DESCRIPCIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE LAS VARIANTES DE NUCLEÓTIDO SENCILLO (rs3135499, rs2111234, rs8057341 y rs 7194886) EN EL GEN *NOD2* EN POBLACIÓN CON LEPRA Y POBLACIÓN SANA EN NORTE DE SANTANDER.

MONICA ALEXANDRA BUSTOS CARVAJAL

Trabajo de grado presentado para optar al título de Magister en Biología Molecular y Biotecnología

Universidad de Pamplona

Facultad de Ciencias Básicas

Maestría en Biología Molecular y Biotecnología

Pamplona

2022

DESCRIPCIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE LAS VARIANTES DE NUCLEÓTIDO SENCILLO (rs3135499, rs2111234, rs8057341 y rs 7194886) EN EL GEN *NOD2* EN POBLACIÓN CON LEPRA Y POBLACIÓN SANA EN NORTE DE SANTANDER.

MONICA ALEXANDRA BUSTOS CARVAJAL

Trabajo de grado presentado para optar al título de Magister en Biología Molecular y Biotecnología

Directora del trabajo de Grado

Luz Dary Gutiérrez Castañeda

Codirectora de trabajo de Grado

Diana Patricia Bohada Lizarazo

Universidad de Pamplona

Facultad de Ciencias Básicas

Maestría en Biología Molecular y Biotecnología

Pamplona

2022

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico al dador de vida, al que ha forjado mi camino, al padre celestial, que en medio de las adversidades estuvo conmigo. A mi hijo quien con su afecto y su cariño permitió que mis esfuerzos cada día fueran más solo por buscar lo mejor para él, y aun en su corta edad me ha enseñado que la última palabra nunca esta dicha y que lo que Dios ha destinado para ti se dará.

A mis padres y a mi hermano que con amor fueron el apoyo en momentos difíciles, quienes fueron la columna para forjar la persona y la profesional que crece día a día, mis logros son gracias a sus sacrificios y a sus constantes consejos.

A mi compañero de vida quien durante todo este tiempo estuvo a mi lado impulsándome y dándome la mano en los momentos donde los obstáculos parecían imposibles de atravesar.

A mis amigos y compañeros del presente y del pasado porque aún sin esperar nada a cambio compartieron su tiempo, y dieron lo mejor de sí para apoyarme.

AGRADECIMIENTOS

Sin ti mi Dios la experiencia no hubiese sido posible, hoy para ti, todo el honor y la gloria, por eso infinitas gracias mi padre celestial, tú diste las situaciones y los momentos precisos para que todo esto se diera, sin ti nada de esto hubiese sido posible, Gracias a mi familia y a su constante apoyo porque sin ellos el entorno se hubiese tornado un espacio lleno de obstáculos, a mi hijo y a mi compañero de vida gracias por entender que su mamá y su esposa aún cuando debía separase de ustedes lo hacía para crecer como mujer, como persona, como profesional y como madre, gracias a cada uno de mis maestros y de mis tutores porque por ellos la persona que entregan a la sociedad hoy es una persona con un grado más de conocimientos capaz de afrontar nuevos retos, y así mismo quiero agradecer a cada uno de mis amigos y amigas que puedo decir son un número significativo que durante las diferentes etapas de este camino e estuvieron allí dispuestos a colaborarme y que contribuyeron en el logro de mis objetivos.

Y por último quiero agradecer a quien se interese por leer mi tesis y por permitir que mi experiencia y mi investigación contribuya a su fortalecimiento intelectual.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN **10**

INTRODUCCIÓN **12**

JUSTIFICACIÓN **14**

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN **16**

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA **17**

OBJETIVO GENERAL **19**

OBJETIVOS ESPECÍFICOS **19**

MARCO TEORICO **20**

Introducción **20**

Epidemiologia **20**

Transmisión **24**

Periodo de incubación **25**

Patogenia de la lepra **25**

Clasificación de las formas clínicas **27**

Mecanismos inmunológico desarrollados en la lepra **29**

Factores del hospedero y susceptibilidad a la lepra **32**

METODOLOGÍA **38**

Selección de Polimorfismo o variantes de nucleótidos sencillo **42**

Obtención del Material de Análisis -Extracción del ADN **43**

Genotipificación **45**

Secuenciación de DNA **50**

Análisis estadístico Hardy-Weinberg. **50**

RESULTADOS **51**

Asociación entre las variantes de nucleótido sencillo rs3135499, rs2111234, rs8057341 y rs7194886 en el gen NOD2 y el desarrollo de lepra en individuos del departamento de Norte de Santander. **52**

Asociación entre SNP y susceptibilidad a lepra **53**

Asociación entre haplotipos y susceptibilidad a lepra **55**

DISCUSION **58**

RECOMENDACIONES **65**

BIBLIOGRAFIA **66**

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Genes asociados a la susceptibilidad a la lepra. 33

Tabla 2. Variables evaluadas en el estudio. 38

Tabla 3. Preparación de Master Mix 47

Tabla 4. Programación del ciclado de qPCR para la detección de los polimorfismos (rs3135499, rs2111234, rs8057341 y rs 7194886) 48

Tabla 5. Secuencia de primers usados en estudio para ampliación de segmentos para análisis de cada SNP por metodología Sanger 49

Tabla 6. Características de los casos de lepra y controles 51

Tabla 7. Descripción de rs3135499, rs2111234, rs8057341 y rs7194886 del gen NOD2 analizados. .. 52

Tabla 8 Frecuencias genotípicas de los SNP rs3135499, rs2111234, rs8057341 y rs 7194886 en casos y controles (n=570). 53

Tabla 9 . Asociación entre los polimorfismos (SNPS) y la susceptibilidad a lepra en los diferentes modelos de herencia ID_ SNP 54

Tabla 10. Frecuencias de haplotipos asociado con rs2111234, rs3135499, rs3135499, rs8057341. 56

Tabla 11. Asociación de haplotipos de los SNPs rs2111234, rs3135499, rs8057341 y la susceptibilidad a lepra en mujeres (n=283, ajustado por edad). 57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 . Bloque de haplotipo formado por los SNP analizados en el gen NOD2 56

RESUMEN

En Colombia, el departamento de Norte de Santander ha presentado históricamente una alta incidencia de lepra. A pesar de los esfuerzos estatales esta patología sigue siendo de alto impacto en el departamento. La lepra es un problema de salud pública dado que ocupa los primeros lugares en el número de casos nuevos en el país de acuerdo al boletín epidemiológico de la semana 02 del año 2022 en el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública.

Uno de los aspectos importantes en la fisiopatología de la lepra es la susceptibilidad del huésped al desarrollo de la enfermedad una vez infectado. Varios estudios han reportado que existe una asociación entre portadores de variantes de nucleótido sencillo (SNP) y la susceptibilidad a esta enfermedad. Varios genes han sido mostrados como posibles candidatos para la susceptibilidad o resistencia a la lepra, en especial los relacionados con la respuesta inmunológica. En zonas endémicas de esta enfermedad se ha reportado que la presencia de variantes en el gen *NOD2* en algunas poblaciones pueden ser un factor de riesgo y en otras pueden ser protector para el desarrollo de lepra.

En Colombia se han realizado estudios genéticos con el objetivo de encontrar marcadores de mayor relevancia, sin embargo, no se ha estudiado la relación de las variantes en el gen *NOD2*, ni tampoco hay estudios en la población del Norte de Santander. El estudio de estas variantes podría aportar al conocimiento y diseñar estrategias de promoción y prevención en el programa local de lepra.

Por esta razón, el objetivo de este estudio fue explorar la presencia de 4 SNPs (rs3135499, rs2111234, rs8057341 y rs7194886) en el gen *NOD2* en 570 individuos. Se incluyeron 114 pacientes con lepra y 456 controles procedentes del departamento de Norte de Santander. Se invito

a los pacientes y controles a participar en el estudio y se aplicó el consentimiento informado. Se obtuvo ADN a partir de sangre periférica. Para la detección de las variantes polimórficas de nucleótido sencillo rs3135499, rs2111234, rs8057341 y rs7194886 en el gen *NOD2* se realizó extracción de ADN de sangre periférica, posteriormente las variantes fueron detectadas mediante el uso de qPCR por sondas TaqMan. Estas variantes fueron escogidas teniendo en cuenta lo reportado previamente en la literatura mundial.

Las frecuencias genotípicas de los SNP rs3135499 (*p=0,55 y p=0,085*), rs2111234 (p= 0,84 y p=0, 13), rs8057341 (*p=0,53 y p=0,57*) se encontraron en equilibrio de H-W en casos y controles respectivamente. Cada uno de los SNP fue evaluado para modelos co-dominante, dominante, recesivo, sobre-dominante y aditivo. Se evidenció que el SNP rs8057341 mostró ser factor de protector para desarrollar lepra en el modelo codominante con el genotipo A/A OR=0.45; 95%IC=0.22-0.91; *p=0,044*, en el modelo dominante para los genotipos A/G-A/A OR=0.57; 95%IC=0.36-0.92; *p=0,021* y en el modelo aditivo OR=0.66; 95%IC=0.47-0.92; *p=0,013*. Los SNP rs2111234 y rs3135499 no mostraron estar asociados al desarrollo de lepra post-infección. En conclusión, en la muestra analizada se encontró que existen factores genéticos asociados a la susceptibilidad a lepra. El Haplotipo GAG mostró ser un factor de riesgo (OR=3.61; IC95%=1.54 - 8.46, *p=0,0034*), mostrando que la presencia de estas variantes en la población analizada podría estar implicadas en la susceptibilidad a la lepra.

