



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOMEDICINA

**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**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

QFB RITA SARAI QUIROZ CRUZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. SALVADOR FONSECA CORONADO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

CD. MX. ENERO, 2017



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
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOMEDICINA

**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**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

QFB RITA SARAI QUIROZ CRUZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. SALVADOR FONSECA CORONADO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, CD. MX. ENERO, 2017

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/001/2017
ASUNTO: Oficio de Jurado

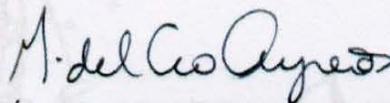
Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 17 de octubre de 2016 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** del (la) alumno (a) **QUIROZ CRUZ RITA SARAI** con número de cuenta **406012272** con la tesis titulada **"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"**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. SALVADOR FONSECA CORONADO**:

Presidente: DR. ALEJANDRO ESCOBAR GUTIÉRREZ
Vocal: DRA. LETICIA MORENO FIERROS
Secretario: DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO
Suplente: DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ
Suplente: M. EN C. KARINA RUIZ TOVAR

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 5 de enero de 2017



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



MCAA/MJFM/ASR/mnm

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por darme la oportunidad de estar dentro programa de Maestría, por la experiencia profesional y personal adquirida; así como la aportación de diversos apoyos que encaminaron mi proyecto de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo recibido a través de la beca CONACYT 631635, para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México y su respaldo al proyecto financiado 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”.

Agradezco a mi Tutor principal Dr. Salvador Fonseca Coronado y a los miembros de mi Comité Tutor Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo y Dra. Antonia Isabel Castillo Rodal, por el apoyo, paciencia, disposición, dedicación y confianza brindada durante la realización del proyecto, gracias por creer en mí y compartir su experiencia y conocimiento.

El presente trabajo 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.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Dr. Salvador y a la M. en C. Karina Ruiz por apoyarme y motivarme a seguir siempre adelante, por ser un ejemplo para mí y por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Jerusalén, Angélica y Rubén por sus consejos y amistad. Y en especial a ti Ali que además de ser mi compañera y amiga has compartido el camino de este sueño y me has brindado tu apoyo incondicional.

Al Dr. Alejandro Escobar, a la Dra. Leticia Moreno y al Dr. Ramón Coral por el tiempo, apoyo y consejos que me brindaron para enriquecer mi trabajo de investigación.

A la Dra. Xóchitl García Samper, Jefa del Servicio de Gastroenterología del Hospital Adolfo López Mateos, ISSSTE, al Dr. Carlos Manuel del Real Calzada, Jefe del Servicio de Gastroenterología y a la Dra. Francisca Martínez Gastroenteróloga; ambos del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza, IMSS; por su disposición y apoyo en la obtención de muestras para la realización de este proyecto.

A la máxima casa de estudios UNAM por darme la oportunidad de vivir esta experiencia profesional y personal, me siento orgullosa de formar parte de esta Institución: “Por mi raza hablará el espíritu”

DEDICATORIAS

A mis padres Eduardo y Rita, sin ustedes no estaría en este camino gracias por darme la vida y por apoyarme de sobremanera son y serán siempre un ejemplo de vida para mí, la felicidad es de momentos y lo único que nos quedamos son recuerdos, por eso quiero que disfruten este logro y se sientan orgullosos de mí, los amo.

AníLu gracias por ser mi apoyo incondicional, confidente, mejor amiga, pero sobre todo gracias por ser mi hermana y por creer en mí a pesar de todo, jamás lograre pagarte todo lo que haces por mí, este logró también es tuyo, eres mi persona te amo.

Noe y Cheche gracias por hacer mi vida divertida, por su apoyo y amor incondicional, disfruten este éxito como si fuera suyo los amo hermanos.

A mis primos, en especial a Toño, Nanís, Karhy y Daniel que siempre han compartido absolutamente todo y que tienen un lugar especial en mi vida.

Les agradezco a todas esas personas especiales e importantes en mi vida que me apoyaron siempre donde quiera que se encuentren sé que están orgullosos de mí, gracias por darme su cariño y amor siempre estarán en mi corazón.

Finalmente le agradezco a Dios por permitirme llegar hasta aquí, por rodearme de grandes personas y por darme la fuerza de siempre seguir adelante.

“Si una persona es perseverante, aunque sea dura de entendimiento, se hará inteligente; y aunque sea débil se transformará en fuerte”

Leonardo Da Vinci

ÍNDICE

Abreviaturas	i
Índice de Figuras	iii
Índice de Tablas	iv
Resumen	v
Abstract	vi
1. Introducción	1
1.1. Enfermedad Inflamatoria Intestinal	1
1.2. Epidemiología	5
1.3. Etiopatogenia	7
1.3.1. Factores Ambientales	8
1.3.2. Factores Inmunológicos	10
1.3.3. Factores Genéticos	14
1.3.3.1. Polimorfismos de Nucleótido Único y moléculas del sistema inmune	16
1.3.3.1.1. IL-23R	16
1.3.3.1.2. IL-10	18
1.3.3.1.3. NOD-2	20
1.3.3.1.4. ATG16L1	23
1.4. Genética de poblaciones: Equilibrio de Hardy-Weinberg	26
2. Justificación	28
3. Hipótesis	28
4. Objetivos	28
4.1. Objetivo General	28
4.2. Objetivos Particulares	29
5. Plan General de Trabajo	29
6. Metodología	30
7. Resultados	33
8. Discusión	41
9. Conclusiones	53
10. Referencias	54

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.
C	Citocina, base pirimidínica.
CARD	<i>Caspase activation and recruitment domains</i> . Dominio de reclutamiento de caspasas.
CCD	<i>Coiled-Coil-Domain</i> .
CD	Células Dendríticas.
Chr	<i>Chromosome</i> . Cromosoma.
CP	Células Paneth.
CU	Colitis Ulcerativa.
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> . Ácido desoxirribonucleico.
EC	Enfermedad de Crohn.
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal. IBD, <i>Inflammatory Bowel Disease</i> .
FAM	Fluorocromo 5-Carboxyfluoresceína.
G	Guanina, base púrica.
GALT	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i> . Tejido linfoide asociado a intestino.
GlcNAc	N-acetilglucosamina.
GLI	Glicina.
GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i> . Estudios de Asociación de Genoma Completo.
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> . Antígeno humano leucocitario.
HWE	<i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i> . Equilibrio de Hardy-Weinberg.
IFN	Interferón.
IC	Intervalo de Confianza.
IL	Interleucina.
IKK	<i>Inhibitors of IκB kinase</i> . Inhibidor de I κ B cinasa.
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social.
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
IRGM	<i>Innate immunity related GTPase family M</i> . Gen que codifica proteínas de autofagia.
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado.
LP	Lámina Propia.
LPS	Lipopolisacárido.
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i> . Repetición Rica en Leucinas.
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> . Proteín-cinasas activadas por mitógenos.
MDP	Muramil dipéptido.

MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> . Complejo Principal de Histocompatibilidad.
MLN	<i>Mesenteric lymph nodes</i> . Ganglios linfáticos mesentéricos.
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i> .
MurNAc	Ácido N-acetilmurámico.
NBD	<i>Nucleotide-binding domain</i> . Dominio de unión a nucleótidos.
NEMO	<i>NF-kappa-B essential modulator</i> .
NF- $\kappa\beta$	<i>Nuclear Factor</i> . Factor Nuclear.
NK	<i>Natural Killer cells</i> . Células Asesinas Naturales.
NLR	<i>Nod-like receptor</i> . Receptores tipo NOD.
NOD-2	<i>Nucleotide Oligomerization Domain</i> . Dominio de oligomerización de nucleótidos.
OCTN1-2	Gen codificante de transportadores de cationes orgánicos.
OR	Odds Ratio.
p	p -value. Medida de significancia estadística.
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i> . Patrón molecular asociados a patógenos.
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> . Reacción en cadena de la polimerasa.
PGN	Peptidoglicano.
PP	Placas de Peyer.
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> . Receptor de reconocimiento de patógenos.
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.
Rip2	<i>Receptor interacting protein-2</i> . Receptor de interacción.
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> . Ácido ribonucleico.
RNA _m	<i>Ribonucleic Acid</i> . Ácido ribonucleico mensajero.
ROR γ t	<i>RAR-related orphan receptor gamma</i> .
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> . Polimorfismo de nucleótido único.
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i> . Supresor de la señalización de citocinas.
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i> . Transductor de señal y activador de la transcripción.
T	Timina, base pirimidínica.
TCR	<i>T cell receptor</i> . Receptor de linfocitos T.
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	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> . Factor de Necrosis Tumoral α .
Treg	Células T reguladoras.
UTR	<i>Untranslated Region</i> . Región no traducida.
VDR	<i>Vitamin D receptor</i> . Receptor de Vitamina D.
5-ASA	Ácido 5-aminosalicílico.
6- TGN	6 Tioguanin-nucleótido.

ÍNDICE DE FIGURAS

No. Figura	Título de la Figura	Página
Figura 1.	Clasificación y localización anatómica de la EII.	1
Figura 2.	Distribución de las formas clínicas de la EII en diferentes grupos étnicos con la EII en Estados Unidos.	7
Figura 3.	Factores involucrados en la etiopatogenia de la EII.	8
Figura 4.	Sistema inmune intestinal. Proceso de tolerancia e inflamación.	11
Figura 5.	IL-23 y su receptor de membrana.	17
Figura 6.	IL-10 y su receptor de membrana.	19
Figura 7.	Representación de la estructura del receptor NOD-2.	22
Figura 8.	Proceso de autofagia.	24
Figura 9.	Relación entre las frecuencias genóticas y alélicas en una población en Equilibrio de Hardy-Weinberg.	26
Figura 10.	Mapa de la Zona Metropolitana del Valle de México.	31
Figura 11.	Diagrama representativo de la genotipificación del SNP rs11209026.	33
Figura 12.	Frecuencias alélicas reportadas a nivel mundial para los SNPs presentes en IL23R, IL10, NOD2 y ATG16L1.	42

ÍNDICE DE TABLAS

No. Tabla	Título de la Tabla	Página
Tabla 1.	Clasificación de Montreal 2005 de la EII.	3
Tabla 2.	Tratamiento utilizado para inducir remisión en la EII de acuerdo a su forma clínica	5
Tabla 3.	Clasificación de la EII de acuerdo a los genes involucrados en su patogénesis según diferentes estudios de asociación.	15
Tabla 4.	Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs presentes en IL23R, NOD2, IL10 y ATG16L1 en población abierta.	34
Tabla 5.	Poder Estadístico calculado para la asociación de SNPs con la Enfermedad Inflamatoria Intestinal.	35
Tabla 6.	Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs presentes en IL23R, IL10, NOD2 y ATG16L1 en población control y pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.	36
Tabla 7.	Características clínicas de los pacientes con EII.	37
Tabla 8.	Modelos Genéticos y distribución genotípica en pacientes con EII y controles.	38
Tabla 9.	Frecuencias del alelo menor de los SNPs presentes en IL23R, IL10, NOD2 y ATG16L1 en pacientes con EII y controles.	39
Tabla 10.	Análisis fenotípico de los SNPs rs1800896 y rs3024505 presentes en IL10 en pacientes con Colitis Ulcerativa.	40

RESUMEN

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) se caracteriza por la presencia de inflamación crónica en el tracto gastrointestinal debido a diversos factores entre los que se destaca una desregulación de la respuesta inmune en individuos genéticamente susceptibles. La EII incluye dos formas clínicas: la Colitis Ulcerativa (CU) y la Enfermedad de Crohn (EC). En México existen pocos estudios sobre la patogenia y la epidemiología de la EII, pero se ha reportado un aumento en la incidencia de este padecimiento en los últimos años.

Entre los factores genéticos involucrados, se encuentran diversos polimorfismos de nucleótido único (SNP) que han mostrado relevancia en la susceptibilidad y progresión de la EII. Es así como los SNPs rs11209026A localizado en el gen de IL23R, rs2066844T y rs2066845C presentes en la región codificante del gen NOD2, rs1800896G y rs3024505T presentes en el gen que codifica para IL10, y rs2241880G localizado en el gen de ATG16L1; han sido fuertemente asociados con la EII. Estos SNPs podrían estar implicados en cambios de la expresión génica y en los niveles de proteína de estas moléculas que impactan en la progresión de la enfermedad.

En este trabajo se realizó la identificación de los SNPs presentes en los genes de IL23R, NOD2, IL10, y ATG16L1 para establecer las frecuencias de los mismos y su posterior asociación con protección o susceptibilidad al desarrollo de EII, utilizando para ello el sistema de PCR en tiempo real por Sondas TaqMan®. Se genotipificaron 93 pacientes con diagnóstico de EII y 200 individuos no relacionados como controles.

Se estableció una asociación significativa entre el genotipo AG del rs1800896 presente en el gen de IL10 con un mayor riesgo de presentar EII ($p=0.001$); el análisis con las formas clínicas, estableció esta misma asociación con el riesgo de desarrollar CU ($p=0.005$) y EC ($p=0.026$), en tanto que el genotipo AA se asoció negativamente con la EII ($p=0.003$), y de igual manera con CU ($p=0.011$) y EC ($p=0.038$). A nivel alélico, se identificó el alelo G con un mayor riesgo de presentar CU ($p=0.043$), pero no con la EC. El SNP rs3024505 presente en el mismo gen, mostró asociación con el riesgo a desarrollar EII cuando está presente el alelo T ($p=0.048$), esta misma asociación se estableció para la CU ($p=0.011$); además, este alelo se asoció con el inicio de CU a una edad temprana (0 a 16 años) ($p=0.033$) y se demostró que existe una mayor frecuencia de individuos portadores de este alelo que son tratados con esteroides ($p=0.019$). El análisis a nivel genotípico y alélico de los SNPs presentes en IL23R, NOD2 y ATG16L1 no mostraron diferencias estadísticamente significativas para determinar la asociación con la EII.

En este trabajo se describe por primera vez la frecuencia relativa de diversos SNPs en moléculas del sistema inmune y su asociación con protección o susceptibilidad en el desarrollo de las formas clínicas de la EII en una muestra de población de origen mexicano.

ABSTRACT

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a multifactorial disease characterized by chronic intestinal inflammation, generated, at least in part, by a dysregulation of the immune system, in genetically susceptible individuals. This pathology includes two clinical forms: Crohn's disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC), which are distinguished by each other for their location and severity. In Mexico, there are few studies about the pathogenesis and epidemiology of IBD in spite of the increase in incidence of this disease in the last 10 years.

Among the genetic factors involved in the etiology of IBD, several single nucleotide polymorphisms (SNPs) have become associated with protection or susceptibility to development of both CD and UC. Thus, SNPs rs2066844(C/T) and rs2066845 (G/C) present in the coding region of NOD2, rs11209026 (G/A) present in the gene of IL-23R, rs2241880 (A/G) in ATG16L1, and rs1800896A/G and rs3024505C/T present in the gene coding for IL-10, are strongly associated with IBD susceptibility. These SNPs could be implicated in expression changes both at transcript level as well as at protein level with consequences on the outcome of the disease.

In this study, several SNPs were identified by real-time PCR (TaqMan probes) in order to establish its association with IBD in a Mexican population. SNPs present in genes of IL23R, IL10, NOD2 and ATG16L1 were genotyped in a group of 93 patients diagnosed with IBD and 200 individuals with no history of IBD as controls.

The AG genotype for SNPs rs1800896 was associated with risk of both UC and CD ($p=0.005$ and $p=0.026$, respectively) whereas AA genotype was negatively associated with IBD ($p=0.011$ for UC, and 0.038 for CD). For this SNP, G allele was also associated with risk of UC ($p=0.043$) but not with CD. For the SNP rs3024505, T allele was associated with UC ($p=0.011$). Moreover, presence of this allele was associated with early onset of UC ($p=0.033$) and with the use of steroid treatment ($p=0.019$). No significant differences for IL23R (rs11209026), rs2066844 and rs2066845 (NOD2) and ATG16L1 (rs2241880) were found between cases and controls. The TT and CC genotypes for rs2066844 and rs2066845, respectively, were not present in the Mexican population evaluated.

This work describes for the first time in a representative cohort of Mexican population, the relative frequency of several SNPs in molecules of the immune system and its association with protection or susceptibility for CD and UC.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad Inflamatoria Intestinal

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) pertenece a una serie de patologías inflamatorias de etiología desconocida (Yamamoto-Furusho, 2010), cuya característica principal es la presencia de inflamación crónica en el tracto gastrointestinal debido a una desregulación de la respuesta inmune en individuos genéticamente susceptibles. La EII incluye dos formas clínicas: la Colitis Ulcerativa y la Enfermedad de Crohn (Figura 1). El curso clínico de la EII consiste en periodos alternos de inactividad (fase de remisión) y actividad de diferente intensidad (brotes o recidivas) (Gassull, et al., 2007). Su importancia radica en el deterioro de la calidad de vida de quienes la padecen y el alto riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (Sepúlveda, et al., 2008).

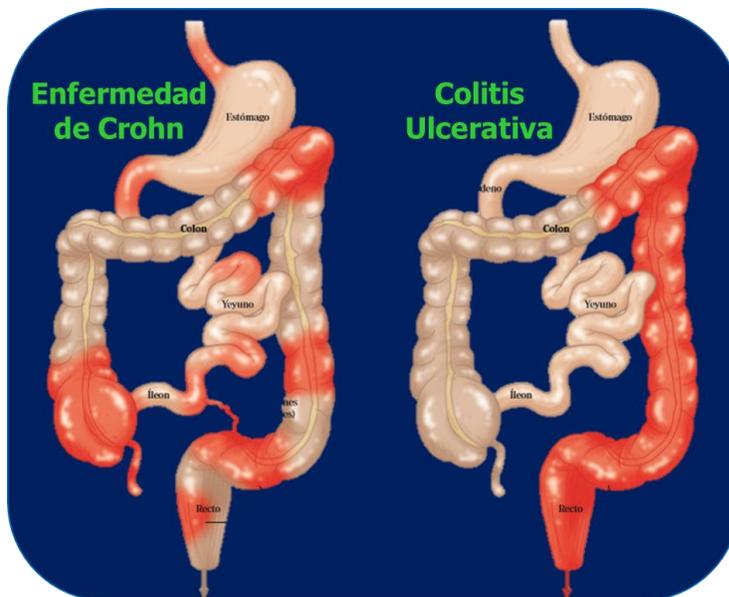


Figura 1. Clasificación y localización anatómica de la EII (<http://www.cun.es/material-audiovisual/infografia/enfermedad-inflamatoria-intestinal>, 2016).

