

# Fenotipificación y genotipificación en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal en un centro de referencia de Colombia

## Phenotyping and genotyping in patients with inflammatory bowel disease in a reference center in Colombia

Viviana Parra Izquierdo<sup>1</sup> , Albis Cecilia Hani<sup>2,3</sup> , Consuelo Romero-Sánchez<sup>4</sup> , Ana Isabel Sánchez<sup>5</sup> , Yuly Laguado<sup>5</sup> , Ana María Leguizamó<sup>2,3</sup> , Juan Sebastián Frías-Ordoñez<sup>6</sup> , Gerardo Andrés Puentes<sup>2,7</sup> , Ignacio Zarante<sup>5</sup> 

<sup>1</sup> Gastroenterología y Reumatología, Hospital Internacional de Colombia, Bucaramanga, Colombia.

<sup>2</sup> Gastroenterología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

<sup>3</sup> Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá, Colombia.

<sup>4</sup> Grupo de Inmunología Celular y Molecular, Universidad el Bosque, Bogotá, Colombia.

<sup>5</sup> Instituto de Genética, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

<sup>6</sup> Gastroenterología y endoscopia digestiva, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

<sup>7</sup> Hospital Serena del Mar, Cartagena de Indias, Colombia.

**Recibido:** 20/09/2023

**Aprobado:** 26/02/2024

**En línea:** 18/02/2024

### Contribución de los autores

Los autores declaran haber contribuido equitativamente en la realización del estudio.

### Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflicto de intereses.

### Financiamiento

Ninguno.

### Citar como

Parra Izquierdo V, Cecilia Hani A, Romero-Sánchez C, Sánchez Al, Laguado Y, Leguizamó AM, et al. Fenotipificación y genotipificación en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal en un centro de referencia de Colombia. *Rev Gastroenterol Peru.* 2024;44(1):26-34. doi: 10.47892/rgp.2023.441.1609

### Correspondencia:

Juan Sebastián Frías Ordoñez  
Gastroenterología y endoscopia  
digestiva, Universidad Nacional de  
Colombia, Bogotá, Colombia.  
E-mail: jsfrias@unal.edu.co

## RESUMEN

**Introducción:** Se ha tratado de identificar los factores genéticos relacionados con susceptibilidad para enfermedad inflamatoria intestinal (EII), y los hallazgos actuales se inclinan por un modelo de patología complejo, sin un patrón hereditario claro. **Objetivo:** Realizar caracterización fenotípica y genotípica de pacientes con EII en población colombiana y describir su posible asociación con predisposición. **Materiales y métodos:** Serie de casos, 16 pacientes con EII por criterios clínicos y anatomopatológicos, inicio de síntomas gastrointestinales después de los 18 años. Todos tuvieron asesoramiento genético pre-test y se realizaron árboles genealógicos de mínimo tres generaciones. También, genotipificación, por medio de un panel de genes múltiples que incluía genes relacionados con EII y algunos trastornos autoinmunitarios. Finalmente, se realizó análisis genómico de variantes. **Resultados:** 9 mujeres y 7 hombres, con edad media de diagnóstico de EII 35 años, y 32 años para aparición de síntomas gastrointestinales. 11/16 (68,75%) requirieron terapia biológica. 10/16 (62,5%) presentaron refractariedad a terapia estándar. 3/16 (18,75%) tenían antecedentes familiares positivos de EII. 100% casos presentaron al menos un single nucleotide polymorphism relacionado con riesgo de EII en más de un gen. Los genes más relacionados con colitis ulcerosa (CU), fueron CD48, CD6, y TYK2 para CU, y CD6 e ITGAM para la enfermedad de Crohn. El gen más frecuente fue CD6. Se observó en 3/16 (18,75%) presencia de hasta 5 genes, 4 en 3/16 (18,75%), y tres en 5/16 (31,25%). **Conclusión:** En EII hay presencia de variantes genéticas con predisposición asociada, pero sin patogenicidad confirmada, y cuya sumatoria parece contribuir en su fisiopatología.

**Palabras clave:** Enfermedades inflamatorias del intestino; Fenotipo; Genotipo; Genética; Colitis ulcerosa; Enfermedad de Crohn (fuente: DeCS Bireme).

## ABSTRACT

**Introduction:** Attempts have been made to identify the genetic factors related to susceptibility to inflammatory bowel disease (IBD), and the current conclusions are in favor of a complex pathology model, without a clear hereditary pattern. **Objective:** To perform phenotypic and genotypic characterization of patients with IBD in Colombian population and to describe its possible association with predisposition. **Materials and methods:** case series, 16 patients with IBD according to clinical and pathological criteria, onset of gastrointestinal symptoms after 18 years of age. All had pre-test genetic counseling and family trees of at least three generations were made. Also, genotyping, using a multi-gene panel that included genes related to IBD and some autoimmune disorders. Finally, a genomic analysis of variants was performed. **Results:** 9 women and 7 men, with mean age of diagnosis of IBD of 35 years, and gastrointestinal symptoms appearance of 32 years. 11/16 (68.75%) required biological therapy. 10/16 (62.5%) were refractory to standard therapy. 3/16 (18.75%) had positive family history of IBD. 100% cases presented at least one single nucleotide polymorphism related to IBD risk in more than one gene. The genes most related to ulcerative colitis (UC) were CD48, CD6, and TYK2 for UC, and CD6 and ITGAM for Crohn's disease. The most frequent gene was CD6. It was found presence of up to 5 genes in 3/16 (18.75%), 4 in 3/16 (18.75%), and three in 5/16 (31.25%). **Conclusion:** In IBD there is the presence of genetic variants with associated predisposition, but without confirmed pathogenicity, and whose sum seems to contribute to its pathophysiology.

**Keywords:** Inflammatory bowel diseases; Phenotype; Genotype; Genetics; Colitis, ulcerative; Crohn disease (source: MeSH NLM).