Palabras clave: lepra, inmunidad innata, SNP, polimorfismos, casos, controles.

INTRODUCCIÓN

La Lepra, es una enfermedad ocasionada por un agente bacteriano denominado *Mycobacterium leprae* y se caracteriza por ser de presentación crónica. El desarrollo de la enfermedad involucra varios factores dentro de ellos están los factores de virulencia del agente bacteriano, la respuesta inmunológica, los factores ambientales y los factores genéticos del hospedero, encontrando que algunos genes implicados en la respuesta inmune pueden favorecer o proteger frente al desarrollo del proceso infeccioso. Uno de los genes candidatos de estudio es el gen *NOD2,* que codifica para la proteína NOD2. Está proteína reconoce antígenos intracelulares y en el caso de la lepra, esta proteína participa en el reconocimiento del muramildipéptido presente en la pared de la bacteria de la micobacteria, lo cual es necesario para la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB) indispensable para establecer una respuesta inmunológica adecuada para eliminar la micobacteria. Esto hace que el gen *NOD2* y su producto sean de interés para el estudio de variantes de nucleótido sencillo en esta enfermedad. En Colombia se ha mantenido alrededor de los 300 casos de lepra en los últimos años, pero el departamento de Norte de Santander sigue liderando la lista de departamentos que más número de casos nuevos notifica para la enfermedad en especial los municipios de Cúcuta, Villa del Rosario, Ocaña y Puerto de Santander, por lo anterior se realizó un estudio de casos y controles. Los casos fueron individuos que se encontraban registrados en el SIVIGILA (Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública) y los controles individuos de las mismas regiones de los casos que no correspondían a familiares. A cada sujeto se le explico el estudio y se solicitó la firma de un consentimiento informado, una vez obtenida su autorización se procedió a tomar muestra de sangre periférica para extraer el ADN. Luego se realizó genotipificación de 4 variantes de nucleótido sencillo (rs7194886, rs2111234, rs3135499, rs8057341) en el gen *NOD2* mediante la

técnica de PCR en tiempo real, mediante uso de sondas Taqman ® prevalidadas. Posteriormente se realizó análisis el equilibrio de Hardy Weimberg, y análisis de asociación teniendo en cuenta cinco modelos de herencia (codominante, dominante, recesivo, sobredominate y aditivo, lo anterior con la finalidad de conocer si estos SNPs están asociados al desarrollo o la protección para la lepra en la población de Norte de Santander. Estos resultados permiten obtener un mayor conocimiento genético de la población del departamento de Norte de Santander al ser una región con predisposición al desarrollo de la lepra.

JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública, durante el primer semestre de 2019, se analizaron 167 casos, de los cuales 143 fueron nuevos y 2 casos con departamentos desconocidos, los departamentos que presentaron mayor número de casos nuevos notificados fueron Norte de Santander, Valle del Cauca y Santander. El departamento con mayor tasa de detección durante el 2019 es el departamento de Cesar con una tasa de 1,97 por 100 000 habitantes, seguido por Norte de Santander con 1,51 y Arauca con 1,48 por 100 000 habitantes. (*2020_Boletin_epidemiologico_semana_3.pdf*, s. f.), por este motivo es importante ahondar en el conocimiento relacionado con Lepra, tanto a nivel del huésped como del microorganismo.

Los estudios de asociación de genoma completo(GWAS) han mostrado un gran número de variantes genéticas que juegan un papel importante en la respuesta inmune desarrollada contra *Mycobacterium leprae*,(Vannberg et al., 2011) esto indica que los polimorfismos presentes en el hospedero permitirían identificar posibles personas con mayor riesgo. Zhang et al. (2009) reportaron que los genes que participan en la vía de señalización de NOD2 (del inglés; nucleotidebinding oligomerization domain containing 2) estaban asociados con susceptibilidad a la infección con *Mycobacterium leprae* en China. (Zhang et al., 2009a) Igualmente, se ha detectado que el gen *NOD2* aumenta su expresión en el tejido de la lesión de pacientes con lepra comparado con tejido normal. Esto muestra la importancia de este gen en la patogénesis de la enfermedad.

Según el estudio realizado por Ruiz et al (2010) se muestra que la presencia de diversas variantes de nucleótido sencillo en el gen *NOD2* han sido asociadas a enfermedades causadas por Micobacterias. (Ruiz-Larrañaga et al., 2010) Un estudio realizado con población de Nepal encontró que cuatro polimorfismos se asociaron con la susceptibilidad a la lepra cuando se

compararon las frecuencias alélicas al ser significativos ($p<0.05$) a nivel alelo, rs12448797 (OR 2.18, 95%IC 1.05-4.52, p=0.031), rs2287195 (OR 1.51, 95%IC 1.09-2.10, p=0.013) , rs8044354 (OR 1,53, IC 95% 1,12-2,07, p=0,006), y rs1477176 (OR 0,44, IC 95% 0,29-0,68, p=0,0002)), siendo el SNP rs1477176 el más significativo, así mismo al comparar las frecuencias genotípicas con un modelo dominante ocho polimorfismos (rs12448797, rs1477176, rs2287185, rs8044354, rs8043770, rs13339578, rs4785225 y rs751271) se asociaron con la enfermedad. De estos ocho polimorfismos, dos de los SNP (rs12448797 y rs1477176) se ubicaron en genes adyacentes del gen *NOD2* y los otros SNP (rs2287185, rs8044354, rs8043770, rs13339578, rs4785225 y rs751271) se agruparon en la región promotora y dentro del propio gen *NOD2*. Adicionalmente, en el mismo estudio se encontró que la presencia de siete polimorfismos en el gen *NOD2* (rs7194886, rs1861759, rs8044354, rs8043770, rs4785225, rs751271) estaban relacionados con protección contra las reacciones de tipo I o reversión (RR) tipo 1, como también otros 7 polimorfismos (rs2287195, rs8044354, rs7194886, rs6500328, rs17312836, rs1861759 y rs1861758) con susceptibilidad a las reacciones de tipo 2 o eritema nodoso leproso (ENL). (Berrington et al., 2010) Así mismo, un estudio realizado con muestras de individuos del sur de China y mediante GWAS encontró que la presencia de dos SNPs en este gen (rs9302752 y rs7194886) estaban relacionados con mayor susceptibilidad a desarrollar lepra, los otros SNPs evaluados en *NOD2* rs8057341 (A/G) y rs3135499 (A/C) no mostraron asociación con la lepra en este estudio. (Zhang et al., 2009a) En un estudio realizado entre la población china Yi se investigó si polimorfismos de un solo nucleótido presentes en los genes *NOD2, C13orf31 y CCDC122* se encontraban asociados con la lepra y se evidenciaron diferencias significativas en rs3135499 en *NOD2*, rs3764147 y rs10507522 en *C13orf31*, y rs3088362 y rs9533634 en *CCDC122* entre los pacientes y los grupos de control sanos en la cohorte, mostrando que el SNP s3135499 presente en el gen *NOD2* estaba asociado significativamente con la lepra en este

estudio (alélica *P* = 1E-08). La frecuencia del alelo de riesgo fue de 0,91 en pacientes y 0,80 en los controles sanos, lo que lleva a 2,55 veces (IC 95%: 1.83–3.55) mayor probabilidad de lepra. (Xiong et al., 2016) Por otro lado, un estudio realizado en familias con historia familiar de lepra de población de Prata, Brasil, encontró asociación entre la presencia del SNP rs8057431 en el gen *NOD2* y el desarrollo de la enfermedad, indicando un claro papel del gen *NOD2* en la susceptibilidad a lepra en las diversas poblaciones, además del rs8057341 A, otras variantes del gen NOD2 se relacionaron con la transmisión insuficiente de la protección contra la lepra a la descendencia afectada en el población brasileña rs2111234 G y rs3135499 C.(Jorge & MarianettiSoriani, 2018; Sales-Marques et al., 2014)En conclusión, estos resultados indican que variantes del gen *NOD2* están asociada con una mayor susceptibilidad a la lepra y juegan un papel importante en las características clínicas de la enfermedad. Esto muestra, que es necesario conocer si la población de Norte de Santander, una zona endémica para lepra, existen variantes de este gen que puedan tener un rol importante en la susceptibilidad a esta enfermedad. Esta información podría ser usada en un futuro para la detección y el control de la lepra en el departamento.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las variantes rs3135499, rs2111234, rs8057341 y rs7194886 del gen *NOD2* están asociados al desarrollo de lepra en población del departamento de Norte de Santander ?