La Enfermedad de Crohn (EC) se caracteriza por presentar un patrón discontinuo de inflamación, afectando cualquier zona del tracto digestivo desde la boca hasta el ano; el íleon terminal es el área que presenta mayor frecuencia de este padecimiento. Se considera una enfermedad transmural debido a que la inflamación altera todas las capas de la pared intestinal: mucosa, submucosa, muscularis externa y capa serosa. La afección transmural tiene como complicaciones la aparición de fístulas y estenosis (engrosamiento de la luz intestinal) (Couto, et al., 2009). Por otro lado, la Colitis Ulcerativa (CU) afecta la mucosa del intestino grueso, presenta un patrón de inflamación continuo que inicia en el recto y se extiende hasta el colon descendente (Aguilera, 2004; Gassull, et al., 2007).

Los síntomas más frecuentes tanto de la EC como de la CU son mala absorción, diarrea, sangrado rectal, fiebre, dolor abdominal y pérdida de peso (Yamamoto-Furusho y Fonseca-Camarillo, 2015). Ambas patologías pueden presentar manifestaciones extraintestinales como dolor articular, artralgias, uveítis, aftas bucales, úlceras cutáneas, etc.

El diagnóstico inicia con la sospecha clínica y precisa de la combinación de una serie de criterios clínicos, endoscópicos, radiológicos, histológicos y serológicos que son sugestivos; al mismo tiempo se descartan enfermedades que puedan cursar con una clínica similar (Couto, et al., 2009).

En los últimos años se estableció la clasificación de estas enfermedades tomando en cuenta variables que permanecen constantes en los pacientes como la extensión, gravedad, comportamiento de la enfermedad entre otras; sin embargo, la EII es evolutiva en el tiempo y presenta sucesivas complicaciones, por lo que cada paciente puede cambiar su clasificación a lo largo de su vida. La clasificación de Montreal ha estratificado tanto a la EC como a la CU de acuerdo a estas variables (Saro, 2008) (Tabla 1).

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

ENFERMEDAD DE CROHN				
A (Age) Edad al Diagnóstico	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 úlcera 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.				

Aproximadamente el 50 % de los pacientes con EII presentan síntomas leves con baja prevalencia de recaídas, hospitalizaciones y complicaciones; mientras que otros pacientes tienen un curso más grave y pueden desarrollar complicaciones que requieren cirugía (Aguilera, 2004). El objetivo principal del tratamiento es inducir y mantener el periodo de remisión y prevenir la recaída mejorando la calidad de vida con los mínimos efectos secundarios (Sepúlveda, et al., 2008).

Actualmente el tratamiento de la EII comprende el uso de antiinflamatorios, inmunomoduladores y agentes biológicos:

a) Aminosalicilatos

La Mesalazina es el aminosalicilato más utilizado en el tratamiento de la EII; tiene en su estructura química la molécula del ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) como principio activo y un enlace azo que evita su absorción en el intestino delgado permitiendo su llegada intacta al colón. El mecanismo de acción implica la inhibición de la vía de la cicloxigenasa y lipoxigenasa en el metabolismo del ácido araquidónico disminuyendo la síntesis de prostanglandinas E y F, troboxano A2 y leucotrieno B4 (Medina, et al., 2014).

b) Corticoesteroides

Los corticoesteroides fueron los primeros fármacos en utilizarse para tratamiento de la EII. Los más utilizados son la prednisona y la prednisolona. El mecanismo de acción depende de la afinidad hacia su receptor específico iniciando un efecto antiinflamatorio promovido por la inhibición del ácido araquidónico y la producción de eicosanoides; los corticoesteroides sistémicos son muy efectivos para controlar la enfermedad activa, induciendo la remisión en un 60-90% de los casos, del tal manera que un 35% de los pacientes pueden llegar a ser eventualmente corticodependientes (Medina, et al., 2014).

c) Inmunomoduladores

La azatioprina y su metabolito mercaptopurina son análogos de las purinas y los inmunomoduladores más utilizados en la actualidad. La azatioprina es un profármaco que es convertido en mercaptopurina, la cual es metabolizada enzimáticamente formando el 6 tioguanin-nucleótido (6-TGN) al cual se le atribuye el efecto terapéutico teniendo un efecto antagonista sobre las purinas inhibiendo así la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, y por tanto la proliferación celular; son indicados para el tratamiento de fistulas y de la corticodependencia (Yamamoto-Furusho, 2013; Medina, et al., 2014).

d) Agentes Biológicos

Existen varios agentes biológicos que antagonizan a la molécula TNF- α y que se han utilizado para el tratamiento de diversas enfermedades como artritis reumatoide, psoriasis, espondilitis anquilosante, etc. Estos agentes biológicos son representados por Infliximab y Adalimumab, que son anticuerpos monoclonales anti-TNF α y actúan uniéndose tanto a la forma soluble como a la forma transmembranal del TNF- α , inhibiendo el efecto inflamatorio y la producción de otros mediadores inflamatorios (Yamamoto-Furusho, 2012, 2013).

Se ha observado en estudios de cohorte que poco más del 50% de los pacientes con EC requieren tratamiento con corticoesteroides para inducir la remisión; mientras que, en la CU la remisión se logra con aminosalicilatos en alrededor del 50 al 70% de los pacientes (Rogler, et al., 2012) (Tabla 2).

Tabla 2. Tratamiento utilizado para inducir remisión en la EII de acuerdo a su forma clínica (Rogler, et al., 2012).

EC	CU
≈ 50% Corticoesteroides	≈ 70% Aminosalicilatos
≈ 25% Aminosalicilatos	≈ 12% Corticoesteroides
15% Azatioprina/6-Mercaptopurina	10% Azatioprina/6-Mercaptopurina
10% Agentes Biológicos (Infliximab/Adalimumab)	5% Agentes Biológicos (Infliximab/Adalimumab)

1.2. Epidemiología

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, por ejemplo las diferencias étnicas y la localización geográfica del paciente (Sandoval y Bosques, 2008).

Establecer los valores de incidencia y prevalencia de EII ha sido un reto debido a al sesgo en los criterios de diagnóstico y a los escasos registros prospectivos, sin embargo, conforme aumenta el interés en estas enfermedades y en el desarrollo de diversos protocolos de investigación, se ha recabado una mayor cantidad de información que proporciona datos aproximados del comportamiento a nivel mundial de estos padecimientos (Gassull, et al., 2007).

En general la prevalencia de la EII es 100 pacientes por cada 100,000 habitantes a nivel mundial, con 10,000 nuevos casos diagnosticados anualmente. En cuanto a la incidencia, para la CU es mayor en la mayoría de los países que para la EC (Yamamoto-Furusho, 2015). Tradicionalmente se hablaba de 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; observándose una mayor incidencia en los países con mayor desarrollo industrial y urbanización; sin embargo, estas diferencias también pueden observarse por los criterios utilizados para realizar el diagnóstico (Aguilera, 2004; Ananthakrishnan, 2015).

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 (Aguilera, 2004). Globalmente la tasa de incidencia de la CU en países occidentales se estima de 0.5 a 24.5 pacientes por 100,000 habitantes; mientras que la incidencia para la EC se estima de 0.1 a 16 pacientes por 100,000 habitantes (Rodríguez, 2001; Gassull, et al., 2007; Sandoval y Bosques, 2008; Yamamoto-Furusho, 2015).

En cuanto a las diferencias étnicas, las enfermedades inflamatorias intestinales presentan mayor frecuencia entre poblaciones caucásicas (Basu, et al., 2005; Yamamoto-Furusho, 2015).

A nivel Latinoamérica existen pocos estudios publicados sobre la incidencia y prevalencia y los datos reportados en México son escasos y no son concluyentes (Rodríguez, 2001). Basu y colaboradores sugieren una mayor frecuencia de CU en población mexicoamericana comparada con otras etnias donde observan una mayor frecuencia de EC (Figura 2). Por otra parte un estudio realizado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán reportó que en la última década se observó un aumento de casos nuevos diagnosticados por año comparado con la década anterior (Yamamoto-Furusho, 2009) y que tanto mujeres como hombres son afectados de manera similar (Gassull, et al., 2007; Yamamoto-Furusho, 2010), con una distribución bimodal respecto a la edad de incidencia con un pico entre la edad de 15-25 y un segundo pico entre los 55-65 años (Rodríguez, 2001; Yamamoto-Furusho, 2010).

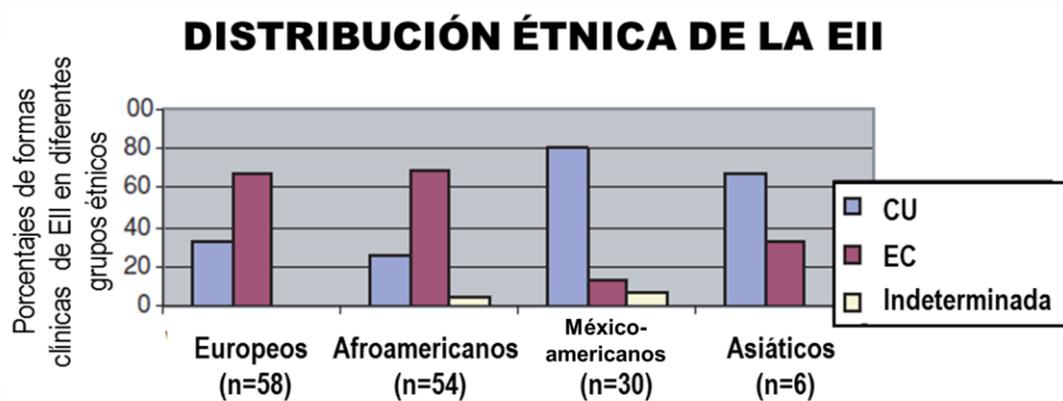


Figura 2. Distribución de las formas clínicas de la EII en diferentes grupos étnicos con la EII en Estados Unidos (Basu y cols, 2005).

1.3. Etiopatogenia

La etiología de la EII no se ha comprendido completamente, siendo clasificada como una enfermedad multifactorial, no obstante, los estudios epidemiológicos sugieren la participación de una serie de factores ambientales, inmunológicos y genéticos (Figura 3), los cuales han permitido conocer la heterogeneidad de la enfermedad.

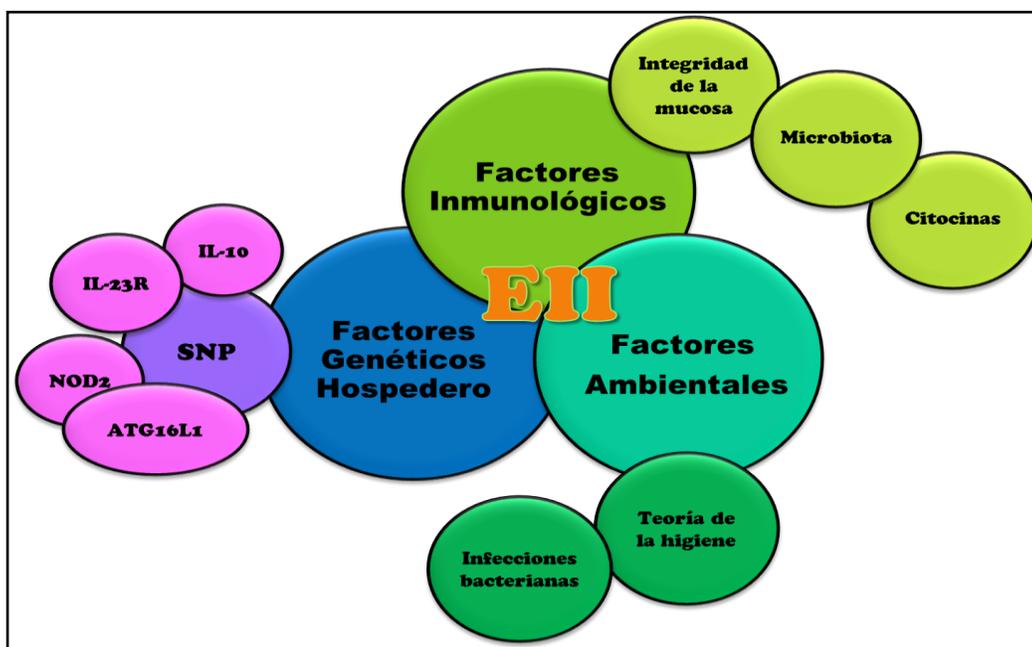


Figura 3. Factores involucrados en la etiopatogenia de la EII.

1.3.1. Factores Ambientales

Muchos han sido hasta ahora los factores ambientales relacionados con la EII y algunos de estos se comportan de manera diferente en la CU y EC. Los agentes infecciosos, la dieta, el consumo de tabaco, la apendicetomía y la toma de anticonceptivos orales son los factores que más frecuentemente se han asociado con la EII (Gassull, et al., 2007; Yamamoto-Furusho, 2015).

Se han propuesto diversos factores infecciosos como desencadenantes de la EII: *Mycobacterium paratuberculosis*, *Pseudomonas*, *Listeria* y el virus del sarampión han sido sugeridos como causales de la EC, mientras que especies de *Bacillus*, *E. coli* y *Fusobacterium varium* han sido relacionadas con el desarrollo de CU, aunque no se ha demostrado de manera convincente su relación con la etiopatogenia de estas enfermedades (Bueno-Hernández, et al., 2015; Yamamoto-Furusho, 2015).

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 maduro a generar respuestas cruzadas frente a autoantígenos (Lidar, et al., 2009).

En este sentido, la hipótesis de la higiene propone que la falta de exposición a agentes microbianos durante la infancia predispone el desarrollo de la EII (Cho, 2008). 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 las exposiciones ambientales o diferencias en los estilos de vida (Thompson y Lees, 2011).

El primer factor ambiental asociado a la EII fue el tabaco, ya que se piensa que su efecto está relacionado con la modulación de la composición de la microbiota intestinal, de la respuesta inmune y la generación de radicales libres por estrés oxidativo (Cosnes y Seksik, 2009; Nikfar, et al., 2010; Yamamoto-Furusho, 2015).

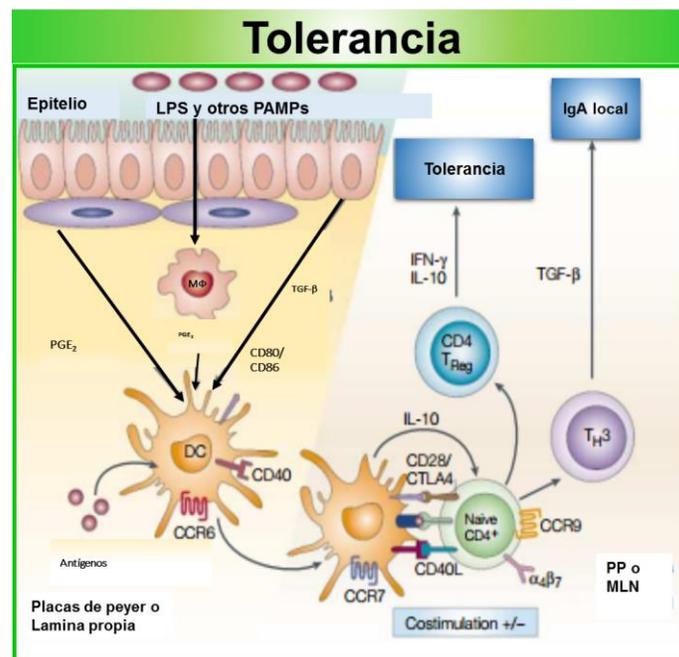
Así mismo se ha propuesto que la apendicetomía tiene efectos inmunomoduladores que confieren cierta protección contra la EII, posiblemente debido a que el apéndice está compuesto mayoritariamente por tejido linfoide y su extirpación puede alterar el equilibrio entre células T reguladoras y efectoras (Yamamoto-Furusho, 2010).

En cuanto a la dieta, su composición varía dependiendo del sexo, edad, localización geográfica, nivel socioeconómico, costumbres y gustos de cada individuo, por lo que existen diversas formas de alimentación que modifican la composición de la microbiota intestinal y por esto la alimentación previa al desarrollo de la enfermedad representa un factor de riesgo (Yamamoto-Furusho, 2010; Bueno, et al., 2012; Yamamoto-Furusho, 2015).

1.3.2. Factores Inmunológicos

El sistema inmune intestinal es considerado un sistema complejo, constituido por el tejido linfoide asociado a intestino (GALT). El GALT puede dividirse en dos tipos de compartimentos: los tejidos linfoides organizados como las Placas de Peyer (PP), los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN, por sus siglas en ingles) y folículos linfoides aislados; responsables de la fase de inducción de la respuesta inmune y por otra parte los sitios efectores: linfocitos dispersos en el intestino y la Lámina Propia (LP), que son los encargados de llevar a cabo la respuesta inmune (Mowat, 2003).

El tracto gastrointestinal constituye una extensa superficie mucosa que favorece una amplia área de contacto y la absorción de nutrientes (Sepúlveda, et al., 2008). Los componentes del intestino interactúan no solo con antígenos provenientes de los alimentos, sino que además hospedan una gran cantidad de diferentes microorganismos (10^{15}) (Gassull, et al., 2007; Fonseca-Camarillo y Yamamoto-Furusho, 2015) por esta razón el sistema inmune tiene que distinguir entre antígenos inofensivos y antígenos invasivos, generando adecuadas respuestas de inflamación o tolerancia (Figura 4).



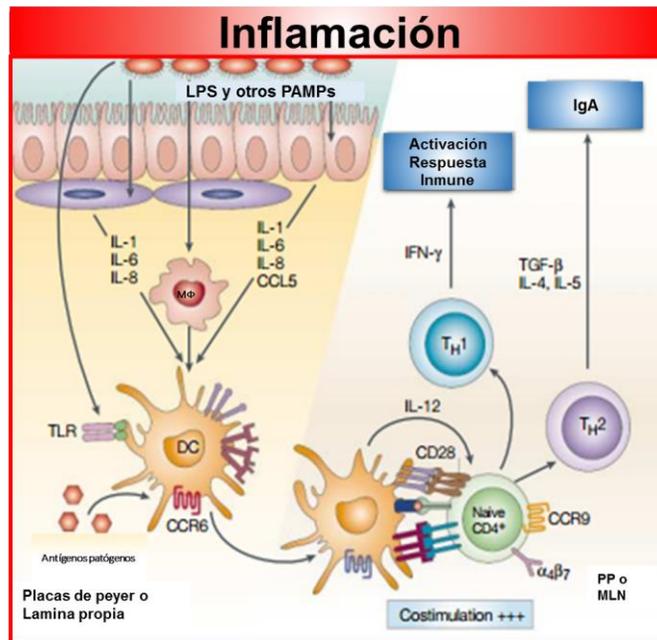


Figura 4. Respuesta inmune intestinal. Proceso de tolerancia e inflamación (Mowat, 2003).

