

Implicaciones clínicas de la investigación básica

Variantes del gen *CARD15/Nod2* en la enfermedad de Crohn

MANUEL ÁLVAREZ^a Y FLAVIO NERVI^b

^aServicio de Gastroenterología. Hospital Clínico de Barcelona. Barcelona. España.

^bDepartamento de Gastroenterología. Escuela de Medicina. P. Universidad Católica de Chile. Santiago. Chile.

La enfermedad de Crohn (EC) es una enfermedad multifactorial compleja en la que están implicados factores genéticos, inmunitarios y medioambientales¹. La reciente identificación del *CARD15/Nod2* como el primer gen de susceptibilidad fuertemente asociado a la EC, ha significado la apertura de un nuevo frente de investigación sobre los factores etiopatogénicos de la enfermedad. El objetivo de este trabajo es revisar las actuales implicaciones de las investigaciones sobre el gen *CARD15/Nod2* en la EC.

Puntos clave

- Tres variantes dentro del gen *CARD15/Nod2* están presentes en hasta un 30% de pacientes caucásicos con enfermedad de Crohn: A702W, G908R, L1007fsinsC.
- Las 3 variantes genéticas se encuentran en la región rica en leucina (LRR) de la proteína *CARD15/Nod2*, región que estaría implicada en el reconocimiento de microorganismos.
- La proteína *CARD15/Nod2* se encuentra expresada sólo en el ámbito intracelular y sería crucial en la defensa de las células epiteliales contra microorganismos intracelulares.
- El riesgo de desarrollar la enfermedad de Crohn en los heterocigotos para la variante es de 1,5-3 veces mayor, y en los homocigotos o heterocigotos compuestos, de 10 a 42 veces mayor comparado con los individuos sin mutación.
- Las variantes del *CARD15/Nod2* están asociadas a una mayor frecuencia de afectación ileal, a mayor frecuencia de un patrón estenosante y, en algunos estudios, a una edad más temprana de comienzo.

Descubrimiento del gen *CARD15/Nod2*

La identificación y caracterización de este gen, que está ubicado en el cromosoma 16, se realizó en el año 2001². Por presentar homologías con un gen denominado *Nod1*, se denominó en un primer momento *Nod2*². Comparte similitudes con el gen *R* de resistencia de las plantas frente a patógenos bacterianos^{3,4} y estaría relacionado con otros genes miembros de la familia *APAF1/CED4/Nod1* implicados en la regulación de los mecanismos de apoptosis celular².

Expresión del gen *CARD15/Nod2*

El gen *CARD15/Nod2* sintetiza una proteína intracelular de 1.040 aminoácidos, cuya estructura básica se divide en 3 regiones (fig. 1)^{2,5}:

- La región aminoterminal tiene 2 dominios de reclutamiento y activación de caspasas (CARD). Es por la presencia de este dominio que el gen se denomina actualmente *CARD 15*.
- La región central tiene una estructura que une nucleótidos (NBD).
- La región carboxiterminal tiene 10 secuencias repetidas ricas en leucina (LRR)⁵, similar a los receptores de membrana *toll-like*, que son receptores capaces de reconocer patógenos extracelulares⁶.

Este gen se expresa principalmente en células inmunes de la línea monocítica, pero también en granulocitos y linfocitos^{2,7,8}. Existe expresión en el epitelio intestinal, en especial en las células de Paneth, que son células con funciones de defensa en contra de patógenos entéricos⁹.

Recientemente, se ha visto que determinadas citocinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF) α y el interferón γ , así como algunos productos bacterianos, como el lipopolisacárido y el peptidoglicano, aumentan la expresión del gen *CARD15/Nod2* a través de la activación del NF- κ B, lo que sugiere que el *CARD15/Nod2* puede desempeñar un papel importante en la respuesta inmune innata intestinal^{7,10}.

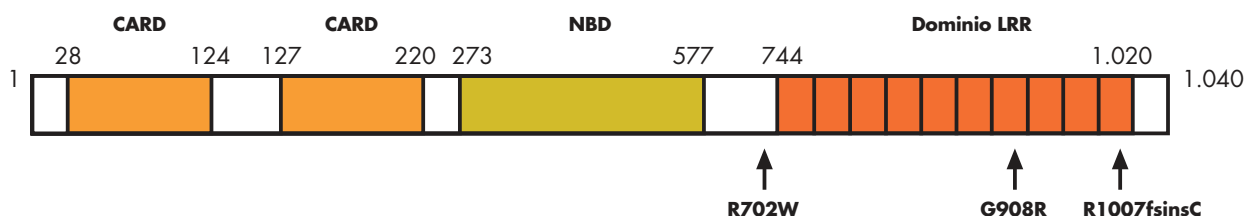


Figura 1. Esquema de la estructura proteica *CARD15/Nod2* con la localización de las variantes asociadas a la enfermedad de Crohn.