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) se caracteriza por ser un proceso inflamatorio, crónico, recurrente, con diferentes grados de severidad que afecta el tubo digestivo, pero que además puede afectar otros órganos. Dentro de la EII se clasifican la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU) <sup>(1)</sup>. Esta patología suele tener dos picos de presentación, uno en el segundo, y otro en la tercera década de la vida <sup>(2)</sup>. Esta inflamación crónica es caracterizada por ser de tipo netamente mucoso, simétrico y solo comprometiéndolo el intestino grueso en la CU y transmural, focal, asimétricos y con posibilidad de comprometer cualquier trayecto del tubo digestivo en la EC <sup>(1)</sup>. Las manifestaciones clínicas son heterogéneas, dependiendo del segmento comprometido, usualmente el paciente se queja de dolor abdominal, diarrea crónica, algunas veces con rectorragia, urgencia, tenesmo, pérdida de peso, anemia, sin olvidar que también puede presentar compromiso extraintestinal dentro del cual los más frecuentes son el articular, cutáneo y ocular. Dentro de las complicaciones está el compromiso fistulizante, perianal y estenosante principalmente presentado en la EC <sup>(3)</sup>.

Existen aproximadamente 1,4 millones de personas afectadas con EII en Estados Unidos y Canadá, y 2,2 millones en Europa y su morbimortalidad es grande <sup>(4,5)</sup>. En Colombia ya existen 2 estudios de prevalencia de EII el primero en el 2017 documento CU del 51,77 / 100 000 y de EC de 5,85 / 100 000 <sup>(6)</sup>, en el 2020 se incrementó en CU a 113,12 / 100 000 y en EC a 16,57 / 100 000 <sup>(7)</sup>.

Se han hecho algunos estudios para tratar de identificar los factores genéticos que confieren susceptibilidad para EII. Hasta la fecha, se han documentado más de 240 loci <sup>(8)</sup> únicos asociados a EII en más de 50 genes, gracias a estudios de asociación de todo el genoma (*Genome Wide Association Studies*, GWAS por sus siglas en inglés), principalmente en población adulta <sup>(9,10)</sup>. La mayoría de estos loci de susceptibilidad identificados parecen tener individualmente un efecto bajo (OR ~ 1,0-1,5), y en conjunto parece que representan menos del 20% del riesgo hereditario para EII <sup>(11)</sup>. Lo anterior apoya un modelo de patología complejo, en el que variantes comunes con efectos modestos parecen interactuar con factores ambientales como la dieta, el tabaquismo y el microbioma intestinal, dando lugar a la susceptibilidad a EII. Por lo tanto, se acepta que la EII no sigue un patrón de herencia mendeliano sino que es el resultado de una respuesta inflamatoria inapropiada del microbioma intestinal en individuos genéticamente susceptibles <sup>(12)</sup>.

Algo que apoya la heredabilidad y el componente genético de esta patología, es que se ha documentado que hasta un 20% de individuos tienen historia familiar de EII. Y que además, en el 25-35% de estas familias, existen individuos afectados con ambas entidades (EC y CU). Parientes en primer grado de pacientes con CU o EC tienen un riesgo hasta 10 veces mayor de presentar EII <sup>(13)</sup>. En EC, la concordancia en gemelos monocigóticos es del 30,3%, y en dicigóticos del 3,6%. En CU, la concordancia en gemelos

monocigóticos es del 15,4% y en dicigóticos del 3,9%. Los estudios en gemelos han demostrado la mejor evidencia de la predisposición genética a EII, que será mayor para EC que para CU <sup>(14)</sup>.

Así mismo, se han documentado también síndromes genéticos asociados a EII, como el síndrome de Turner, el síndrome de Hermansky - Pudlak, enfermedad de células falciformes, trisomía 9, deficiencia selectiva de IgA, síndrome de Chediak Higashi, y paquidermaperiosis, entre otros <sup>(15)</sup>.

Es importante resaltar que hay genes como el *NOD2*, *MDR1*, *CARD15* que parecen afectar directamente la respuesta inmunológica normal en el intestino <sup>(16,17)</sup>. Recordemos que, en estado saludable, las células caliciformes secretan una capa de moco que limita la exposición del epitelio intestinal a bacterias. Tanto la secreción de péptidos antimicrobianos (por ejemplo, A-defensinas) por las células de Paneth como la producción de inmunoglobulina A (IgA) proporcionan protección adicional contra el microbioma luminal <sup>(18)</sup>. La detección microbiana innata por las células epiteliales, las células dendríticas y los macrófagos está mediada por receptores de reconocimiento de patrones, como los receptores tipo toll y las proteínas del dominio de oligomerización de nucleótidos (NOD). Las células dendríticas presentan antígenos a las células T CD4 + vírgenes en órganos linfoides secundarios (placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos), donde factores como el fenotipo de las células presentadoras de antígeno y el medio de citocinas (factor de crecimiento transformante  $\beta$  [TGF- $\beta$ ] e interleucina - 10) modulan la diferenciación de subgrupos de células T CD4 + con la producción de perfiles característicos de citocinas (células T reguladoras por ejemplo, Treg, Th1, Th2 y Th17) y moléculas enterotrópicas como por ejemplo,  $\alpha 4\beta 7$  que proporcionan la localización intestinal de los linfocitos de la circulación sistémica. Estas células T CD4 + activadas luego circulan hacia la lámina propia intestinal, donde llevan a cabo funciones efectoras <sup>(19)</sup>. Teniendo en cuenta esta inmunología de mucosas, también se han documentado alteraciones en ciertos genes pueden involucrar cambios en este proceso, incluso se han implicado algunos genes en el pronóstico de la enfermedad como lo son:

- *NOD2*: se ha asociado a un incremento del riesgo para EC de tres veces más con respecto a la población general, si hay variantes heterocigotas, 38 veces más si variantes homocigotas y 44 veces más si variantes heterocigosis compuesta <sup>(20,21)</sup>. Está asociado a mayor agresividad en EC, mayor riesgo de enfermedad estenosante y necesidad de intervención quirúrgica temprana <sup>(22)</sup>.
- *ABC1*: algunos polimorfismos se han asociado a incremento en el riesgo para CU <sup>(23)</sup>.

Hay que resaltar que también hay implicaciones terapéuticas en las alteraciones genéticas. Se han documentado alteraciones en los genes *ATG16L1*, *NOD2* e *IRGM*, los cuales están involucrados en aumentar las vías de autofagia con posterior evidencia de no eficacia para

algunos medicamentos. Por eso, gracias a la identificación de nuevos loci de riesgo, se han diseñado medicamentos dirigidos que permiten el acercamiento a la medicina personalizada<sup>(24)</sup>.