La respuesta inmunológica en la EII es compleja y se piensa que la pérdida de la función del sistema inmune intestinal y la falta de tolerancia inmunológica frente a la microbiota intestinal son componentes fundamentales en la patogénesis de esta enfermedad (Sepúlveda, et al., 2008; Fonseca-Camarillo y Yamamoto-Furusho, 2015).

La respuesta inmune innata en el intestino esta mediada por la barrera epitelial; el epitelio intestinal consiste en una capa de células especializadas responsables de la absorción dispuestas en microvellosidades, permanecen unidas por uniones estrechas, asegurando el paso selectivo de moléculas microscópicas, iones y microorganismos seleccionados (Mowat, 2003). Las principales poblaciones celulares que se pueden encontrar son: los enterocitos, responsables del transporte de nutrientes; las células caliciformes, encargadas de la producción de moco; y las Células Paneth (CP), que secretan péptidos antimicrobianos y se encuentran en la base de las criptas intestinales (Fonseca-Camarillo y Yamamoto-Furusho, 2015).

En condiciones fisiológicas normales, los antígenos de la luz intestinal son constantemente monitoreados por Células Presentadoras de Antígeno (APC), especialmente por Células Dendríticas (DC) localizadas tanto en los folículos linfoides como en las PP; estas células reciben los antígenos procedentes de las células M y los presentan a las células T naive que en condiciones normales y en ausencia de moléculas estimuladoras generan una respuesta de tolerancia por medio de un proceso de anergia o supresión de células efectoras potencialmente reactivas (Mowat, 2003).

El reconocimiento antigénico ocurre a través de la detección de los PAMPS (patrones moleculares asociados a patógenos) que a su vez son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Los principales PRR en el intestino son los receptores tipo Toll (TLR, *Toll*) y NOD. El reconocimiento del ligando de estos receptores promueve la activación de la respuesta inmune y por tanto la producción de citocinas y mediadores inflamatorios. En condiciones normales los PRR mantienen la homeostasis intestinal mientras que en la enfermedad inducen la inflamación crónica persistente y descontrolada contra la microbiota intestinal y los agentes patógenos (Abreu, et al., 2005; Fonseca-Camarillo y Yamamoto-Furusho, 2015).

La activación de la respuesta inmune desencadena la producción de citocinas, la respuesta celular a estos polipéptidos implica cambios en la expresión génica de células blanco. En la EII se ha observado un aumento en la producción de citocinas pro inflamatorias y una disminución en citocinas reguladoras (Yamamoto-Furusho, 2010).

Los avances en la investigación sobre la participación de los factores inmunológicos en la etiología de la EII han permitido proponer nuevas moléculas implicadas en la respuesta inmune y se han clasificado en: Integridad y barrera epitelial, receptores de la inmunidad innata, citocinas y linfocitos T reguladores (Shih y Targan, 2009; Fonseca-Camarillo y Yamamoto-Furusho, 2015).

a) Integridad y Barrera Epitelial

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 (Podolsky, 2002).

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. El defecto en la barrera intestinal conlleva a un aumento en la permeabilidad intestinal y por tanto a un exceso de presentación antigénica (Podolsky, 2002).

b) Receptores de la Inmunidad Innata

La inmunidad innata se basa en el reconocimiento de los PAMP's por receptores PRR, 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 DC dando lugar a la presentación de antígenos a las células T (Siegmund y Zeitz, 2011).

En un entorno particular de citocinas las DC 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) (Siegmund y Zeitz, 2011).

c) Citocinas

Muchos estudios realizados aislando las células mononucleares de la lámina propia de pacientes con EC, han mostrado niveles altos de citocinas caracterizando el proceso inflamatorio crónico que se desarrolla en el intestino: IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-8, IL-21, IL-23, etc. Actualmente los tratamientos están basados en contrarrestar la respuesta inflamatoria, tratamientos basados en el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra TNF- α (Siegmund y Zeitz, 2011).

d) Linfocitos 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, et al., 2011).

Varias observaciones experimentales indican que una respuesta inmune alterada de la mucosa es de importancia en la patogénesis de la EII. Esta reacción está dirigida contra antígenos producidos por microorganismos que residen normalmente en el intestino, la estimulación antigénica masiva da lugar a una infiltración extensa de la mucosa intestinal que desarrolla un estado de inflamación (Lidar, et al., 2009; Kaser, et al., 2010).

1.3.3. Factores Genéticos

Con el conocimiento del genoma humano y los estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) se han identificado más de 50 genes y más de 5 millones de polimorfismos de nucleótido único (SNP, por sus siglas en inglés) involucrados en la patogénesis de la EII. Estos se han clasificado según su localización en nueve diferentes loci, denominándose IBD 1 a 9 (Yamamoto-Furusho, 2010; Yamamoto-Furusho y Sánchez, 2015) (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de la EII de acuerdo a los genes involucrados en su patogénesis según diferentes estudios de asociación (Rodríguez-Bores, et al., 2007).

REGIÓN	LOCALIZACIÓN	GENES
IBD 1	Chr 16	NOD2, IL4R
IBD 2	Chr 12	VDR, STAT6, IFN γ
IBD 3	Chr 6	MHC clase I, II y III
IBD 4	Chr 14	TCR
IBD 5	Chr 5	OCTN, IL6, CD14
IBD 6	Chr 19	Tromboxano A2
IBD 7	Chr 1	TGF β , Receptor de TNF α
IBD 8	Chr 16	En investigación
IBD 9	Chr 9	CCT5, CCR9, IL12

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. Algunos de estos estudios mostraron que la concordancia en la EC en gemelos era del 58 % para monocigotos y el 4 % para dicigotos, indicando que los factores genéticos desempeñan un papel importante. Para el caso de la CU los porcentajes de concordancia fueron menores, 10 % y 3 % para gemelos monocigóticos y dicigóticos, respectivamente; sugiriendo un menor impacto genético en comparación con la EC (Peeters, et al., 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 la enfermedad. El mayor riesgo ocurre en niños donde ambos progenitores tienen EII (>30 % a la edad de 28 años) (Orholm , et al., 1991).

Actualmente, se está llevando una estrategia para la búsqueda de nuevos factores genéticos de susceptibilidad, en una colaboración internacional para reunir un mayor número de muestras e intentar confirmar o refutar señales sugerentes de asociación (Gassull, et al., 2007).

1.3.3.1. Polimorfismos de nucleótido único y moléculas del sistema inmune

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. 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 (Ramírez, et al., 2013).

Como se ha mencionado anteriormente el estudio de los SNPs permite encontrar asociaciones de diferentes genes involucrados con el sistema inmunológico que pueden estar vinculados con la patología de la EII (Khor, et al., 2011). 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-Furusho y Podolsky, 2007; Yamamoto-Furusho, 2007), TNF α (Sanchez, et al., 2009), TLR4 (Tsianos, et al., 2011), IL10, IL10R (Thompson y Lees, 2011), IL23R (Glas, et al., 2007), NOD2 (Kabi, et al., 2012), ATG16L (Kaser, et al., 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 (Rodríguez-Bores, et al., 2007).

1.3.3.1.1. IL-23R

La interleucina 23 (IL-23) es una citocina heterodimérica compuesta por dos subunidades, p19 (específica de IL-23) y p40 (Cummings, et al., 2007), es secretada por varios tipos de células como monocitos, macrófagos, células Th17 activadas y DC (Li, et al., 2016). Participa junto con IL-6, IL-1 y TGF- β en la activación de la respuesta Th17 (Teng, et al., 2015; Abdollahi, et al., 2016) (Figura 5).

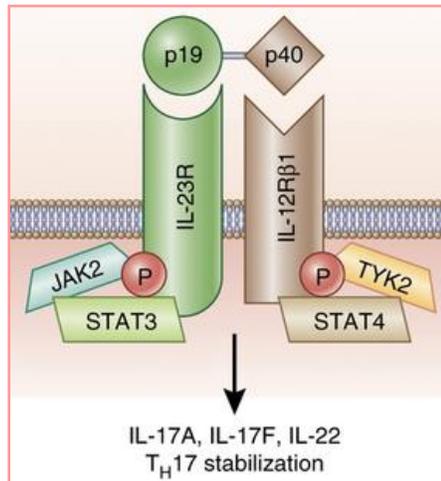


Figura 5. IL-23 y su receptor de membrana. IL-23 (p19 y p40) es captada por su receptor compuesto por IL-23R e IL-12R β 1, este reconocimiento activa la cascada de señalización JAK-STAT que promueve la producción de IL-17, IL-22 e induce la respuesta TH17 (Teng, et al., 2015).

El receptor de IL-23 (IL-23R) está compuesto por las subunidades IL-23R e IL-12R β 1; este último es parte funcional de IL-12R. Por otra parte, la subunidad IL-23R está constituida por un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio intracelular (dominio aminoácido citoplasmático 252), codificado en el cromosoma 1p31 y es altamente expresado en células T y NK, pero mínimamente expresado en monocitos, macrófagos y CD (Cummins, et al., 2007; Liu, et al., 2015).

La unión de IL-23R a su receptor activa la vía de tirosin cinasas, induciendo la fosforilación y activación del factor de transcripción STAT3 (Transductor de señal y activador de la transcripción 3), el cuál transloca al núcleo donde actúa como activador de la transcripción de genes que codifican la síntesis de citocinas como IL-6, IL-22, IL-23, IL-17A y IL-17F (Naser, et al., 2012; Teng, et al., 2015).

La función que desempeña la IL-23, es regular la actividad de células del sistema inmune y juega un papel importante en la respuesta inflamatoria frente a la infección por bacterias o virus y en combinación con IL-6, IL-1 y TGF β , induce la

expresión del factor de transcripción ROR γ t que estimula la respuesta Th17 y promueve la secreción de IL-17 (Liu, et al., 2015; Teng, et al., 2015).

La vía IL-23/IL-17 juega un papel importante en el desarrollo de inflamación crónica y en la defensa del hospedero contra microorganismos; promueve la inflamación local en tejido por estimulación de células T, macrófagos y fibroblastos, así como también en células endoteliales y epiteliales produciendo citocinas proinflamatorias, metaloproteinasas y quimiocinas (Glas, et al., 2007).

Diversos grupos de investigación han estudiado y reportado SNPs presentes en la región correspondiente a IL23R, siendo el de mayor relevancia el rs11209026, presente en el exón 9 de dicho gen, el cual afecta el dominio intracelular del receptor en la región rica en triptófano. Se ha reportado que el alelo A de este SNP reduce la función del receptor sugiriendo que la interrupción de la vía de señalización de IL-23 tiene relevancia en la fisiopatología de algunas enfermedades como espondilitis anquilosante, artritis reumatoide, psoriasis, asma, EII, entre otras (Yu, et al., 2015; Abdollahi, et al., 2016).

1.3.3.1.2. IL-10

La Interleucina 10 (IL-10) es una citocina pleiotrópica conocida por sus propiedades antiinflamatorias (Zou, et al., 2014), se codifica en el cromosoma 1q31 y tiene 5 exones. Es sintetizada por diversas poblaciones celulares como linfocitos T y B, aunque las principales células productoras son los monocitos y los macrófagos (Le, et al., 1997).

Es una citocina que desempeña un papel muy importante en la inmunoregulación y la inflamación. Suprime las funciones efectoras de macrófagos, células T y NK, inhibiendo la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-8, IL-12, IFN γ y TNF α), bloquea la maduración de DC e inhibe la expresión de moléculas HLA clase II y de moléculas coestimuladoras (Engelhardt y Grimbacher, 2014).

Los efectos antiinflamatorios contrastan con sus efectos sobre los linfocitos B, donde actúa como un factor estimulante de la proliferación celular, así como de la secreción de inmunoglobulinas y promueve el cambio de isotipo (Reyes, 2010).

En cuanto a su receptor, está formado por un tetrámero formado por dos cadenas alfa de IL-10R1 y dos cadenas beta de IL-10R2. El reconocimiento de IL-10 por su receptor activa la cascada de señalización vía tirosin cinasas (Jak1-Tyk2), proteínas que por fosforilación de sus residuos de tirosina permite el reclutamiento de STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3) en su dominio SH2 resultando en la dimerización y translocación al núcleo de este factor de transcripción, promoviendo la expresión de genes SOCS (Supresor de la señalización de citocinas), que son reguladores negativos de la síntesis de citocinas (Paul, et al., 2012; Engelhardt y Gimbacher, 2014) (Figura 6).



Figura 6. IL-10 y su receptor de membrana. El receptor de IL-10 está constituido por las subunidades IL-10R1 e IL-10R2, las cuales reconocen a la IL-10 activando la vía de señalización JAK-STAT que promueve la expresión de genes SOCS inhibiendo la síntesis de citocinas pro inflamatorias (Mosser y Zhang, 2008).

Diversas investigaciones se han enfocado en el estudio del papel que desempeña la IL-10 en la patología de enfermedades autoinmunes y recientemente en enfermedades inflamatorias crónico degenerativas, como artritis reumatoide, cáncer colorrectal, EII, entre otras (Khor, et al., 2011; Doecke, et al., 2013).

Se ha observado que ratones deficientes en la producción de IL-10 desarrollan enterocolitis de forma espontánea en condiciones libres de microorganismos dando la pauta de la importancia de la IL-10 en la patogénesis de la EII (Thompson y Lees, 2011; Paul, et al., 2012).

Mediante GWAS se han identificado una gran cantidad de genes involucrados en la EII, incluyendo IL10. La región promotora del gen es altamente polimórfica, principalmente se han reportado los polimorfismos: -1082A/G (rs1800896), -819C/T (rs1800871), y -592C/A (rs1800872) (Lv, et al., 2014).

En forma particular, el rs1800896 se ha asociado con la expresión y producción de IL-10 in vitro (Zou, et al., 2014). El rs1800896 afecta el sitio de unión para el factor de transcripción Ets modificando así la expresión de IL10 (Romero-Valdovinos, et al., 2012; Zou, et al., 2014). Se ha reportado también que el genotipo AA se asocia con bajos niveles de IL-10, AG con niveles intermedios y GG con altos niveles de citocina en la mucosa intestinal (Turner, et al., 1997; Romero-Valdovinos, et al., 2012).

Nuevos estudios han reportado la relación del rs3024505 con la susceptibilidad a la EII, este SNP se localiza en la región 3'UTR del gen y se piensa que también afecta la expresión de IL10 por regulación post-trascricional; la presencia de motivos AUUUA en secuencias ricas en AU (ARE) localizadas en la región 3'UTR podrían estar participando como desestabilizadores del RNAm afectando la traducción del gen (Le, et al., 1997; Powell, et al., 2000; Doecke, et al., 2013).

1.3.3.1.3. NOD-2

Los receptores tipo NOD (NLRs) son una familia de PRRs y localizados en el citoplasma celular (Kutikhin, 2011). NOD-2 es miembro de esta familia, el gen que codifica esta proteína se localiza en el cromosoma 16q12 que consta de 12 exones y 11 intrones (Boukercha, et al., 2015).

Esté receptor está implicado en el reconocimiento intracelular de microorganismos; se expresa en monocitos, macrófagos, CD, células epiteliales, así como en las CP presentes en la mucosa intestinal (Yamamoto-Furusho, et al., 2010; Kutikhin, 2011).

Se ha demostrado que reconoce peptidoglicano (PGN), que es el componente de la pared celular de bacterias y que participa generando señales para la respuesta inmune adaptativa (Carneiro, et al., 2004). El PGN se compone de cadenas de glicano que contienen N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc). NOD-2 ha sido implicado como un sensor general tanto para los PGN de Gram-positivas y Gram-negativas y se ha identificado el muramil dipéptido (MurNAc-L-Ala-D-isoGln) (MDP) como la estructura esencial reconocida por el receptor NOD-2, la cual es el mínimo componente bioactivo del PGN (Carneiro, et al., 2004; Yamamoto-Furusho, et al., 2010).

La detección de MDP por NOD-2, induce la producción de citocinas pro-inflamatorias, un aumento en la expresión del MHC II (Complejo principal de Histocompatibilidad clase II) en APC, además de que funciona como un adyuvante para las respuestas de células T y la producción de anticuerpos, lo que sugiere un papel importante de NOD-2 en el acoplamiento de la respuesta inmune innata y adaptativa (Carneiro, et al., 2004; Antosz y Osiak, 2013).

Por lo general, NOD-2 tiene una estructura de tres dominios. El dominio amino terminal que presenta dos dominios de reclutamiento de caspasas (CARD-CARD); el dominio central de unión a nucleótidos (NBD) y el dominio carboxilo terminal de repetición rica en leucina (LRR) (Yamamoto-Furusho, et al., 2010; Kutikhin, 2011). El dominio CARD media la interacción proteína-proteína y es caracterizado por la presencia de 6 α -hélices que forman trímeros o dímeros con otras proteínas y activan el proceso de apoptosis.

Por su parte el dominio NBD tiene una actividad de ATPasa intrínseca y es responsable de la auto-oligomerización y formación de un complejo para la activación y reclutamiento de proteínas implicadas en la señalización celular del NOD-2. Por último, el dominio LRR, es el dominio de reconocimiento de ligando (MDP), está formado por repeticiones en tándem de una unidad estructural de 20 a 30 aminoácidos que forman una estructura rica en leucina (Kutikhin, 2011; Castaño-Rodríguez, et al., 2014) (Figura 7).