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La enfermedad de Hansen o lepra es una enfermedad transmitida por un agente bacteriano denominado *Mycobacterium leprae*, el cual afecta principalmente la piel y la función nerviosa periférica, las mucosas de las vías respiratorias altas y los ojos, (*Lepra- Organización mundial de la Salud*, 2022) mostrando una evolución lenta con un período de incubación promedio de 3 años, aunque no es muy contagiosa se puede transmitir por gotas nasales y orales cuando se presenta un contacto estrecho y frecuente con enfermos no tratados, puede afectar a cualquier persona sin distinción de sexo o edad pero puede ser curada sin desarrollar discapacidad en la persona afectada. Las personas que padecen la enfermedad suelen ser objeto de estigmatización social, presentando efectos negativos en el acceso al diagnóstico, en el tratamiento y en la atención. (*Lepra - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*, s. f.)

A nivel mundial a final del año de 2018 se informaron 184.238 personas con lepra, durante este año se detectaron 208.619 nuevos casos de lepra en todo el mundo, disminuyendo en 8474 casos con respecto al año de 2017, el aumento de casos en varios países se debió a la aplicación de campañas activas de detección de casos y manejo de contactos. A nivel de las Américas durante los años de 2016, 2017 y 2018 se observó un incremento en el número de casos nuevos mostrando así 27.368 casos para el 2016, 29.127 casos para el 2017 y 30.957 para el 2018. (*Lepra - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*, s. f.) En Colombia según Boletín Epidemiológico del Instituto Nacional de Salud, para el 2017 se encontraron 362 casos, en el 2018 se detectaron 324 casos nuevos, para el 2019 se registraron en Colombia 339 casos,

en 2020 se hallaron 219 casos y 270 casos nuevos para el 2021, presentando una tasa de casos nuevos por 100.000 habitantes de 0.39 según datos presentados por el sistema de vigilancia (SIVIGILA) en su reporte presentado en el boletín de la semana epidemiológica XI de 2022.(*2022_Boletin_epidemiologico_semana_2.pdf*, s. f.) Durante el primer semestre de 2021 se detectaron 145 casos de los cuales 20 se encontraron dentro del departamento de Norte de Santander, mostrando una tasa de detección de 0,7 por 100.000 habitantes. (*2020_Boletin_epidemiologico_semana_3.pdf*, s. f.) Hacia el 2021 de acuerdo a las cifras entregadas por Instituto departamental de Salud (IDS) en Norte de Santander para el 2021 se registraron 25 casos en la región, siendo 19 de sexo masculino y 6 de sexo femenino, presentes en edades de 25 - 29 años (2 casos) 30 - 39 años (6 casos), 40 - 44 años (1 caso), 45 - 49 años (3 casos), 50 - 54 años (1 caso) y entre 55 - 69 años (12 casos). Los municipios con mayor número de casos fueron Cúcuta (13 casos), puerto Santander (3 casos), Villa del rosario (3 casos) y los municipios de Ocaña, San Calixto, la laya, el Tarra, Cucutilla y la Esperanza (1 caso). (*Norte, entre los departamentos con el mayor número de reportes de lepra*, s. f.)

La información que se conoce sobre la genética de huésped asociada a la susceptibilidad a Lepra por la infección con *Mycobacterium leprae* es muy baja y debido a la carencia de estudios en la población colombiana sobre la inferencia de los diferentes polimorfismo presentes en el gen *NOD2,* nos lleva a un desconocimiento si los SNPs que se han reportado como protectores o factores de riesgo en el mundo en diferentes poblaciones tienen significancia clínica en nuestra población especialmente en la región de Norte de Santander.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la presencia de los SNPs rs3135499, rs2111234, rs8057341 y rs7194886 en el gen *NOD2* en población con lepra y población sana en Norte de Santander.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir las variables demográficas en pacientes con lepra e individuos sanos del departamento de Norte de Santander.
- Describir las características clínicas de pacientes con lepra del departamento de Norte de Santander.
- Establecer la asociación entre las variantes de nucleótido sencillo rs3135499, rs2111234, rs8057341 y rs7194886 en el gen *NOD2* con el desarrollo de lepra en individuos del departamento de Norte de Santander.
- Establecer la asociación entre haplotipos de los SNP rs3135499, rs2111234, rs8057341 y rs7194886 en el gen *NOD2* con susceptibilidad a lepra

MARCO TEORICO

Introducción

La enfermedad de Hansen es una infección que afecta principalmente la piel y los nervios periféricos, su desarrollo se debe a la presencia del agente *Mycobacterium leprae (M. leprae) o Mycobacterium lepromatosis (M. lepromatosis)*, (Ploemacher et al., 2020) esta última especie se reconoció a partir del 2018 como una nueva especie involucrada en el desarrollo de la enfermedad.(Guevara & Cruz, 2021) La lepra es considerada una de las enfermedades de mayor antigüedad en la historia. (Fischer, 2017) El origen real y exacto no se conoce pero se atribuye su aparición a los registros presentes en los Papiros de Berlín 3038, que datan de la época de Ramses II del Imperio Medio de Egipto, (Barba Evia, 2021) con el tiempo y las diferentes situaciones sociales, por la presentación clínica y la ausencia de medicamentos en el tiempo hizo que se interpretará como un castigo divino o una maldición de los Dioses o una enfermedad de tipo hereditaria, siendo una enfermedad que estigmatizó a cada individuo haciendo que la imagen del leproso se dibuje en adjetivo como mísero, pobre, muerte o pecado(Salcedo & Romero Sierra, 2020). Con los diferentes estudios realizados hacia el año de 1873, (Sarode et al., 2020) se confirma la infecciosidad de la lepra cuando finalmente el médico de Salud pública Gerhard Henrik Amauer Hansen en sus estudios descubre al agente bacteriano denominado *Mycobacterium lepra.* (Fischer, 2017)

Epidemiologia

La enfermedad de Hansen o mejor llamada lepra, es estigmatizada, debido a que fue considerada como un castigo divino o producto de maldiciones en la antigüedad. Gracias al avance del conocimiento de los microrganismos y a la tecnología, los estudios mostraron que es una enfermedad infecciosa curable que sigue siendo endémica en más de 140 países de todo el

mundo. En el año 2000 la Organización Mundial de la salud lo declaró como un problema eliminado, lo que se contrapuso con lo observado en el año 2017 donde se evidenciaron alrededor de 200.000 casos nuevos.(Maymone et al., 2020) Para el año de 2017 se registraron 211.009 nuevos casos en todo el mundo cifras provenientes de 159 países, reporte evidenciado por la OMS, (*Lepra- Organización mundial de la Salud*, 2022) adicionalmente según el reporte de lepra en las Américas por parte de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en 2018 se detectaron 30.957 nuevos casos, de los 1.789 correspondían a población pediátrica y 2.324 a pacientes con deformidad visible a causa de la enfermedad. (*Lepra - OPS/OMS Organización Panamericana de la Salud.*) Los programas nacionales contra la lepra plantearon 3 pilares en el año 2020 orientados a llegar a un mundo libre de la enfermedad. Los pilares incluyen: 1. Fortalecer la apropiación y las asociaciones gubernamentales, 2. Detener la lepra y sus secuelas y 3. Finalización de la discriminación y aumento de la inclusión. De acuerdo a ello según el registro epidemiológico semanal del 30 de agosto de 2019 de la OMS durante el año 2018 se detectaron 208.619 casos nuevos de lepra a nivel mundial y la tasa de detección de nuevos casos fue de 2,74 por 100.000 habitantes, mostrando que la prevalencia mundial registrada a finales del 2018 disminuyo en 8.474 casos desde finales del 2017 cuando habían 192.713 casos en tratamiento, aunque la prevalencia disminuyó la presencia en los aumentos a la resistencia en los tratamientos se hizo evidente. Según el informe en Colombia se evidenciaron 324 casos nuevos de lepra, dentro de ellos 266 correspondían a lepra Multibacilar, 136 al género femenino y 5 correspondían a niños. (*Global Leprosy Update, 2018*, 2019) En Colombia según el informe presentado en el boletín epidemiológico V del Instituto Nacional de Salud (INS) para 2021 se encontró que la lepra disminuyó en 33.8% comparado con la notificación en el tercer periodo epidemiológico de años anteriores con una tasa de 0,23 casos nuevos por 100.000 habitantes con un 70,68 % de casos con pacientes multibacilares, y 29,31% de casos con pacientes

paucibacilares; los departamentos del Valle del Cauca, Norte de Santander, y Santander se caracterizaron por ser los departamentos con el mayor número de casos nuevos de lepra 15, 10 y 10 respectivamente. (Instituto Nacional de Salud, 2021) De igual manera en el boletín epidemiológico XII de 2021 se presentaron 277 casos disminuyendo en un 17.5% comparado con la notificación en el tercer periodo epidemiológico de años anteriores, pero presentó una incidencia de 0,49 casos nuevos por 100.000 habitantes y para esta fecha el departamento de Norte de Santander mostro 25 casos nuevos de lepra (Instituto Nacional de Salud, 2021)

En el departamento de Norte de Santander según el boletín epidemiológico 12 de 2019 entregado por el Instituto departamental de Salud se encontró que para el año de 2018 se presentaron 27 casos y para 2019 se evidenciaron 31 casos, de estos 31 casos el 32,26% (10 casos) correspondieron al municipio de Cúcuta, 25,81% (8 casos) municipio de Ocaña y 12,90% (4 casos) al municipio de Villa del Rosario, siendo el grupo etéreo con mayor cantidad de casos los comprendidos entre las edades de 20 a 49 años. . (Instituto Departamental de Salud - Maritza Panqueva Ochoa, 2019). Para el 2021 el Municipio de Cúcuta reporto 13 casos nuevos de lepra para una tasa de detección de casos nuevos de 1,27 por 100.000 habitantes y 25 casos en el departamento de Norte de Santander (Instituto Nacional de Salud, 2021), el 75% de los casos se presentaron en pacientes de sexo masculino y el 83% en el grupo de edad de 29 a 59 años, se evidenciaron casos tanto en el aérea rural como urbana del municipio. (*Norte, entre los departamentos con el mayor número de reportes de lepra*, s. f.)