Se requiere un cambio de perspectiva para avanzar en la comprensión de la EII. La mayoría de enfoques de investigación tradicionales se han centrado en aspectos de la etiología o tratamiento, sin una apreciación de las asociaciones etiológicas y farmacológicas complejas. Mediante el siguiente estudio se propone realizar una caracterización fenotípica y genotípica de pacientes con EII en población colombiana y describir su posible asociación con predisposición.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño del estudio y pacientes

Estudio observacional descriptivo tipo serie de casos, el análisis de la frecuencia de estas variantes se hizo teniendo en cuenta las frecuencias alélicas reportadas en la literatura y los datos arrojados por el proyecto 1000 genomas.

Se incluyeron 16 pacientes seleccionados por conveniencia de la Consulta de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del Hospital Universitario San Ignacio. Todos tuvieron asesoramiento genético pre test y se realizaron los árboles genealógicos de mínimo tres generaciones de sus familias con el objetivo de establecer antecedentes de patologías asociadas con sistema gastrointestinal o enfermedades autoinmunes. Se incluyeron pacientes diagnosticados con EC o CU por criterios clínicos y anatomopatológicos de acuerdo a biopsia intestinal, con inicio de síntomas gastrointestinales después de los 18 años.

### Control de sesgos

Dado que se trata de un estudio observacional y retrospectivo, los datos fueron tomados de la historia clínica. El control de sesgo de información se realiza teniendo en cuenta que los pacientes pertenecen a la clínica de EII del Hospital Universitario San Ignacio. Por lo tanto, son pacientes con un seguimiento médico continuo, en quienes se realiza control paraclínico seriado y registro de signos y síntomas en varias consultas y evoluciones de la historia clínica, por lo tanto, la consolidación de las variables tiene alta fidelidad y representatividad disminuyendo sustancialmente el sesgo de memoria y de registro de variables.

### Tamaño de muestra

Como es una serie de casos no se tiene un tamaño de muestra dado que no se quiere realizar una inferencia de los resultados teniendo en cuenta una variabilidad de condiciones clínicas que no permiten la generalización de los resultados de estos pacientes, pero sí describir asociaciones y características demográficas con los hallazgos genéticos y fenotípicos en estos pacientes. Como es un estudio en el que se requiere inversión económica

para poder realizar el estudio de los paneles genéticos, hay una limitación en la inclusión de más pacientes, el cual estuvo condicionado al presupuesto disponible.

### Extracción de ADN y genotipificación

Se extrajeron muestras de ADN de sangre total de cada paciente mediante el método de *Salting out* en el Laboratorio del Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana Bogotá. Todas las muestras de ADN se genotipificaron utilizando un panel de genes múltiples basado en secuenciación de próxima generación (NGS por sus siglas en inglés) que incluía 46 genes relacionados con EII y algunos trastornos relacionados con autoinmunidad: *IL23R, IL12B, JAK2, TYK2, STAT1, STAT3, STAT4, IBD3, REL, CARD9, ITAM, IL2RA, ICOSLG, PRDM1, SMAD3, ORMDL3, CD48, STAT1, IL21, DOK3, CREM, CD226, MLH3, IFNG, CD6, MAP3K8, SLC11A1, NOD2, IL6, IBD5, NKX2-3, TNF, CCR6, IBD5, IL1R2, IRGM, ATG16L1, PTPN22, IL6ST, SPRED1, IFNGR2, TNFSF18, TNFRSF14, CARD11* e *IRF5*.

### Análisis genómico de las variantes

Se aplicaron varios filtros de calidad a las variantes que se encontraron, incluidas aquellas con bajas frecuencias o ausentes de los controles. Para el análisis descriptivo de los single nucleotide polymorphism (SNP) se utilizó la Nomenclatura Internacional del Genoma Humano (HUGO-GNC: Comité de Nomenclatura Genética de la Organización del Genoma Humano) y adicionalmente se les asignó significación clínica según las bases de datos OMIM, ClinVar y dbSNP. Se realizaron algoritmos *in silico*: Polyphen, SIFT, PROVEAN, MutationTester, cuando fue posible. La patogenicidad de estas variantes se evaluó finalmente de acuerdo con el *American College of Medical Genomics and Genetics* (criterios ACMG).

## RESULTADOS

La distribución por sexo incluyó 9 mujeres y 7 hombres. La edad media de los pacientes en el momento del diagnóstico de EII fue de 35 años. Y la edad media de aparición de síntomas gastrointestinales fue de 32 años.

Todos los pacientes habían tenido manejo con esteroide, sulfalazina o enemas al menos una vez en la vida. Once pacientes requirieron manejo farmacológico con terapia biológica (Adalimumab<sup>(2)</sup>, Infliximab<sup>(9)</sup>). Diez pacientes (62,5%) presentaron algún tipo de fracaso terapéutico con los tratamientos estándar y, por lo tanto, se clasificaron con enfermedad clínicamente grave. En seis pacientes se documentó falla terapéutica al manejo con esteroides, en cuatro a la terapia biológica (Adalimumab, Infliximab), y en un paciente falla terapéutica con Azatiopina. Tres de los dieciséis pacientes (18,75%) tenían antecedentes familiares positivos de EII.

### Genotipificación

En cuanto a los resultados genéticos, todos los pacientes presentaron al menos un SNP relacionado con riesgo

de EII en más de un gen. En Tabla 1 se resume los SNPs encontrados y su clasificación según *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG).

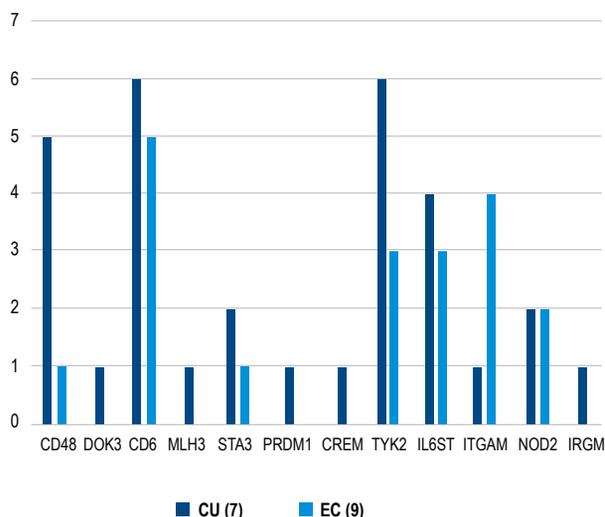
Seis de dieciséis pacientes (37,5%) tenían los siguientes SNPs en el gen CD48: rs6667145 y rs2295615. Once de dieciséis pacientes (68,75%) tenían los siguientes SNP en

**Tabla 1.** Genotipificación de los pacientes con EII. En las columnas se encuentran los genes evaluados. VUS: Variantes de significado clínico desconocido. Benigna: Variantes descritas sin asociación a la patología según la literatura y las bases de datos globales actuales.