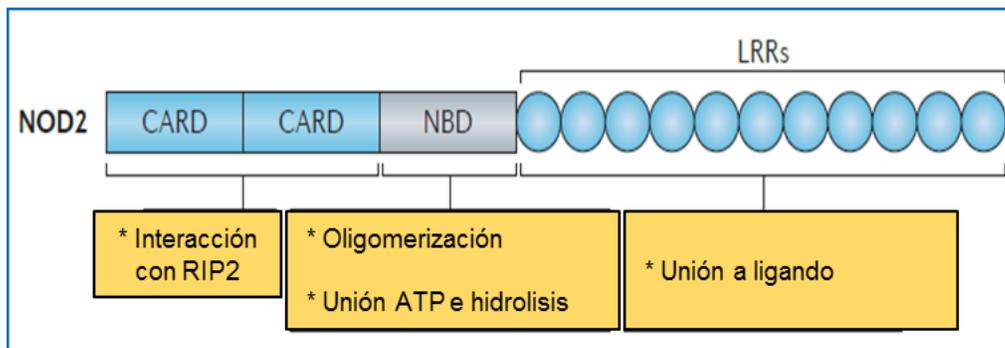


Figura 7. Representación de la estructura del receptor NOD-2. El dominio amino terminal CARD-CARD media la interacción proteína-proteína; el dominio central de unión a nucleótidos actúa como ATPasa, es responsable de la auto-oligomerización y el dominio carboxilo terminal LRR lleva a cabo el reconocimiento del MDP (Philpott, et al., 2014).

El dominio CARD de NOD-2 interactúa con el dominio CARD de una proteína adaptadora conocida como Rip2 (RICK2), Rip2 activa la ubiquitinación de IKK γ (NEMO, modulador esencial de NF κ B) y activa a su vez el complejo IKK (IkB cinasa); este complejo fosforila el inhibidor de NF κ B (IkB α), la liberación del factor de transcripción NF κ B permite su translocación al núcleo e induce la expresión de más de 200 genes, incluyendo genes que codifican la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (Carneiro, et al., 2004). Rip2 también puede activar TAK1 cinasa (factor de crecimiento transformante cinasa 1 β -activado), que puede afectar el complejo IKK, y activar MAP cinasas: p38, JNK y ERK. Como resultado se libera el factor de transcripción AP1, el cual es responsable del control de la proliferación celular, la diferenciación celular, y la apoptosis (Kutikhin, 2011; Antosz y Osiak, 2013; Zhong, et al., 2013; Jakopin, 2014).

La activación de NFκB y MAPK desencadena la síntesis de mediadores inflamatorios. IL-1β, IL-6, TNFα, IL-8, IL-18, IL-12, el óxido de nitrógeno y las moléculas de adhesión celular se producen en las CD, linfocitos, monocitos y macrófagos. Las células epiteliales producen mediadores pro-inflamatorios como el TNF-α, IL-6, IL-8, MIP2 (Proteína Inflamatoria de Macrófagos 2) y péptidos antimicrobianos (α y β-defensinas), lo que acelera significativamente la eliminación de agentes patógenos (Antosz y Osiak, 2013).

Las mutaciones presentes en el gen que codifica para NOD2 se han asociado con una mayor susceptibilidad a trastornos inflamatorios crónicos. La pérdida de la actividad de reconocimiento del receptor NOD-2 puede dar lugar a la incapacidad de la respuesta inmune en la mucosa intestinal para controlar la infección bacteriana, iniciando de este modo respuestas sistémicas y por tanto a la presencia de inflamación crónica (Carneiro, et al., 2004).

Los SNPs rs2066844TT y rs2066845CC se encuentran en la región codificante del gen NOD2 (dominio LRR) (Kutikhin, 2011) y su presencia afecta el dominio carboxilo terminal LRR y por tanto la función de reconocimiento de ligando y activación de NFκB, permitiendo la multiplicación bacteriana y disminuyendo la tolerancia inmunológica hacia los microorganismos comensales. En particular, estas mutaciones en NOD2 se encuentran asociadas con los fenotipos de la EC en cuanto a su localización (Ileón) y el comportamiento fistulizante; el genotipo CT y TT del SNP rs2066844 ha sido asociado con la susceptibilidad a padecer la EII al igual que el genotipo GC y CC del rs2066845 (Yamazaki, et al., 2002; Boukercha, et al., 2015).

1.3.3.1.4. ATG16L1

La autofagia es un proceso de degradación intracelular que permite obtener nutrientes esenciales en condiciones de inanición o estrés oxidativo, eliminar componentes citoplasmáticos tóxicos o dañados y participa principalmente en el

mantenimiento de la homeostasis celular (Naser, et al., 2012). Recientemente se ha relacionado como mecanismo de respuesta inmune innata mediante la eliminación de microorganismos por degradación lisosomal; es un proceso conservado evolutivamente (Levine y Deretic, 2007).

La autofagia puede dividirse en tres clases: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por moléculas chaperonas. La macroautofagia o llamada en general autofagia, es la más estudiada y está implicada en la regulación de la inflamación crónica (Randall-Demllo, et al., 2013). La vía de la autofagia implica la participación de aproximadamente 30 proteínas codificadas por genes de autofagia (Atg). El proceso se divide en varias etapas: inducción, nucleación, elongación, fusión lisosoma/autofagosoma y degradación (Naser, et al., 2012) (Figura 8).

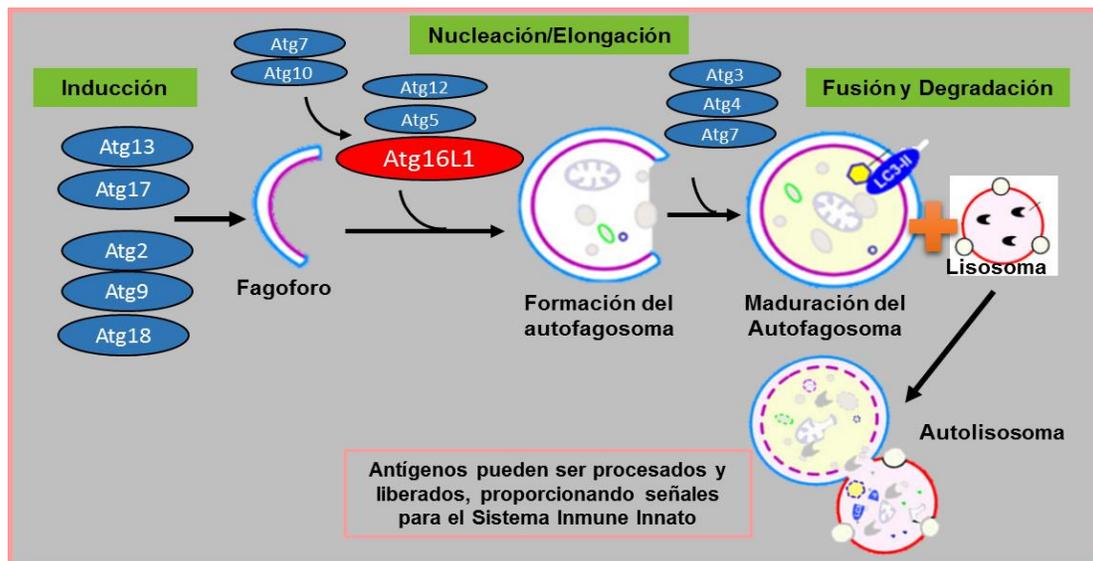


Figura 8. Proceso de autofagia. El proceso se activa con la fosforilación consecutiva de proteínas Atg (Atg13, Atg17, Atg2, Atg9, y Atg18), permitiendo la formación de una doble capa fosfolipídica (fagoforo); el proceso continúa con el reclutamiento del complejo Atg5-Atg12-ATG16L1 formando el autofagosoma; mientras que las proteínas Atg8, Atg10, Atg7 y Atg3 permiten la maduración del mismo, el cual se fusiona con lisosomas permitiendo la degradación del material secuestrado. Antígenos pueden procesarse y proporcionar señales que permitan la activación del sistema inmune (Tang, et al., 2012).

La inducción se activa principalmente por la señalización de mTORC1 (serin/treonin cinasa), en condiciones ricas en nutrientes, mTORC1 se encuentra altamente expresado inhibiendo la formación del autofagosoma; la ausencia de nutrientes inactiva mTORC1 y se activa la fosforilación de Atg13 induciendo el proceso. La segunda etapa involucra la formación de una vesícula con doble capa fosfolipídica conocida como fagóforo por reclutamiento de Atg6 y Atg14. El proceso de elongación o formación del autofagosoma implica la participación del complejo Atg5-Atg12-ATG16L1. El autofagosoma ya maduro se fusiona con lisosomas (Atg8, Atg10, Atg7 y Atg3) resultando en la degradación del material secuestrado (Múzes, et al., 2013; Randall-Demllo, et al., 2013).

Recientemente se ha planteado el concepto de inmunofagia, proceso de autofagia aplicado a la inmunidad adaptativa (homeostasis en linfocitos, procesamiento y presentación antigénica, así como eliminación de cuerpos apoptóticos) e inmunidad innata (regulación de la respuesta inflamatoria y regulación en la producción de citocinas) (Tang, et al., 2012). También se ha estudiado la participación de NOD-2 en la activación de la autofagia como un mecanismo no selectivo: para la eliminación de patógenos por degradación vía autofagosoma, activación de la respuesta inflamatoria, remoción de cuerpos apoptóticos y presentación antigénica vía MHC clase II (Tang, et al., 2012).

Estudios de asociación han identificado una relación entre los genes que participan en la autofagia y la EII (Levine y Deretic, 2007). Uno de los genes más estudiados es el ATG16L1, se encuentra localizado en el cromosoma 2q37 y es una molécula altamente expresada en colon, intestino delgado, células epiteliales intestinales, leucocitos y en bazo (Naser, et al., 2012).

El rs2241880 A/G representa una sustitución nucleotídica que da lugar a un cambio de aminoácido (treonina por alanina) en la posición 300 del exón 9 de ATG16L1 (Murthy, et al., 2014) y se ha asociado con el desarrollo de EII.

La proteína ATG16L1 se compone de tres dominios: el dominio amino terminal, que media la interacción con proteínas Atg; un dominio CCD (Dominio *Coiled-Coil*), que proporciona la capacidad de autodimerización y unión no covalente con ATG5-ATG12 y el dominio WD, que consta de siete repeticiones de triptófano y ácido aspártico (Salem, et al., 2015). La presencia del rs2241880 afecta el dominio CCD disminuyendo la capacidad de formación del autofagosoma y, por lo tanto, del proceso de autofagia y eliminación de patógenos (Cheng, et al., 2010; Naser, et al., 2012). La importancia de esta proteína radica en la participación en el complejo proteico Atg5-Atg12-ATG16L1 que inicia la formación del autofagosoma.

1.4. Genética de poblaciones: Equilibrio de Hardy-Weinberg

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 experimental. Una manera rápida de valorar la situación de la distribución de frecuencias de los genotipos estudiados es mediante el ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) (Soriquer y Morcillo, 2007) (Figura 9).

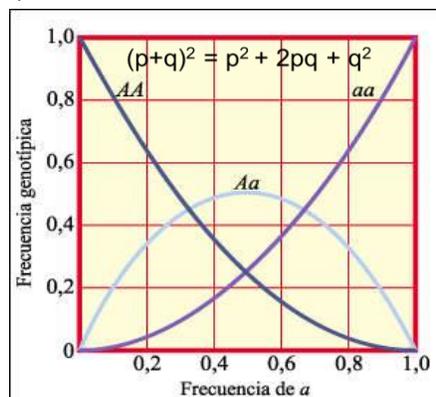


Figura 9. Relación entre las frecuencias genotípicas y alélicas en una población en Equilibrio de Hardy-Weinberg.

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 reciente.

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).

2. JUSTIFICACIÓN

Se ha observado que diversos factores genéticos del hospedero afectan la regulación de la respuesta inmune a nivel intestinal y se relacionan con el desarrollo de la EII, por lo que en este trabajo se determinó la frecuencia genotípica de diversos SNPs presentes en genes relacionados con moléculas del sistema inmune: IL23R(rs11209026), IL-10 (rs3024505 y rs1800896), NOD2 (rs2066844, rs2066845) y ATG16L1 (rs2241880), así como su asociación con el desarrollo de la enfermedad para proponerlos como posibles marcadores biológicos de la progresión clínica de la EII en población mexicana.

3. HIPÓTESIS

Si la susceptibilidad y progresión clínica de la EII está determinada por factores genéticos del hospedero que afectan la regulación de la respuesta inmune a nivel intestinal, entonces la presencia de determinados genotipos y alelos en los genes de IL-23R, IL-10, NOD2 y ATG16L1 estarán asociados con el pronóstico de susceptibilidad y progresión clínica de la EII.

4. OBJETIVOS

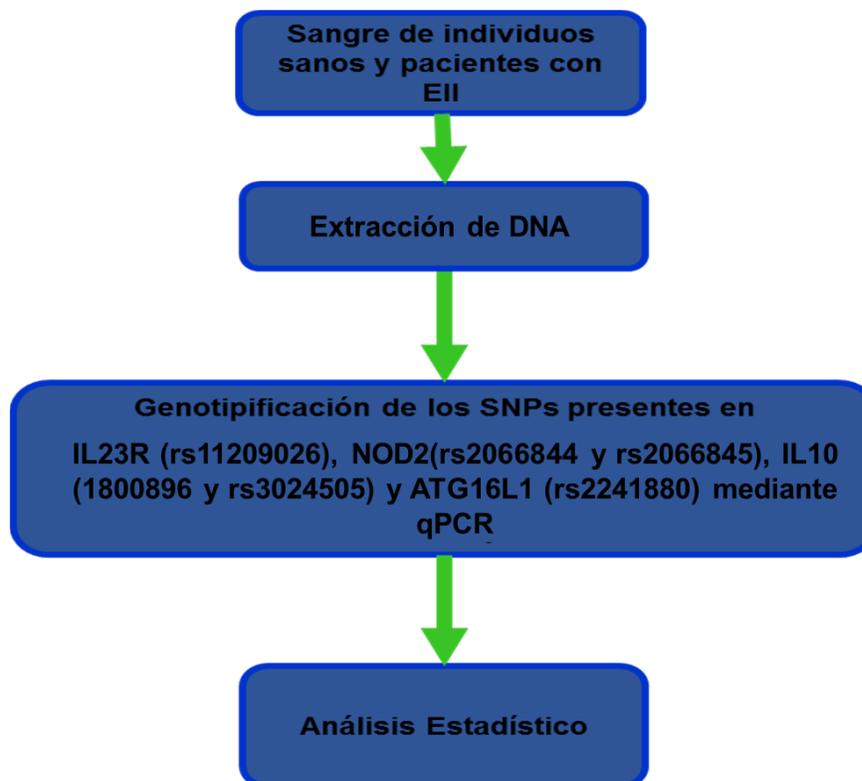
4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia genotípica de los SNPs presentes en los genes de IL23R, IL-10, NOD2 y ATG16L1 y su asociación con la susceptibilidad y la progresión clínica de la EII en población mexicana y establecer asociaciones que contribuyan para la generación un modelo predictivo de desarrollo de la enfermedad.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Seleccionar muestras de sangre completa de donadores de población abierta sin EII y de pacientes con EII del Área Metropolitana de la Ciudad de México.
- Realizar la genotipificación de los SNP de IL23R, IL-10, NOD2 y ATG16L1, en ambos grupos mediante PCR en tiempo real (qPCR).
- Determinar la frecuencia alélica y genotípica de los SNP en la población de estudio.
- Establecer la asociación estadística entre los marcadores analizados (SNPs) y la susceptibilidad en el desarrollo de la EII.

5. PLAN GENERAL DE TRABAJO



6. METODOLOGIA

Determinación de los tamaños de muestra.

De acuerdo a lo reportado por el INEGI, la población del Área Metropolitana está conformada por: la Ciudad de México, con una población de 8,851,080 habitantes; el Estado de México, con una población de 15,175,862 habitantes y Tizayuca, Hidalgo; con una población de 100,562 habitantes dando un total de 24,127,504 habitantes por lo que se requirió del análisis de 400 individuos que se establecieron como población control para alcanzar una representatividad con un nivel de confianza del 95 % y un margen de error del 5 %. En este estudio se obtuvieron muestras del periodo 2013 y 2014 que corresponden a 400 individuos sin diagnóstico médico de EII (Figura 10).

Grupos de estudio.

Se colectaron muestras de sangre completa de 400 individuos no relacionados con la enfermedad de estudio, residentes del Área Metropolitana de la Ciudad de México; estos individuos fueron tomados como población abierta para establecer las frecuencias genotípicas y alélicas en la población mexicana. De esas 400 muestras se seleccionaron 200 al azar como población control para el posterior análisis de asociación con la enfermedad. Así mismo, se colectaron 93 muestras de pacientes con diagnóstico de EII, de los cuales, 78 fueron diagnosticados de CU y 15 con EC. Estos individuos son derechohabientes de los servicios de salud otorgados por el área de gastroenterología del Hospital Regional "Lic. Adolfo López Mateos" del ISSSTE y del Hospital General Centro Médico Nacional La Raza del IMSS. Las muestras de sangre obtenidas fueron inmediatamente congeladas a -70 °C para su preservación.

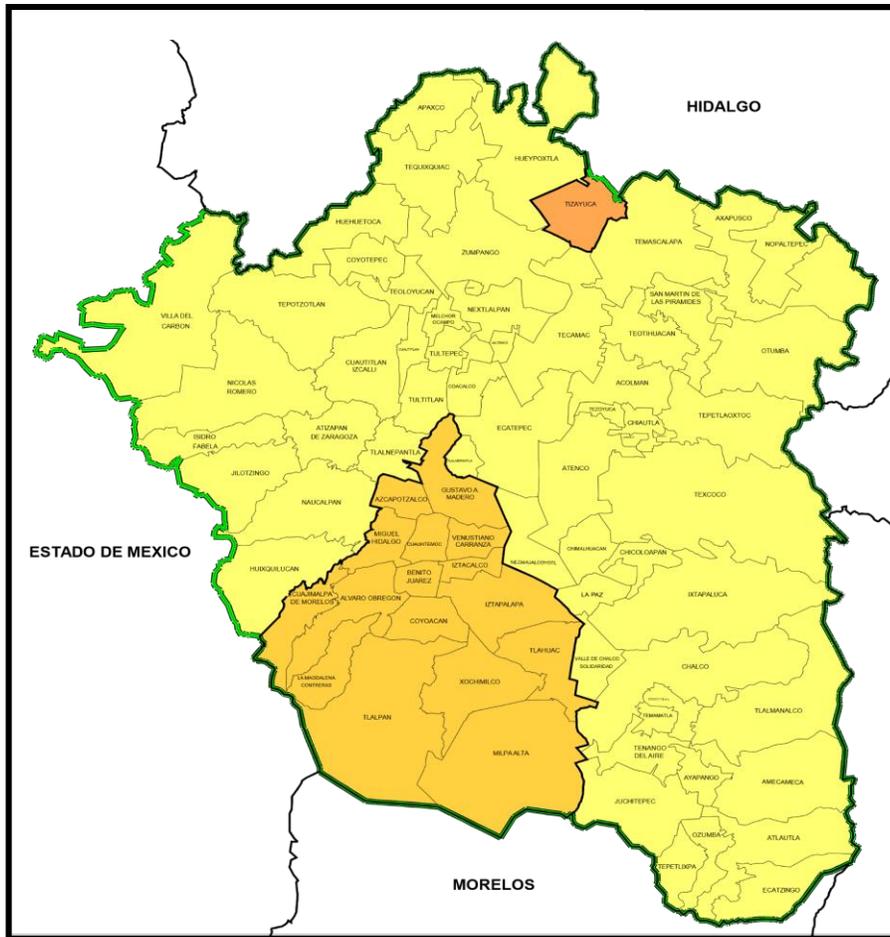


Figura 10. Mapa de la Zona Metropolitana del Valle de México; en amarillo claro están representados los municipios que conforman el estado de México, en amarillo oscuro las delegaciones de la Ciudad De México y en naranja el Municipio de Tizayuca, Hidalgo.