Enfermedad de Crohn y variantes del *Nod2*

La detección de una región del cromosoma 16 asociado a la EC, denominado IBD1, fue comunicada por primera vez en el año 1996¹¹ y ha sido posteriormente confirmada, en especial en población caucásica¹².

Dos grupos de investigación comunicaron simultáneamente que 3 variantes genéticas del gen *CARD15/Nod2* se asocian con una mayor susceptibilidad a la EC, pero no a la colitis ulcerosa^{13,14}. Las variantes identificadas son las siguientes:

- R702W. Existe un cambio de un nucleótido dentro del exón 4 del gen. Esto produce una sustitución de triptofano por arginina en la posición 702 de la proteína.
- G908R. Existe un cambio de un nucleótido dentro del exón 8 del gen, lo que produce una sustitución de arginina por glicina en la posición 908 de la proteína.
- L1007fsinsC. Existe una inserción de un nucleótido dentro del exón 11 del gen, lo que codifica un codón de parada en la síntesis de la proteína (*stop codon*). El resultado funcional es una proteína truncada que carece de sus 33 aminoácidos terminales (mutación tipo *frameshift*).

Estudios posteriores han confirmado estas observaciones¹⁵⁻²¹ y las frecuencias alélicas comunicadas se muestran en la figura 2^{14-17,19-24}. Estas variantes muestran importantes variaciones dependiendo de la población estudiada²³⁻²⁴.

Efectos de la mutación

En un trabajo *in vitro* se observó que células epiteliales transfectadas con *CARD15/Nod2* mutado en la región LRR no eliminaban la *Salmonella typhimurium* intracelular²⁵, lo que sugiere que el *Nod2* estaría implicado en el reconocimiento intracelular de patógenos o sus productos^{25,26} y podría explicar la observación de otros estudios sobre la disminución en la activación de NF- κ B inducida por peptidoglicanos y lipopolisacáridos en células transfectadas con las variantes del *CARD15/Nod2*^{14,15}.

La ineficiente eliminación de las bacterias intracelulares en el epitelio podrían llevar a una sobreactivación de las células inmunes del intestino y a una sobreproducción local de citocinas inflamatorias, que llevarían al aumento en la expresión de NF- κ B por vías alternativas y potenciarían aún más la activación de las células T, lo que causaría la afectación tisular en la EC²⁷. En relación con el posible efecto sobre los mecanismos de apoptosis, algunos estudios han estudiado *in vitro* el efecto funcional de las variantes de *CARD15/Nod2* sobre la apoptosis celular y no han encontrado ningún cambio en este tipo de respuestas^{2,15}.

Implicaciones clínicas

En población caucásica (si bien no en todos los estudios) un 10-32% de los pacientes con EC es heterocigoto para