Agente etiológico

Hacia el año de 1873 el médico noruego Gerhard Armauer Hansen identificó como agente etiológico a *Mycobacterium leprae,* por lo cual se le dio el nombra al microrganismo también de bacilo de Hansen. En México y el Caribe se ha descrito una nueva micobacteria *M. lepromatosis* endémica en estos lugares.(Eichelmann et al., 2013) *M. leprae* se caracteriza por tener forma

bacilar recta o ligeramente curvo, con extremos redondeados, mide entre 1.5 a 8 μm de largo y 0.2 a 0.5 μm de diámetro. Presenta características ácido alcohol resistente debido a su alto contenido lipídico es por ello que la tinción apropiada para su visualización es la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) debido a que retiene el rojo de fucsina fenicada y no se decolora cuando se realizan los lavados con alcohol y ácido.(Lastória & Abreu, 2014)

El *M. leprae* se reproduce por fisión binaria y es característico su crecimiento lento (entre 12 a 14 días), no se ha cultivado *in vitro* con éxito, (Lastória & Abreu, 2014) aunque se ha logrado su cultivo i*n vivo* en ratones utilizando el método de inoculación en la pata trasera de Shepard. El armadillo de nueve bandas *(Dasypus novemcinctus)* además de ser un hospedero natural de *M. leprae,* se ha convertido en la fuente principal de la micobacteria para los estudios de investigación inmunológica y bioquímica. (Walker et al., 2014) La micobacteria muestra un óptimo crecimiento cuando la temperatura oscila entre 27°C y 30°C mostrando así una mayor predisposición por áreas como la piel, nervios periféricos, testículos, tracto respiratorio superior y compromiso visceral inferior. (Lastória & Abreu, 2014)

Mediante microscopia electrónica se ha identificado que el bacilo de *M. leprae* tiene una ultraestructura común del género *Mycobacterium,* presentando una morfología característica de bacterias Gram positivas. A nivel de la bicapa lipídica presente en la membrana citoplasmática se evidencian proteínas de interacción. La pared celular muestra una composición similar a la de otras micobacterias compuesta de peptidoglicanos unidos a polisacáridos de cadena ramificada como los arabinogalactanos que soporta los ácidos micólicos y el lipoarabinomano (LAM). En la capa más externa se encuentra la cápsula compuesta de lípidos como el dimicocerosato de tiocerol y el glicolípido fenólico (PGL-1) , el cual tiene un trisacárido unido a los lípidos por medio de un fenol, siendo este trisacárido especifico antigénicamente para *M. leprae* (Lastória &

Abreu, 2014) siendo el responsable de una intensa respuesta humoral mediada por IgM. (Eichelmann et al., 2013)

En el 2001 Cole et al. secuenciaron el genoma de *M. lepra.* El genoma de *M. leprae* está compuesto por 3.268.203 pares de bases (pb) con 57,8% de contenido guanina + citosina.(Lastória & Abreu, 2014) Al compararlo con el genoma de *M. tuberculosis* se evidencia un ejemplo claro de evolución reductiva, siendo un 25% más pequeño que el genoma del *M. tuberculosis,*(Walker et al., 2014) Es un genoma que presenta 2.770 genes de ellos el 49.5%(1.604 genes) codifican proteínas y 1.116 (27%) son pseudogenes.(Lastória & Abreu, 2014)

Transmisión

La forma en que se transmite no es muy bien conocido. El *M. leprae* se caracteriza por ser una de las micobacterias con un poder de contagio bajo mas no despreciable, se relaciona con factores de riesgo como el hacinamiento y el contacto estrecho (Eichelmann et al., 2013) entre un individuo susceptible y un paciente infectado.(Lastória & Abreu, 2014) Una de las posibles vías de transmisión es mediante vía respiratoria a través de la inhalación de los bacilos contenidos en la secreción nasal o gotitas de *Flügge*.(Lastória & Abreu, 2014) De igual manera se ha postulado que se puede transmitir mediante la piel, pero aún no se ha demostrado. La micobacteria presenta una viabilidad fuera del cuerpo que oscila entre 36 horas hasta 9 días siendo posiblemente una transmisión mediante fómites,(Eichelmann et al., 2013) siempre y cuando existan las condiciones óptimas de alta humedad y baja luz del sol.(Walker et al., 2014) Otras posibles vías de transmisión son la sangre, la transmisión vertical, la leche materna y la picadura de insectos.(Lastória & Abreu, 2014) Se requieren más investigaciones para dilucidar la(s) o vía(s) de transmisión y los reservorios naturales del microorganismo, se ha descrito que el armadillo de

nueve bandas presente en el continente americano, Luisiana, Mississippi y el este de Texas es considerado un huésped natural y un reservorio de la micobacteria, hacia el año de 2016 se evidenció la micobacteria en Ardillas rojas. (Guevara & Cruz, 2021)

Los pacientes que cursan con lepra lepromatosa (LL) se caracterizan por presentar una carga bacteriana significativa en los tejidos, identificándose hasta 7.000 millones de bacilos por gramo, los pacientes que cursan con una lepra diferente a la lepromatosa presentan una carga bacilar más baja, alrededor de un millón de bacterias en total. Uno de los lugares anatómicos donde se ha encontrado en mayor número el bacilo es en la mucosa nasal (100 millones de microorganismos viables por día). (Eichelmann et al., 2013)

Periodo de incubación

El periodo de incubación de la lepra es aún incierto y difícil de definir de manera exacta al presentarse de manera tan variada, mostrando un período de incubación para la lepra tuberculoide entre 2,9 y 5,3 años y para la presentación lepromatosa entre 9,3 y 11,6 años en un estudio realizado al personal militar de EE. UU expuestos por periodos de tiempo relativamente cortos. Aunque se han evidenciado periodos tan largos como 30 años en otros individuos. (Walker et al., 2014)

Patogenia de la lepra

La lepra es una enfermedad con múltiples presentaciones clínicas causada en primer lugar por *M. leprae* y en menor medida por *M. lepromatosis.* La patología suele afectar diferentes tejidos, siendo los cambios a nivel de la piel como la perdida de sensibilidad, los cambios en la pigmentación, y las deformidades o discapacidades graves e irreversibles, los que llevan al paciente a presentarse en las instalaciones médicas. La enfermedad se puede presentar de manera

temprana caracterizada por una o varias manchas con hipopigmentación que pueden curar de manera espontánea o progresar hacia diferentes presentaciones de gravedad.

M. leprae ingresa posiblemente por la nariz o la piel, una vez logran ingresar las bacterias allí invaden, sobreviven y se multiplican en las células fagocíticas, queratinocitos y células de Schwann. De acuerdo con la vía usada para el ingreso será el tipo de célula que iniciará el proceso de respuesta inmunológica, dado que cada tipo de célula presentan receptores que detectan los diferentes componentes bacterianos. Dentro de la respuesta inflamatoria generada se encuentra la secreción de citocinas que permita la activación de otras células del sistema inmunitario y así mismo la activación de las células T presentadoras de antígeno. (Röltgen et al., 2020).De acuerdo con la carga bacteriana, las características clínicas, histológicas y a la respuesta inmunológica se ha utilizado por los dermatólogos la clasificación de Ridley y Jopling, la cual consta de cinco categorías: Lepra tuberculoide polar (TT) con la mayor respuesta celular (interferón gama (INF-γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) e interleuquina 15 (IL-15) y un numero bajo de bacterias al presentar un crecimiento reducido de las mismas. Lepra bordeline tuberculoide (BT), bordeline bordeline (BB) bordeline lepromatoso (BL) y lepra lepromatosa polar (LL) las cuales se caracterizan por la presencia de una respuesta humoral exagerada pero ineficiente (interleuquina 4 (IL-4) e Interleuquina 10 (IL-10)) que conduce al mantenimiento de la bacteria dentro del hospedero, con presencia de una alta carga bacteriana. (Katharina Röltgen, 2020)

Los pacientes durante el curso de la enfermedad e incluso después del tratamiento pueden experimentar complicaciones de tipo inmunológico denominadas reacciones leprosas, las cuales corresponden a reacciones inflamatorias agudas que pueden conducir a un alto nivel de morbilidad si no se da un tratamiento apropiado. Se han establecido dos tipos de reacciones:

1. La reacción de reversión RR o reacción de tipo 1, donde se da un aumento agresivo de la respuesta celular Th1 contra *M. leprae,* la inflamación se evidencia en lesiones cutáneas o nervios, mostrando cambios en la secreción de IFN-γ y TNF-α por parte de los linfocitos CD4+ y una disminución de la interlequina IL-10. Este tipo de reacciones son más frecuentes en algunos pacientes dentro del espectro límite de la lepra tuberculoide.