Genotipificación de SNPs

Se realizó la extracción de DNA a partir de muestras de sangre total mediante el uso del estuche comercial *QIAamp® DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Valencia, USA). El DNA purificado fue utilizado como molde para la amplificación de fragmentos específicos para la identificación de los SNPs rs11209026 localizado en la región promotora del gen de IL-23R, rs1800896 y rs3024505 presentes en la región promotora y región intergénica respectivamente del gen de IL-10, así como también los SNPs rs2066844 y rs2066845 localizados en la región codificante de NOD-2 y el rs2241880 localizado en la región codificante del gen de ATG16L1.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador de tiempo real Stratagene Mx3000P qPCR System (Agilent Technologies) utilizando el método TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems), para lo cual se utilizaron las siguientes sondas:

SNP	SECUENCIA	Assay ID*
rs11209026	ATTGGGATATTTAACAGATCAATCC[A/G]AACTGGGTAGGTTTTGCAGAATTT	C_1272298_10
rs1800896	TCCTCTTACCTATCCCTACTTCCCC[T/C]TCCCAAAGAAGCCTTAGTAGTGTTG	C_1747360_10
rs3024505	GGGCTGCCCAGGCAGAGCGTGAGGG[A/G]GACTAGTGTTACTCAGCTCATTTT	C_15983681_20
rs2066844	CCAGACATCTGAGAAAGCCCTGCTC[C/T]GGCGCCAGGCCTGTGCCCGCTGGT	C_11717468_20
rs2066845	CTCTTTGGCCTTTTCAGATTCTGG[C/G]GCAACAGAGTGGGTGACGAGGGGGC	C_11717466_20
rs2241880	CCCAGTCCCCCAGGACAATGTGGAT[A/G]CTCATCCTGGTTCTGGTAAAGAAGT	C_9095577_20

La reacción de PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: activación, 95 °C por 10 min; seguido por 40 ciclos de amplificación a 92 °C por 15 seg y 60 °C por 1 min y el análisis de los SNP se llevó a cabo utilizando el TaqMan Genotyper Software.

Análisis Estadístico.

Las distribuciones genotípicas y alélicas para cada SNP se encuentran representadas en porcentaje. Se realizó una prueba de χ^2 para determinar si seguían las proporciones del HWE, donde se compararon las frecuencias observadas y las esperadas de homocigotos y heterocigotos. Se realizó el estudio de asociación de los SNPs y la susceptibilidad a la EII, así como un análisis fenotípico mediante la prueba de χ^2 y tablas de contingencia, calculando el odds ratio (OR) con un nivel de confianza del 95 % utilizando los programas GraphPad Prism 5 y MedCalc 13.3.3.0. El poder estadístico se determinó con el Software QUANTO (<http://hydra.usc.edu/GxE/>).

7. RESULTADOS

Determinación de frecuencias genotípicas y alélicas en la población de estudio.

La genotificación de los SNPs rs11209026, rs2066844, rs2066845, rs1800896, rs3024505 y rs2241880 se realizó por qPCR mediante el uso de sondas TaqMan y para el análisis de los resultados se empleó el programa TaqMan Genotyper Software. En la figura 11 se muestra un diagrama representativo de la genotificación.

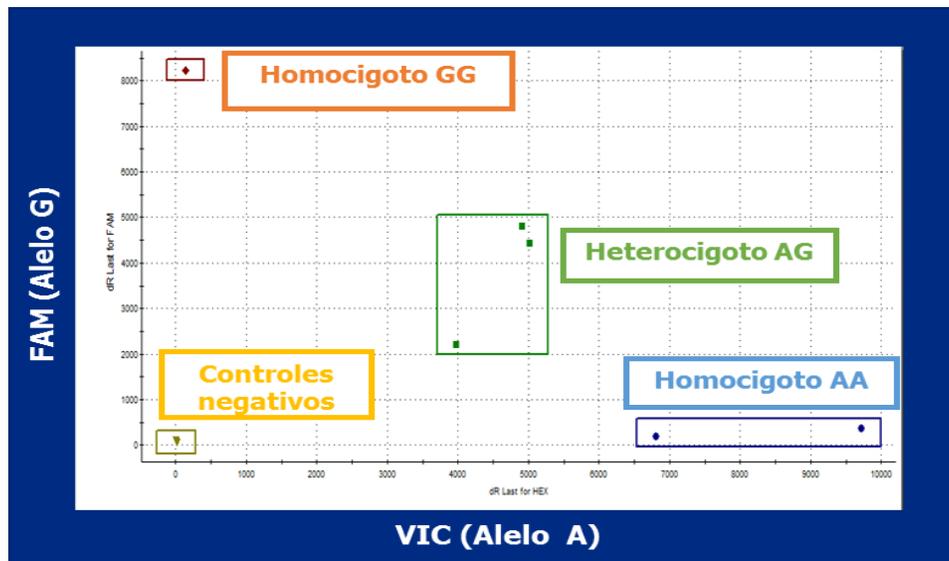


Figura 11. Diagrama de puntos obtenido al realizar una reacción de qPCR para la genotificación del SNP rs11209026. Tres muestras son heterocigotas y presentan señal en los dos canales de fluorescencia (fluorocromos FAM y VIC), dos muestras homocigotas para el alelo A que solo es detectado para el fluorocromo VIC y una muestra homocigota para el alelo G que está marcado con el fluorocromo FAM. Se incluye la lectura obtenida para los controles negativos de la reacción.

A partir del análisis de 400 muestras de donadores se obtuvieron las frecuencias alélicas y genotípicas de población abierta. Los SNPs rs11209026 ($p=0.580$), rs2066844 ($p=0.436$), rs2066845 ($p=0.741$), rs1800896 ($p=0.418$), rs3024505 ($p=0.327$) y rs2241880 ($p=0.712$) se encuentran en HWE y no hay diferencias significativas entre las frecuencias observadas y las esperadas por lo que este estudio permitió establecer que estos SNPs pueden ser utilizados en un estudio de asociación de casos y controles.

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 (Soriguer y Morcillo, 2007).

Tabla 4. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs presentes en IL23R, NOD2, IL10 y ATG16L1 en población abierta.

Gen	SNP	N	Genotipo	n	FG (%)	Alelo	n	FA (%)	HWE (p)
IL23R	rs11209026	400	GG	274	68.5	G	664	83.0	0.580
			AG	116	29.0				
			AA	10	2.5	A	136	17.0	
NOD2	rs2066844	400	CC	370	92.5	C	770	96.3	0.436
			CT	30	7.5				
			TT	0	0.0	T	30	3.8	
NOD2	rs2066845	400	GG	387	96.8	G	787	98.4	0.741
			CG	13	3.3				
			CC	0	0.0	C	13	1.6	
IL10	rs1800896	400	AA	237	59.3	A	612	76.5	0.418
			AG	138	34.5				
			GG	25	6.3	G	188	23.5	
IL10	rs3024505	400	CC	370	92.5	C	767	95.9	0.327
			CT	27	6.8				
			TT	3	0.8	T	33	4.1	
ATG16L1	rs2241880	400	AA	240	60.0	A	618	77.3	0.712
			AG	138	34.5				
			GG	22	5.5	G	182	22.8	

* SNP, Polimorfismo de Nucleótido Único; N, Población total; FG, Frecuencia Genotípica; FA, Frecuencia Alélica; HWE, Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Aunado al cálculo del HWE, se determinó el poder estadístico que permite detectar una asociación real entre los SNPs rs11209026, rs2066844, rs2066845, rs1800896, rs3024505 y rs2241880 con la EII tomando en cuenta las frecuencias alélicas reportadas en otras poblaciones, el número de casos, la incidencia de la enfermedad en México y el modelo de herencia. En la tabla 5 se muestra que para los SNP's analizados se obtiene un poder estadístico óptimo superior al 0.8 excepto para el rs2066844 y el rs2066845, cuya frecuencia alélica es muy baja en la población estudiada; este cálculo se determinó con el Software QUANTO (<http://hydra.usc.edu/GxE/>).

Tabla 5. Poder Estadístico calculado para la asociación de SNPs con la EII.

SNP	Pacientes con EII	Modelo de Herencia	Frecuencia Alélica	Incidencia de la EII	Poder Estadístico
rs11209026	93	Aditivo	0.170	0.06	0.99
rs2066844	93	Aditivo	0.038	0.06	0.79
rs2066845	93	Aditivo	0.016	0.06	0.43
rs1800896	93	Aditivo	0.235	0.06	0.99
rs3024505	93	Aditivo	0.041	0.06	0.83
rs2241880	93	Aditivo	0.228	0.06	0.99

* SNP, Polimorfismo de Nucleótido Único

Una vez obtenido el poder estadístico y el HWE en población abierta, se realizó la genotipificación de 93 pacientes con EII, de los cuales 78 estaban clínicamente diagnosticados con CU y 15 con EC y se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas tomando 200 muestras de la población abierta como control (Tabla 6).

Para determinar las asociaciones de los SNPs con la EII se calculó el HWE en la población enferma, obteniendo que los SNPs presentes en los genes de IL10 (rs1800896 [$p=0.0029$] y rs3024505 [$p=0.0011$]) y ATG16L1 (rs2241880 [$p=0.0001$]) no se encuentran en equilibrio, este valor de HWE en el grupo de los casos sugiere ser indicio de la existencia de una asociación entre el genotipo y el desarrollo de la enfermedad estudiada (Tabla 6).

Tabla 6. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs presentes en IL23R, IL10, NOD2 y ATG16L1 en población control y pacientes con EII.

Gen	EII	CU	EC	Controles	Gen	EII	CU	EC	Controles
IL23R	0.15	HWE		0.58	IL10	0.0029	HWE		0.418
rs11209026	(n=93)	(n=78)	(n=15)	(n=200)	rs1800896	(n=93)	(n=78)	(n=15)	(n=200)
Alelo	n (fa)	n (fa)	n (fa)	n (fa)	Alelo	n (fa)	n (fa)	n (fa)	n (fa)
G	158(85.0)	133 (85.3)	25 (83.3)	338 (84.5)	A	132 (71.0)	112 (71.8)	20 (66.7)	319 (79.8)
A	28 (15.0)	23 (14.7)	5 (16.7)	62 (15.5)	G	54 (29.0)	44 (28.2)	10 (33.3)	81 (20.2)
Genotipo	n (fg)	n (fg)	n (fg)	n (fg)	Genotipo	n (fg)	n (fg)	n (fg)	n (fg)
GG	67 (72.0)	57 (73.1)	10 (66.7)	141 (70.5)	AA	45 (48.3)	39 (50.0)	6 (40.0)	133 (66.5)
AG	24 (25.8)	19 (24.4)	5 (33.3)	56 (28.0)	AG	42 (45.2)	34 (43.6)	8 (53.3)	53 (26.5)
AA	2 (2.2)	2 (2.5)	0 (0.0)	3 (1.5)	GG	6 (6.5)	5 (6.4)	1 (6.7)	14 (7.0)
NOD2	0.706	HWE		0.436	IL10	0.0011	HWE		0.32
rs2066844	(n=93)	(n=78)	(n=15)	(n=200)	rs3024505	(n=38)	(n=32)	(n=6)	(n=200)
Alelo	n (fa)	n (fa)	n (fa)	n (fa)	Alelo	n (fa)	n (fa)	n (fa)	n (fa)
C	179 (96.2)	150 (96.2)	29 (96.7)	370 (92.5)	C	170 (91.4)	140 (89.7)	30 (100.0)	382 (95.5)
T	7 (3.8)	6 (3.8)	1 (3.3)	30 (7.5)	T	16 (8.6)	16 (10.3)	0 (0.0)	33 (4.5)
Genotipo	n (fg)	n (fg)	n (fg)	n (fg)	Genotipo	n (fg)	n (fg)	n (fg)	n (fg)
CC	86 (92.5)	72 (92.3)	14 (93.3)	170 (85.0)	CC	79 (84.9)	64 (82.1)	15 (100.0)	183 (91.5)
CT	7 (7.5)	6 (7.7)	1 (6.7)	30 (15.0)	CT	12 (12.9)	12 (15.4)	0 (0.0)	16 (8.0)
TT	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	TT	2 (2.2)	2 (1.28)	0 (0.0)	1 (0.5)
NOD2	0.958	HWE		0.741	ATG16L1	0.001	HWE		0.712
rs2066845	(n=93)	(n=78)	(n=15)	(n=200)	rs2241880	(n=69)	(n=57)	(n=12)	(n=200)
Alelo	n (fa)	n (fa)	n (fa)	n (fa)	Alelo	n (fa)	n (fa)	n (fa)	n (fa)
G	185 (99.5)	156 (100.0)	29 (96.7)	389 (97.3)	A	159 (85.5)	135 (86.5)	24 (80.0)	313 (78.3)
C	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (3.3)	11 (2.7)	G	27 (14.5)	21 (13.5)	6 (20.0)	87 (21.7)
Genotipo	n (fg)	n (fg)	n (fg)	n (fg)	Genotipo	n (fg)	n (fg)	n (fg)	n (fg)
GG	92 (98.9)	78 (100.0)	14 (93.3)	189 (94.5)	AA	74 (79.6)	63 (80.8)	11 (73.4)	124 (62.0)
GC	1 (1.1)	0 (0.0)	1 (6.7)	11 (5.5)	AG	11 (11.8)	9 (11.5)	2 (13.3)	65 (32.5)
CC	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	GG	8 (8.6)	6 (7.7)	2 (13.3)	11 (5.5)

* EII, Enfermedad Inflamatoria Intestinal; CU, Colitis Ulcerativa, EC, Enfermedad de Crohn; n, número de individuos; fa, frecuencia alélica; fg, frecuencia genotípica; HWE, Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Estudio de asociación de los SNPs presentes en los genes de IL23R, IL10, NOD2 y ATG16L1 con la EII.

En la tabla 7 se muestran los principales datos obtenidos del historial clínico de los pacientes, los cuales se obtuvieron para hacer un análisis de asociación de los SNP's con características fenotípicas como el género, edad de diagnóstico, la extensión de la CU, la localización y comportamiento de las lesiones en EC, las manifestaciones extraintestinales, el tipo de tratamiento, la necesidad de resección intestinal y apendicectomía y los antecedentes familiares, aunados a los estudios de asociación genotípica.

Tabla 7. Características clínicas de los pacientes con EII. Se presenta el número de pacientes y entre paréntesis el porcentaje del total al que corresponde.

	CU (n= 78)	EC (n= 15)
Género		
Masculino	29 (37.2)	7 (46.7)
Femenino	49 (62.8)	8 (53.3)
Edad al Diagnóstico (años)		
Menor de 17	5 (6.4)	1 (6.7)
Entre 17 y 40	36 (46.2)	4 (26.7)
Más de 40	37 (47.4)	10 (66.6)
Extensión CU		
Proctitis	19 (24.4)	
Colitis Distal	20 (25.6)	
Pancolitis	39 (50.0)	
Localización EC		
Ileal		10 (66.7)
Colónica		2 (13.3)
Ileocolónica		3 (20.0)
Comportamiento EC		
No estenosante-No fistulizante		7 (46.7)
Estenosante		6 (40.0)
Fistulizante		2 (13.3)
Manifestaciones Extraintestinales		
Sí	50 (64.1)	7 (46.7)
No	28 (35.9)	8 (53.3)
Tratamiento		
Mesalazina	37 (47.4)	8 (53.4)
Esteroides	22 (28.2)	5 (33.3)
Infliximab/Adalimumab	19 (24.4)	2 (13.3)
Resección Intestinal	Sí	8 (10.3)
Apendicectomía	Sí	2 (13.3)
Antecedentes Familiares	Sí	2 (13.3)

Mediante el establecimiento de los modelos genéticos dominante y recesivo mostrados en las tablas, se analizaron las asociaciones de los diferentes genotipos para cada SNP con la EII, CU y EC, así como la asociación con el alelo menor (tabla 9) para obtener la significancia estadística y la razón de momios (OR) con un intervalo de confianza del 95%.

Tabla 8. Modelos Genéticos y distribución genotípica en pacientes con EII y controles.