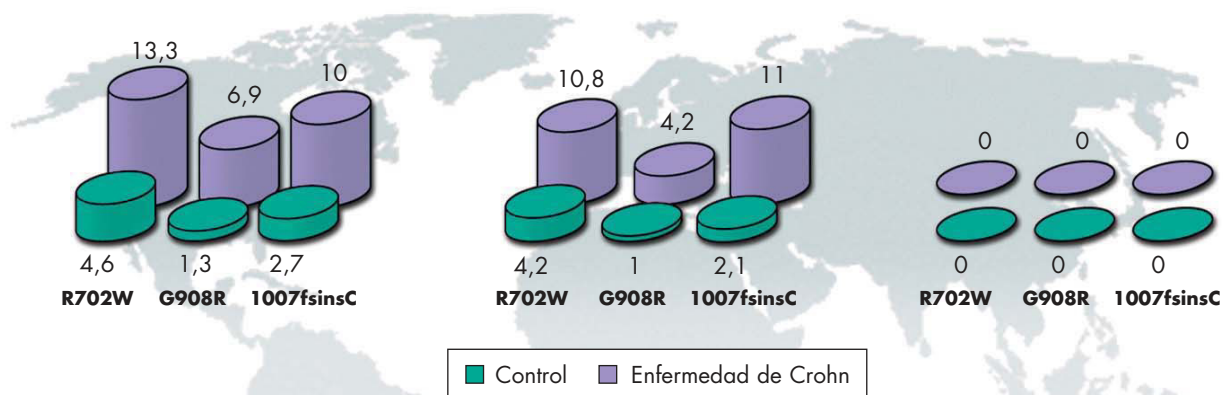


Figura 2. Representación geográfica de las frecuencias alélicas (promedios, %) de las variantes del gen *CARD15/Nod2* en pacientes con enfermedad de Crohn y controles, obtenidas de los diferentes estudios en población norteamericana^{15,20,22}, europea^{14,16,17,19,21} y asiática^{23,24}. En los estudios realizados en población norteamericana y europea se observan las diferencias en la prevalencia de las 3 variantes (R702W, G908R y 1007fsinsC) entre los pacientes con enfermedad de Crohn y los controles. Es destacable la ausencia de estas variantes en los estudios realizados en pacientes de la población asiática con enfermedad de Crohn, lo que probablemente es reflejo de la absoluta ausencia de estas variantes en la población control.

una de las 3 mutaciones y un 3-17% es homocigoto o heterocigoto compuesto (2 diferentes mutaciones, una en cada cromosoma). Estas proporciones son claramente distintas a las observadas en la población control sana, en la que un 8-15% es heterocigoto y un 0-1% es homocigoto o heterocigoto compuesto^{13,14,16,17,19}. Así, el efecto de esta mutación podría explicar un 30% de la susceptibilidad a la enfermedad^{17,19}.

Los pacientes heterocigotos para la mutación presentan un riesgo ligeramente aumentado con respecto a la población normal (1,5-3 veces más riesgo) para desarrollar la enfermedad, mientras los homocigotos o heterocigotos compuestos tienen un riesgo de 10 a 42 veces superior^{13,14}.

Influencia en la presentación e historia natural de la enfermedad

Se ha encontrado una asociación entre las variantes del *CARD15/Nod2* y mayor frecuencia de enfermedad ileal, mayor frecuencia de estenosis, y con menos claridad, con una presentación más temprana de la enfermedad^{17,19,22,28,29}. Las diferencias en la población, diseño, seguimiento y análisis de los estudios pueden explicar los resultados no siempre concordantes.

Influencia en la respuesta al tratamiento

No hay datos disponibles que estudien la influencia en la respuesta a corticoides o inmunosupresores. Un estudio investigó la asociación de variantes de *Nod2* y su respuesta al infliximab a corto y medio plazo y no halló diferencias³⁰.

Recomendaciones clínicas actuales sobre análisis genético

Algunos estudios han encontrado una asociación entre la presencia de estenosis y las variantes del gen *CARD15/Nod2*^{17,22,28,29}. Sin embargo, en la actualidad no está claramente establecido que un determinado genotipo se asocie a una determinada evolución de la enfermedad, por lo que no se recomienda realizar un estudio genético en la práctica clínica en los pacientes con EC. Así mismo, la evidencia actual no sugiere que sea útil realizar este estudio genético en los familiares de los pacientes con EC, en los pacientes con colitis indeterminada o en personas con síntomas sugestivos de EC, ya que la probabilidad de encontrar una mutación es baja y aún se desconoce el valor predictivo positivo y negativo de estas variantes en relación con la EC.

Conclusión

El descubrimiento de estas variantes genéticas representa un soporte para el modelo inmunogenético propuesto para la EC, en el cual individuos genéticamente susceptibles presentan una aberrante respuesta a un factor medioambiental (flora microbiana intestinal). Esto puede ayudar a comprender la importancia de los mecanismos genéticos de la enfermedad y puede acelerar la investigación de otros genes asociados a estas enfermedades. Además, podría ayudar a predecir qué pacientes con EC pueden desarrollar un determinado curso de la enfermedad y a conocer el riesgo de las complicaciones y de respuesta a los diferentes tratamientos.