2. La reacción es el eritema nodoso leproso (ENL) o reacción tipo 2, se presenta como un proceso de tipo inflamatorio doloroso de las lesiones de la piel y los nervios con tendencia a la cronicidad y a procesos repetitivos y se presenta en algunos casos lepromatosos, se establece que un posible mecanismo aborda la liberación de citoquinas inflamatorias como el TNF-α en las lesiones una vez la micobacteria ha ingresado en los neutrófilos.

Existe el fenómeno de Lucio el cual es una afección mortal asociada con la presentación lepromatosa difusa y en ocasiones con la lepra lepromatosa, su presentación es con lesiones cutáneas rodeadas de eritema que evolucionan a necrosis de la piel. La razón por la cual se desarrollan las reacciones aun es desconocida pero se cree que depende del tipo respuesta inmune que desarrolle el hospedero.(Röltgen et al., 2020)

Clasificación de las formas clínicas

Durante años se han presentado diferentes clasificaciones para la enfermedad, siendo el resultado de los nuevos conocimientos sobre la lepra. Una de las clasificaciones es la presentada en Madrid en 1953 en el congreso internacional de lepra basándose en las características clínicas y el resultado del examen de piel dividiendo así esta enfermedad en dos grandes grupos inmunológicos inestables (indeterminada y bordelinde) y dos grupos estables (tuberculoide y

lepromatosa). Posteriormente surge la clasificación propuesta por Ridley & Jopling donde usando criterios histopatológicos, clínicos e inmunológicos establece dos extremos la lepra tuberculoide (TT) y la lepra lepromatosa (LL) presentando así mismo un estadio intermedio correspondiente a la lepra borderline que a su vez se divide en borderline- tuberculoide (BT) y Borderline-lepromatosa (BL) dependiente del extremo hacia el cual se encuentre y una intermedia que corresponde a borderline-bordeline (BB). La Organización Mundial de la salud (OMS) con la finalidad de volver más operativa y simple la clasificación hacia el año de 1982 establece de acuerdo con el índice bacilar (IB) obtenido del análisis del laboratorio dos divisiones: lepra paucibacilar (PB) y lepra multibacilar (MB), teniendo como referencia que los pacientes multibacilares corresponderán aquellos que tienen un IB mayor o igual a 2+ y los pacientes PB serán aquellos que presenten un IB menor a 2+. Debido a la falta de recursos y de acceso al examen microscópico del frotis de piel, la OMS sugiere en 1988 el uso de una clasificación clínica donde los pacientes PB corresponden aquellos que tienen hasta cinco lesiones cutáneas y/o compromiso de un solo tronco nervioso, mientras que los pacientes MB corresponderán a los que presenten más de cinco lesiones cutáneas y/o más de un tronco nervioso comprometido, al correlacionar esta clasificación con la presentación con la establecida por Ridley & Jopling se encuentra que los pacientes positivos en el frotis se consideran MB, independiente del número de lesiones así mismo los pacientes con presentaciones indeterminadas , TT o BT se incluyen dentro del grupo de PB y el grupo MB lo integran los pacientes BB, BL, LL, y algunas pacientes BT.(Lastória & Abreu, 2014)

Se presentó un cambio en la clasificación de la enfermedad combinando la clasificación en número de lesiones con el test serológico de flujo lateral de *M. leprae (ML- FLOW* Test) que relaciona el índice bacilar con la concentración de Ig-M anti-trisacárido de PGL-1 en sangre

periférica de los pacientes, siendo los pacientes seropositivos los que cursan con una MB y los pacientes seronegativos aquellos que presentan PB.(Lastória & Abreu, 2014)

Mecanismos inmunológico desarrollados en la lepra

El desarrollo de una interacción apropiada entre la inmunidad natural y la micobacteria es considerado el paso crucial para el desarrollo de una respuesta inmune eficiente, permitiendo el direccionamiento hacia las posibles células efectoras Th1 o Th2, caracterizando el estado de la inmunidad y de la presentación de la enfermedad. (Lastória & Abreu, 2014)

Inmunidad innata

En el momento se desconoce cuáles son los factores que permiten la activación o inhibición de ciertos patrones en la inmunidad, presentándose como una posible hipótesis la cual se basa en la vía de transmisión y/o carga bacilar, siendo así que las presentaciones tuberculoides pueden surgir de una vía de infección con la capacidad de activar un sistema inmune eficiente para contrarrestar el proceso infeccioso, llevando a que la micobacteria sea detectada por los receptores de reconocimiento de patrones (PPR) y se pueda desarrollar una respuesta inmunitaria apropiada , en donde la cantidad de bacterias al ser bajo no permita la detección del ADN por la vía estimuladora de genes de interferón (STING) y se induzca la secreción eficiente de INF-γ, y se produzca una regulación en la autofagia y la protagonista en la inmunidad sea la inmunidad mediada por células, siendo las responsables de la aparición de las lesiones de la lepra. Al contrario la presencia de una alta carga bacilar provocada por un mecanismo de transmisión diferente en donde el sistema inmunológico no sea capaz de controlar el proceso infeccioso, conducirá a la presencia de ADN bacteriano en el ambiente del hospedero, la activación de la respuesta antiinflamatoria vía INF tipo I , a la inhibición de la autofagia y la persistencia de las bacterias en las presentaciones lepromatosas.(Röltgen et al., 2020)

Una vez ingresa la micobacteria al ambiente del hospedero, los antígenos presentes en la pared celular de la micobacteria son reconocidos por receptores del complemento CR1, CR3 y CR4, pero al mismo tiempo se sabe que las interacciones de la micobacteria con los macrófagos esta mediada por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) dentro ellos se han identificado dos familias los receptores tipo toll (TLR) 1 y 2 y los receptores tipo NOD o proteínas 2 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2). Los PPR se caracterizan porque reconocen estructuras moleculares comunes presentes en los patógenos mejor conocidos como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). La activación del heterodímero TLR2/TLR1 es elemental para la eliminación de la micobacteria,(Ozório Moraes et al., 2016) en especial para la diferenciación del monocito en macrófago y la activación de la respuesta TH1 mediante la secreción de citocinas proinflamatorias TNF- α, IL-12 e IL-15, siendo esta interleuquina importante al ser una estimuladora de la actividad antimicrobiana dependiente de vitamina D y aumenta a su vez la secreción del péptido antimicrobiano catelicidina. (Ozório Moraes et al., 2016)

Las lipoproteínas de la micobacteria de 19 kDa y 33 kDa incrementan la expresión de citoquinas proinflamatorias en monocitos y células dendríticas mediadas por el heterodímero TLR1 y TLR2, esta activación lleva a un aumento en la liberación de IL-12 y de factor de necrosis tumoral (TNF), siendo este último el responsable de inducir respuestas protectoras de tipo Th1, mostrando un fenotipo predominante de macrófagos tipo 1 (M1). En las biopsias de piel de los pacientes con lepra tuberculoide se ha encontrado una expresión de TLR1 y TLR2 en comparación con los pacientes que cursan con lepra lepromatosa.(Ozório Moraes et al., 2016)

Una vía de señalización que ha cobrado importancia fue la respuesta inmune mediada por el dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2) donde las variantes presentes en este gen también influyen en la susceptibilidad a la infección por *M. leprae.*(Toledo Pinto et al.,

2018). Los receptores similares a dominios de oligomerización de unión a nucleótidos llamados NLR o (receptores similares a NOD) son otro grupo de relevancia de los PPR que han sido asociados con una participación en la respuesta inmune innata frente a la micobacteria. La proteína NOD2 se comporta como un sensor a nivel citoplasmático cuya funcionalidad es reconocer los peptidoglicanos, incluyendo el peptidoglucano presente en la micobacteria, en donde el ligando principal es el muramil-dipéptido (MDP), el cual es reconocido por NOD2 activando así el factor de transcripción NF-KB a través de la molécula adaptadora RIP2, desencadenando la producción de mediadores proinflamatorios. Adicionalmente el MDP puede activar el proceso inflamatorio mediante el reclutamiento de la caspasa-1, la cual es la responsable de la escisión y activación de la IL- 1B. El proceso de activación de la proteína NOD2 aumenta la vía de la autofagia dentro de las células dendríticas y media en el procesamiento, la presentación antigénica y la generación de una respuesta de células T CD4.(Ozório Moraes et al., 2016; Toledo Pinto et al., 2018) y esto porque NOD2 induce la diferenciación de las células dendríticas a través de la secreción de la citocina proinflamatoria IL-32. (Toledo Pinto et al., 2018)

Se ha documentado que la variación genética en el gen *NOD2* se asocia con respuestas inflamatorias exacerbadas en reacciones de lepra lo cual podría llevar a modular las vías posteriores como la activación de LRRK2 (quinasa de repetición rica en leucina 2). El LRRK2 es un enzima quinasa que aumenta la producción de citoquinas inflamatorias que se requieren para la actividad antimicrobiana en presencia de macrófagos. Paralelamente, también se recluta caspasa I, lo cual lleva a la activación de IL-1β, un mediador esencial de la inflamación y alternativamente a la activación de las células TH17. (Toledo Pinto et al., 2018)

Según revisiones actuales se comprende la importancia de la secreción del interferón y la regulación de la autofagia en cuanto a la polarización de la lepra, en donde el INF tipo II (INF-γ)

se manifiesta en lesiones de tipo tuberculoide promoviendo una respuesta antimicrobiana efectiva, mientras que el INF tipo I (INF-β) se expresa en lesiones de tipo lepromatoso conduciendo a la supervivencia y diseminación de la micobacteria, debido a que induce la activación de la IL-10 dependiente de la IL-27 lo que lleva a que se suprima la respuesta antimicrobiana mediante la inhibición de la secreción de INF- γ, así mismo aumentando la actividad fagocítica y captación bacteriana de los macrófagos aumentando la supervivencia de la micobacteria en las células del hospedero.(Röltgen et al., 2020)

Factores del hospedero y susceptibilidad a la lepra

No todas las personas que se encuentran expuestas a pacientes con lepra multibacilar pasaran a presentar esta enfermedad, lo cual puede plantear la hipótesis de una posible resistencia natural a la enfermedad, pero se cree que la genética del hospedero desempeña un papel importante en la respuesta inmune innata desarrollada frente a la micobacteria.