ID Paciente	Diagnóstico	CD48	DOK3	CD6	MLH3	STAT3	PRDM1	CREM	TYK2	IL6ST	ITGAM	NOD2	IRGM
0001	CU	(c.706G>A, p.Glu236Ly) ACMG benigna (c.304G>C, p.Glu102Gln) ACMG benigna	c.878C>A (p.Pro293Gln) ACMG VUS	(c.673C>T; p.Arg225Trp) ACMG benigna	(c.3440A>; p.Asn1147Ile) ACMG VUS	(c.1381G; p.Val461Leu) ACMG benigna	No	No	No	No	No	No	No
0004	CU	No	No	(c.673C>T; p.Arg225Trp) ACMG benigna	No	No	(c.806T>; p.Ile269Asn) ACMG VUS	(c.524C>T; p.Ser175Leu) ACMG Likely benigna	c.1084G>T; p.Val362Phe) ACMG benigna	No	No	No	No
0007	CU	No	No	(c.673C>T; p.Arg225Trp) ACMG benigna	No	No	No	No	c.1084G>T; p.Val362Phe) ACMG benigna	c.442G>C; p.Gly148Arg) ACMG benigna	No	No	No
0005	EC	No	No	No	No	No	No	No	(c.1084G>; p.Val362Phe) ACMG benigna	(c.442G>; p.Gly148Arg) ACMG benigna	(c.3436C>T; p.Pro1146Ser) ACMG benigna	No	No
0015	EC	No	No	(c.673C>T; p.Arg225Trp) ACMG benigna	No	No	No	No	No	(c.442G>; p.Gly148Arg) ACMG benigna	(c.3436C>T; p.Pro1146Ser) ACMG benigna	No	No
0013	EC	No	No	(c.673C>T; p.Arg225Trp) ACMG benigna (c.1720G>A; p.Gly606Ser) ACMG benigna	No	No	No	No	No	No	(c.3436C>T; p.Pro1146Ser) ACMG benigna	No	No
0002	EC	No	No	(c.673C>T; p.Arg225Trp) ACMG benigna	No	No	No	No	(c.1084G>; p.Val362Phe) ACMG benigna	c.442G>C; p.Gly148Arg) ACMG benigna	No	(c.2722G>; p.Gly908Arg) ACMG benigna	No
0008	CU	No	No	(c.650C>T; p.Thr217Met) ACMG benigna	No	No	No	No	(c.3488A>; p.Glu1163Gly) ACMG benigna	No	No	No	No
0006	EC	(c.304G>C, p.Glu102Gln) ACMG benigna	No	(c.673C>T; p.Arg225Trp) ACMG benigna	No	No	No	No	(c.1084G>; p.Val362Phe) ACMG benigna (c.2051T>; p.Ile684Se) ACMG benigna	No	No	No	No
0011	CU	No	No	No	No	No	No	No	(c.1084G>; p.Val362Phe) ACMG benigna	No	No	No	No
0016	CU	(c.304G>C, p.Glu102Gln) ACMG benigna	No	(c.673C>T; p.Arg225Trp) ACMG benigna	No	No	No	No	No	c.442G>C; p.Gly148Arg) ACMG benigna	No	No	No
0010	CU ***	(c.706G>A, p.Glu236Ly) ACMG benigna	No	No	No	(c.1381G>C; p.Val461Leu) ACMG benigna	No	No	No	c.442G>C; p.Gly148Arg) ACMG benigna	(c.3436C>T; p.Pro1146Ser) ACMG benigna	(c.2863G>A; p.Val955Ile) ACMG Likely benigna	No
0009	EC	No	No	(c.673C>T; p.Arg225Trp) ACMG benigna	No	(c.1381G>C; p.Val461Leu) ACMG benigna	No	No	No	No	No	No	No
0014	EC	No	No	No	No	No	No	No	No	No	(c.3436C>T; p.Pro1146Ser) ACMG benigna	(c.2107C>T; p.Arg703Cys) ACMG VUS/ Likely pathogenic	No
0012	CU***	(c.706G>A, p.Glu236Ly) ACMG benigna (c.304G>C, p.Glu102Gln) ACMG benigna	No	(c.1720G>A; p.Gly606Ser) ACMG benigna	No	No	No	No	(c.1084G>; p.Val362Phe) ACMG benigna (c.2051T>; p.Ile684Se) ACMG benigna	(c.442G>; p.Gly148Arg) ACMG benigna	No	(c.2104C>T; p.Arg702Trp) ACMG benigna	No
0003	CU	(c.304G>C, p.Glu102Gln) ACMG benigna	No	No	No	No	No	No	(c.1084G>; p.Val362Phe) ACMG benigna	c.442G>C; p.Gly148Arg) ACMG benigna	No	No	(c.281C>; p.Thr94Lys) ACMG benigna

**Tabla 2.** Variantes genéticas documentadas en sujetos con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

	CU <sup>(6)</sup>	EC <sup>(7)</sup>
CD48	5 (55%)	1 (14,2%)
DOK3	1 (11,1%)	0
CD6	6 (66,6%)	5 (71,4%)
MLH3	1 (11,1%)	0
STAT3	2 (22,2%)	1 (14,2%)
PRDM1	1 (11,1%)	0
CREM	1 (11,1%)	0
TYK2	6 (66,6%)	3 (42,8%)
IL6ST	4 (44,4%)	3 (42,8%)
ITGAM	1 (11,1%)	4 (57,1%)
NOD2	2 (22,2%)	2 (28,5%)
IRGM	1 (11,1%)	0



