidos por PRRs expresados en muchos tipos celulares incluyendo células epiteliales, macrófagos, CD y células B. Su activación promueve la fagocitosis, la liberación de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias (IL-8, IL-1 β y TNF α); la segunda consecuencia es la activación de la actividad de los PRRs sobre la superficie de las CD dando lugar a la presentación de antígenos a las células T. En un entorno particular de citocinas las CD tienen la capacidad de dirigir una respuesta inmune a través de la inducción de células efectoras con perfiles Th1, Th2 o Th17 o hacia la inducción de tolerancia mediante células T reguladoras (Treg). Se han descrito familias de PRR, en el intestino los receptores tipo Toll (TLR) y las proteínas NOD o NLR (dominios de oligomerización de nucleótidos). El primer grupo está representado por proteínas transmembranales que se expresan en diferentes tipos de células, mientras que las

proteínas NOD se localizan en el citoplasma y reconocen productos bacterianos que entran en la célula. Ha surgido gran interés en las proteínas NOD2, dado que mutaciones en este gen se han asociado a un grupo de individuos con aumento del riesgo de desarrollar EC (Siegmund y Zeitz, 2011).

c) Inmunidad Adaptativa

Muchos estudios realizados aislando las células mononucleares de la lámina propia de pacientes con EC, han mostrado niveles altos de citocinas Th1 caracterizando el proceso inflamatorio crónico que se desarrolla en el intestino: $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL-12, IL-8, IL-21 e IL-23. El papel que juega cada molécula en la respuesta inmune es importante ya que en estudios recientes se ha encontrado polimorfismos que regulan la expresión del gen y se han asociado a la presencia de la EC. Actualmente los tratamientos están basados en contrarrestar la respuesta inflamatoria, tratamientos basados en el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra $TNF\alpha$ (Siegmund y Zeitz, 2011).

d) Células Presentadoras de Antígeno

Como se ha mencionado, la mucosa intestinal forma un compartimiento inmunológico único en el cual los estímulos pro inflamatorios que proceden del reconocimiento de la microbiota intestinal, coexisten en equilibrio dinámico con una respuesta inmune inflamatoria controlada (Gassull y cols., 2007).

Las células presentadoras de antígeno (APC) juegan un papel crucial en este proceso, se piensa que son responsables de la respuesta inmune adaptativa generada por los estímulos antigénicos específicos. Muchas citocinas derivadas de las APC han demostrado tener un papel en el desarrollo de una respuesta inmune específica. La IL-6, una citocina producida ampliamente por las CD activadas, se ha visto previamente que bloquea la actividad de las células Treg, siendo responsable de uno de los posibles mecanismos de los cuales las CD pueden bloquear la tolerancia, favoreciendo una respuesta inmune activa hacia un antígeno específico (Khor y cols., 2011).

Se ha comprobado que la IL-6 promueve junto con el TGF- β el desarrollo de una nueva clase de células T llamadas Th17 debido a la expresión de la IL-17. Los niveles de IL-17 se encuentran elevados en EC y en muchos modelos experimentales de colitis. Cabe destacar que mientras el TGF- β de forma aislada estimula la diferenciación de células T naive a células Treg, la coestimulación con IL-6 da lugar a la generación de una respuesta Th17 (Naser y cols., 2012).

Otra citocina clave para el desarrollo de inflamación es la IL-12, esta citocina también es producida por las CD activadas y está formada por un heterodímero constituido por la subunidad p40 y p35. Esta interleucina está relacionada con la IL-23, otra citocina derivada de las APC ya que comparte con la IL-12 la subunidad p40 y forma un heterodímero de p40 y p19. La IL-23 se ha implicado con la expansión de las células Th17, ya que su receptor se encuentra en las células T CD4+ e induce la producción de IL-17 (Naser y cols., 2012).

e) Células Treg

Las células Treg tienen un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune. En el caso de la EII, se observa la pérdida de la homeostasis inmunológica, que puede ser debida al menos en parte a una pérdida de tolerancia hacia la microbiota intestinal (Khor y cols., 2011).

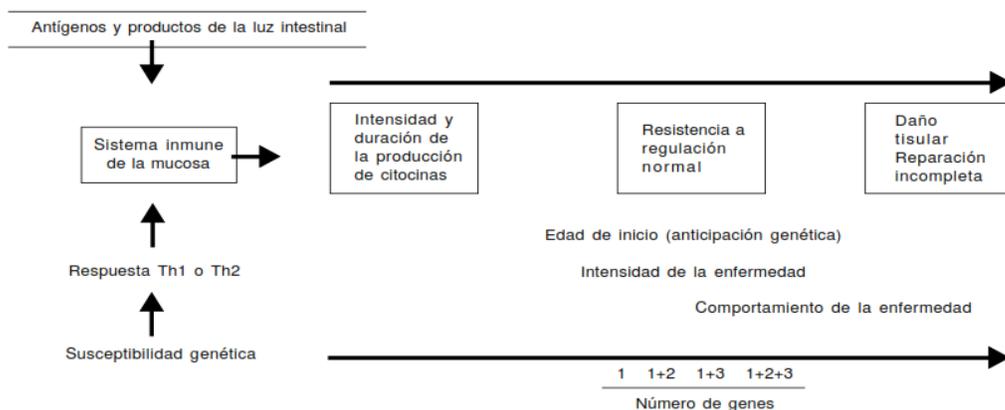


Figura 10. Patogénesis de la EII. El tipo de respuesta inmune del organismo depende de varios genes y la activación de ellos condiciona el inicio, la intensidad y el comportamiento de la enfermedad (Gassull y cols., 2007).

2.3.3. Factores genéticos

La EII tiene un importante componente genético, la metodología actual ha permitido encontrar asociaciones entre diversos genes y la susceptibilidad a padecer esta enfermedad, fenotipo de la misma e incluso la respuesta a determinados tratamientos.

Se han identificado un número de genes relacionados con la susceptibilidad a estas enfermedades que ayudaran de forma indudable a desenmarañar la fisiopatología de la EII (Murphy y cols., 2012).

Los primeros datos de las bases genéticas de la EII procedieron de estudios a partir de gemelos, estudios familiares, de diferentes etnias y de la asociación de la enfermedad con determinados síndromes genéticos. En la EC, los gemelos monocigóticos tienen una mayor concordancia de enfermedad (37 %) que los gemelos dicigóticos (7 %), indicando que los factores genéticos desempeñan un papel importante. Para el caso de la CU los porcentajes de concordancia son menores (10 % contra 3 % para gemelos monocigóticos y dicigóticos, respectivamente), sugiriendo un menor impacto genético en comparación con la EC. (Peeters y cols., 1996). Los estudios familiares han mostrado que entre un 5.5 % y un 22.5 % de los pacientes con EII tienen algún otro familiar diagnosticado con EII. El mayor riesgo ocurre en niños donde ambos progenitores tienen EII (>30 % a la edad de 28 años) (Orholm y cols., 1991).

El análisis de segregación no ha apoyado el modelo genético simple de herencia (modelo mendeliano) en la EII; más bien es catalogada como una enfermedad poligénica compleja: varios genes se encuentran implicados junto con los factores ambientales e inmunológicos. En su conjunto todos ellos contribuyen a interaccionar y entender el comportamiento de la enfermedad (Yamamoto, 2001).

Uno de los principales factores genéticos involucrados en la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas es la presencia de polimorfismos en los genes de

respuesta inmune, entre los cuales encontramos los genes de IL-10, IL-23R, IL-1 β , HLA, TLR4, TNF- α , NOD2 entre otros que se han postulado como posibles genes candidatos de susceptibilidad a la EII (Gassull y cols., 2007).

Se ha demostrado que las alteraciones en dichos genes, alteran la respuesta inmune protectora que se genera luego de la entrada del agente infeccioso al organismo disminuyendo o incrementando la producción de citocinas relacionadas con la protección a la infección o alterando la producción de citocinas reguladoras de la respuesta inmune producidas con el fin de evitar la inmunopatología. La regulación de la respuesta inmune es determinante en la evolución hacia la enfermedad (Khor y cols., 2011).

Hay dos sistemas principales para identificar genes en enfermedades multifactoriales: la aproximación basada en la clonación posicional usando estudios de ligamento y la aproximación de genes candidatos usando estudios de casos y controles (estudios de asociación).

- **Clonación Posicional**

Los análisis de ligamento estudian la co-segregación de la enfermedad a estudio con un marcador dentro de las familias afectadas. Dado que en las enfermedades complejas no se dispone de información sobre el tipo de herencia (dominante o recesiva) o los porcentajes de penetrancia, se usan aproximaciones no paramétricas, que no requieren la asunción de estos parámetros. Los resultados se expresan principalmente como escalas de ligamento no paramétrico o como escalas LOD, que representan un logaritmo de *odds*, reflejando que las *odds* están a favor de la presencia del ligamento o de la posibilidad de que el ligamento ocurra. La mayor desventaja de esta técnica es la falta de potencial estadístico dado el gran número de regiones cromosómicas investigadas (Bores y cols., 2007).

En la EII se han realizado varios escaneos del genoma objetivando un número de regiones generadoras de susceptibilidad en los cromosomas 1, 3, 4, 5, 7, 10, 12,

14, 16, 19, de acuerdo con las regiones de los cromosomas 16, 12, 6, 14 y 5 se han denominado EII1 a EII9, respectivamente (Bores y cols., 2007) (figura 11).

REGION	LOCALIZACIÓN	GENES INVOLUCRADOS
EII1	Cromosoma 16	NOD2, IL-4R; CD11B
EII2	Cromosoma 12	VDR (Receptor de Vitamina D), STAT6, IFN γ
EII3	Cromosoma 6	Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase I, II y III
EII4	Cromosoma 14	TCR (Receptor de Linfocitos T)
EII5	Cromosoma 5	OCTN, IL-6, CD14
EII6	Cromosoma 19	Tromboxano A2, ICAM-1(Moléculas de adhesión intracelular)
EII7	Cromosoma 1	TGF β , Receptores de TNF α
EII8	Cromosoma 16	En investigación
EII9	Cromosoma 9	CCT-5 (Receptor de quimiocina 5), CCR9 (Receptor de quimiocina 9), IL-12

Figura 11. Clasificación de la EII según la susceptibilidad genética (adaptado de Bores y cols., 2007).