La susceptibilidad o la mayor resistencia a la lepra se ha relacionado con marcadores genéticos del hospedero en cuanto a varias vías, siendo de importancia los que involucran el reconocimiento inmunitario innato, el INF tipo I, la autofagia y el metabolismo de los lípidos y la energía. (Katharina Röltgen, 2020)

En las últimas décadas los estudios genéticos han revelado variantes genéticas como factores de riesgo para el desarrollo de la lepra, el tipo de presentación clínica a desarrollar y la aparición de reacciones leprosas. -. *M. leprae* se caracteriza por presentar un genoma muy reducido lo que permite reforzar la hipótesis sobre el impacto de la genética del hospedero en el control o desarrollo de la enfermedad, evidencia de ello están los estudios genéticos descriptivos, donde se encuentra que la lepra muestra una fuerte agregación familiar y la concordancia de infección es mayor en gemelos monocigóticos (59.7%) que en gemelos dicigóticos (20%)

(Chakravartti, 1973). En diferentes exploraciones se han encontrado regiones cromosómicas que albergan posibles candidatos posicionales que albergan genes de susceptibilidad a la lepra y hay un primer estudio de asociación de todo el genoma (GWAS) sobre la lepra que se realizó en china con un gran número de muestras con un total de 491.883 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) distribuidos por todo el genoma, estudio que demostró que los cuatro SNP presentes en el locus *NOD2* asociados con lepra, dos de ellos (rs9302752 y rs7194886) se encuentran entre *NOD2* y *SNX20* (gen que codifica para la proteína clasificadora nexina20), siendo estos dos SNP intergénicos los más asociados con la lepra que los otros dos SNP en estudio presentes dentro de *NOD2,* esto permite deducir que proteínas involucradas en la respuesta inmune innata pueden ser factores de riesgo para el desarrollo de la lepra.(Zhang et al., 2009a)

Diferentes genes se han convertido en candidatos para evaluar la susceptibilidad frente a la enfermedad en ella podemos encontrar estudios en diferentes poblaciones haciendo uso de estudios de casos y controles o estudios basados en familia *(tabla No. 1)*

Tabla 1. **Genes asociados a la susceptibilidad a la lepra.**

Se presentan algunos genes que han sido asociados al desarrollo de lepra en diferentes poblaciones.

Gen	Nombre del Gen	Función del gen	Población en estudio
IL- 10	Interleuquina 10	Inmunoregulación	Estudio de casos y controles en Brasil (Santos et al., 2002) (Mazini et al., 2016) Estudio de casos y controles en India(Moraes et al., 2004) Estudio basado en familias en Brasil, Meta-análisis.(Malhotra et al., 2005)
NOD2	Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos 2	Reconocimiento del muramil dipéptido bacteriano y activación de NF-KB	Estudio de caso y controles en China(Zhang et al., 2009a)

			Estudio de casos y controles en Brasil(Sales-Marques et al., 2014) Estudio basado en familias en Brasil(Sales-Marques et al., 2014) Estudio basado en familia Vietnamitas(Grant et al., 2012)
TLR1	Toll like receptor 1	Reconocimiento de patógenos y activación de la inmunidad innata	Estudio de casos y controles de la India(Sunny et al., 2010)

En un estudio de casos y controles con respecto a SNP presentes en el Gen de la IL-10 realizado en Rio de Janeiro, Brasil en la fundación Oswaldo Cruz se evidenció una asociación entre los alelos TNF2 y la resistencia a la lepra MB, pero no a la lepra PB, respaldando la hipótesis de que la presencia del alelo mutante podría ser un marcador genético contra el desarrollo de la enfermedad (Santos et al., 2002) En otro estudio realizado en Brasil en el cual se involucraron 36 SNP de cinco genes ubicados en cuatro locis diferentes: *CCDC122- LACC1, NOD2, TNFSF15 y RIPK2,* se encontró que los SNP de *NOD2 (*rs8057431) y *CCC122-LACC1 (*rs4942254) se encuentran involucrados en la regulación de la vía de NOD2 y por ende en la susceptibilidad a la lepra en diversas poblaciones. En el estudio comparativo de las familias vietnamitas se encontró que el comportamiento entre las poblaciones de china y las vietnamitas están más relacionadas y muestran una mayor similitud en sus patrones de desequilibrio de ligamiento que las poblaciones de india y maliense, lo que permite explicar la reproducibilidad de los resultados con respecto al estudio chino, siendo de relevancia el hallazgo de que tres de los genes implicados en la susceptibilidad a la lepra pertenecían a la vía de señalización de NOD2 (NOD2, TNSF15, RIPK2) , indicando la importancia de la vía en la susceptibilidad a la lepra, lo cual radica en la importancia de los mecanismos implicados en el reconocimiento bacteriano a nivel citosólico de las células mieloides.(Grant et al., 2012)

En un estudio de casos y controles realizados a la población de Nueva Delhi en india, población donde prevalece la enfermedad se encontró que *TLR1* y *HLA-DRB1/DQA1* son determinantes genéticos de la susceptibilidad a la lepra, de igual manera se evidencia el efecto protector contra el patógeno cuando hay presencia de la variante TLR1 hipofuncional. (Sunny et al., 2010)

Gen *NOD2* y proteína NOD2

Dentro de los receptores de reconocimiento de patrones moleculares encontramos los receptores similares al dominio de unión a nucleótidos (NOD). En ellos se encuentra el gen *NOD2* antes conocido como CARD15 el cual está ubicado en el cromosoma 16q12-21y su información conduce a la síntesis de la proteína NOD2 o proteína que contiene el dominio e oligomerización de unión a nucleótidos, esta proteína está conformada por 1040aa y tiene tres regiones: un extremo carboxiterminal rico en repeticiones de leucinas extremo involucrado en el reconocimiento del antígeno, un dominio central de unión de nucleótidos que facilita la auto-oligomerización y contienes el sitio de unió a ATP y un dominio amino terminal compuesto por un dominio de reclutamiento de caspasas N-terminales (CARD), el cual es el responsable para la transducción de señales a través de interacciones proteína–proteína. Esta proteína posee dos repeticiones en tándem de regiones CARD que son activadas por el dipéptido muramil, componente de la pared celular.(Peña, 2007)

La proteína NOD2 esta activa en algunas células el sistema inmune (monocitos, macrófagos y células dendríticas), de igual manera la proteína esta activa en varios tipos de células epiteliales como las células de Paneth, las cuales están en el revestimiento del intestino, actuando como defensa de la pared intestinal contra infecciones bacterianas.(Peña, 2007)

Las funciones de la proteína NOD están involucradas en la defensa del cuerpo ante la presencia de agentes bacterianos intracelulares. La proteína NOD2 al realizar el reconocimiento

intracelular enciende o activa un complejo proteico llamado factor nuclear kappa-B, complejo encargado de regular la actividad de múltiples genes incluidos aquellos que controlan las respuestas inmunitarias y las reacciones inflamatorias. También a la proteína NOD2 se le ha descrito su actuación en el proceso de la autofagia, proceso que usan las células del hospedero para rodear y destruir agentes infecciosos y sustancias dañinas.(Peña-Sanoja & De Sanctis, 2013)

El sistema inmunitario innato lleva a cabo funciones importantes, en ellas se encuentra incluido el reconocimiento y la eliminación de organismos infecciosos mediante la detección de receptores de reconocimiento de patógenos. (Caruso et al., 2014) Diversos estudios han evidenciado que la estimulación con la proteína NOD2 incrementa las respuestas dependientes de Th1 y Th2.(Magalhaes et al., 2008; Tada et al., 2005) Por lo tanto la proteína NOD2 puede aumentar las respuestas Th1 o Th2 mediante el reconocimiento de los antígenos expresados por los agentes infecciosos.(Berrington et al., 2010)