**Figura 1.** Variantes genéticas presentes en subtipos de enfermedad inflamatoria intestinal, según frecuencia.

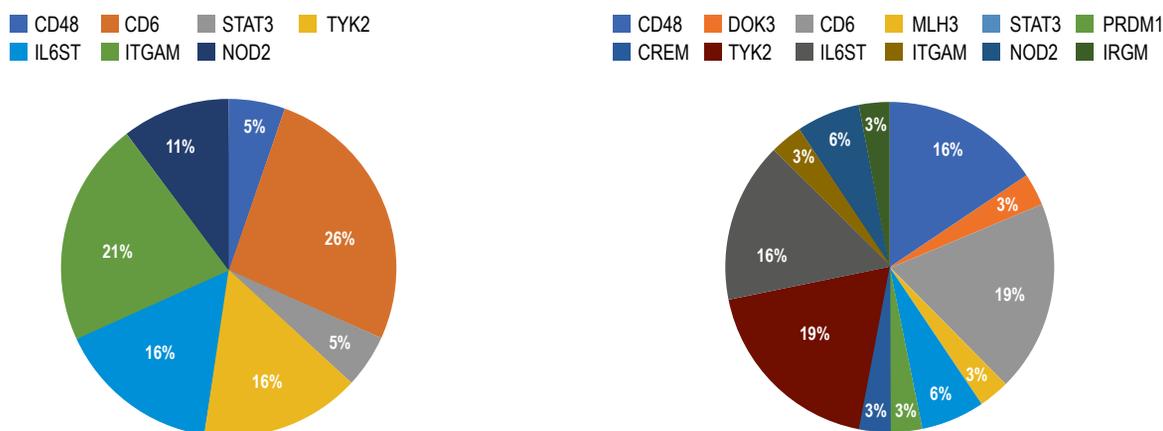
el gen CD6: rs11230562, rs2074233, rs11230563. El último SNP se ha informado en pacientes con EII. Dos pacientes con CU y 1 paciente con EC tenían el SNP rs149214040 en el gen STAT3; este gen juega un papel patogénico en la colitis a través de la regulación de las células T.

Ocho de dieciséis pacientes tenían el SNP rs2304256 en el gen TYK2. En los japoneses, se ha informado que este SNP en combinación con diferentes SNP en el gen STAT3 aumenta la susceptibilidad a la EC, sin embargo, ninguno de nuestros pacientes con polimorfismos en TYK2 tenía polimorfismos en STAT3 al mismo tiempo.

El rs2228044 en el gen il6ST se encontró en 4 pacientes con EC y en 4 pacientes con CU. Las variantes de este gen se han asociado con la EII y el cáncer de colon, sin embargo, el SNP informado en nuestro paciente no se ha asociado antes con EII.

Tres pacientes diagnosticados clínicamente con EC, tenían variantes heterocigotas en NOD2: c.2104C> T (p.Arg702Trp), c.2107C> T (p.Arg703Cys), c.2722G> C (p.Gly908Arg), todos ellos tienen interpretaciones contradictorias de la patogenicidad (VUS vs. Probablemente benigno). Otro paciente con EC tenía la variante benigna c.2863G> A (p.Val955Ile) en el gen NOD2 (Tabla 1).

Al analizar la presencia de variantes genéticas se puede evidenciar que estuvieron presentes en al menos un paciente con CU, pero en cambio en los pacientes con EC hubo 5 genes ausentes (Tabla 2, Figuras 1 y 2). En este punto es importante analizar la significancia estos genes. También se observó que, en los pacientes con CU, los siguientes genes están presentes en más del 50% de los pacientes: CD48, CD6, TYK2, y en los pacientes con EC, los siguientes genes estuvieron presentes en más del 50% de los pacientes: CD6 e ITGAM (Figuras 1 y 2).



**Figura 2.** Comparación de variantes genéticas encontradas de acuerdo a subtipo de enfermedad inflamatoria intestinal.

**Tabla 3.** Comparación según frecuencia de los genes por patología

	CD6 presente (11 - 69%)	CD6 ausente (5 - 31%)
CU	6	3
EC	5	2
Promedio de genes presentes	3,27	3

En nuestra serie de casos los genes más frecuentes sin discriminación según patología fueron CD6 (22%), TYK2 (18%) y IL6ST (16%). El gen más frecuente fue el CD6 y no hay diferencias entre CU y EC ni en el promedio de otros genes comprometidos (Tabla 3).

**Análisis por número de genes expresados por pacientes**

Se observó en tres pacientes la presencia de hasta 5 genes, 4 en tres pacientes, y en 5 pacientes tres de ellos (Tabla 4). Por otro lado, al comparar por número de genes comprometidos vemos que los pacientes que tienen más de 4 genes presentes el 83,3% son CU, en cambio en los que tienen menos de 4 genes presentes, el 60% son EC (Tabla 5).

**DISCUSIÓN**

La EII es una enfermedad multifactorial, con múltiples factores ambientales asociados incluyendo el microbioma gastrointestinal y que además incluye la predisposición genética como posible factor desencadenante (12). Los estudios de GWAS han identificado múltiples loci genéticos en el huésped que parecen mostrar una asociación significativa con la EII. Estos genes cumplen funciones en varias vías clave dentro de la inmunidad innata (por ejemplo, el gen *NOD2*), la señalización de citocinas (*JAK2*, *STAT3*, y *TYK2*) y el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal (*HNF4A*, *CDH1* y *MUC19*) (25-27). En el presente estudio se encontró que la mayoría de los pacientes tenían una sumatoria de variantes clasificadas como benignas en los genes evaluados. En dos pacientes se encontraron tres variantes que la literatura ha reportado como de significado incierto (VUS por sus siglas en inglés, *variants of unknown significance*) (28). En el paciente (001)

con diagnóstico clínico y anatomopatológico de CU se encontraron dos VUS en los genes *DOK3* y *MLH3*.