- **Estudios de Asociación**

En los estudios de genes candidatos, se comparan las frecuencias alélicas entre pacientes portadores de la enfermedad y controles ajustados, debiendo las diferencias encontradas apuntar hacia la implicación de este gen particular en la patogenia de la enfermedad objeto de la investigación. Esta aproximación requiere de una hipótesis previa de cómo el gen candidato podría estar implicado en la patogenia de la enfermedad (Gassull y cols., 2007).

Los estudios de asociación de genes candidatos en la EII se han centrado de forma importante en genes incluidos dentro de las vías inflamatorias, tales como citocinas o receptores de citocinas. La región HLA de clase II es la región más estudiada, esta molécula presenta el antígeno parcialmente digerido al receptor de las células T y juegan un papel central en la respuesta inmune. Tras descubrir el gen NOD2/CARD15 como el gen principal para conferir susceptibilidad para la EC, los estudios genéticos se han centrado en otros genes relacionados con la inmunidad innata (Gassull y cols., 2007). En el 2004, se describió una asociación entre el

polimorfismo TLR4 (Asp299Gly) y la EII. Este polimorfismo se asocia con una señalización alterada tras exposición a lipopolisacáridos (LPS) y un aumento en la susceptibilidad a infecciones por gram negativos. En el estudio, realizado por Franchimont y cols., la frecuencia alélica del polimorfismo TLR4 Asp299Gly fue significativamente superior en pacientes con EC (11 % contra 5 %; odds ratio: 2.31; $p=0.004$) y con CU (10 % contra 5 %; OR: 2.05; $p=0.027$) en comparación con la población control (Tsianos y cols., 2011).

La asociación de la enfermedad con un polimorfismo particular puede no implicar necesariamente que este gen sea su causa. La asociación puede ser debida al hecho de que exista un DL en el gen en los alrededores de su localización (Checa, 2007).

- **Microarreglos de DNA**

Una estrategia relativamente nueva, consiste en los escaneos de genoma total o parcial y las aproximaciones de genes candidatos, que son los análisis de los patrones de expresión génica a través de la tecnología basada en los microarreglos. Las diferencias en los patrones de expresión génica entre pacientes con EII y controles, o entre pacientes con EC y CU, pueden explicar determinadas vías genéticas que son diferentes en EC y CU. Se pueden estudiar los perfiles de expresión génica entre el tejido inflamado y el no inflamado para indicar que genes se sobreexpresan durante la inflamación (Gassull y cols., 2007).

- **Farmacogenética**

Hay genes que interfieren con las vías metabólicas de fármacos y que pueden influir en la respuesta clínica y en la toxicidad relacionada con ellas. Con el aumento en el conocimiento de las variaciones dentro de la secuencia del genoma, se intenta optimizar el tratamiento de los pacientes en función al genotipo (Gassull y cols., 2007). La sulfasalazina (SASP) y los 5-aminosalicilatos (5-ASA) son fármacos de primera línea en el tratamiento de CU. La toxicidad producida por SASP se determina por polimorfismos genéticos en genes que repercuten en una acetilación

lenta lo que impide su biotransformación produciendo efectos adversos como náuseas, vómito, cefalea, anemia hemolítica entre otros (Dubinsky y cols., 2000).

El incremento en la comprensión de las vías implicadas en la inflamación intestinal ha llevado al desarrollo de tratamientos biológicos dirigidos hacia estos mediadores inflamatorios. Uno de los primeros agentes biológicos y también de los más extensamente usados actualmente son los anticuerpos monoclonales quiméricos dirigidos contra el factor de necrosis tumoral (TNF α) (infliximab, Remicade®). Es el tratamiento de elección para la inducción y el mantenimiento de la remisión en la EC y CU. Sin embargo se ha observado una falta de respuesta en un 25 % pero esta falta de respuesta es constante en un paciente dado sugiriendo que existen factores genéticos responsables. Se han examinado sin éxito varios polimorfismos en los genes de TNF- α así como en sus receptores pero tras el descubrimiento de NOD2/CARD15, se postuló que las mutaciones en este gen podrían predecir los resultados evolutivos del tratamiento basándose en los cambios en la activación de NF- κ B y en consecuencia de la producción de TNF- α pero hasta ahora no se ha logrado hacer una asociación (Mascheretti y cols., 2002).

Un posible punto de partida sería continuar con la búsqueda de genes asociados a otras enfermedades autoinmunes y cuya función sugiera un posible papel en EC. Genes interesantes en la susceptibilidad en la EC serían NKX2-3 (NK2 transcription factor related, locus 3) factor de transcripción que en ratones está implicado en desarrollo intestinal, ATG16L1 (autophagy-related 16-like 1) e IRGM (immunity-related GTPase family M) genes que codifican proteínas implicadas en autofagia e IL-23R (interleukin 23 receptor) gen que codifica la subunidad específica del receptor de la IL-23; esta citocina parece intervenir en la expansión y/o estabilización del fenotipo Th17 actuando sobre los linfocitos previamente diferenciados. También el estudio del gen CLEC16A (KIAA0350) podría resultar interesante por su asociación a DMT1 y por estar localizado en el mismo bloque de DL que el gen CIITA anteriormente mencionado (Khor y cols., 2011).

Por otro lado, una estrategia que actualmente se está llevando a cabo para la búsqueda de nuevos factores genéticos de susceptibilidad, es la colaboración internacional para reunir un mayor número de muestra e intentar confirmar o refutar señales sugerentes de asociación por estudios de barrido genético previo (GWAS) (Gassull y cols., 2007). Además durante la última década ha aumentado enormemente el interés por la búsqueda de genes asociados con la EII por lo que se han utilizado varios métodos para detectar influencias genéticas, incluyendo el análisis de genes candidatos que codifican proteínas implicadas en la inmunoregulación, como HLA (Yamamoto, 2007), TNF- α (Sanchez y cols., 2009), TLR4 (Tsianos y cols., 2011), IL10 (Fonseca y cols., 2011), IL-10R (Thompson, 2011), IL-23R (Glas y cols., 2007), NOD2 (Kabi y cols., 2012), ATG16L (Kaser y cols., 2010) entre otros. Sin embargo, la asociación de estos genes con la presentación clínica de la enfermedad se ve afectada por las características étnicas de cada población de estudio (Bores y cols., 2007).

2.4. Equilibrio de Hardy-Weinberg

Aunado a la asociación de genes, es indispensable que este fenómeno cumpla con el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), que es la distribución polimórfica cuya evaluación es una condición necesaria previa a cualquier tipo de estudio genético (Soriguer y Morcillo, 2007).

En los últimos años han aumentado los estudios de asociación entre las variantes de secuencias de DNA y determinados fenotipos o enfermedades. En estos estudios la presencia de una asociación estadística independiente del azar entre el genotipo y el fenotipo podría implicar algún tipo de relación biológica, directa o indirecta, entre ambos o de riesgo de padecer la enfermedad en función de determinado genotipo. Sin embargo, para que una asociación pueda ser asumida como biológicamente válida es preciso antes estar seguro de que no se han producido sesgos sistemáticos o aleatorios en el diseño y en la elaboración del trabajo. Una manera

rápida de valorar la situación de la distribución de frecuencias de los genotipos estudiados es mediante el ajuste al HWE (Soriguer y Morcillo, 2007).

En la reproducción sexual hay una relación entre el genotipo de una generación y el patrón de apareamiento de los padres de esta generación. Si el apareamiento es al azar entonces la frecuencia genotípica de los descendientes está determinada por la frecuencia alélica. La frecuencia alélica es la variable cuantitativa más importante desde el punto de vista genético de cualquier población (Soriguer y Morcillo, 2007).

Si no hay diferencias significativas entre las frecuencias observadas y las esperadas se dice que la población está en HWE. Si, por el contrario, hay un incumplimiento de la distribución teórica según Hardy-Weinberg, la población no estaría en equilibrio.

El HWE implica que:

- El tamaño de la población es infinito (suficientemente grande).
- El apareamiento es al azar.
- Hay frecuencias alélicas similares.
- No hay mutación, migración ni selección.

Tradicionalmente, la desviación del equilibrio se ha considerado como una indicación de que los alelos no segregan de forma independiente, el apareamiento no es al azar, o que los alelos reflejan una mutación reciente que aún no ha alcanzado el equilibrio. Una desviación de las condiciones de HWE puede significar que algunas de aquellas condiciones no se cumplen. En los estudios de asociación de casos y controles es de gran importancia que el grupo control esté en HWE. Sin embargo, una desviación del HWE en el grupo de los casos podría ser indicio de la existencia de una asociación real entre el genotipo y la enfermedad estudiada (Soriguer y Morcillo, 2007).

3. Justificación

La identificación de los factores etiológicos (inmunológicos y genéticos) han permitido una mejor estratificación de la EII, promoviendo la mejora en el tratamiento de los pacientes, por lo que en este trabajo, se determinará la frecuencia de los SNPs presentes en los genes IL-23R (rs11209026) e IL-10 (rs3024505 y rs1800896) en población mexicana para proponerlos como posible modelo predictivo de progresión clínica de la EII y de mejora en el esquema de tratamiento en los pacientes.

4. Hipótesis

La frecuencia de los SNPs rs11209026, rs3024505 y rs1800896 en población mexicana cumple con el HWE, lo que los convierte en candidatos para generar un modelo predictivo de desarrollo y progresión de la EII.