Dentro de las enfermedades infecciosas se encuentra la lepra, un proceso patológico incapacitante de tipo crónico ocasionado por *Mycobacterium leprae,* enfermedad que a menudo elude el diagnóstico temprano siendo detectada cuando la mayoría de los pacientes presentan lesiones en la piel o daños neurológicos que se pueden expresar como falta de sensibilidad, dolores musculares o deformaciones, esto debido a la daño que ocasiona en los nervios periféricos, la piel, los ojos y las mucosas de las vías respiratorias altas (Wen et al., 2014). La lepra es una enfermedad que ha sido utilizada como modelo para estudiar la regulación génica de la respuesta inmune del hospedero, y la infección. Un ejemplo de ello son los estudios realizados a gemelos monocigóticos en donde se encontró que tienen una similitud 3 veces mayor en el tipo de lepra que los gemelos dicigóticos.(Chakravartti, 1973) Investigaciones recientes sobre los mecanismos y la modulación de la inmunidad innata respaldan la idea que después de la lepra indeterminada debiese ocurrir una serie de eventos inmunoreguladores que determinaran el

espectro de la enfermedad.(Mazini et al., 2016) La proteína NOD2 detectan fragmentos de peptidoglicano a nivel intracelular, los mecanismos mediante el cual los hospederos pueden internalizar al peptidoglicano incluyen varias rutas como la fagocitosis con la subsecuente degradación bacteriana, siendo una opción la absorción de fragmentos de peptidoglicano mediante vesículas, o mediante el transporte a través de las membranas del hospedero usando canales, moléculas formadoras de poros o secreción, mediante endocitosis o mediante células vecinas. Una vez dentro de la célula, la activación de NOD1 y NOD2 implica su reubicación a nivel intracelular. La activación de NOD2 induce la formación de un autofagosoma que esta mediado por el reclutamiento del complejo proteico ATG16L1en la membrana plasmática y el cual es indispensable para iniciar la autofagia de las bacterias que ingresaron a las células del hospedero. (Caruso et al., 2014) (Travassos et al., 2010) De acuerdo con el papel de NOD1 y NOD2, en la respuesta del hospedero contra la infección bacteriana se evidencia que los ratones deficientes de estas dos proteínas muestran mayor susceptibilidad a varios patógenos. (Franchi et al., 2009; Philpott et al., 2014) Las proteínas NOD1 y NOD2 desempeñan funciones redundantes con los TLR en la detección de bacterias y la producción de moléculas proinflamatorias, debido a que ambas vías de señalización conducen a la activación de NF-κB y MAPK(Park et al., 2007; Tada et al., 2005). NOD2 también regula las respuesta de las células Th17(Brain et al., 2013), en ratones, la estimulación con NOD1 o NOD2 solo conduce a respuestas inmunitarias adaptativas dependientes de Th2 mientras que la coestimulación con agonistas de TLR promueve respuestas inmunitarias de células Th1, Th2 y Th17 (Fritz et al., 2007)

METODOLOGÍA

Para dar cumplimiento a los tres objetivos planteados en el estudio se tuvieron en cuenta las siguientes variables listadas en la tabla 2.

Tabla 2. Variables evaluadas en el estudio.

Nombre de la Variable	Definición Operativa	Relación	Naturaleza y Nivel de Medición	Nivel Operativo
Estado caso o control	Identifica si se trata de un sujeto caso: diagnóstico de lepra, o control, según criterios definidos.	Dependiente	Cualitativa nominal dicotómica.	Caso: 1 Control: 0
Edad	Años cumplidos	Independiente potencial confusor.	Numérica continua	Valor en años cumplidos.
Sexo	Hombre, mujer	Independiente	Cualitativa nominal dicotómica.	Mujer: 0 Hombre: 1
Municipio de nacimiento	Lugar de nacimiento: Municipiode Norte de Santander. Código DANE	Independiente	Cualitativa nominal politómica.	Municipio de Norte de Santander. Código DANE
Municipio de procedencia	Lugar de procedencia: Municipiode Norte de Santander. Código DANE	Independiente	Cualitativa nominal politómica.	Municipio de Norte de Santander Código DANE
Municipio de nacimientodel padre	Lugar de nacimiento del padre:Municipio de Norte de Santander. Código DANE	Independiente	Cualitativa nominal politómica.	Municipio de Norte de Santander Código DANE
Municipio de nacimientode la madre	Lugar de nacimiento de la madre:Municipio de Norte de Santander.Código DANE	Independiente	Cualitativa nominal politómica.	Municipio de Norte de Santander. Código DANE

Clasificación de la enfermedad en casos	Multibacilar o paucibacilar	Independiente	Cualitativa nominal dicotómica.	Paucibacilar: 0 Multibacilar: 1
rs3135499Adenina	Polimorfismo de nucleótido sencillo Adenina-Citocina	Independiente	Cualitativa nominal dicotómica	Adenina: A Citocina: C
rs2111234Guanina	Polimorfismo de nucleótido sencillo Guanina-Adenina	Independiente	Cualitativa nominal dicotómica	Guanina: G Adenina: A
rs8057341Adenina	Polimorfismo de nucleótido sencillo Adenina-Guanina	Independiente	Cualitativa nominal dicotómica	Adenina: A Guanina: G
rs7194886Citocina	Polimorfismo de nucleótido sencillo Citocina-Timina	Independiente	Cualitativa nominal dicotómica	Citocina: C Timina: T

Declaración de ética

Para dar cumplimiento a los objetivos planteados el estudio fue evaluado, revisado y aprobado por el comité de ética del HU Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta de Bogotá, Colombia (Código 1DIS02-2Ñ MinCiencias 212084368694). Una vez aprobado, se invito a los participantes y se explicó el estudio, se realizó verificación de la comprensión de este y posteriormente se les solicitó la firma del consentimiento informado. Este estudio fue clasificado como una investigación con mínimo riesgo, de acuerdo con lo establecido en los artículos 15 y 16 de la resolución 8430 de 1993. Adicionalmente, cumple con los lineamientos promulgados en la declaración de Helsinki introducidas por la 52ª Asamblea General de la Asociación Médica Mundial en octubre del año 2000 en Edimburgo.

Población de estudio

Para dar cumplimiento a los objetivos se realizó un estudio de casos y controles con individuos procedentes y naturales del Departamento de Norte de Santander. Se realizó una búsqueda de individuos con diagnóstico de lepra en el periodo comprendido entre el 2020 hasta el 2021 en el SIVIGILA.

Para dar cumplimiento al objetivo 3, se realizó cálculo del tamaño de la muestra para tener un poder del 80%; α 0,05, error tipo II 0,2, para detectar odds ratio [OR] >1,8; Para este cálculo se usó la frecuencia del SNP rs7194886 reportada para otras poblaciones en la base de datos dbSNP y Haploreg. Adicionalmente se hizo una relación 1:4 (casos: controles). El cálculo de tamaño de muestra se determinó mediante la fórmula del arcoseno la cual arrojo 114 individuos con lepra y 456 controles.

Para la elección de los casos se revisaron los registros del programa de lepra en Norte de Santander, en ellos se incluyeron pacientes curados, no curados, en tratamiento o en cualquier fase de la enfermedad, mayores de 18 años. Se incluyeron sujetos diagnosticados menores de

edad, en este caso se firmó el asentimiento informado por el acudiente o adulto a cargo del menor. El consentimiento informado aplicado a mayores de edad fue diferente al aplicado a menores de edad. Se incluyeron en el estudio pacientes con datos completos y verificables con la condición de vivos. Los sujetos que no quisieron participar en el estudio no fueron incluidos.

Para la inclusión de los sujetos control, se invitó a participar a personas mayores de edad (18 años) naturales y de procedencia del Norte de Santander, de la misma región o municipio del caso, en relación 1caso: 4controles. Sujetos que no padecían la enfermedad y no tenían nexo con algún caso de lepra, que no tenían asociación, o sospecha o diagnóstico de enfermedades autoinmunes. Se excluyeron los individuos que presentaron antecedentes familiares de lepra en primer y segundo grado de consanguinidad o que fueran convivientes con un caso. Posterior a la explicación del estudio y verificación de la compresión de este, se aplicó el a consentimiento informado.

Definición de caso: individuo con diagnóstico de lepra que se encontraba registrado en la base de datos del programa de Norte de Santander, siendo pacientes curados, no curados, en tratamiento o en cualquier fase de la enfermedad.

Criterios de inclusión usados para la variable de caso:

1. Persona mayor de 18 años.
2. Natural o procedente del departamento de Norte de Santander.
3. Libre acceso en la participación del proyecto mediante la firma de un consentimiento informado para casos.
4. Datos completos y verificables en la base de datos del programa.
5. Condición vivo.

Criterios de Exclusión:

1. Pacientes que no otorgaron su consentimiento para la participación en el proyecto.

Definición de Control: individuo que no padece la enfermedad, que vivan cerca de los individuos denominados caso, se usó 4 controles por 1 caso.

Criterios de inclusión usados para la variable de control:

1. Personas sanas sin diagnóstico de la enfermedad.
2. Mayores de 18 años.
3. Libre acceso en la participación del proyecto mediante la firma de un consentimiento informado para controles.
4. Personas sin ninguna inmunodeficiencia diagnosticada.

Criterios de exclusión:

1. Personas que presentaron antecedentes familiares de lepra en primer y segundo grado de consanguinidad.
2. Personas que fueran convivientes con un caso.
3. Personas que no accedieron a participar en el proyecto mediante la firma del consentimiento informado.