SNP	Grupos	1/2	Genotipos, N (%)			Genotipo 12 vs 11+22		Genotipo 22 vs 12+11	
			GG	AG	AA	p	OR (95% IC)	p	OR (95% CI)
IL23R rs11209026	Controles	G/A	141 (70.5)	56 (28.0)	3 (1.5)				
	EII		67 (72.0)	24 (25.8)	2 (2.2)	0.694	0.89 (0.51-1.56)	0.689	1.44 (0.23-8.79)
	CU		57 (73.1)	19 (24.4)	2 (2.5)	0.538	0.82 (0.45-1.51)	0.548	1.72 (0.28-10.55)
	EC		10 (66.7)	5 (33.3)	0 (0.0)	0.658	1.28 (0.42-3.93)	0.632	1.82 (0.08-36.88)
			CC	CT	TT				
NOD2 rs2066844	Controles	C/T	170 (85.0)	30 (15.0)	0 (0.0)				
	EII		86 (92.5)	7 (7.5)	0 (0.0)	0.073	0.46 (0.19-1.09)		
	CU		72 (92.3)	6 (7.7)	0 (0.0)	0.103	0.47 (0.18-1.18)		
	EC		14 (93.3)	1 (6.7)	0 (0.0)	0.375	0.40 (0.05-3.19)		
			GG	GC	CC				
NOD2 rs2066845	Controles	G/C	189 (94.5)	11 (5.5)	0 (0.0)				
	EII		92 (98.9)	1 (1.1)	0 (0.0)	0.075	0.18 (0.02-1.46)		
	CU		78 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.034	0.10 (0.006-1.80)		
	EC		14 (93.3)	1 (6.7)	0 (0.0)	0.849	1.22 (0.14-10.21)		
			AA	AG	GG				
IL10 rs1800896	Controles	G/A	133 (66.5)	53 (26.5)	14 (7.0)				
	EII		45 (48.3)	42 (45.2)	6 (6.5)	0.001	2.28 (1.36-3.82)	0.003	0.47 (0.28-0.78)
	CU		39 (50.0)	34 (43.6)	5 (6.4)	0.005	2.14 (1.24-3.70)	0.011	0.50 (0.29-0.85)
	EC		6 (40.0)	8 (53.3)	1 (6.7)	0.026	3.17 (1.09-9.16)	0.038	0.33 (0.11-0.98)
			CC	CT	TT				
IL10 rs3024505	Controles	C/T	183 (91.5)	16 (8.0)	1 (0.5)				
	EII		79 (84.9)	12 (12.9)	2 (2.2)	0.183	1.70 (0.75-3.84)	0.191	4.37 (0.50-63.65)
	CU		64 (82.1)	12 (15.3)	2 (2.6)	0.066	2.09 (0.91-4.78)	0.134	5.23 (0.59-76.20)
	EC		15 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.254	0.00 (0.00-2.70)	0.783	0.00 (0.00-120)
			AA	AG	GG				
ATG16L1 rs2241880	Controles	A/G	124 (62.0)	65 (32.5)	11 (5.5)				
	EII		74 (79.6)	11 (11.8)	8 (8.6)	0.278	0.0002 (0.13-0.55)	1.617	0.315 (0.63-4.09)
	CU		63 (80.8)	9 (11.5)	6 (7.7)	0.271	0.0004 (0.12-0.56)	1.432	0.493 (0.51-4.06)
	EC		11 (73.4)	2 (13.3)	2 (13.3)	0.319	0.122 (0.07-1.29)	2.643	0.219 (0.53-11.65)

* SNP, Polimorfismo de Nucleótido Único; 1, Alelo mayor; 2, Alelo menor; N, número de individuos; 12 vs 11+22, Modelo dominante; 22 vs 12+11, Modelo recesivo; OR, Odds ratio; IC, Intervalo de confianza.

Para el SNP rs1800896 presente en la región promotora del gen de IL10 se encontró una asociación con el riesgo a desarrollar CU (OR= 2.14, 95% IC=1.24-3.70, p=0.005) o EC (OR= 3.17, 95% IC=1.09-9.16, p=0.026) cuando se presenta el heterocigoto AG.

Mientras que al evaluar el genotipo AA se encontró una asociación negativa con CU (OR= 0.50, 95% IC=0.29-0.85, p=0.011) y EC (OR= 0.33, 95% IC= 0.11-0.98, p=0.038). Se realizó el análisis del alelo G, mostrando una asociación con el riesgo de presentar CU (OR= 1.54, 95% IC= 1.01-2.36, p=0.043) y no se encontró asociación a nivel alélico con la EC.

Tabla 9. Frecuencias del alelo menor de los SNPs presentes en IL-23R, IL-10, NOD2 y ATG16L1 en pacientes con EII y controles.

SNP	Grupo	AM	Alelos (n)	FAM %	Análisis de asociación a nivel alélico	
					OR (95% IC)	p-value
IL23R rs11209026	Controles (n=200)	A	338/62	15.5		
	EII (n=93)		158/28	15.0	0.96 (0.59-1.56)	0.889
	CU (n=78)		133/23	14.7	0.94 (0.56-1.58)	0.823
	EC (n=15)		25/5	16.7	1.09 (0.40-2.95)	0.865
NOD2 rs2066844	Controles (n=200)	T	370/30	7.5		
	EII (n=93)		179/7	3.8	0.48 (0.20-1.11)	0.083
	CU (n=78)		150/6	3.8	0.49 (0.20-1.21)	0.115
	EC (n=15)		29/1	3.3	0.42 (0.05-3.23)	0.394
NOD2 rs2066845	Controles (n=200)	C	389/11	2.8		
	EII (n=93)		185/1	0.5	0.19 (0.02-1.49)	0.078
	CU (n=78)		156/0	0.0	0.11 (0.006-1.84)	0.036
	EC (n=15)		29/1	3.3	1.21 (0.15-9.78)	0.851
IL10 rs1800896	Controles (n=200)	G	319/81	20.3		
	EII (n=93)		132/54	29.0	1.61 (1.08-2.40)	0.018
	CU (n=78)		112/44	28.2	1.54 (1.01-2.36)	0.043
	EC (n=15)		20/10	33.3	1.96 (0.88-4.37)	0.091
IL10 rs3024505	Controles (n=200)	T	382/18	4.5	1.99 (1.02-4.06)	0.048
	EII (n=38)		170/16	8.6	2.42 (1.23-4.96)	0.011
	CU (n=32)		140/16	10.3	0.00 (0.00-2.72)	0.235
	EC (n=6)		30/0	0.0		
ATG16L1 rs2241880	Controles (n=200)	G	313/87	21.8	0.61 (0.37-0.96)	0.039
	EII (n=69)		159/27	14.5	0.55 (0.33-0.92)	0.026
	CU (n=57)		135/21	13.5	0.89 (0.37-2.22)	0.822
	EC (n=12)		24/6	20.0	1.99 (1.02-4.06)	0.048

* SNP, Polimorfismo de Nucleótido Único; AM, Alelo menor; FAM, Frecuencia del alelo menor; n, número de individuos; OR, Odds ratio; IC, Intervalo de confianza.

El análisis del SNP rs3024505 presente en el gen de IL10, mostro una asociación con el riesgo a desarrollar CU para el alelo T (OR= 2.42, 95% IC= 1.23-4.96, p=0.011) pero no para el desarrollo de EC.

El análisis a nivel genotípico y alélico para los SNP rs11209026 presente en IL23R, rs2066844 y rs2066845 presentes en NOD2 y el rs2241880 presente en ATG16L1 no mostraron diferencias estadísticamente significativas para determinar la asociación con la EII en población mexicana.

Por otra parte la asociación genotípica del alelo T encontrada para el SNP rs3024505 y la EII permitió establecer la posibilidad de que existiera una relación con las características clínicas de la enfermedad previamente mencionadas, por lo cual se realizó un análisis de este alelo a nivel fenotípico, donde se observó una asociación entre el alelo T y el inicio del padecimiento a una edad temprana (0 a 16 años) para CU (OR=4.385, 95% IC= 1.11-19.94, p=0.033) y se demostró que existe una mayor frecuencia de individuos tratados con esteroides cuando son portadores de este alelo (OR= 3.33, 95% IC= 1.19-8.69, p=0.019) (Tabla 10).

Para el rs1800896 presente en el mismo gen se encontró la asociación del alelo G con el riesgo de presentar CU, pero al realizar el análisis fenotípico no se demostró asociación significativa con las características clínicas evaluadas.

Tabla 10. Análisis fenotípico de los SNPs rs1800896 y rs3024505 presentes en IL10 en pacientes con Colitis Ulcerativa.

	CU rs1800896 (G)		CU rs3024505 (T)	
	OR (95% IC)	p	OR(95% IC)	p
Edad al Diagnóstico				
0-16 años	1.09 (0.27-4.45)	0.896	4.38 (1.11-19.94)	0.033
17-40 años	1.09 (0.54-2.19)	0.804	3.69 (0.65-20.7)	0.117
>40 años	0.89 (0.44-1.80)	0.756	0.05 (0.002-0.96)	0.005
Extensión CU				
Proctitis	1.37 (0.61-3.06)	0.043	0.12 (0.006-2.24)	0.058
Colitis Distal	0.95 (0.42-2.12)	0.908	5.00 (0.98-25.4)	0.046
Pancolitis	0.57 (0.29-1.10)	0.095	0.96 (0.19-4.68)	0.959
Manifestaciones Extraintestinales	0.57 (0.26-1.24)	0.159	0.30 (0.01-5.7)	0.227
Tratamiento				
Mesalazina	0.94 (0.47-1.90)	0.876	0.09 (0.004-1.67)	0.029
Esteroides	0.79 (0.36-1.71)	0.553	3.33 (1.19-8.69)	0.019
Infliximab/Adalimumab	1.44 (0.62-3.31)	0.384	0.55 (0.09-3.07)	0.491
Resección Intestinal	1.30 (0.37-4.55)	0.681	0.38 (0.02-7.45)	0.289

* CU, Colitis Ulcerativa; OR, Odds ratio; IC, Intervalo de confianza.

8. DISCUSIÓN

La incidencia de la EII ha ido en aumento en los últimos años, paralelamente al progreso de las sociedades y en especial en países industrializados. Aunque existen pocos datos epidemiológicos en México, en 2009 se reportó un incremento en la incidencia de CU con 76 pacientes diagnosticados por año (1997 a 2006) comparado con la década anterior (28 pacientes por año) (Yamamoto-Furusho, 2009). Es probable que este incremento este asociado con los cambios del estilo de vida, hábitos alimenticios y un mejor conocimiento de los factores que favorecen la aparición de la enfermedad y en la unificación y sistematización de los criterios de diagnóstico de la misma. Si bien la etiología no se comprende en su totalidad, se ha descrito que tanto factores inmunológicos como genéticos, contribuyen en la patogenia y son clave para el entendimiento de la enfermedad.

Durante los últimos años se ha confirmado la existencia de más de 5 millones de SNP asociados con la EII, de los cuales un número importante se localizan en genes que participan en la respuesta inmune y varios han sido asociados específicamente con EC o CU; algunos son compartidos por ambas entidades (Sepúlveda, et al., 2008; Murthy, et al., 2014).

La importancia de la determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas entre diferentes poblaciones se pone de manifiesto en las diferencias de susceptibilidad que presenta cada población a la EII; en este trabajo se establecen por primera vez las frecuencias para los polimorfismos presentes en IL23, NOD2, IL10, y ATG16L1 en población mexicana, las cuales presentan diferencias significativas cuando se comparan con las frecuencias reportadas en otras poblaciones a nivel mundial (Figura 12).

En el caso del rs11209026 presente en IL23R, se observa un aumento muy marcado en la frecuencia del alelo A (17%) en comparación con otras reportadas en el continente americano y europeo, en tanto que en población asiática y africana el alelo no está presente. Para el rs1800896 del gen IL10, el alelo A es el

más representado en todas las poblaciones y las frecuencias en la población aquí analizada son similares. Para el alelo G se observa una menor frecuencia en la población asiática. El alelo T del rs3024505 presente en el mismo gen está más representado en población europea, seguido de la población americana y en población mexicana se obtuvo un 4.13%, semejante a la población asiática y africana. Para los SNPs rs2066844 y rs2066845 presentes en NOD2 las frecuencias se mantienen parecidas en población americana, europea; siendo un alelo ausente en población asiática y africana. El alelo G presente en ATG16L1 se mantienen las frecuencias en población americana, asiática y africana y se observa una mayor frecuencia en el continente europeo (Figura 12). Estos datos reflejan la variabilidad genética de estos SNP en diversas poblaciones a nivel mundial y permiten establecer que la identificación de las frecuencias en cada étnica es de suma importancia para poder realizar los estudios de asociación en pacientes con EII.

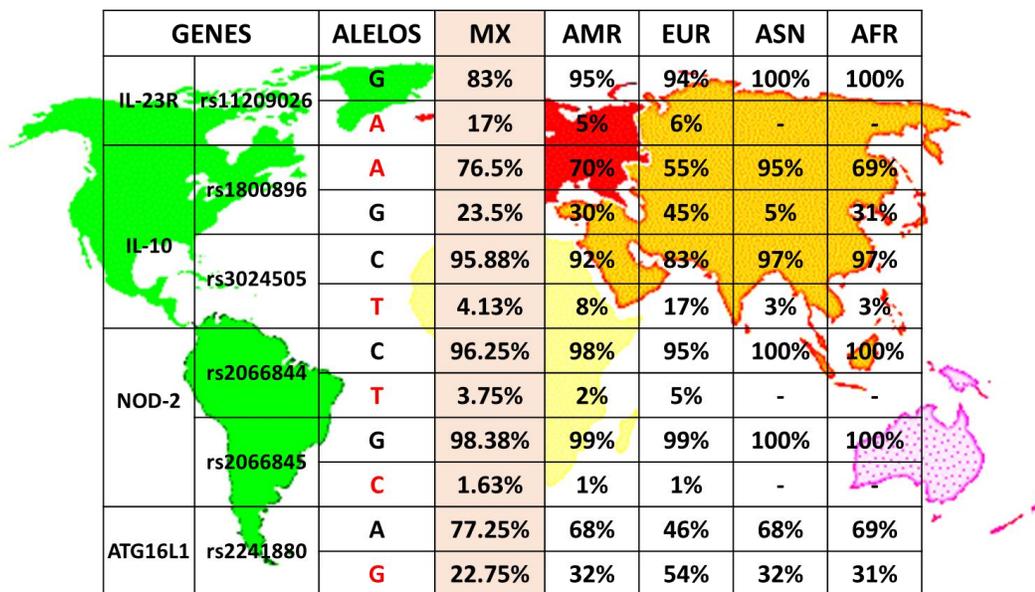


Figura 12. Frecuencias alélicas reportadas a nivel mundial para los SNPs presentes en IL23R, IL10, NOD2 y ATG16L1 (datos consultados en http://browser.1000genomes.org/Homo_sapiens/Info/Index, 2016). MX, población mexicana estudiada; AMR, población americana; EUR, población europea; ASN, población asiática; AFR, población africana.

Con el desciframiento del genoma humano y el desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular, se han identificado nuevos genes de susceptibilidad con la EII que se han delimitado en 9 diferentes regiones cromosómicas. Dentro de estas se han localizado algunos polimorfismos en genes como NOD2, STAT6, IFNG, VDR, MHC, TLR4, IL23R, Tromboxano A2, Leucotrieno B4, IL10, TNF α , ATG16L1, que están involucrados en la patogénesis y que contribuyen al desarrollo de la enfermedad. 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 del paciente a la que se realiza el diagnóstico (Oliver, et al., 2007; Rodríguez-Bores, et al., 2007; Yamamoto-Furusho, 2010).

La presencia de SNPs tiene implicaciones en una serie de alteraciones a nivel de DNA, RNA o proteínas que generan modificaciones en los mecanismos de defensa de la mucosa intestinal y que se han asociado con el desarrollo de la EII (Yamamoto-Furusho y Sánchez, 2015). Por ejemplo, se ha observado que los pacientes con EII que presentan los alelos rs2266844T y rs2266845C de NOD2, tienen una menor capacidad de secretar α -defensinas por parte de las CP, favoreciendo de esta manera la colonización intestinal por microorganismos patógenos y comensales, creando un desbalance en el microambiente de citocinas que da lugar a una activación constante del sistema inmune (Kaser, et al., 2010).

Los SNPs localizados en el gen NOD2 son los más estudiados, durante varios años se han investigado las posibles implicaciones en la patología de diversas enfermedades como cáncer colorrectal y EII, así como su progresión a formas graves (Alvarez-Lobos, et al., 2005; Gazouli, et al., 2010). Los SNPs rs2066844 (T) y rs2066845(C) se han identificado en el 30-40% de los pacientes con EC en poblaciones norteamericanas y europeas (Ogawa, et al., 2011) y también se ha descrito su asociación con el riesgo a desarrollar CU (Kutikhin, 2011).

Estos SNPs presentes en NOD2 han sido ubicados en el *locus* IBD1, primer gen relacionado con la EII (Khor, et al., 2011; Ogawa, et al., 2011). El SNP rs2066844 está ubicado en el exón 4 de NOD2, este polimorfismo provoca un cambio de Arginina por Triptófano en la posición 702, mientras que el rs2066845 se ubica en el exón 8 de la misma proteína con una sustitución no sinónima de Glicina por Arginina en posición 908, lo cual puede estar directamente asociado con la susceptibilidad a desarrollar EC (Boukercha, et al., 2015).

Los SNPs rs2066844 y rs2066845 afectan el dominio carboxilo terminal LRR de NOD-2, inhibiendo la función de reconocimiento de ligando y la activación de NFκB, de esta manera permite la multiplicación bacteriana, disminuyendo la tolerancia inmunológica hacia los microorganismos comensales. En particular, estas mutaciones están asociados con la EC en cuanto a su localización (Ileón) y el comportamiento (fistulizante); el genotipo CT y TT del SNP rs2066844 ha sido asociado con la susceptibilidad a padecer la EII al igual que el genotipo GC y CC del rs2066845 (Yamazaki, et al., 2002; Boukercha, et al., 2015).

En población caucásica se realizó un estudio de asociación con 1196 pacientes con EII y 435 controles, donde reportaron una asociación significativa con el riesgo a presentar EII ($p < 0.03$) para los SNPs rs2066844 y rs2066845; el rs2066845 se asoció solo con EC ($p = 0.01$) pero no con CU. Mientras que el rs2066844 se asoció con las dos formas clínicas EC y CU ($p < 0.005$) (Kanaan, et al., 2012). En pacientes de Argelia se encontró asociación con la EC y el rs2066844 ($p = 0.09$, $OR = 3.67$) y para el rs2066845 ($p = 0.5$, $OR = 1.67$) (Boukercha, et al., 2015). Otro estudio en población sudafricana incluyó 76 pacientes con EII y 100 controles; en esta población no reportan asociación significativa entre los SNP rs2066844 y rs2066845 y la EII (Zaahl, et al., 2005). Al igual que en población marroquí y población china no encontraron asociación de estos SNPs y la EII. Los alelos T para el rs2066844 y C para el rs2066845 no se encuentran representados en poblaciones del continente africano y asiático, según reportes de frecuencias

alélicas (http://browser.1000genomes.org/Homo_sapiens/Info/Index, consultado 2016).