Por otro lado, la actividad del gen *DOK3*, que codifica para una molécula transductora de receptores tirosin-kinasa, ha demostrado regular negativamente el polímero *JAK2/STAT3* la producción de citoquinas por los neutrófilos colónicos esto en modelos murinos, por lo que ha sido reportado hasta el momento como gen de susceptibilidad en uno de los estudios de asociación genómica. Este gen, aunque no es un actor epigenético, interactúa directamente con el gen *STAT3* que al ser factor de transcripción es un modificador epigenético en la enfermedad inflamatoria intestinal (29). El gen *DOK3* un regulador negativo de la detección de lipopolisacáridos (LPS) a través de la señalización de *TLR4-ERK* en macrófagos, regula la señalización de *TLR3* a través de *TRAF3-TBK1-IRF3* e influye en la secreción de interferón (IFN)  $\beta$ 31-35 (30). Esto explicaría una posible alteración en la regulación inmune. Estudios en animales demuestran que la deficiencia de *DOK3* promueve un desequilibrio en la microflora intestinal y por lo tanto una mayor susceptibilidad a la colitis (29). La susceptibilidad de *DOK3* a la colitis parece explicarse mediante un mecanismo en el que la alteración de *DOK3* restringe la señalización de las vías *JAK2 / STAT3* de los neutrófilos del colon, lo que limita la expresión de la molécula *S100a8 / 9*, indispensable en el mantenimiento del microbioma intestinal comensal protectora, finalmente haciendo que se pierda la homeostasis intestinal (29). La variante en el *DOK3*, clasificada como VUS deberá seguirse en el tiempo para su reclasificación de acuerdo a los nuevos conocimientos científicos.

El gen *NOD2* que por sus siglas corresponde a la proteína 2 que contiene el dominio de oligomerización de unión a nucleótidos confiere el mayor riesgo de EII. Es una proteína citoplasmática expresada esencialmente por células inmunitarias y células presentadoras de antígenos denotadas por linfocitos, macrófagos, células epiteliales (incluidas las células de Paneth ileales) y células dendríticas respectivamente. De hecho, se sabe que la activación de *NOD2* provoca la liberación de varias moléculas proinflamatorias y antimicrobianas como *IL1 $\beta$* , *TNF- $\alpha$* , *IL6*, *IL8* y  $\alpha$ -defensinas. Esto desencadena, a su vez, el reclutamiento y la activación de diversas células inmunitarias innatas junto con la activación y diferenciación de células inmunitarias adaptativas (31). Del mismo modo,

**Tabla 4.** Número de genes presentes por paciente.

Número de genes presentes por paciente	
5	3 pacientes
4	3 pacientes
3	5 pacientes
2	4 pacientes
1	1 pacientes

**Tabla 5.** Grupos de genes documentados en ambos tipos de enfermedad inflamatoria intestinal, y su frecuencia de acuerdo a presencia de CD6 y TYK2.

	Mayor o igual a 4 genes presentes (6 - 37,5%)	Menor a 4 genes presentes (10 - 62,5%)
CU	5 (83,3%)	4 (40%)
EC	1 (16,6%)	6 (60%)
CD6	4 (66,6%)	7 (70%)
TYK2	4 (66,6%)	5 (50%)

las mutaciones en *NOD2* alteran la capacidad de las células de Paneth para reconocer y eliminar patógenos invasores, provocando el desarrollo de lesiones intestinales inflamatorias y disregulación del microbiota por aumento de la concentración de bacterias huésped en el íleon. Una de las variantes más frecuentes, la G908R [rs2066845], fue encontrada en nuestra paciente 002, que según la literatura le confiere un riesgo entre dos y cuatro veces mayor de padecer EII (en particular EC) <sup>(8)</sup>. Mucho se ha avanzado en la comprensión del gen *NOD2* como molécula clave en la EII, incluso hay ensayos que pretenden disminuir la sintomatología de la EII mediante la activación o inhibición de *NOD2* y de moléculas clave en su vía de señalización, convirtiéndolo en blanco terapéutico. Dado que *NOD2* es una molécula clave en la EII, son muchas las investigaciones en torno a su posible aplicación clínica. Se han realizado estudios para aliviar la EII mediante la activación o inhibición de *NOD2* y de moléculas clave en su vía de señalización <sup>(22)</sup>.

El gen *MLH3* codifica para una proteína que hace parte de la maquinaria de reparación de errores de apareamiento del ADN (MMR, Mismatch repair) y es importante debido a su papel en el mantenimiento de la integridad genómica y su conocida asociación con cáncer de colon hereditario no polipósico. Se ha descrito en la EII por su impacto en la represión epigenética en el proceso inflamatorio e hipóxico en modelos animales <sup>(31)</sup>. Adicionalmente en estudios de GWAS se ha demostrado la posible asociación entre algunos SNPs en este gen y el desarrollo de CU <sup>(9,32)</sup>. Lo cual coincide con nuestro estudio al encontrar una variante clasificada como de significado clínico incierto en un paciente con CU.

El haber encontrado dos VUS en un paciente con CU haría suponer que la presencia de múltiples loci en diferentes genes de susceptibilidad podría tener efectos aditivos contribuyendo a incrementar el riesgo de desarrollar EII, sin embargo, hasta el momento, son necesarios más estudios que permitan concluir el efecto aditivo de variantes en genes con funciones sobre el microbioma intestinal <sup>(11)</sup>.

En el paciente 0004 con diagnóstico clínico y anatomopatológico de CU, se encontró una VUS en el gen *PRDM1*. Este gen codifica para una proteína que es un represor transcripcional que se une al ADN, ejerciendo sus funciones represivas mediante el reclutamiento de enzimas modificadoras de histonas. Diferentes estudios en la literatura han mostrado asociación significativa entre algunas variantes en este gen y el riesgo de desarrollar tanto CU como EC, por ejemplo la variante Ser354Asn, asociada significativamente con EC: odds ratio [OR] de 1,23 (95% CI=1,07-1,40), y las variantes rs7746082, rs6568421 y rs6911490 asociadas con un incremento en el riesgo de desarrollar CU de hasta 8 veces más con respecto a población control <sup>(33)</sup>. Aunque la variante en el gen *PRDM1* de la paciente no ha sido previamente descrita en estudios de GWAS, también serían más estudios de asociación y funcionales para poder esclarecer el verdadero significado de la misma en la patogénesis de la enfermedad.