5. Objetivos

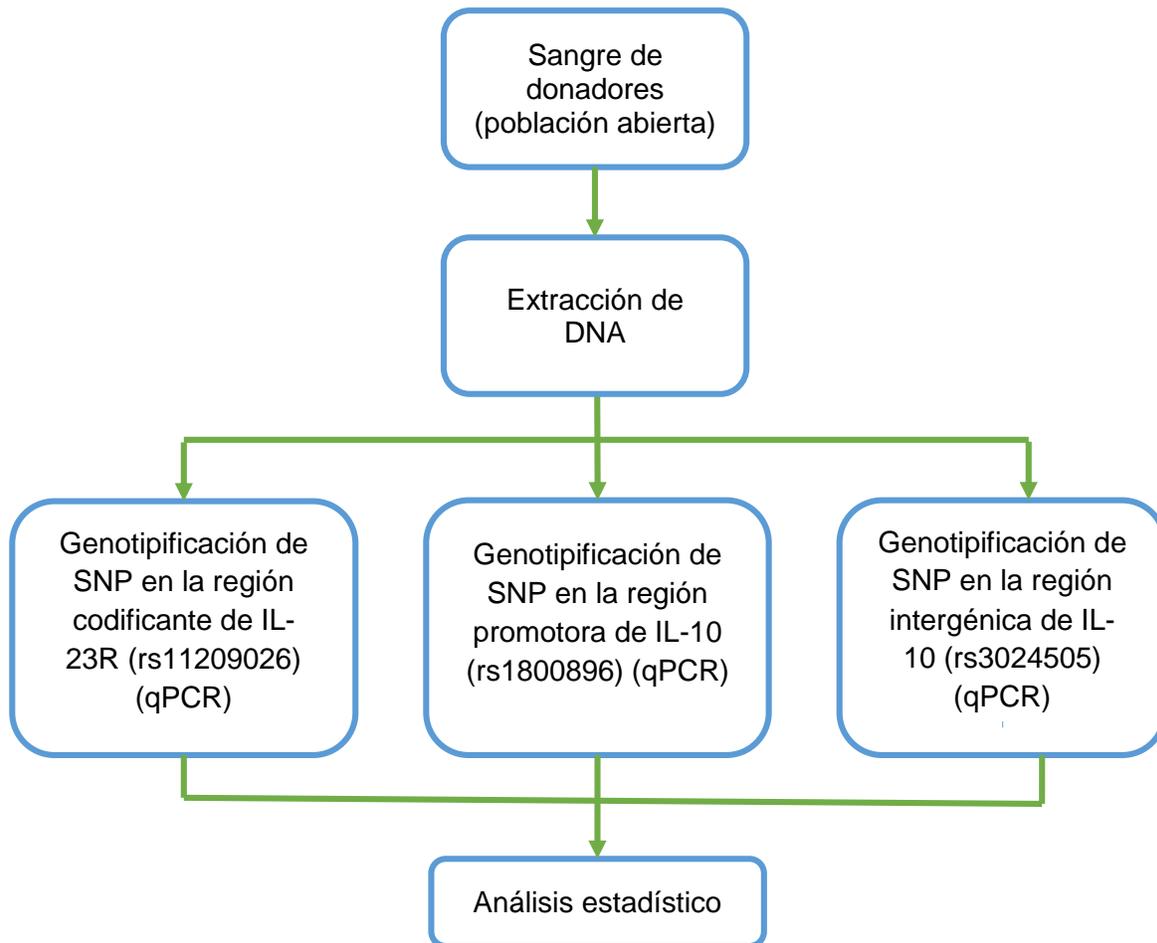
5.1. Objetivo general

Determinar la frecuencia de los SNPs presentes en los genes de IL23R (rs11209026) e IL-10 (rs3024505 y rs1800896) en población mexicana, para el desarrollo e implementación de un modelo predictivo de desarrollo de la EII en nuestro país.

5.2. Objetivos Particulares

- Seleccionar muestras de sangre completa de donadores del Distrito Federal y Área Metropolitana.
- Determinar los SNPs rs11209026, rs1800896 y rs3024505, en cada muestra, mediante PCR en tiempo real (qPCR).
- Determinar la frecuencia de los polimorfismos analizados en cada población.

6. Plan General de Trabajo



7. Metodología

Determinación de los tamaños de muestra.

De acuerdo a lo reportado por el INEGI, la población del Área Metropolitana está conformada por: el Distrito Federal, con una población de 8,851,080 habitantes; el Estado de México, con una población de 11,168,301 habitantes y Tizayuca, Hidalgo; con una población de 100,562 habitantes dando un total de 20,119,943 habitantes por lo que se requiere del análisis de 400 controles para alcanzar un nivel de confianza del 95 % y un margen de error del 5 %. En este estudio se obtuvieron muestras del periodo 2013 que correspondieron a 400 donadores sanos (figura 12).

Grupo de estudio.

Se seleccionaron individuos que fueron aceptados como donadores de población abierta. Así mismo, se seleccionaron 36 pacientes con diagnóstico clínico de EII. Estos individuos son residentes del Distrito Federal y Área Metropolitana y son derechohabientes de los servicios de salud otorgados por el área de gastroenterología del Hospital Regional “Lic. Adolfo López Mateos”, del ISSSTE. Se obtuvo sangre con anticoagulante (EDTA), la cual fue inmediatamente congelada a -70 °C para su preservación.

Genotipificación de los SNPs IL-23R (rs11209026) e IL-10 (rs1800896 y rs3024505).

El DNA de muestras de sangre total fue aislado mediante el empleo del equipo comercial *QIAamp® DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Valencia, USA). El DNA purificado fue utilizado como molde para la amplificación específica de los SNP rs11209026 localizado en la región codificante del gen de IL-23R, así como también para los SNP rs1800896 y rs3024505 localizados en la región promotora y región intergénica respectivamente, del gen de IL-10. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador de tiempo real Light Cycler 480 II (Roche) utilizando el método TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems). Para lo cual se utilizaron las siguientes sondas comerciales (tabla 2):

Tabla 2. Secuencias de sondas comerciales para los SNP de IL-23R e IL-10

SNP	SECUENCIA	Assay ID*
IL-23R (rs11209026)	ATTGGGATATTTAACAGATCATTCC[<u>A/G</u>]AACTGGGTAGGTTTTTGCAGAATTT	C__1272298_10
IL-10 (rs1800896)	TCCTCTTACCTATCCCTACTTCCCC[<u>T/C</u>]TCCCAAAGAAGCCTTAGTAGTGTTG	C__1747360_10
IL-10 (rs3024505)	GGGCTGCCAGGCAGAGCGTGAGGG[<u>A/G</u>]GACTAGTGTTTACTCAGCTCATTTT	C__15983681_20

La reacción de PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: prePCR 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de amplificación a 92 °C por 15 seg y 60 °C por 10 min, el análisis de los SNP se llevó a cabo utilizando el TaqMan Genotyper Software.

Análisis Estadístico.

Las distribuciones genotípicas para cada SNP se encuentran representadas en números (porcentajes). Se realizó una prueba de los SNPs para determinar si seguían las proporciones del equilibrio de Hardy-Weinberg, donde se comparan las frecuencias observadas y las esperadas de homocigotos y heterocigotos. Estos análisis se realizaron con la ayuda del programa GraphPad Prism 5.

8. Resultados

Determinación de frecuencias genotípicas en la población abierta.

Tabla 3. Frecuencias genotípicas de los SNPs rs11209086, rs1800896 y rs3024505 en población abierta del Distrito Federal y Área Metropolitana.

POBLACIÓN ABIERTA									
GEN	SNP	POBL. TOT.	GENOTIPO	n	FRECUENCIA GENOTÍPICA (%)	ALELO	n	FRECUENCIA ALÉLICA (%)	HWE (p)
IL-23R	rs11209026	400	GG	274	68.500	G	664	83.000	0.580
			AG	116	29.000				
			AA	10	2.500	A	136	17.000	
IL-10	rs1800896	400	AA	237	59.250	A	612	76.500	0.418
			AG	138	34.500				
			GG	25	6.250	G	188	23.500	
IL-10	rs3024505	292	CC	277	94.863	C	569	97.432	0.652
			CT	15	5.137				
			TT	0	0.000	T	15	2.568	

$P < 0.05$ no hay HWE
 $P > 0.05$ si hay HWE
No es válido si hay <5 individuos en cualquier genotipo.

Para el SNP presente en la región codificante del gen IL-23R (rs11209026) se analizaron 400 muestras (población abierta) (figura 13).

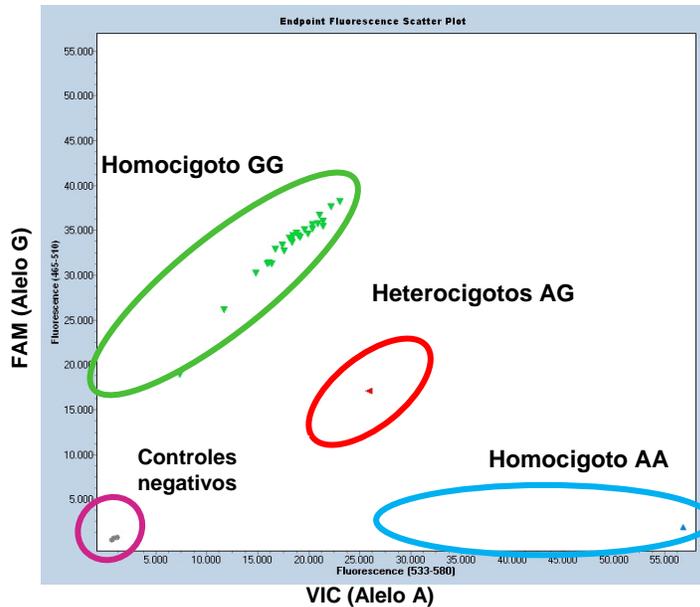


Figura 13. Genotipificación del SNP rs11209026. Diagrama de puntos representativo de 30 muestras obtenido al realizar la reacción de qPCR. Se observa que la mayoría de las muestras son homocigotas para el alelo G que está marcado con el fluorocromo FAM, una muestra presenta el genotipo heterocigoto por lo que dan señal en los dos canales (fluorocromo FAM para el alelo G y VIC para el alelo A) y una muestra homocigota para el alelo A que está marcado con el fluorocromo VIC. Se indican los controles negativos que requiere la reacción.

Se obtuvo la frecuencia genotípica del SNP rs11209026 [A/G] que está presente en el gen de IL-23R, en donde se observó que el 68.5 % de los individuos de la población analizada fueron homocigotos para el alelo G, el 29 % heterocigotos AG y el 2.5 % homocigoto para el alelo A (figura 14).