Bibliografía



- Importante ●● Muy importante
- Epidemiología

1. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115:182-205.
2. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 2001;276:4812-8.
3. Inohara N, Nunez G. The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene* 2001;20:6473-81.
4. Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nunez G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 2001;276:2551-4.
5. ● Inohara N, Ogura Y, Nunez G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:76-80.
6. Akira S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2003;15:238.
7. Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F, et al. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 2002 1;277:41701-5.
8. Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamaillard M, Chareyre F, De Lagausie P, et al. Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* 2003;52:840-6.
9. Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, et al. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 2003;125:47-57.
10. Rosentiel P, Fantini M, Brautigam K, Kuhbacher T, Waetzig GH, Seeger D, Schreiber S. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003;124:1001-9.
11. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson J, Lee J, Beaugerie L, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996;379:821-2.
12. The IBD consortium, Cavanaugh J. The International IBD genetics consortium confirms linkage of Crohn's disease to a locus on chromosome 16 (IBD1). *Gastroenterology* 2000;118:A3862.
13. ●● Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
14. ● Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.
15. ● Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tanabe T, et al. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* 2003;124:140-6.
16. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001;357:1925-8.
17. ● Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, et al. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;122:854-66.
18. Baird E, Harmon DL, Curtis AM, Kelly Y, O'Leary C, Gardner M, et al. Association of NOD2 with Crohn's disease in a homogenous Irish population. *Eur J Hum Genet* 2003;11:237-44.
19. ● Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:867-74.
20. ● Vermeire S, Wild G, Kocher K, Cousineau J, Dufresne L, Bitton A, et al. CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure. *Am J Hum Genet* 2002;71:74-83.
21. Vavassori P, Borgiani P, D'Apice MR, De Negrif F, Del Vecchio Blanco G, Monteleone I, et al. 3020insC mutation within the NOD2 gene in Crohn's disease:

- frequency and association with clinical pattern in an Italian population. *Dig Liver Dis* 2002;34:153.
22. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, et al. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;123:679-88.
 23. Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, Fukuda Y, Takahashi S, Ogura Y, et al. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;123:86-91.
 24. Croucher PJ, Mascheretti S, Hampe J, Huse K, Frenzel H, Stoll M, et al. Haplotype structure and association to Crohn's disease of CARD15 mutations in two ethnically divergent populations. *Eur J Hum Genet* 2003;11:6-16.
 25. ●● Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003;124:993-1000.
 26. ● Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003;278:5509-12.
 27. Jobin C. Intestinal epithelial cells and innate immunity in the intestine: Is CARD15/Nod2 Another player? *Gastroenterology* 2003;124:1145-49.
 28. Lesage S, Zouali H, Cezard 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;70:845-57.
 29. Radlmayr M, Torok HP, Martin K, Folwaczny C. The c-insertion mutation of the NOD2 gene is associated with fistulizing and fibrostenotic phenotypes in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;122:2091-2.
 30. Vermeire S, Louis E, Rutgeerts P, De Vos M, Van Gossum A, Belaiche J, et al. NOD2/CARD15 does not influence response to infliximab in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;123:106-11.

Bibliografía recomendada

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.

A través de una técnica estructurada y sistemática de investigación de genes candidatos (estrategia de clonado posicional) se evaluó todo el genoma en familias afectadas de enfermedad de Crohn y se encontró que en la zona IBD1 del cromosoma 16, específicamente en el gen CARD15/Nod2 existen 3 variantes genéticas que se asocian a la enfermedad de Crohn: R702W, G908R, L1007fsinsC.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.

En este artículo, Ogura et al, además de describir las 3 variantes que se asocian en forma independiente a la enfermedad de Crohn, demostró que estas variantes se asocian in vitro a una deficiente activación del NF- κ B en respuesta a diferentes productos bacterianos, lo que sugiere que el CARD15/Nod2 estaría implicado en el reconocimiento de patógenos o de sus productos.

Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003;124:993-1000.

Trabajo de gran relevancia clínica en el cual se evaluó in vitro el papel de la proteína CARD15/Nod2 en la eliminación intracelular de la Salmonella typhimurium por medio de líneas celulares epiteliales transfectadas con diferentes tipos de CARD15/Nod2. Se observó que la capacidad de eliminar esta bacteria estaba muy disminuida en células sin CARD15/Nod2 o con un CARD15/Nod2 mutado en la región LRR, mientras las células con el CARD15/Nod2 normal (wild type) eliminaban la bacteria.

Bonen D, Cho J. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003;124:521-36.

Excelente artículo de revisión en el que se hace un completo análisis de las implicaciones de los factores genéticos en la enfermedad inflamatoria intestinal, incluido el CARD15/Nod2 y el resto de posibles genes candidatos.