El paciente 14, con diagnóstico clínico y anatomopatológico de EC, presentó una variante con conflicto de patogenicidad según ClinVar en el gen *NOD2* (c.2026C>T, p.Arg703Cys (rs5743277)). Esta variante tiene una frecuencia alélica en gnomAD (Genome Aggregation Database) de 0,00283. Esta variante se ha descrito en la literatura en individuos con enfermedad autoinflamatoria <sup>(34,35)</sup>, y también se ha descrito con mayor frecuencia en individuos con EC y CU <sup>(36,37)</sup>. En conclusión, esta variante en el gen *NOD2* pareciera que pudiese contribuir a la EC como factor de riesgo, posiblemente junto con otros factores genéticos y / o ambientales, pero son necesarios más estudios, porque hasta la fecha no hay evidencia suficiente para otorgar patogenicidad.

Algunas posibles limitaciones del estudio, incluyen que se trata de un estudio retrospectivo, con un número pequeño de pacientes, siendo esta una serie limitada de 16 pacientes. También, no haberse podido contar con una población control, por lo que no fue posible realizar un estudio de asociación de casos y controles. Por otro lado, el desarrollo del estudio en un solo centro podría limitar su validez externa: por ejemplo, la población atendida en este centro suele ser de un estatus socioeconómico medio a alto, lo que le confiere características particulares. Sin embargo, este estudio presenta múltiples ventajas, incluyendo que estos resultados demuestran la amplia variabilidad genética en pacientes colombianos con EII, donde más del 65% de los pacientes presentaban fenotipo clínicamente grave, y se espera que el seguimiento continuo de estos pacientes ser valioso, ya que las características clínicas entre los individuos son generalmente variable y diversa. Además, otras características, como las manifestaciones extraintestinales y otras complicaciones con compromiso multisistémico, afectan tanto el pronóstico a largo plazo como calidad de vida en pacientes con EII, destacando así la necesidad de recopilar una base de datos completa de fenotipos en EII para avanzar en el diagnóstico y tratamiento. La verificación por más de dos investigadores de los datos de los registros clínicos pudo además disminuir el sesgo de transcripción. En general, este estudio es el primero en informar las características clínicas de los pacientes colombianos con diferentes mutaciones, y estos hallazgos amplían los conocimientos fenotípicos y genotípicos en EII.

Aunque no hay una correlación fenotipo genotipo en la enfermedad inflamatoria intestinal si se ha reportado que hay una relación epistática, es decir una relación aditiva, por ejemplo, entre los genes *IBD5/NOD2*, *IL-10/IL10RB/HO1* y *JAK1/TYK2/STAT3* lo cual está en sincronía con gravedad de la enfermedad y pobre respuesta al tratamiento <sup>(38)</sup>. En nuestro estudio reportamos variantes en 2 de estos genes, las cuales han sido previamente reportadas en pacientes con EC.

En conclusión, consideramos que este estudio es una primera aproximación a la caracterización genotípica de pacientes con EII en población colombiana con resultados que indican la presencia de variantes en genes de

predisposición a esta patología compleja, que, aunque sin patogenicidad confirmada al momento actual, parecen sugerir que la sumatoria de estas pueden contribuir en la fisiopatología de la enfermedad. Hemos podido demostrar que nuestra población es similar en cuanto a variantes en línea germinal que aumentan el riesgo o participan en una de las vías de señalización que se afectan en la enfermedad inflamatoria intestinal. Lo cual ubica a Colombia en un país a la vanguardia en temas de generación de conocimiento que permita avanzar en el conocimiento de esta patología con miras a mejorar la respuesta terapéutica e individualizar a los pacientes para dar una terapia dirigida. Son necesarios más estudios de genotipificación y estudios funcionales que permitan identificar biomarcadores o blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevos fármacos. Además, generar conocimiento entre genes de susceptibilidad, cambios epigenéticos y las ciencias ómicas, lo cual permita enfoques confiables para la detección precoz de riesgo de enfermedades e interacciones entre patologías autoinmunes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lamb CA, Kennedy NA, Raine T, Hendy PA, Smith PJ, Limdi JK, *et al*. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*. 2019;68(Cdc):s1-106. doi: 10.1136/gutjnl-2019-318484.
- Bernstein CN, Wajda A, Svenson LW, MacKenzie A, Koehoorn M, Jackson M, *et al*. The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: A population-based study. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(7):1559-68. doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00603.x.
- Rubin DT, Ananthakrishnan AN, Siegel CA, Sauer BG, Long MD. ACG Clinical Guideline: Ulcerative Colitis in Adults. *Am J Gastroenterol*. 2019;114(3):384-413. doi: 10.14309/ajg.000000000000152.
- Kappelman MD, Rifas-Shiman SL, Kleinman K, Ollendorf D, Bousvaros A, Grand RJ, *et al*. The Prevalence and Geographic Distribution of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5(12):1424-9. doi: 10.1016/j.cgh.2007.07.012.
- Chan SSM, Luben R, Olsen A, Tjønneland A, Kaaks R, Teucher B, *et al*. Body mass index and the risk for crohn's disease and ulcerative colitis: Data from a european prospective cohort study (The IBD in EPIC Study). *Am J Gastroenterol*. 2013;108(4):575-82. doi: 10.1038/ajg.2012.453.
- Juliao F, Damas OM, Arrubla M, Calixto OJ, Camargo JL, Cruz L, *et al*. Sa1798 – The Prevalence of Inflammatory Bowel Disease in Colombia is Increasing: Report on the National Prevalence of IBD and Description of IBD Phenotype. *Gastroenterology*. 2019;156(6):S-405. doi: 10.1016/S0016-5085(19)37865-5.
- Fernández-Ávila DG, Bernal-Macias S, Parra-Izquierdo V, Rincón-Riaño DN, Gutiérrez JM, Rosselli D. Prevalencia en Colombia de la enfermedad inflamatoria intestinal y el compromiso articular asociado, según información del Sistema Integral de Información de la Protección Social. *Rev Colomb Reumatol*. 2020;27(1):3-8.
- Younis N, Zarif R, Mahfouz R. Inflammatory bowel disease: between genetics and microbiota. *Mol Biol Rep*. 2020;47(4):3053-63. doi: 10.1007/s11033-020-05318-5.
- Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, *et al*. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2012;491(7422):119-24. doi: 10.1038/nature11582.
- Liu JZ, Van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R, Takahashi A, *et al*. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet*. 2015;47(9):979-86. doi: 10.1038/ng.3359.
- McGovern DPB, Kugathasan S, Cho JH. Genetics of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1163-1176.e2. doi: 10.1053/j.gastro.2015.08.001.
- Loddo I, Romano C. Inflammatory bowel disease: Genetics, epigenetics, and pathogenesis. *Front Immunol*. 2015;6:551. doi: 10.3389/fimmu.2015.00551.
- Liu TC, Stappenbeck TS. Genetics and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2016;11(Cdc):127-48. doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044152.
- Nunes T, Fiorino G, Danese S, Sans M. Familial aggregation in inflammatory bowel disease: Is it genes or environment? *World J Gastroenterol*. 2011;17(22):2715-22. doi: 10.3748/wjg.v17.i22.2715.
- Ferrari M, Stagi S. Autoimmunity and genetic syndromes: A focus on down syndrome. *Genes (Basel)*. 2021;12(2):268. doi: 10.3390/genes12020268.
- Cho JH, Brant SR. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1704-12. doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.046.
- Venthram NT, Kennedy NA, Nimmo ER, Satsangi J. Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: The emerging role of epigenetics. *Gastroenterology*. 2013;145(2):293-308. doi: 10.1053/j.gastro.2013.05.050.
- Dupont A, Heinbockel L, Brandenburg K, Hornef MW. Antimicrobial peptides and the enteric mucus layer act in concert to protect the intestinal mucosa. *Gut Microbes*. 2015;5(6):761-5. doi: 10.4161/19490976.2014.972238.
- Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GMH, Schütte A, *et al*. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev*. 2014;260(1):8-20. doi: 10.1111/imr.12182.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, *et al*. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):599-603. doi: 10.1038/35079107.
- Horowitz JE, Warner N, Staples J, Crowley E, Gosalia N, Murchie R, *et al*. Mutation spectrum of NOD2 reveals recessive inheritance as a main driver of Early Onset Crohn's Disease. *Sci Rep*. 2021;11(1):5595. doi: 10.1038/s41598-021-84938-8.
- Liu Z, Zhang Y, Jin T, Yi C, Ocansey DKW, Mao F. The role of NOD2 in intestinal immune response and microbiota modulation: A therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Int Immunopharmacol*. 2022;113(Pt B):109466. doi: 10.1016/j.intimp.2022.109466.
- Cao Y, Qu C, Chen Y, Li L, Wang X. Association of ABCB1 polymorphisms and ulcerative colitis susceptibility. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(1):943-7.
- Borg-Bartolo SP, Boyapati RK, Satsangi J. Precision medicine in inflammatory bowel disease: Concept, progress and challenges. *F1000Res*. 2020;9:F1000 Faculty Rev-54. doi: 10.12688/f1000research.20928.1.
- Mesbah-Uddin M, Elango R, Banaganapalli B, Shaik NA, Al-Abbasi FA. In-silico analysis of inflammatory bowel disease (IBD) GWAS loci to novel connections. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119420. doi: 10.1371/journal.pone.0119420.
- Chen GB, Lee SH, Brion MJA, Montgomery GW, Wray NR, Radford-Smith GL, *et al*. Estimation and partitioning of (co) heritability of inflammatory bowel disease from GWAS and immunochip data. *Hum Mol Genet*. 2014;23(17):4710-20. doi: 10.1093/hmg/ddu174.
- Rivas MA, Beaudoin M, Gardet A, Stevens C, Sharma Y, Zhang CK, *et al*. Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet*. 2011;43(11):1066-73. doi: 10.1038/ng.952.