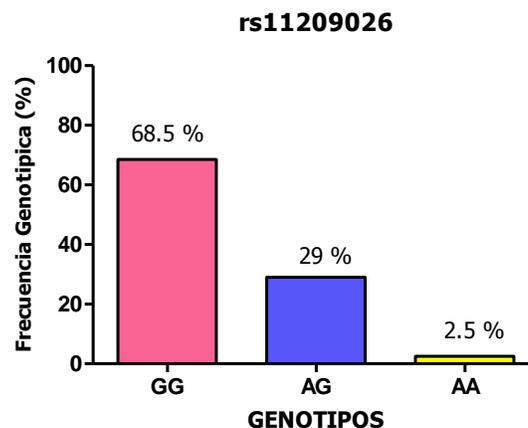


Figura 14. Frecuencia genotípica del SNP rs11209026 [A/G] presente en el gen de IL-23R. Mediante qPCR se obtuvieron las frecuencias genotípicas de la población abierta (n=400).

La frecuencia alélica del SNP rs11209026 [A/G] mostró la presencia del alelo G en el 83 % de los individuos mientras que para el alelo A fue del 17 % en población abierta (Figura 15).

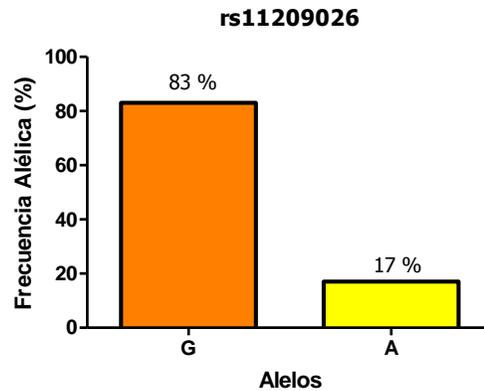


Figura 15. Frecuencia alélica en población abierta del SNP rs11209026 (n=400).

Para el SNP presente en la región promotora del gen IL-10 (rs1800896), también se analizaron 400 muestras (población abierta) (figura 16).

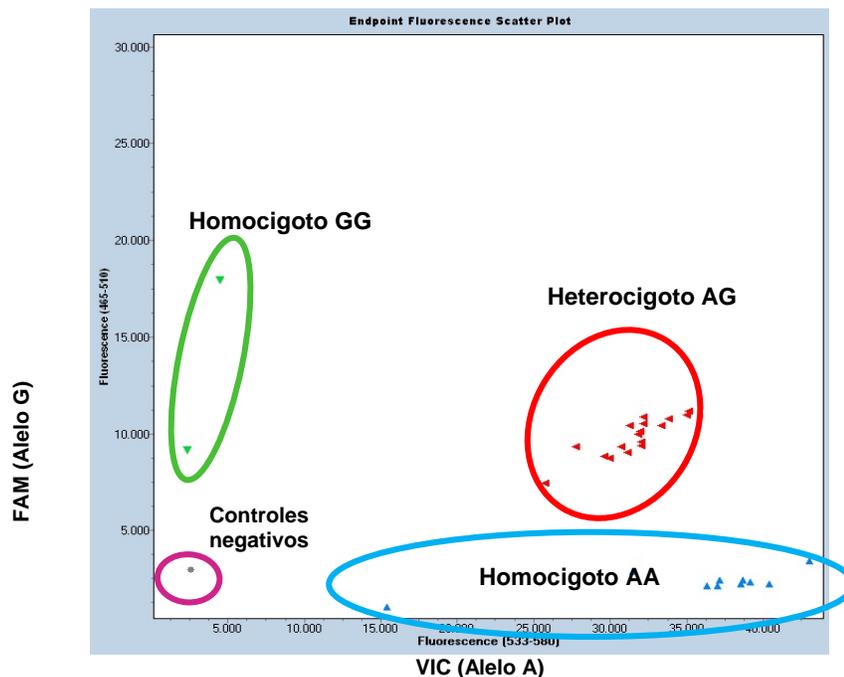


Figura 16. Genotipificación del SNP rs1800896. Diagrama de puntos representativo de 30 muestras obtenido al realizar la reacción de qPCR. Se observa que dos muestras son homocigotas para el alelo G que está marcado con el fluorocromo FAM, 18 muestras presentan el genotipo heterocigoto por lo que dan señal en los dos canales (fluorocromo FAM para el alelo G y VIC para el alelo A) y 10 muestras homocigotas para el alelo A que está marcado con el fluorocromo VIC. Se indican los controles negativos que requiere la reacción.

Se obtuvo la frecuencia genotípica del SNP rs1800896 [A/G] presente en el gen de IL-10, en donde se observó que el 59.25 % de los individuos de la población analizada fueron homocigotos para el alelo A, el 34.5 % heterocigotos AG y el 6.25 % homocigotos para el alelo G (figura 17).

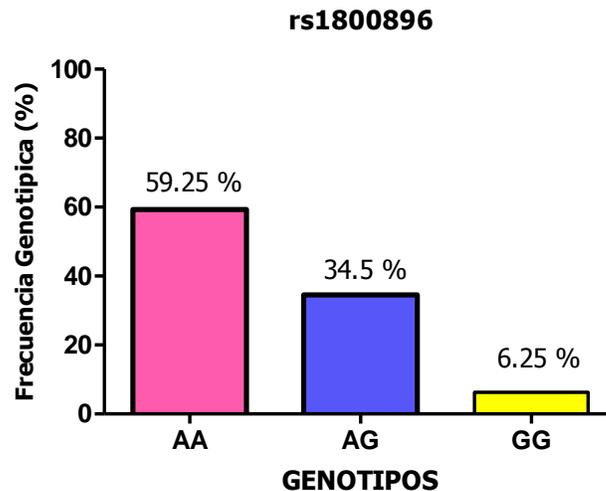


Figura 17. Frecuencia genotípica del SNP rs1800896 [A/G] presente en el gen de IL-10. Mediante qPCR se obtuvieron las frecuencias genotípicas de la población analizada (n=400).

La frecuencia alélica del SNP rs1800896 [A/G] mostró la presencia del alelo A en el 76.5 % de los individuos mientras que para el alelo G fue del 23.5 % en población abierta (figura 18).

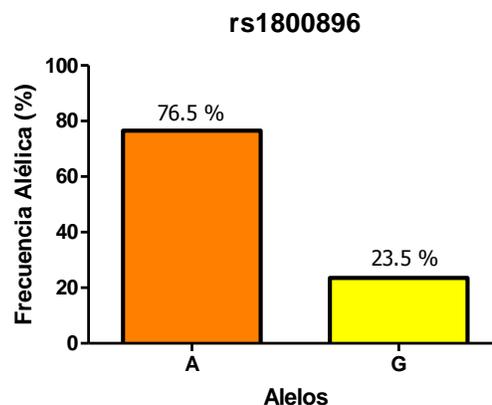


Figura 18. Frecuencia alélica en población abierta del SNP rs1800896 (n=400).

Así mismo, para el SNP presente en la región intergénica del gen IL-10 (rs3024505) se analizaron 292 muestras de donadores residentes y originarios del Distrito Federal y Área Metropolitana (figura 19).

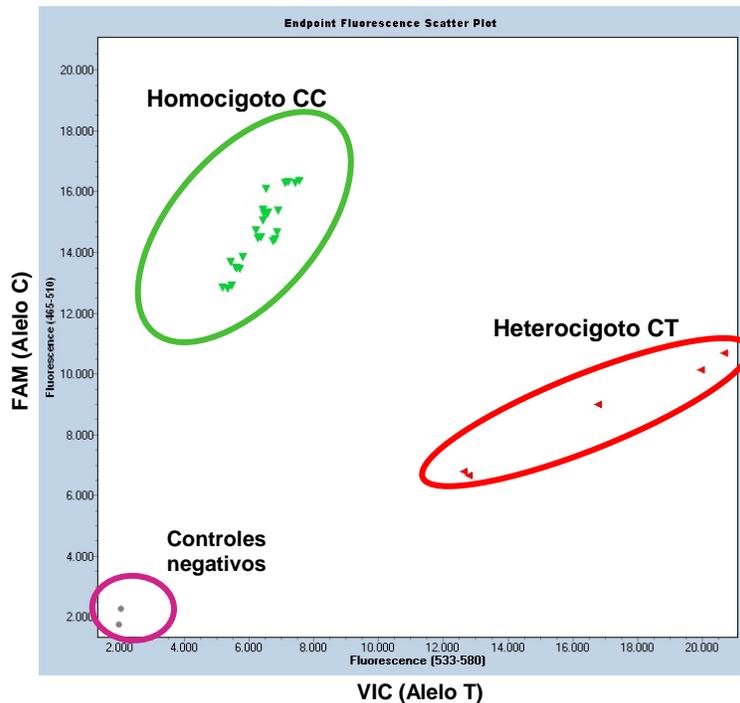


Figura 19. Genotipificación del SNP rs3024505. Diagrama de puntos representativo de 30 muestras obtenido al realizar la reacción de qPCR. Se observan 25 muestras homocigotas para el alelo C que está marcado con el fluorocromo FAM y 5 muestras presentan el genotipo heterocigoto por lo que dan señal en los dos canales (fluorocromo FAM para el alelo C y VIC para el alelo T). Se indican los controles negativos que requiere la reacción.

Se obtuvo la frecuencia genotípica del SNP rs3024505 [T/C] presente en el gen de IL-10, en donde se observó que el 94.863 % de los individuos de la población analizada fueron homocigotos para el alelo C, el 5.137 % heterocigotos CT y no se encontraron homocigotos para el alelo T (figura 20).

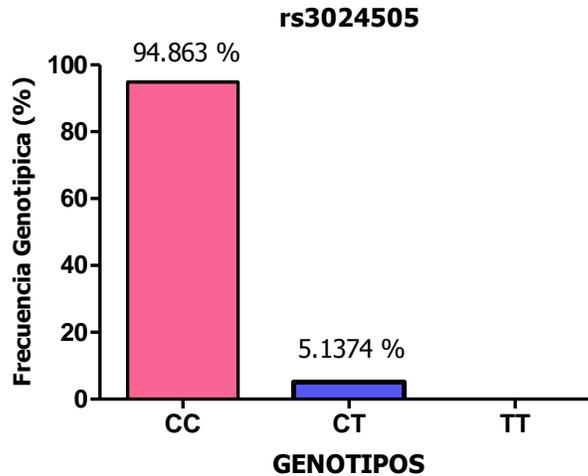


Figura 20. Frecuencia genotípica del SNP rs3024505 [T/C] presente en el gen de IL-10. Mediante qPCR se obtuvieron las frecuencias genotípicas de la población analizada (n=292).