Los resultados obtenidos en este proyecto no reflejaron asociación a nivel genotípico ni alélico para el rs2066844; al determinar las frecuencias alélicas y genotípicas se observa que el genotipo TT, para el que se ha reportado asociación con la EII en otras poblaciones, no se encuentra representada en los datos analizados, por lo que no refleja una asociación con la enfermedad. Para el rs2066845, el genotipo CC no se encuentra representado en la población analizada, sin embargo, en otras poblaciones este SNP se asocia con el desarrollo de EII. Nuestros resultados concluyen que el rs2066844 y rs2066845 presentes en NOD2 no se encuentran representados en la población de origen mexicano analizada.

Aun no se conoce exactamente como participan estos SNPs en la patogénesis de la EII, pero la pérdida en la función de reconocimiento de ligando por el dominio LRR de NOD-2, está asociada a una proliferación de microorganismos, propiciando la persistencia del proceso inflamatorio debida a la sobre-estimulación de la respuesta inmune y a la disminución de la tolerancia inmunológica (Corridoni, et al., 2014).

Por otra parte, también se ha investigado acerca de la participación del receptor de IL-23 (IL-23R) en el desarrollo de la EII. La IL-23 es una citocina descubierta recientemente que tiene estructura y funciones semejantes a la IL-12. 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, et al., 2012) (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 es un regulador clave en

la diferenciación de los linfocitos Th-17 y la expresión del receptor heterodimérico IL23R e IL-12R β 1 el cual regula las actividades de la IL-23. Por lo tanto, en conjunto, la IL-23 e IL-17 constituyen un mecanismo que media el desarrollo y el progreso de la inflamación por células Th-17 (Oliver, et al., 2007).

En modelos animales, se ha demostrado que la IL-23 es esencial para las manifestaciones de inflamación crónica intestinal; se observó que ratones knockout para IL-23 no desarrollan colitis; lo que sugiere la participación de esta citocina en la patogénesis de la EII (Sanchez-Muñoz, et al., 2008). La participación de la IL-23 e IL-17 en el desarrollo de EC, se pone de manifiesto por el aumento en los niveles de estas citocinas, tanto en mucosa intestinal como en el suero de pacientes con esta patología (Naser, et al., 2012).

En un estudio con 2, 877 muestras de DNA de pacientes con EII (dos tercios con EC y un tercio con CU), se estableció al alelo A en el SNP rs11209026 como una variante de protección. 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 señalización celular; al no existir la unión citocina-receptor no existe el efecto biológico de la citocina (Oliver, et al., 2007).

Yu y colaboradores demostraron que este SNP presente en el gen de IL-23R altera la expresión del RNAm y favorece la codificación para una fracción soluble del receptor mediante splicing alternativo, por lo tanto, el alelo A del rs11209026 aumenta la expresión de la forma soluble del receptor y disminuye la señalización de IL-23 y en consecuencia la respuesta Th17. Los exones son secuencias del gen que no solo codifican información para los aminoácidos, también contienen elementos cis que influyen en el uso de los sitios de splicing por lo que pueden regular el procesamiento del RNAm (Watakabe, et al., 1993).

Por otra parte, Schmidt y colaboradores realizaron un análisis a nivel de expresión de RNAm de la subunidad p19 de IL-23, los resultados muestran un aumento en la expresión de los transcritos de IL-23Rp19 en la mucosa intestinal inflamada estos estudios sugirieren que la subunidad específica juega un papel importante en la patología de la EII (Schmidt, et al., 2005; Thompson y Lees, 2011).

Estudios adicionales han confirmado que el SNP rs11209026 confiere protección, esto en poblaciones norteamericanas y europeas. Estos estudios incluyen cohortes de población griega (Gazouli, et al., 2010), alemana (Dubinsky, et al., 2007; Glas, et al., 2007), e iraní (Hayatbakhsh, et al., 2012), entre otros. En población alemana reportan una asociación protectora de este SNP y la EC (OR=0.43, $p=8.04 \times 10^{-8}$), así como con la CU (OR=0.70, $p=3.61 \times 10^{-2}$) (Glas, et al., 2007). Se encontró una asociación parecida en población sueca para EC (OR=0.51, $p=0.038$) y CU (OR=0.43, $p=0.007$) (Einarsdottir, et al., 2009). En Reino Unido también se mostró una asociación protectora para EC (OR=0.45, $p=6.65 \times 10^{-6}$) y UC (OR=0.63, $p=0.008$) en 1251 pacientes con EII y 1134 controles (Cummings, et al., 2007). En una población de niños caucásicos con ascendencia no judía, se encontró asociación solo con EC (OR=0.26, $p=0.009$) (Dubinsky, et al., 2002).

Debido al papel de la IL-23 en la activación de las respuestas inflamatorias, el estudio de esta citocina y de su receptor en todos sus niveles, representa un blanco importante desde un punto de vista terapéutico (Naser, et al., 2012).

En este estudio se analizó el SNP rs11209026 en población control y en los pacientes con EII, determinando que las frecuencias genotípicas y alélicas cumplen con el HWE ($p=0.58$) y no se observa una desviación del equilibrio en los pacientes con EII. En los estudios de asociación de casos y controles es de gran importancia que el grupo control esté en equilibrio de HWE; una desviación del HWE en el grupo de los casos podría ser indicio de la existencia de una asociación entre el genotipo y la enfermedad estudiada (Soriguer y Morcillo, 2007).

En el caso del rs11209026 no existió una desviación del HWE en los pacientes con EII y al realizar el análisis genotípico no se observó asociación del SNP con la susceptibilidad a desarrollar la EII.

Así mismo se analizaron los SNP rs1800896 y rs3024505 presentes en el gen de IL10, en ambos SNPs se observó una desviación en el HWE ($p=0.029$ y $p=0.0011$ respectivamente). La interleucina 10 (IL-10) es una citocina inmunoreguladora que actúa en las APC, inhibiendo tanto de la síntesis de citocinas como de moléculas coestimuladoras y moléculas HLA clase II (Fonseca-Camarillo, et al., 2011).

La región promotora del gen de IL10 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 forman estos tres polimorfismos se asocia con la baja producción *in vitro* de IL-10 en linfocitos (Andersen, et al., 2010). En forma particular, el rs1800896 se ha asociado con la expresión y síntesis de IL-10 *in vitro* (Zou, et al., 2014). La región promotora del gen contiene un número importante de sitios de reconocimiento para factores de transcripción, el rs1800896 afecta el sitio de unión para el factor de transcripción Ets modificando así la expresión de IL10 (Romero-Valdovinos, et al., 2012; Zou, et al., 2014). Se ha reportado que el genotipo AA se asocia con bajos niveles de IL-10, AG con niveles intermedios y GG con altos niveles de citocina en la mucosa intestinal (Turner, et al., 1997; Romero-Valdovinos, et al., 2012). Con relación a la asociación de los SNP's en la región promotora del gen de IL-10 y su asociación con EII los resultados aún son contradictorios.

Fonseca y colaboradores reportaron la comparación en los niveles de expresión del RNAm de IL-10 en mucosa intestinal de pacientes con CU, en las diferentes condiciones de la enfermedad (remisión y actividad) y las compararon con población control. La expresión génica de IL-10 fue mayor en los pacientes con CU en remisión en comparación con CU activa ($p=0.001$) y con el grupo control

($p=0.05$). Estos resultados muestran la importancia de IL-10 como factor inmunoregulador en la CU.

Por otro lado, Garza y colaboradores realizaron un estudio de asociación donde el heterocigoto AG del rs1800896 se observa incrementado significativamente en EC y CU (OR=7.76, $p<0.01$; OR=10.91, $p<0.01$; respectivamente) y el homocigoto AA con baja ocurrencia en EII (OR=0.18, $p=0.028$). Mientras que en población italiana se encontró asociación del alelo A con CU (OR=1.66, $p=0.00003$) cuando se compararon con controles (Tedde, et al., 2008).

Se han reportado asociaciones con EC en individuos neo zelandeses con el genotipo CT y el alelo T (OR=1.5, $p=0.022$; OR=1.37, $p=0.011$; respectivamente), además que el alelo T se asoció con el riesgo a un primer diagnóstico de la enfermedad entre los 17 y 40 años de edad, desarrollar la EC con comportamiento estenosante y con el riesgo de resección intestinal ($p=0.017$) para el rs3024505, mientras que el heterocigoto AG del rs1800896 se asoció con EC (OR=1.73, $p=0.001$) (Wang, et al., 2011).

En población danesa se observó un incremento en el riesgo a desarrollar EC y CU en individuos con el genotipo CC y TT (OR=1.4, $p=0.02$; OR=1.43, $p=0.004$; respectivamente) y riesgo de un diagnóstico a edad temprana (antes de los 40 años) para EC (OR=1.47) y CU (OR=1.35) (Andersen, et al., 2010).

Las contradicciones en estos estudios pueden deberse particularmente a las limitaciones de las muestras de pacientes con EII, por lo que es difícil observar diferencias significativas que demuestren la asociación y adicionalmente puede deberse a las diferencias geográficas y étnicas que hacen más difícil la interpretación de resultados.

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 IL10. La

región tiene un alto potencial para contener secuencias reguladoras, se ha descrito que también afecta la expresión de IL10 por regulación post-transcripcional; la presencia de motivos AUUUA en secuencias ricas en AU (ARE) localizadas en la región 3'UTR podrían estar participando como desestabilizadores del RNAm (Le, et al., 1997; Powell, et al., 2000; Doecke, et al., 2013).

En este estudio, para el SNP rs1800896 se encontró una asociación con el riesgo a desarrollar CU (OR= 2.14, $p=0.005$) o EC (OR= 3.17, $p=0.026$) cuando se presenta el genotipo heterocigoto AG. Para el genotipo AA se encontró una asociación negativa con CU (OR= 0.50, $p=0.011$) y EC (OR= 0.33, $p=0.038$). Mientras que el alelo G se asoció con el riesgo de presentar CU (OR= 1.54, $p=0.043$) pero no EC; con un poder estadístico de 0.99.

El rs3024505, mostro una asociación con el riesgo a desarrollar CU para el alelo T (OR= 2.42, $p=0.011$) pero no para el desarrollo de EC. El alelo T se asoció, además, con el inicio a una edad temprana (0 a 16 años) en pacientes con CU (OR=4.38, $p=0.033$) y se demostró que existe una mayor frecuencia de individuos tratados con esteroides cuando son portadores de este alelo (OR= 3.33, $p=0.019$), observándose un poder estadístico de 0.94.

Se ha observado que los pacientes con una alteración en la producción de IL-10 presentan casos graves de CU y EC. La región promotora del gen de IL-10 cuenta con diferentes variaciones genéticas en donde se ven afectados los niveles de citocina producida, como es el caso del rs1800896 (Andersen, et al., 2010).

La importancia biológica del rs3024505 en la EII sigue siendo poco clara, está situado en una región intergénica proximal al extremo 3'UTR del gen de IL10, la cual tiene un alto contenido de secuencias reguladoras, por lo que puede estar implicado en la regulación de la expresión de IL10 (Wang, et al., 2011).

Por último, se analizó el rs2041880 presente en el gen de ATG16L1, molécula implicada en el proceso de autofagia. Durante un estudio del genoma completo, el mapeo de 19,779 SNP no sinónimos permitió identificar el SNP rs2241880 A/G; la cuya variante alélica está implicada en un cambio de aminoácido treonina por alanina en posición 300 del exón 9 de ATG16L1 (Murthy, et al., 2014). La proteína ATG16L1 se compone de tres dominios: el dominio amino terminal, que media la interacción con proteínas Atg; un dominio CCD (Dominio Coiled-Coil), proporciona la capacidad de autodimerización y unión no covalente con ATG5-ATG12; y por último el dominio WD, consta de siete repeticiones de triptófano y ácido aspártico (Salem, et al., 2015). El SNP presente en esta proteína afecta el dominio CCD disminuyendo la capacidad de formación del autofagosoma por tanto del proceso de autofagia y la eliminación eficiente de patógenos (Cheng, et al., 2010; Naser, et al., 2012).

La importancia de esta proteína radica en la participación en el complejo proteico Atg5-Atg12-ATG16L1 que inicia la formación del autofagosoma. Estudios en ratones neonatales deficientes en ATG16L1 muestran baja sobrevivencia; un segundo modelo utilizando ratones con mutación en el gen de ATG16L1 muestran deficiencia en la formación del autofagosoma en CP y por tanto hay una secreción anormal de péptidos antimicrobianos, proponiendo a estas células como susceptibles a los defectos de autofagia (Khor, et al., 2011; Randall-Demllo, et al., 2013).

Cheng y colaboradores realizaron un meta-análisis de estudios de asociación del rs2241880 y la EII realizados en diferentes poblaciones a nivel mundial, mostrando que el alelo G se asocia con susceptibilidad a EC (OR= 1.32; $p < 0.00001$) y riesgo a CU (OR=1.06, $p=0.02$) (Cheng, et al., 2010).

Un estudio en población húngara mostro asociación del genotipo GG y la EC (OR=1.39, $p=0.037$), con un desarrollo de la enfermedad preferentemente en colón (OR= 1.83, $p=0.036$) (Lakatos, 2009). Una asociación similar se observó en

neo zelandeses (OR=1.41, p=0.0001) para EC, pero no para CU (Roberts, et al., 2007). Büning y colaboradores reportan una asociación con el riesgo a EC (OR= 1.31, p=0.0005) en población europea (alemanes, húngaros y holandeses).

En la cohorte analizada para este SNP no se encontró asociación con el desarrollo de la enfermedad. En estudios de asociación genética en otras poblaciones como en griegos y chinos, el genotipo GG se ha encontrado asociado con susceptibilidad a desarrollar EC (OR= 1.38 y OR=1.18 respectivamente) (Gazouli, et al., 2010; Zhang, et al., 2014).

En este trabajo se describe por primera vez la frecuencia relativa de diversos SNP's presentes en genes implicados en la respuesta inmune y su asociación con protección o susceptibilidad en el desarrollo de las formas clínicas de la EII. 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.

9. CONCLUSIONES

- Los SNPs presentes en los genes *IL23R* (rs11209026), *IL10* (rs1800896 y rs3024505), *NOD2* (rs2066844 y rs2066845) y *ATG16L1* (rs2241880) cumplen con el HWE por lo que pueden ser considerados marcadores biológicos en población de origen mexicano.
- Los genotipos asociados a riesgo en los SNP's rs2066844 y rs2066845 en *NOD2*, no se encuentran representados en la población de origen mexicano analizada.
- Los SNPs rs1800896 y rs3024505 en el gen de *IL10*, presentan diversas asociaciones genotípicas tanto con EII como con CU y EC en la población analizada, por lo que se establecen como marcadores de riesgo en la enfermedad.
- El alelo T del rs3024505, en *IL-10*, se asoció a un inicio temprano de los síntomas en CU y se demostró que existe una mayor frecuencia de individuos tratados con esteroides cuando son portadores de este alelo.
- Este estudio demuestra que diversos SNP's relacionados con la respuesta inmune, están asociados con factores genotípicos y fenotípicos en pacientes con EII de origen mexicano y pueden ser propuestos como marcadores de riesgo, protección o progresión de la Enfermedad.

10. REFERENCIAS

- Abdollahi, E., Tavasolian, F., Momtazi-Borojeni, A. A., Samadi, M., y Rafatpanah, H. (2016). Protective role of R381Q (rs11209026) polymorphism in IL-23R gene in immune-mediated diseases: A comprehensive review. *Journal of Immunotoxicology*, 13(3), 286-300.
- Abreu, M. T., Fukata, M., y Arditi, M. (2005). TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol*, 174(8), 4453-4460.
- Aguilera, N. (2004). *Caracterización de Linfocitos T y Células Dendríticas en pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. (Tesis de Doctorado), Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Alvarez-Lobos, M., Arostegui, J. I., Sans, M., Tassies, D., Plaza, S., Delgado, S., et al. (2005). Crohn's Disease Patients Carrying Nod2/CARD15 Gene Variants Have an Increased and Early Need for First Surgery due to Stricture Disease and Higher Rate of Surgical Recurrence. *Annals of Surgery*, 242(5), 693-700.
- Ananthakrishnan, A. N. (2015). Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 12(4), 205-217.
- Andersen, V., Ernst, A., Christensen, J., Østergaard, M., Jacobsen, B. A., Tjønneland, A., et al. (2010). The polymorphism rs3024505 proximal to IL-10 is associated with risk of ulcerative colitis and Crohn's disease in a Danish case-control study. *BMC Medical Genetics*, 11, 82-82.
- Antosz, H., y Osiak, M. (2013). NOD1 and NOD2 receptors: integral members of the innate and adaptive immunity system. *Acta Biochim Pol*, 60(3), 351-360.
- Basu, D., Lopez, I., Kulkarni, A., y Sellin, J. H. (2005). Impact of race and ethnicity on inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 100(10), 2254-2261.
- Boukercha, A., Mesbah-Amroun, H., Bouzidi, A., Saoula, H., Nakkemouche, M., Roy, M., et al. (2015). NOD2/CARD15 gene mutations in North Algerian patients with inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 21(25), 7786-7794.

- Bueno-Hernández, N., Núñez-Aldana, M., Ascaño-Gutierrez, I., y Yamamoto-Furusho, J. K. (2015). Evaluation of diet pattern related to the symptoms of mexican patients with Ulcerative Colitis (UC): through the validity of a questionnaire. *Nutrition Journal*, 14, 25.
- Bueno, H., MañeAlmero, J., Cortes, I., y Yamamoto-Furusho, J. K. (2012). Role of Nutrition in Inflammatory Bowel Disease (IBD): New Therapeutic Approaches and Recent Outcomes. *Journal of Nutritional Therapeutics*, 1(2), 132-137.
- Carneiro, L. A. M., Travassos, L. H., y Philpott, D. J. (2004). Innate immune recognition of microbes through Nod1 and Nod2: implications for disease. *Microbes and Infection*, 6(6), 609-616.
- Castaño-Rodríguez, N., Kaakoush, N. O., y Mitchell, H. M. (2014). Pattern-Recognition Receptors and Gastric Cancer. *Frontiers in Immunology*, 5, 336.
- Corridoni, D., Arseneau, K. O., Cifone, M. G., y Cominelli, F. (2014). The Dual Role of Nod-Like Receptors in Mucosal Innate Immunity and Chronic Intestinal Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 5, 317.
- Cosnes, J., y Seksik, P. (2009). [Inflammatory bowel disease: from sulfasalazine to biologics]. *Gastroenterol Clin Biol*, 33(8-9), 692-701.
- Couto, I., Bello, L., González, B., Tizón, M., y Souto, J. (2009). Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Cad Aten Primaria*, 16, 211-215.
- Cummings, J. R., Ahmad, T., Geremia, A., Beckly, J., Cooney, R., Hancock, L., et al. (2007). Contribution of the novel inflammatory bowel disease gene IL23R to disease susceptibility and phenotype. *Inflamm Bowel Dis*, 13(9), 1063-1068.
- Cheng, J.-F., Ning, Y.-J., Zhang, W., Lu, Z.-H., y Lin, L. (2010). T300A polymorphism of ATG16L1 and susceptibility to inflammatory bowel diseases: A meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 16(10), 1258-1266.
- Cho, J. H. (2008). Inflammatory bowel disease: Genetic and epidemiologic considerations. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 14(3), 338-347.