28. Uhlig HH, Charbit-Henrion F, Kotlarz D, Shouval DS, Schwerdt T, Strisciuglio C, *et al.* Clinical Genomics for the Diagnosis of Monogenic Forms of Inflammatory Bowel Disease: A Position Paper From the Paediatric IBD Porto Group of European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2021;72(3):456-73. doi: 10.1097/MPG.0000000000003017.
29. Loh JT, Lee KG, Lee AP, Teo JKH, Lim HL, Kim SSY, *et al.* DOK3 maintains intestinal homeostasis by suppressing JAK2/STAT3 signaling and S100a8/9 production in neutrophils. *Cell Death Dis.* 2021;12(11):1054. doi: 10.1038/s41419-021-04357-5.
30. Peters LA, Perrigoue J, Mortha A, Iuga A, Song WM, Neiman EM, *et al.* A functional genomics predictive network model identifies regulators of inflammatory bowel disease. *Nat Genet.* 2017;49(10):1437-49. doi: 10.1038/ng.3947.
31. Edwards RA, Witherspoon M, Wang K, Afrasiabi K, Pham T, Birnbaumer L, *et al.* Epigenetic repression of DNA mismatch repair by inflammation and hypoxia in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer. *Cancer Res.* 2009;69(16):6423-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1285.
32. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, *et al.* Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet.* 2011;43(3):246-52. doi: 10.1038/ng.764.
33. Till A, Lipinski S, Ellinghaus D, Mayr G, Subramani S, Rosenstiel P, *et al.* Autophagy receptor CALCOCO2/NDP52 takes center stage in Crohn disease. *Autophagy.* 2013;9(8):1256-7. doi: 10.4161/auto.25483.
34. Shen M, Moran R, Tomecki KJ, Yao Q. Granulomatous disease associated with NOD2 sequence variants and familial camptodactyly: An intermediate form of NOD2-associated diseases? *Semin Arthritis Rheum.* 2015;45(3):357-60. doi: 10.1016/j.semarthrit.2015.05.007.
35. Yao Q, Piliang M, Nicolacakis K, Arrossi A. Granulomatous pneumonitis associated with adult-onset Blau-like syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(5):465-6. doi: 10.1164/ajrccm.186.5.465.
36. Burillo-Sanz S, Montes-Cano MA, García-Lozano JR, Ortiz-Fernández L, Ortego-Centeno N, García-Hernández FJ, *et al.* Mutational profile of rare variants in inflammasome-related genes in Behçet disease: A Next Generation Sequencing approach. *Sci Rep.* 2017;7(1):8453. doi: 10.1038/s41598-017-09164-7.
37. Lesage S, Zouali H, Cézard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, *et al.* CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet.* 2002;70(4):845-57. doi: 10.1086/339432.
38. Lin Z, Wang Z, Hegarty JP, Lin TR, Wang Y, Deiling S, *et al.* Genetic association and epistatic interaction of the interleukin-10 signaling pathway in pediatric inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2017;23(27):4897-909. doi: 10.3748/wjg.v23.i27.4897.