La frecuencia alélica del SNP rs3024505 [T/C] mostró la presencia del alelo C en el 97.432 % de los individuos mientras que para el alelo T fue del 2.568 % en población abierta (figura 21).

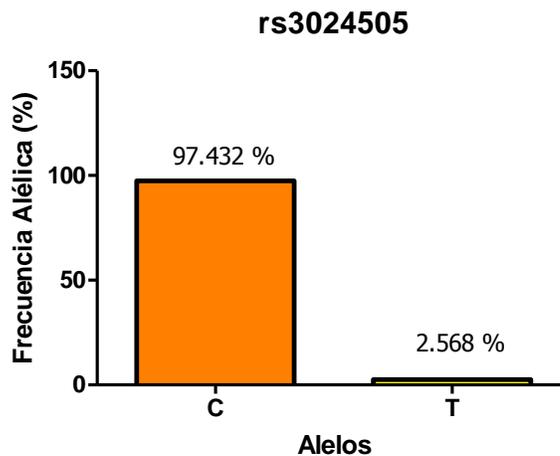


Figura 21. Frecuencia alélica en población abierta del SNP rs3024505 (n=292).
Determinación de frecuencias genotípicas en pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

Tabla 4. Frecuencias genotípicas de los SNPs rs11209086, rs1800896 y rs3024505 en pacientes con EII.

CASOS									
GEN	SNP	POBL. TOT.	GENOTIPO	n	FRECUENCIA GENOTÍPICA (%)	ALELO	n	FRECUENCIA ALELICA (%)	HWE (p)
IL-23R	rs11209026	36	GG	35	97.22	G	71	98.611	0.93
			AG	1	2.78				
			AA	0	0.00	A	1	1.389	
IL-10	rs1800896	37	AA	19	51.35	A	52	70.270	0.57
			AG	14	37.84				
			GG	4	10.81	G	22	29.730	
IL-10	rs3024505	29	CC	25	86.21	C	54	93.103	0.69
			CT	4	13.79				
			TT	0	0.00	T	4	6.897	

Una vez que se conoció la frecuencia de los SNPs de interés en población abierta, se procedió a obtener la frecuencia genotípica del SNP rs11209026 [A/G] presente en el gen de IL-23R en pacientes con EII, en donde se observó que el 97.22 % fueron homocigotos para el alelo G, el 2.78 % heterocigotos AG y no se encontraron homocigotos para el alelo A (figura 22).

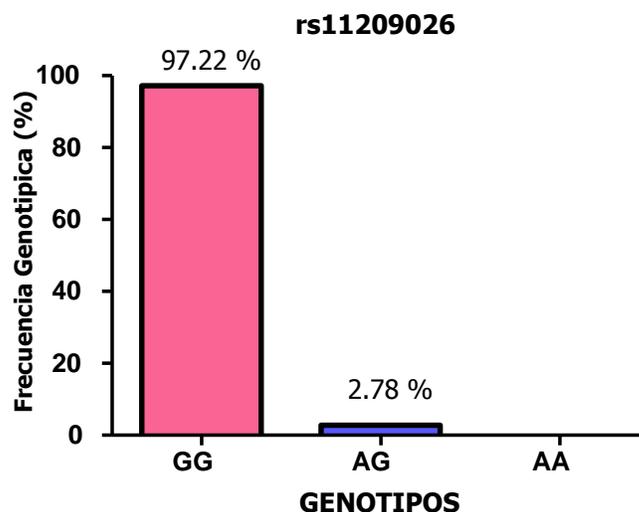


Figura 22. Frecuencia genotípica del SNP rs11209026 [A/G] presente en el gen de IL-23R en pacientes con EII. Mediante qPCR se obtuvieron las frecuencias genotípicas (n=36).

Se obtuvo la frecuencia genotípica del SNP rs1800896 [A/G] presente en el gen de IL-10, en donde se observó que el 51.35 % de los pacientes con EII fueron

homocigotos para el alelo A, el 37.84 % heterocigotos AG y el 10.85 % homocigoto para el alelo G (figura 23).

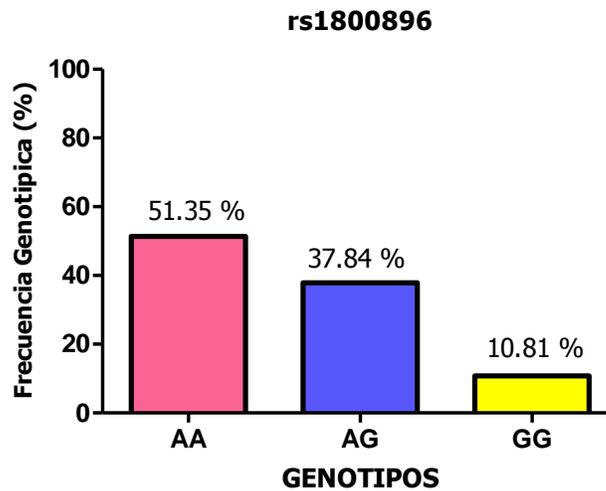


Figura 23. Frecuencia genotípica del SNP rs1800896 [A/G] presente en el gen de IL-10 en pacientes con EII. Mediante qPCR se obtuvieron las frecuencias genotípicas (n=37).

Se obtuvo la frecuencia genotípica del SNP rs3024505 [T/C] presente en el gen de IL-10, en donde se observó que el 86.21 % de los pacientes con EII presentaron el genotipo homocigoto para el alelo C, el 13.79 % fue heterocigoto y no se encontraron homocigotos para el alelo T (figura 24).

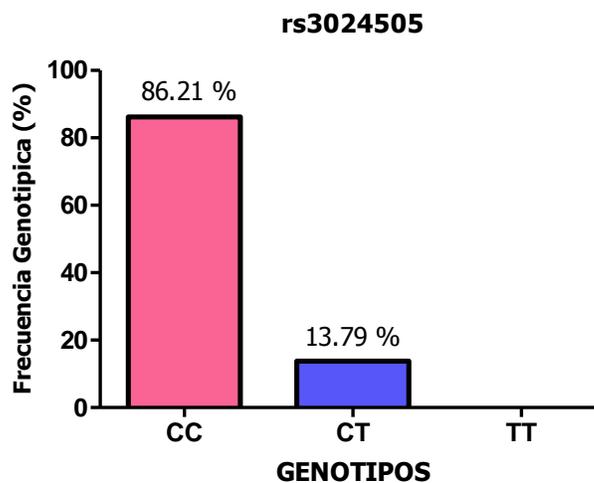


Figura 24. Frecuencia genotípica del SNP rs3024505 [T/C] presente en el gen de IL-10 en pacientes con EII. Mediante qPCR se obtuvieron las frecuencias genotípicas (n=29).

9. Discusión

La incidencia de la EII ha ido en aumento en los últimos tiempos paralelamente al progreso de las sociedades, en especial de países industrializados. Si bien la etiología no se comprende en su totalidad, se han descrito factores ambientales, inmunológicos y genéticos que contribuyen a la patología y que son clave para el entendimiento de la historia natural de la enfermedad.

La microbiota juega un papel importante en la patogenia de la enfermedad y la aparición de algunos defectos funcionales en las células de la inmunidad podría asociarse con el desarrollo de la EII. Un ejemplo de esto es que se ha observado que pacientes con EC tienen una menor capacidad de secretar α -defensinas favoreciendo así la colonización intestinal por microorganismos patógenos y creando un desbalance en el microambiente de citocinas provocando una activación constante del sistema inmune (Sepulveda y cols., 2008).

En el 2001 se descubrió la implicación del gen NOD2/CARD15 (*nucleotidebinding oligomerization domain containing 2*) en la EC, este gen está relacionado con la destrucción de microorganismos de la luz intestinal, por lo que esto supuso la primera evidencia de cómo una serie de variantes genéticas estaban asociadas con la EII (Oliver, 2008).

Desde el punto de vista de la interacción entre la inmunología y la genética se ha postulado que existe cierta predisposición genética de algunos individuos a desarrollar EII, que estaría relacionada con una inadecuada respuesta inmunológica frente a la microbiota. Diferentes grupos de estudio han demostrado tanto en pacientes como en modelos murinos de EII, que existen factores genéticos capaces de aumentar el riesgo de desarrollar la enfermedad (Sepulveda y cols., 2008). Hasta el momento se han localizado 9 regiones cromosómicas candidatas y dentro de ellas se han localizado algunos polimorfismos en genes como NOD2/CARD15, TLR4, IL-23R, IL-10, TNF α , ATG16L1, que están involucrados en la patogénesis y que contribuyen al desarrollo de la enfermedad (Bores y cols., 2007; Oliver, 2008).

También se han realizado estudios de estos polimorfismos en diferentes poblaciones, en donde se han encontrado asociaciones con la gravedad, localización de la enfermedad y edad de diagnóstico.

Una de las moléculas más estudiadas es la interleucina 23 (IL-23), que es una citocina descubierta recientemente y que tiene estructura y funciones semejantes a la IL-12. La ubicación molecular del gen de IL-23R está en el cromosoma 1 y se forma de la unión de dos subunidades: p40, que comparte con la IL-12 y p19. Es altamente expresado en la membrana de células T, NK, monocitos y células dendríticas. Esta proteína está implicada en la producción de IL-17 a través de la activación de linfocitos Th17 y juega un papel muy importante en la respuesta inflamatoria (Naser y cols., 2012).