- Doecke, J. D., Simms, L. A., Zhao, Z. Z., Huang, N., Hanigan, K., Krishnaprasad, K., et al. (2013). Genetic Susceptibility in IBD: Overlap Between Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*, 19(2), 240-245.
- Dubinsky, M. C., Wang, D., Picornell, Y., Wrobel, I., Katzir, L., Quiros, A., et al. (2007). IL-23 receptor (IL-23R) gene protects against pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 13(5), 511-515.
- Dubinsky, M. C., Yang, H., Hassard, P. V., Seidman, E. G., Kam, L. Y., Abreu, M. T., et al. (2002). 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 122(4), 904-915.
- Einarsdottir, E., Koskinen, L. L., Dukes, E., Kainu, K., Suomela, S., Lappalainen, M., et al. (2009). IL23R in the Swedish, Finnish, Hungarian and Italian populations: association with IBD and psoriasis, and linkage to celiac disease. *BMC Med Genet*, 10, 8.
- Engelhardt, K. R., y Grimbacher, B. (2014). IL-10 in humans: lessons from the gut, IL-10/IL-10 receptor deficiencies, and IL-10 polymorphisms. *Curr Top Microbiol Immunol*, 380, 1-18.
- Fonseca-Camarillo, G., Furuzawa-Carballeda, J., Martinez-Benitez, B., Barreto-Zuniga, R., y Yamamoto-Furusho, K. (2011). [Intelukin-10 expression with immunoregulatory function in the mucosa of patients with ulcerative colitis]. *Rev Gastroenterol Mex*, 76(2), 113-119.
- Fonseca-Camarillo, G., y Yamamoto-Furusho, J. K. (2015). Nuevos Aspectos de la Inmunología en la Patogenia de la EII. *AMG*, 1, 33-44.
- Gassull, M., Gomollón, F., Hinojosa, J., y Obrador, A. (2007). *Enfermedad Inflamatoria Intestinal* (pp. 666). Recuperado de <https://es.scribd.com/doc/177808859/Enfermedad-Inflamatoria-Intestinal-Booksmedicos-org>
- Gazouli, M., Pachoula, I., Panayotou, I., Mantzaris, G., Chrousos, G., Anagnou, N. P., et al. (2010). NOD2/CARD15, ATG16L1 and IL23R gene polymorphisms and childhood-onset of Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, 16(14), 1753-1758.

- Glas, J., Seiderer, J., Wetzke, M., Konrad, A., Török, H.-P., Schmechel, S., et al. (2007). rs1004819 Is the Main Disease-Associated IL23R Variant in German Crohn's Disease Patients: Combined Analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 Variants. *PLoS ONE*, 2(9), e819.
- Hayatbakhsh, M. M., Zahedi, M. J., Shafiepour, M., Nikpoor, A. R., y Mohammadi, M. (2012). IL-23 receptor gene rs7517847 and rs1004819 SNPs in ulcerative colitis. *Iran J Immunol*, 9(2), 128-135.
- Jakopin, Z. (2014). Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) inhibitors: a rational approach toward inhibition of NOD signaling pathway. *J Med Chem*, 57(16), 6897-6918.
- Kabi, A., Nickerson, K. P., Homer, C. R., y McDonald, C. (2012). Digesting the genetics of inflammatory bowel disease: insights from studies of autophagy risk genes. *Inflamm Bowel Dis*, 18(4), 782-792.
- Kanaan, Z. M., Eichenberger, M. R., Ahmad, S., Weller, C., Roberts, H., Pan, J., et al. (2012). Clinical predictors of inflammatory bowel disease in a genetically well-defined Caucasian population. *J Negat Results Biomed*, 11, 7.
- Kaser, A., Zeissig, S., y Blumberg, R. S. (2010). Genes and Environment: How Will Our Concepts on the Pathophysiology of IBD Develop in the Future? *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 28(3), 395-405.
- Kaser, A., Zeissig, S., y Blumberg, R. S. (2010). Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol*, 28, 573-621.
- Khor, B., Gardet, A., y Xavier, R. J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351), 307-317.
- Kutikhin, A. G. (2011). Role of NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 gene polymorphisms in cancer etiology. *Hum Immunol*, 72(10), 955-968.
- Lakatos, P. L. (2009). Environmental Factors Affecting Inflammatory Bowel Disease: Have We Made Progress? *Digestive Diseases*, 27(3), 215-225.
- Le, T., Leung, L., Carroll, W. L., y Schibler, K. R. (1997). Regulation of interleukin-10 gene expression: possible mechanisms accounting for its upregulation and for maturational differences in its expression by blood mononuclear cells. *Blood*, 89(11), 4112-4119.

- Levine, B., y Deretic, V. (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 7(10), 767-777.
- Li, Y., Wang, H., Lu, H., y Hua, S. (2016). Regulation of Memory T Cells by Interleukin-23. *Int Arch Allergy Immunol*, 169(3), 157-162.
- Lidar, M., Langevitz, P., y Shoenfeld, Y. (2009). The role of infection in inflammatory bowel disease: initiation, exacerbation and protection. *Isr Med Assoc J*, 11(9), 558-563.
- Liu, M., Zhu, W., Wang, J., Zhang, J., Guo, X., Wang, J., et al. (2015). Interleukin-23 receptor genetic polymorphisms and ulcerative colitis susceptibility: A meta-analysis. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 39(4), 516-525.
- Lv, H., Jiang, Y., Li, J., Zhang, M., Shang, Z., Zheng, J., et al. (2014). Association between polymorphisms in the promoter region of interleukin-10 and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Molecular Biology Reports*, 41(3), 1299-1310.
- Medina, E., Fuentes, D., y G, P. (2014). Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNPAEP*, 151-160.
- Mosser, D. M., y Zhang, X. (2008). Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev*, 226, 205-218.
- Mowat, A. M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*, 3(4), 331-341.
- Murthy, A., Li, Y., Peng, I., Reichelt, M., Katakam, A. K., Noubade, R., et al. (2014). A Crohn's disease variant in Atg16l1 enhances its degradation by caspase 3. *Nature*, 506(7489), 456-462.
- Múzes, G., Tulassay, Z., y Sipos, F. (2013). Interplay of autophagy and innate immunity in Crohn's disease: A key immunobiologic feature. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 19(28), 4447-4454.
- Naser, S. A., Arce, M., Khaja, A., Fernandez, M., Naser, N., Elwasila, S., et al. (2012). Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. *World J Gastroenterol*, 18(5), 412-424.

- Nikfar, S., Ehteshami-Ashar, S., Rahimi, R., y Abdollahi, M. (2010). Systematic review and meta-analysis of the efficacy and tolerability of nicotine preparations in active ulcerative colitis. *Clin Ther*, 32(14), 2304-2315.
- Ogawa, C., Liu, Y. J., y Kobayashi, K. S. (2011). Muramyl dipeptide and its derivatives: peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy. *Curr Bioact Compd*, 7(3), 180-197.
- Oliver, J., Rueda, B., López-Nevot, M. A., Gómez-García, M., y Martín, J. (2007). Replication of an Association Between *IL23R* Gene Polymorphism With Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 5(8), 977-981.e972.
- Orholm, M., Munkholm, P., Langholz, E., Nielsen, O. H., Sørensen, T. I. A., y Binder, V. (1991). Familial Occurrence of Inflammatory Bowel Disease. *New England Journal of Medicine*, 324(2), 84-88.
- Paul, G., Khare, V., y Gasche, C. (2012). Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10. *Eur J Clin Invest*, 42(1), 95-109.
- Peeters, M., Nevens, H., Baert, F., Hiele, M., de Meyer, A. M., Vlietinck, R., et al. (1996). Familial aggregation in Crohn's disease: Increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology*, 111(3), 597-603.
- Philpott, D. J., Sorbara, M. T., Robertson, S. J., Croitoru, K., y Girardin, S. E. (2014). NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 14(1), 9-23.
- Podolsky, D. K. (2002). Inflammatory Bowel Disease. *New England Journal of Medicine*, 347(6), 417-429.
- Powell, M. J., Thompson, S. A. J., Tone, Y., Waldmann, H., y Tone, M. (2000). Posttranscriptional Regulation of IL-10 Gene Expression Through Sequences in the 3'-Untranslated Region. *The Journal of Immunology*, 165(1), 292-296.
- Ramírez, J., Vargas, G., Tovilla, C., y JM, F. (2013). Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP)

- y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gac Méd Méx*, 149(2), 220-228.
- Randall-Demllo, S., Chieppa, M., y Eri, R. (2013). Intestinal Epithelium and Autophagy: Partners in Gut Homeostasis. *Frontiers in Immunology*, 4, 301.
- Reyes, J. (2010). *Estudio de polimorfismos e interacciones génicas de los genes IL1A, IL1B, IL1R, IL1RA, IL4R A, IL12, IFNG, TGFB1, TNFA, IL2, IL4, IL6, IL10 en pacientes con asma* (Tesis de Doctorado), Universidad de Salamanca, España. Retrieved from http://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/83319/1/DOGP_Padr%C3%B3n_MoralesJR_Estudiodepolimorfismos.pdf
- Roberts, R. L., Gearry, R. B., Hollis-Moffatt, J. E., Miller, A. L., Reid, J., Abkevich, V., et al. (2007). IL23R R381Q and ATG16L1 T300A are strongly associated with Crohn's disease in a study of New Zealand Caucasians with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 102(12), 2754-2761.
- Rodríguez-Bores, L., Fonseca, G. C., Villeda, M. A., y Yamamoto-Furusho, J. K. (2007). Novel genetic markers in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 13(42), 5560-5570.
- Rodríguez, G. (2001). Enfermedad inflamatoria intestinal: Epidemiología y patogénesis. *Médica Sur Sociedad de Médicos, A. C.*, 8(3), 84-89.
- Rogler, G., Bernstein, C. N., Sood, A., Goh, K. L., Yamamoto-Furusho, J. K., Abbas, Z., et al. (2012). Role of biological therapy for inflammatory bowel disease in developing countries. *Gut*, 61(5), 706-712.
- Romero-Valdovinos, M., Gudiño-Ramírez, A., Reyes-Gordillo, J., Martínez-Flores, W. A., Ramírez-Miranda, M. E., Maravilla, P., et al. (2012). Interleukin-8 and -10 gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Molecular Biology Reports*, 39(9), 8837-8843.
- Salem, M., Ammitzboell, M., Nys, K., Seidelin, J. B., y Nielsen, O. H. (2015). ATG16L1: A multifunctional susceptibility factor in Crohn disease. *Autophagy*, 11(4), 585-594.

- Sanchez-Muñoz, F., Dominguez-Lopez, A., y Yamamoto-Furusho, J. K. (2008). Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 14(27), 4280-4288.
- Sanchez, R., Levy, E., Costea, F., y Sinnett, D. (2009). IL-10 and TNF-alpha promoter haplotypes are associated with childhood Crohn's disease location. *World J Gastroenterol*, 15(30), 3776-3782.
- Sandoval, E., y Bosques, F. (2008). Enfermedad Inflamatoria Intestinal: Realidad en México. *Rev Gastroenterol Mex*, 73(2), 38-42.
- Saro, C. (2008). Clasificación de Montreal de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) y sus implicaciones clínico-terapéuticas. *RAPD Online*, 31, 15-20.
- Schmidt, C., Giese, T., Ludwig, B., Mueller-Molaian, I., Marth, T., Zeuzem, S., et al. (2005). Expression of Interleukin-12-Related Cytokine Transcripts in Inflammatory Bowel Disease: Elevated Interleukin-23p19 and Interleukin-27p28 in Crohn's Disease But Not in Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 11(1), 16-23.
- Sepúlveda, S. E., Beltrán, C. J., Peralta, A., Rivas, P., Rojas, N., Figueroa, C., et al. (2008). Enfermedad inflamatoria intestinal: Una mirada inmunológica. *Revista médica de Chile*, 136, 367-375.
- Shih, D. Q., y Targan, S. R. (2009). Insights into IBD Pathogenesis. *Current gastroenterology reports*, 11(6), 473-480.
- Siegmund, B., y Zeitz, M. (2011). Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 17(27), 3178-3183.
- Soriguer, F., y Morcillo, S. (2007). ¿Qué hacer cuando en los estudios de epidemiología biomolecular la distribución genotípica no se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg? *Endocrinología y Nutrición*, 54(3), 169-173.
- Soriguer, F., y Morcillo, S. (2007). ¿Qué hacer cuando en los estudios de epidemiología biomolecular la distribución genotípica no se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg? *Endocrinología y Nutrición*, 54, 169-173.
- Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J., y Lotze, M. T. (2012). PAMPs and DAMPs: Signal 0s that Spur Autophagy and Immunity. *Immunol Rev*, 249(1), 158-175.

- Tedde, A., Laura Putignano, A., Bagnoli, S., Congregati, C., Milla, M., Sorbi, S., et al. (2008). Interleukin-10 promoter polymorphisms influence susceptibility to ulcerative colitis in a gender-specific manner. *Scand J Gastroenterol*, 43(6), 712-718.
- Teng, M. W., Bowman, E. P., McElwee, J. J., Smyth, M. J., Casanova, J. L., Cooper, A. M., et al. (2015). IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat Med*, 21(7), 719-729.
- Thompson, A. I., y Lees, C. W. (2011). Genetics of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 17(3), 831-848.
- Tsianos, E. V., Katsanos, K. H., y Tsianos, V. E. (2011). Role of genetics in the diagnosis and prognosis of Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, 17(48), 5246-5259.
- Turner, D. M., Williams, D. M., Sankaran, D., Lazarus, M., Sinnott, P. J., y Hutchinson, I. V. (1997). An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*, 24(1), 1-8.
- Wang, A. H., Lam, W. J., Han, D. Y., Ding, Y., Hu, R., Fraser, A. G., et al. (2011). The effect of IL-10 genetic variation and interleukin 10 serum levels on Crohn's disease susceptibility in a New Zealand population. *Hum Immunol*, 72(5), 431-435.
- Watakabe, A., Tanaka, K., y Shimura, Y. (1993). The role of exon sequences in splice site selection. *Genes Dev*, 7(3), 407-418.
- Yamamoto-Furusho, J. (2010). Enfermedad inflamatoria intestinal: bases moleculares y clínicas. *Rev Gastroenterol Mex*, 75(2), 189-190.
- Yamamoto-Furusho, J. K. (2007). Genetic factors associated with the development of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 13(42), 5594-5597.
- Yamamoto-Furusho, J. K. (2009). Clinical Epidemiology of Ulcerative Colitis in Mexico: A Single Hospital-based Study in a 20-year Period (1987-2006). *Journal of Clinical Gastroenterology*, 43(3), 221-224.

- Yamamoto-Furusho, J. K. (2012). Tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Rev Gastroenterol Mex*, 77, Supplement 1, 39-41.
- Yamamoto-Furusho, J. K. (2013). Enfermedad de Crohn: Diagnóstico y tratamiento. *Rev Gastroenterol Mex*, 78, Supplement 1, 68-70.
- Yamamoto-Furusho, J. K. (2015). La epidemiología cambiante de la EII y su relevancia en Latinoamérica. *AMG*, 5, 14-21.
- Yamamoto-Furusho, J. K., Barnich, N., Hisamatsu, T., y Podolsky, D. K. (2010). MDP-NOD2 stimulation induces HNP-1 secretion which contributes to NOD2 anti-bacterial function. *Inflamm Bowel Dis*, 16(5), 736-742.
- Yamamoto-Furusho, J. K., y Fonseca-Camarillo, G. (2015). Genetic Markers Associated with Clinical Outcomes in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*, 21(11), 2683-2695.
- Yamamoto-Furusho, J. K., y Podolsky, D. K. (2007). Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 13(42), 5577-5580.
- Yamamoto-Furusho, J. K., y Sánchez, G. (2015). Papel de la genética en la Susceptibilidad y Desenlaces Clínicos de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *AMG*, 1, 22-32.
- Yamazaki, K., Takazoe, M., Tanaka, T., Kazumori, T., y 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.
- Yu, R. Y., Brazaitis, J., y Gallagher, G. (2015). The human IL-23 receptor rs11209026 A allele promotes the expression of a soluble IL-23R-encoding mRNA species. *J Immunol*, 194(3), 1062-1068.
- Zaahl, M. G., Winter, T., Warnich, L., y Kotze, M. J. (2005). Analysis of the three common mutations in the CARD15 gene (R702W, G908R and 1007fs) in South African colored patients with inflammatory bowel disease. *Molecular and Cellular Probes*, 19(4), 278-281.
- Zhang, J., Chen, J., Gu, J., Guo, H., y Chen, W. (2014). Association of IL23R and ATG16L1 with susceptibility of Crohn's disease in Chinese population. *Scand J Gastroenterol*, 49(10), 1201-1206.

- Zhong, Y., Kinio, A., y Saleh, M. (2013). Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front Immunol*, 4, 333.
- Zou, L., Wang, L., Gong, X., Zhao, H., Jiang, A., y Zheng, S. (2014). The association between three promoter polymorphisms of IL-10 and inflammatory bowel diseases (IBD): A meta-analysis. *Autoimmunity*, 47(1), 27-39.
- 1000 Genomes A Deep Catalog of Human Genetic Variation, 2015. Recuperado el 15 de agosto del 2016.
http://browser.1000genomes.org/Homo_sapiens/Info/Index.