Los linfocitos Th17 son un conjunto de células T que producen principalmente IL-17 y en menor medida IL-6 y TNF- α . La IL-17 in vitro e in vivo actúa como una potente citocina inflamatoria. Se ha descrito que la IL-23 podría ser un regulador clave en la diferenciación de los linfocitos Th-17 y la expresión del receptor heterodimérico, IL23R e IL-12R β 1, regula las actividades de la IL-23. Por lo tanto, el conjunto IL-23 e IL-17 es un mecanismo patogénico clave que media el desarrollo y el progreso de la inflamación por células Th-17 (Oliver, 2008). El papel de la IL-23 e IL-17 en pacientes con EC fue apoyado en pacientes humanos donde se observan aumentados los niveles de IL-17 tanto en mucosa intestinal como en el suero de pacientes con EC (Naser y cols., 2012).

Durante un estudio con 2,877 muestras de DNA de pacientes con EII (dos tercios de EC y un tercio de la CU), se planteó el SNP rs11209026 como una posible variante de protección identificado en el gen IL-23R en el cromosoma 1p31. Hay muchas otras variantes de polimorfismos en IL-23R que están asociadas con la EII, pero el rs11209026 tiene la asociación más fuerte que confiere protección contra EII. Este polimorfismo provoca un cambio de aminoácido de arginina a glutamina, el cual afecta al residuo 50 de la proteína, concretamente se sitúa en la región inicial de la porción intracitoplasmática del receptor afectando la afinidad; esta región

interviene en la transmisión de señales a la célula, al no existir la unión citocina más receptor no existe el efecto biológico de la citocina (Oliver, 2008).

Estudios adicionales han confirmado que el SNP rs11209026 confiere protección, esto en poblaciones norteamericanas y europeas. Incluyen cohortes que van desde población griega (Gazouli y cols., 2010), ingleses (Fraser y cols., 2012), alemanes (Glas y cols., 2007; Dubinsky y cols., 2007), iraníes (Hayatbakhsh y cols., 2012), japoneses entre otros. Debido al papel de la IL-23 en la activación de las respuestas inflamatorias, la orientación de esta vía puede ser un buen enfoque terapéutico (Naser y cols., 2012).

En otro estudio se ha demostrado que esta variante en el gen de IL-23R protege contra la EC en poblaciones judías y no judías (Dubinsky, 2007). Además, en un estudio con EII (tanto CU como EC) se observa en los pacientes de origen caucásico que la variante del rs11209026 está asociada con la protección de la EII (OR=0.4, 95 %, IC= 0.3 a 0.7) (Oliver y cols., 2007).

En un estudio de población entre los niños canadienses franceses e ingleses, se investigó la asociación entre las variantes genéticas del gen IL-23R y la aparición temprana de la EC. Para el estudio se llevó a cabo un caso control y un estudio basado en la familia. Ellos se basaron en 10 SNP de IL-23R y tres SNP de NOD2/CARD15. En total se estudiaron 259 pacientes con EC y 139 controles, fueron agrupados con una edad media al diagnóstico de 13.3 años (rango: 2.6 a 20 años). El alelo protector IL-23R, rs11209026, sólo estaba presente en el 2 % de los cromosomas de casos de EC y un 6 % de los cromosomas de control. Todas las frecuencias de los alelos variantes de NOD2/CARD15 fueron mayores entre los pacientes con EC en comparación con el grupo control. En el gen IL-23R, se observó una asociación significativa con el inicio precoz de EC entre los niños canadienses (Hradsky y cols., 2010).

No sólo las variantes genéticas del IL-23R son asociadas con la EC, también se asocian con otras enfermedades inflamatorias crónicas, como el SNP rs10489629 que se asocia con periodontitis crónica. En la psoriasis, la variante rs11209026 ha

sido descrita como un haplotipo de predisposición. Tanto en la EC como la psoriasis, el tratamiento con un anticuerpo anti-p40 IL-12/23 ha mostrado resultados prometedores. Por lo tanto, IL-23R puede servir blanco terapéutico en muchas y diferentes enfermedades inflamatorias crónicas, aunque las variantes pueden diferir entre las distintas enfermedades (Naser y cols., 2012).

En este estudio se analizó el SNP rs11209026 en población abierta del Distrito Federal y del Área Metropolitana determinando su frecuencia, ya que no existen datos en la población mexicana sobre esta variación genética. Se encontraron los tres genotipos distribuidos en diferente frecuencia; teniendo el genotipo GG con una frecuencia del 68.5 %, seguido del genotipo AG en un 29.0 % y por último el genotipo AA con 2.5 %. En cuanto a la frecuencia alélica tenemos que el alelo G se encuentra en un 83% y el alelo A en un 76.5 %. El cálculo de la frecuencia genotípica nos ayuda a entender si este SNP puede ser candidato para la asociación con la enfermedad ya que se ajustó al equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE). En cuanto a la frecuencia alélica en estudios posteriores se puede ver si existe asociación con la sola presencia del alelo o solo asociación con el genotipo.

El rs11209026 en esta población se encuentra en HWE ($p=0.58$) y no hay diferencias significativas entre las frecuencias observadas y las esperadas. Tradicionalmente, la desviación del equilibrio o cuando una población no está en HWE se considera como una indicación de que los alelos no segregan de forma independiente, el apareamiento no es al azar, o que los alelos reflejan una mutación reciente que aún no ha alcanzado el equilibrio. Sin embargo, existen otras posibilidades a tener en cuenta para este desequilibrio: errores de genotipificación en el laboratorio, sesgos en la selección de los sujetos controles o la existencia de una estratificación de la población (Soriguer y Morcillo, 2007).

En los estudios de asociación de casos y controles es de gran importancia que el grupo control esté en equilibrio de HWE para evitar tanto errores técnicos como asociaciones falsas-positivas. Sin embargo, una desviación del HWE en el grupo de los casos podría ser indicio de la existencia de una asociación real entre el genotipo y la enfermedad estudiada (Soriguer y Morcillo, 2007).

También se realizó la genotipificación de 36 pacientes con EII, obteniendo para el genotipo GG una frecuencia del 97.22 %, seguido del genotipo AG en un 1.389 %, el genotipo AA no se encontró en estos pacientes. Aun no se puede realizar una asociación como tal, ya que el interés de este trabajo fue establecer la frecuencia en población abierta, se realizó el cálculo de HWE ($p=0.93$) teniendo que la población con EII se encuentra en equilibrio pero para poder considerar este valor es necesario tener como mínimo 5 muestras de cada genotipo y en este caso el genotipo AA no está presente en la población; se pretende aumentar el número de muestras de pacientes con EII y calcular el HWE para calcular estadísticamente si existe asociación biológica con la enfermedad o no.

Por otro lado, la interleucina 10 (IL-10) es una citocina inmunoreguladora que actúa en las células presentadoras de antígeno (células dendríticas, macrófagos y células T) mediante la inhibición tanto de la síntesis de citocinas como de moléculas coestimuladoras y moléculas HLA clase II (Fonseca y cols., 2011).

Se ha observado que los pacientes con una alteración en la producción de IL-10 presentan casos graves de CU y EC (Andersen y cols., 2010). Ha habido un número de estudios en la región promotora del gen de IL-10 para pruebas de asociación con la EII, con resultados contradictorios. Sin embargo, el primer estudio completo de CU mostró una nueva relación concreta con los SNP cerca del 3'UTR del gen IL10 en el cromosoma 1q32 (rs3024505). Aunque el gen de IL-10 ni los genes su receptor previamente habían sido implicados en EII, rs3024505 fue débilmente asociada con EC en población alemana (Thompson, 2010).

La importancia biológica de rs3024505 en la EII sigue siendo poco clara, está situado en una región intergénica proximal al extremo 3'UTR del gen de IL-10. La región tiene un alto potencial para contener secuencias reguladoras, por lo que puede regular la expresión de IL-10. En un estudio en población de Nueva Zelanda el rs3024505 se asoció significativamente con EC tanto alélica como genotípicamente (Wang y cols., 2011). Los individuos con el genotipo CT tenían un aumento significativo de riesgo de padecer EC en comparación con los que tenían el genotipo CC (OR=1.50, 95 % CI=1.12-2.00, $p=0.022$). Los individuos con el

genotipo TT también tenían un mayor riesgo de EC, aunque esto no fue estadísticamente significativa (Wang y cols., 2011).

La región promotora del gen de IL-10 cuenta con diferentes variaciones genéticas en donde se ven afectados los niveles de citocina producida tal como rs1800896 (G-1082A), rs1800872 (C-819T) y rs1800871 (C-592A). El haplotipo que abarcan estos tres polimorfismos se asocia con la baja producción in vitro de IL-10 en linfocitos (Andersen y cols., 2010).

En un estudio en niños canadienses se encontraron tres haplotipos con respecto a los polimorfismos anteriores (GCC, ACC y ATA) se observó que niños que llevan el haplotipo GCC (OR = 2.0, IC = 1.08-3.69) y ACC (OR = 2.5, IC = 1.2 a 6.2) se encontraban en mayor riesgo de desarrollar la enfermedad íleo-colónica e íleon terminal, respectivamente. Y a la inversa, un efecto protector se observó en el haplotipo GCC contra el íleon terminal (OR = 0.34, IC = 0.12 a 0.96) y el tracto digestivo superior (OR = 0.4, IC = 0.17-0.91), mientras que el haplotipo ACC contra la localización íleo-colónica (OR = 0.49, IC = 0.26-0.93). Esto sugiere que los SNP -1082 G> A juega un papel importante en la determinación de localización de la enfermedad (Sánchez y cols., 2009). Otro estudio con población de Nueva Zelanda se encontró asociación con el genotipo CT (OR= 1.73, p= 0.001), con el riesgo de desarrollar la EC (Wang y cols., 2011). El impacto funcional de este SNP se ha demostrado en otros estudios: el genotipo GG -1082 fue el más importante factor genético en la regulación de la expresión de la IL-10; los homocigotos AA se asociaron con una disminución de la IL-10 en pacientes con EC.

En este trabajo, se analizó el SNP rs1800896 en población abierta del Distrito Federal y Área Metropolitana, determinando su frecuencia ya que no existen datos en esta población sobre dicha variación genética. Se encontraron los tres genotipos distribuidos en diferente frecuencia; teniendo el genotipo AA con una frecuencia del 59.25 %, seguido del genotipo AG en un 34.5 % y por último el genotipo GG con 6.25 %. En cuanto a la frecuencia alélica tenemos para el alelo A un 76.5 % y el alelo G un 23.5 %. Al igual que el polimorfismo anterior se calculó el equilibrio de

Hardy-Weinberg (HWE). El rs1800896 en esta población se encuentra en HWE ($p=0.41$) y no hay diferencias significativas entre las frecuencias observadas y las esperadas.

También se realizó la genotipificación de 37 pacientes con EII, obteniendo para el genotipo AA una frecuencia del 51.35 %, seguido del genotipo AG en un 37.84 % y el genotipo GG en 10.81 %. Aun no se puede realizar una asociación como tal, aunque el interés de este trabajo fue establecer la frecuencia en población abierta, se realizó el cálculo de HWE ($p=0.57$) teniendo que la población con EII se encuentra en equilibrio pero para poder considerar este valor es necesario tener como mínimo 5 muestras de cada genotipo y aun no se observan 4 del genotipo GG; se pretende aumentar el número de muestras de pacientes con EII en un futuro y calcular el HWE para evaluar estadísticamente si existe asociación biológica con la enfermedad o no.

Por último se analizó el SNP rs3024505 en el cual solo se encontraron dos genotipos distribuidos en diferente frecuencia; teniendo en mayor proporción el genotipo CC con una frecuencia del 94.86 %, seguido del genotipo CT en un 5.13 % y no se encontró el genotipo TT en esta población. Su frecuencia alélica es para C de 97.437 % y 2.568 % para el alelo T. Al igual que el polimorfismo anterior se hizo el al equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE).

Para el rs3024505 el HWE ($p=0.65$) no se puede considerar ya que para aplicar este ajuste se necesitan al menos 5 muestras de cada genotipo y como se mencionó en este SNP se trabajaron 292 pacientes de los cuales no se observó el genotipo TT. Este resultado nos podría decir que en esta población no puede considerarse como un marcador genético debido a que los alelos no se segregan de forma independiente, el apareamiento no es al azar, o que los alelos reflejan una mutación reciente que aún no ha alcanzado el equilibrio. Sin embargo, existen otras posibilidades a tener en cuenta para este desequilibrio: errores de genotipificación en el laboratorio, sesgos en la selección de los sujetos controles o la existencia de una estratificación de la población (Soriguer y Morcillo, 2007).

De la genotipificación de 29 pacientes con EII, se obtuvo para el genotipo CC una frecuencia del 86.21 %, seguido del genotipo CT en un 13.79 %, y al igual que en la población abierta no se encontró el genotipo TT. Se realizó el cálculo de HWE ($p=0.69$) teniendo que la población con EII se encuentra en equilibrio pero para poder considerar este valor es necesario tener como mínimo 5 muestras de cada genotipo; se pretende aumentar el número de muestras de pacientes con EII y calcular el HWE.

En México no se han realizado estudios de asociación de estos SNP con la EII, por tanto, sería interesante analizar estos SNP y ver si existe asociación con la patología, tratamiento y desarrollo de la EII. Además, la aparición de la EII es un complejo mecanismo en el que interactúan factores genéticos y ambientales, por lo que en este momento no puede establecerse un elemento único como causante del problema. El uso de la biología molecular como herramienta nos permite tener un panorama más amplio de cómo se origina el proceso inflamatorio característico de esta enfermedad y el estudio de diferentes SNPs involucrados en la patogénesis, tratamiento y desarrollo permitirán un manejo mejor en estos pacientes.

10. Conclusiones

- Los SNP rs11209026 del gen de IL-23R y el rs1800896 del gen de IL-10 son buenos candidatos para ser utilizados como marcadores biológicos en la implementación de un modelo predictivo del desarrollo o evolución de la EII en población del Distrito Federal y Área Metropolitana ya que estos cumplen con el HWE.
- El SNP rs3024505 del gen de IL-10 no cumple el HWE por lo que no se puede considerar como marcador en la población del Distrito Federal y Área Metropolitana.

11. Perspectivas

- Aumentar el número de muestras en población abierta para el rs3024505 del gen que codifica IL-10 para dar una mayor confiabilidad a los resultados obtenidos.
- Análisis de polimorfismos de nucleótido único en otras moléculas que estén implicadas en la patogenia de la EII y que puedan ser usadas como marcadores biológicos de progresión en la población de estudio.
- Realizar la genotipificación de los SNP rs11209026 y rs1800896 en pacientes de EII y analizar la relación con la progresión clínica de la EII y la aparición de efectos secundarios debidos al tratamiento con inmunosupresores.

12. Referencias

- Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ. 2002. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 123:679-688.
- Aguilera N. 2004. Caracterización de Linfocitos T y Células Dendríticas en pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal. "Tesis de Doctorado". Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Alvarez- Lobos M, Arostegui JI, Sans M, Tassies D, Plaza S, Delgado S. 2005. Crohn's disease patients carrying NOD2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence. *Ann Surg*. 242:693-700.
- Andersen V, Ernst A, Christensen J, Ostergaard M, Jacobsen B, Tjonneland A, Krarup H, Vogel U. 2010. The polymorphism rs3024505 proximal to IL-10 is associated with risk of ulcerative colitis and Crohns disease in a Danish case-control study. *BMC Medical Genetics*. 11:82.
- Beaugerie L, Brousse N, Bouvier AM, Colombel JF, Lémann M, Cosnes J. 2009. Lymphoproliferative disorders in patients receiving thiopurines for inflammatory bowel disease: a prospective observational cohort study. *Lancet*. 374:1617-1625.
- Beaugerie L, Sokol H. 2012. Clinical, serological and genetic predictors of inflammatory bowel disease course. *World Journal of Gastroenterology*. 18(29): 3806-3813.
- Bueno N, Mañe J, Cortes I, Yamamoto JK. 2012. Role of Nutrition in Inflammatory Bowel Disease (IBD): New Therapeutic Approaches and Recent Outcomes. *Journal of Nutritional Therapeutics*. 1: 132-137.
- Caruso R, Pallone F, Monteleone G. 2007. Emerging role of IL-23/IL-17 axis in *H. pylori*-associated pathology. *World Journal of Gastroenterology*. 13(42): 5547-5551.
- Checa MA. 2007. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 20(3): 213-221.
- Cho J. 2008. Inflammatory bowel disease: Genetic and epidemiologic considerations. *World Journal Gastroenterology*. 14(3): 338-347.
- Cho J. 2008. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 8(6): 458-466.

- Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. 2011. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1410:1785-1794.
- Couto I, Bello L, González B, Tizón M, Souto J. 2009. Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Cad Aten Primaria*. 16: 211-215.
- Cummings F, Ahmad T, Geremia A, Beckly J, Cooney R, Hancock L, Pathan S, Guo C, Cardon L, Jewell D. 2007. Contribution of the Novel Inflammatory Bowel Disease Gene IL23R to Disease Susceptibility and Phenotype. *Inflamm Bowel Dis*. 13(9):1063–1068.
- Dubinsky M, Wang D, Picornell Y, Wrobel I, Katzir L, Quiros A, Dutridge D, Wahbeh G, Silber G, Bahar R, Mengesha E, Targan S, Taylor K, Rotter J. 2007. IL-23 Receptor (IL-23R) Gene Protects Against Pediatric Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 13(5):511-515.
- Dubinsky MC, Yang H, Seidman EG, Kam LY, Abreu MT. 2002. 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 122: 904-915.
- Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ. 2006. A genome-wide association study identifies IL-23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 314(5804): 1461-1463.
- Economou M, Pappas G. 2007. New Global Map of Crohn's Disease: Genetic, Environmental, and Socioeconomic Correlations. *Inflamm Bowel Dis*. 00:000-000.
- Einarsdottir E, Koskinen L, Dukes E, Kainu K, Suomela S, Lappalainen M, Ziberna F, Korponay-Szabo I, Kurppa K, Kaukinen, Ádány R, Pocsai, Széles G, Färkkilä M, Turunen U, Halme L, Paavola-Sakki P, Not T, Vatta S, Ventura A, Löfberg R, Torkvist L, Bresso F, Halfvarson J, Mäki M, Kontula K, Saarialho-Kere U, Kere J, D'Amato M and Saavalainen P. 2009. IL-23R in the Swedish, Finnish, Hungarian and Italian populations: association with IBD and psoriasis, and linkage to celiac disease. *BMC Medical Genetics*. 8(10):1471-2350.
- Fainboim L, Geffner J. 2011. *Introducción a la Inmunología Humana*. Buenos Aires. 6ta ed. Médica Panamericana.
- Fowler E, Eri R, Hume G, Johnstone S, Pandeya N, Lincoln D, Templeton D, Radford-Smith G. 2005. TNFa and IL10 SNPs act together to predict disease behaviour in Crohn's disease. *J Med Genet*. 42:523–528.
- Franke A, McGovern D, Barrett J, Wang K, Radford G, Ahmad T, Lees C, Balschun T, Lee J, Roberts R, Anderson C, Bis J, Bumpstead S, Ellinghaus D, Festen E, Georges M, Haritunians T, Jostins L, Latiano A, Mathew C, Montgomery G, Prescott

N, Rotter J, Schumm P, Sharma Y, Simms L, Taylor K, Whiteman D, Wijmenga C, Baldassano R, Barclay M, Bayless T, Brand S, Buning C, Cohen A, Colombel JF, Cottone M, Stronati L, Denson T, De Vos M, D'Inca R, Dubinsky M, Edwards C, Florin T, Franchimont T, Geary R, Glas J, Van Gossum A, Guthery S, Halfvarson J, Hommes D, Hugot JP, Laukens D, Lawrance I, Lemann M, Levine A, Libioulle C, Louis E, Mowat C, Newman W, Panés J, Phillips A, Proctor D, Regueiro M, Rutgeerts P, Sanderson J, Sans M, Seibold F, Steinhart H, Stokkers P, Torkvist L, Ublick G, Raychaudhuri S, Green T, Walters T, Targan S, Brant S, Rioux J, D'Amato M, Weersma R, Kugathasan S, Griffiths A, Mansfield J, Vermeire S, Duerr R, Silverberg M, Satsangi J, Schreiber S, Cho J, Annese V, Hakonarson H, Daly M, Parkes M. 2010. Meta-Analysis Increases to 71 the Tally of Confirmed Crohn's Disease Susceptibility Loci. *Nat Genet.* 42(12): 1118–1125.

- Gassull M, Gomollón F, Obrador A, Hinojosa J. 2007. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. España. 3ra ed. Aran Ediciones.
- Glas J, Seiderer J, Wetzke M, Konrad A, Török H, Schmechel S, Tonenchi L, Grassl C, Dambacher J, Pfennig S, Maier K, Griga T, Klein W, Epplen J, Schiemann U, Folwaczny C, Lohse P, Göke B, Ochsenkühn T, Müller B, Folwaczny M, Mussack T, Brand S. 2007. rs1004819 Is the Main Disease-Associated IL23R variant in German Crohn's Disease Patients: Combined Analysis of IL-23R, CARD15, and OCTN1/2 Variants. *Plos One.* 9(2): e819.
- Gazouli M, Pachoula I, Panayotou I, Mantzaris G, Chrousos G, Anagnou NP, Romagiannikou E. 2010. NOD2/CARD15, ATG16L1 and IL23R gene polymorphisms and childhood-onset of Crohn's disease. *World Journal Gastroenterology.* 16(14): 1753-1758.
- Hayatbakhsh M, Zahedi M, Shafiepour M, Nikpoo A, Mohammadi M. 2012. IL-23 Receptor Gene rs7517847 and rs1004819 SNPs in Ulcerative Colitis. *Iran. J. Immunol.* 9(2): 128-135.
- Heap G, Heel D. 2009. The genetics of chronic inflammatory diseases. *Human Molecular Genetics.* 18: R101-R106.
- Hernández M, Alvarado A. 2001. Interleucinas e inmunidad innata. *Revista Biomédica.* 12: 272-280.
- Hradsky O, Dusatkova P, Lenicek M, Bronsky J, Nevoral J, Vitek L, Lukas M, Zeniskova I, Cinek O. 2010. The CTLA4 variants may interact with the IL23R and NOD2 conferred risk in development of Crohn's disease. *BMC Med Genet.* 11: 91.

- Jürgens M, Laubender RP, Hartl F, Weidinger M, Seiderer J, Wagner J. (2010). Disease activity, ANCA, and IL23R genotype status determine early response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 105:1811-1819.
- Kabi A, Nickerson K, Homer C, McDonald C. 2012. Digesting the Genetics of Inflammatory Bowel Disease – Insights from Studies of Autophagy Risk Genes. *Inflamm Bowel Dis.* 18(4): 782-792.
- Kaser A, Zeissig S, Blumberg R. 2010. Genes and Environment: How Will Our Concepts on the Pathophysiology of IBD Develop in the Future? *Digestive Diseases.* 28: 395-405.
- Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. 2010. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol.* 28: 573-621.
- Kawada M, Arihiro A, Mizoguchi E. 2007. Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology.* 13(42): 5581-5593.
- Khor B, Gardet A, Xavier R. 2011. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 474(7351): 307-317.
- Lakatos PL. 2009. Environmental factors affecting inflammatory bowel disease: have we made progress? *Dig Dis.* 27: 215-225.
- Latella G, Papi C. 2012. Crucial steps in the natural history of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology.* 18(29): 3790-3799.
- Levine B, Deretic V. 2007. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nature Rev Immunol.* 7:767-777.
- Lidar M, Langevitz P, Shoenfeld Y. 2009. The Role of Infection in Inflammatory Bowel Disease: Initiation, Exacerbation and Protection. *IMAJ.* 11:558-563.
- López M, Malloquín P, Vega M. 2005. Genotipado en la Salud Humana. *Genoma España.* 99.
- Mascheretti S, Hampe J, Kuhbacher T, Herfarth H, Krawczak M. 2002. Pharmacogenetic investigation of the TNF/TNFR system in patients with chronic active Crohn's disease treated with infliximab. *Pharmacogenomics J.* 2: 127-136.
- Medina E, Fuentes D, Suárez L, Prieto G. Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNPAEP.* 151-160.
- Murphy S, Kwon J, Boone D. 2012. Novel Players in Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis. *Curr Gastroenterol Rep.* 14(2):146-152.

- Naser S, 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*. 18(5): 412-424.
- Norrgard K. 2008. Genetic Variation and Disease: GWAS. *Nature Education* 1(1):87
- Pierce B. 2010. *Genética un enfoque conceptual*. 3ra ed. Médica Panamericana.
- Oliver FJ. 2008. Nuevos Marcadores Genéticos de predisposición a la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. "Tesis de Doctorado". Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra. CSIC, Granada.
- Oliver FJ, Rueda B, López-Nevot MA, Gómez-García M, Martín J. 2007. Replication of an association between IL23R gene polymorphism with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 5: 977-981, 981.e1-2.
- Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen O, Sorensen T, Binder V. 1991. Familial occurrence on IBD. *NEJM*. 324:84-88.
- Paul G, Khare V, Gasche C. 2011. Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10. *European journal of Clinical Investigation*.
- Peeters M, Nevens H, Baert F, Hiele M, Vlietinck R. 1996. Familial aggregation in EC: Increases age- adjusted risk in clinical characteristics. *Gastroenterology*. 120: 816-819.
- Podolsky DK. 2002. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 347: 417-429.
- Ramírez J, Vargas G, Tovilla C, Fragoso JM. (2013). Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rsNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta Médica de México*. 149: 220-228.
- Rodríguez G. 2001. *Enfermedad Inflamatoria: Epidemiología y patogénesis*. Médica Sur. 8(3): 85-89.
- Rodríguez L, Fonseca G, Villeda M, Yamamoto JK. 2007. Novel genetic markers in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*. 13(42): 5560-5570.
- Rubio M. 2013. *Especialista en Gastroenterología y Ciencias médicas*. Recuperado el 14 de abril de 2014. <http://mariarubio.com/>
- Sanchez R, Levy E, Costea F, Sinnott D. 2009. IL-10 and TNF- α promoter haplotypes are associated with childhood Crohn's disease location. *World Journal Gastroenterology*. 15(30): 3776-3782.

- Sandoval ER, Bosques F. 2008. Enfermedad Inflamatoria Intestinal: Realidad en México. *Revista de Gastroenterología México*. 73: 38-42
- Saro C. 2008. Clasificación de Montreal de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) y sus implicaciones Clínico- Terapéuticas. *RAPD Online* 31(1):15-20.
- Sepúlveda S, Beltrán C, Peralta A, Rivas P, Rojas N, Figueroa C, Quera R, Hermoso M. 2008. Enfermedad Inflamatoria Intestinal: Una mirada inmunológica. *Rev Méd Chile*. 136: 367-375
- Shih D, Targan S. 2009. Insights into IBD Pathogenesis. *Curr Gastroenterol Rep*. 11(6): 473-480.
- Siegmund B, Zeitz M. 2011. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *World Journal Gastroenterology*. 17(27): 3178-3183.
- Soriguer F, Morcillo S. 2007. ¿Qué hacer cuando en los estudios de epidemiología biomolecular la distribución genotípica no se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg? *Endocrinol Nutr*. 3(54):169- 173.
- Sklug M, Cumming R. 1999. *Conceptos de Genética*. Madrid. 5ta ed. Prentice Hall Iberia.
- Tsianos E, Katsanos K, Tsianos V. 2011. Role of genetics in the diagnosis and prognosis of Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology*. 17(48): 2219-2840.
- Thompson A, Lees C. 2011. Genetics of Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 17(3): 831- 848.
- Wang A, Lam WJ, Han DY, Ding Y, Hu R, Fraser A, Ferguson L, Morgan A. 2011. The effect of IL-10 genetic variation and interleukin 10 serum levels on Crohn's disease susceptibility in a New Zealand population. *Human Immunology*. 72: 431–435.
- Yamamoto-Furusho J. 2008. Tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Revista de Gastroenterología México*. 73: 47-49
- Yamamoto JK. 2007. Genetic factors associated with the development of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*. 13(42): 5594-5597
- Yamamoto JK, Podolsky D. 2007. Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*. 13(42): 5577-5580.
- 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. *J Hum Genet*. 47(9): 469-472. Erratum in: *J Hum Genet*. 2003. 48 (7): 397.

13. Anexo I

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por este medio le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación “**Frecuencia de polimorfismos de nucleótido único presentes en los genes de IL-10 e IL-23R en población mexicana**” que de acuerdo con los lineamientos escritos en la declaración de Helsinki y la Ley General de Salud en México, se considera como un estudio de riesgo mínimo y que requiere de esta carta de consentimiento informado con la aceptación de las personas participantes. Se me explicó que este proyecto se refiere **Enfermedad Inflamatoria Intestinal**. El objetivo es determinar la frecuencia de SNP presentes en los genes de IL23R (rs11209026) e IL-10 (rs3024505 y rs1800896) en población mexicana, para la implementación de un modelo predictivo de desarrollo de la EII en nuestro país. Se me aseguró que puede preguntar todo lo relacionado al estudio y a mi participación.

Se me informó que para este estudio es necesario que yo conteste varias preguntas en no más de 15 minutos y permita que se me tome una muestra inicial de 5 mL de sangre y otra adicional del mismo volumen en cada consulta programada por los médicos tratantes, mismas que serán tomadas por una persona capacitada y que no se espera causen molestia alguna. He sido informado (a) que tengo toda la libertad de retirar mi consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello se modifique la calidad de la atención médica que requiere mi enfermedad. Mi participación en este permitirá conocer las variaciones en los genes relacionados con la respuesta inmune para desarrollar un modelo de evolución de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal...

Autorizo la publicación de los resultados de mi estudio y se me asegura que estrictamente se mantendrá el secreto profesional en todo momento, por lo que nadie sabrá mi nombre ni mi dirección.

Con fecha _____ aseguro haber comprendido lo anterior y una vez que se me aclaran todas las dudas que tuve sobre mi participación en el proyecto, **acepto participar**.

Nombre y firma de la persona o responsable legal

Nombre y firma del testigo 1 _____

Nombre y firma del testigo 2 _____

Nombre y Firma de quien toma la muestra _____

Este documento se extiende por duplicado un ejemplar en poder de la persona que esta donando la muestra y la otra en poder del investigador.