Selección de Polimorfismo o variantes de nucleótidos sencillo

Para la elección de las variantes se tuvo en cuenta los estudios de asociación de genoma completo (GWAS), los estudios de familias y los estudios de casos y controles realizados en diferentes poblaciones a nivel mundial como china, (Zhang et al., 2009b) Vietnam, (Grant et al., 2012) Brasil, (Sales-Marques et al., 2014) India (Marcinek et al., 2013), Amazonia con límites en brasil (Leturiondo et al., 2020), se seleccionaron 4 polimorfismos (SNP) presentes en el gen *NOD2*, rs3135499, rs2111234, rs8057341 y rs 7194886 para la realización del genotipado en la

población de Norte de Santander. Para conocer la significancia funcional de cada SNP, se usó la base de datos *RegulomeDB* , la cual permite identificar de acuerdo a un puntaje si la variante está relacionada con la trascripción y expresión del gen. Los puntajes se encuentran clasificados entre 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 2a, 2b, 2c, 3a, 3b, 4, 5, 6 y 7, en donde el SNP que tenga un puntaje 1a es aquel que tiene mayor evidencia de ser funcional. Está base de datos se tiene en cuenta para la clasificación anterior: sitio de unión a factor de transcripción, apareamiento con motivo de factor de transcripción, sitio de digestión con DNAsa I y sitios de hipersensibilidad a DNAsa.

Obtención del Material de Análisis -Extracción del ADN

Toma de muestra

Una vez obtenido el consentimiento informado por parte del paciente, la información correspondiente a datos básicos y consulta de antecedentes se procedió a tomar mediante venopunción dos muestras de sangre total en tubos con anticoagulante con sal tripotásica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) presentes en tubos tapa lila, volumen aproximado de sangre extraída por tubo 5ml, cada tubo se rotuló con nombre e identificación de cada paciente acompañado del consecutivo asignado en el proyecto.

Separación de fases iniciales

Se realizó un proceso de separación de fases mediante centrifugación (10 minutos por 2500 rpm), posteriormente, se separó en viales el plasma y en el tubo inicial (lila) se mantuvo el componente celular.

Extracción del ADN

Para la obtención del ADN se utilizó el kit de extracción PureLink Genomic DNA Kits (Invitrogen ®), el cual permite una purificación rápida y eficiente del ADN genómico, al basarse en la unión selectiva del ADN a una membrana a base de sílice en presencia de sales caotrópicas.

Preparación del Lisado

1. se calentó el bloque térmico o baño de agua a 55°C.
2. Se adicionó 200 uL de muestra de sangre a un tubo de microcentrífuga.
3. Se agregó 20 uL de proteinasa K a la muestra anterior.
4. Posteriormente, se adicionó 20 uL de ARNasa a la mezcla anterior.
5. Se mezcló bien con breves agitaciones.
6. Se incubó por 2 minutos.
7. Se adicionó a la mezcla anterior 200 uL de tampón de unión/lisis del kit, se mezcló bien con la finalidad de obtener una mezcla homogénea.
8. Una vez mezclado todo se incubó por 10 minutos a 55 °C para promover la digestión de las proteínas.

Procedimiento de purificación mediante columnas de centrifugación.

1. A la preparación del proceso anterior se adicionó 200 uL de etanol al 96%-100% al lisado, se mezcló y agito en vórtex por 5 segundos para obtener una mezcla homogénea.
2. Se adiciono el lisado preparado a una columna de centrifugación PureLink ® la cual se acondiciono en un tubo de recolección del kit.
3. Se centrifugó la columna a 10.000 g por minuto a temperatura ambiente
4. Se desecho el tubo recolector inicial y se transfirió la columna de centrifugación a un nuevo tubo recolector.

5. Se procedió a realizar los lavados del ADN presente en la columna agregando 500 uL de tampón de lavado 1 preparado con etanol.
6. Se centrifugó a 10.000 g por minuto a temperatura ambiente por 1 minuto
7. Se descartó el tubo de recolección y se transfirió la columna a un nuevo tubo recolector.
8. Se adicionó 500 µl de tampón de lavado 2 preparado con etanol a la columna
9. Se centrifugó la columna con el tubo recolector a máxima velocidad durante 3 minutos a temperatura ambiente
10. Se desechó el tubo de recolección y se colocó la columna en tubo microcentrífuga estéril de 1.5 mL
11. Se agregó entre 25-200 µL de buffer de elución a la columna y se incubo por 1 minuto.
12. Una vez incubado se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto a temperatura ambiente
13. Este ultimó tubo contiene el ADN genómico purificado. Se desechó la columna y se guardó a -20°C el ADN para el proceso de amplificación.

Análisis del rendimiento y la calidad del ADN obtenido

Una vez obtenido el ADN purificado se estimó la calidad del mismo determinando la concentración y pureza basado en la capacidad de absorbancia a 260 nm y su relación a A260/280 > 1,80, lo que indica que el ADN está limpio de proteínas y sustancias que puedan interferir, la cuantificación se realizó usando un espectrofotómetro NanoDrop™ ND-1000 (ThermoFisher®, USA).

Genotipificación

Para la identificación de los SNPs en las muestras se usó ensayos de genotipificación con sondas TaqMan^{TM} prediseñadas y validadas obtenidas de Life Technologies (Invitrogen®). Para

cada variante se usó: rs3135499: ensayo ID c_31758802_10, rs2111234:ensayo ID c_15820716_1, rs8057341: ensayo ID c_3017466_10, y rs7194886: C_3017470_10. Se usó el equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System. La discriminación alélica se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante para cada sonda.

Para realizar la detección de los SNP: rs3135499, rs2111234, rs8057341 y rs 7194886 se utilizó el kit de Applied Biosystems™ TaqMan ® SNP Genotyping Assays el cual contiene:

1. La secuencia específica de los primers *forward* y *reverse* necesarios para la amplificación de cada uno de los polimorfismos estudiados.
2. Dos sondas TaqMan marcadas con flúoroforo que se unen al sitio blanco en el ADN : una sonda marcada con VIC para detectar a secuencia del alelo 1 y otra sonda marcada con FAM para detectar la secuencia del alelo 2.

Preparación del Ensayo, muestras de DNA y Master Mix.

1. Se realizó dilución de los ensayos prediseñados que estaban a una concentración de 20X.

2. Antes de realizar la PCR se hizo suspensión del ensayo mediante agitación y centrifugación.

3. El ADN se descongeló, se agitó verticalmente y una hora después de atemperar a temperatura ambiente (18-20°C) se homogenizo mediante mezcla con vórtex, luego se realizó la verificación de la cantidad mediante cuantificación con nanodrop y la calidad mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

4. Se realizó mezcla de la Máster Mix con la finalidad de homogenizar sus componentes.

Preparación de la mezcla de reacción:

1. Se realizó los cálculos del número de reacciones a correr por cada ensayo, incluyendo los controles (positivo y negativo).
2. Se realizó la disposición de los componentes manteniendo las proporciones de acuerdo con el número de reacciones requeridas, teniendo un 10% más por perdidas de volumen. (Tabla No. 3)
3. Se aplico vórtex a la mezcla y se adiciono a cada pozo el volumen de mezcla necesario para la reacción.
4. Y se realizó el proceso de centrifugación para mezclar la reacción y eliminar las posibles burbujas que se hubiesen formado.
5. Los DNA se diluyeron a una concentración de 2.5ng/uL.
6. De acuerdo con las disposiciones establecidas se adicionó a cada pozo la muestra de DNA correspondiente y los controles respectivos.
7. Se realizó el sellado con la película adhesiva y se centrifugó para llevar los reactivos y el ADN al fondo del pozo y eliminar las burbujas de aire.

Tabla 3. Preparación de Master Mix

Componente	**96 pozos (10 uL por reacción)**
Master Mix 2x TaqMan	5 µL
Ensayo de trabajo o Primer	0.5 µL
Agua libre de Nucleasas	4.5 µL
Volumen de Mezcla	10 µL

Programación del Equipo de detección de BIORAD Byosistem

1. Programación del instrumento (tabla No. 4)
2. Se incluyó en el sistema de detección el volumen final de la reacción.
3. Se guardó el protocolo
4. Y se colocó a correr cada una de las reacciones realizando la detección de los polimorfismos (rs3135499, rs2111234, rs8057341 y rs 7194886)
5. Una vez terminaba el equipo se interpretaron cada una de las gráficas verificando la presencia de la amplificación de interés evaluando si eran alelos homólogos o alelos heterólogos.

Tabla 4. **Programación del ciclado de qPCR para la detección de los polimorfismos (rs3135499, rs2111234, rs8057341 y rs 7194886)**

Paso	**Ciclado**		
	Temperatura	**Tiempo**	**Ciclo**
Activación de la polimerasa	95°C	10 minutos	único
Desnaturalización	95°C	15 segundos	40
Extensión	60°C	1 minuto	

Amplificación por PCR

Con el objetivo de verificar si la discriminación alélica realizada con las sondas era correcta, se amplificó mediante PCR un segmento de DNA que contenía el SNP evaluado en 5 muestras elegidas de forma aleatoria y posteriormente se realizó secuenciación por método Sanger. Los primers fueron diseñados usando la herramienta primer 3 (https://primer3.ut.ee/) usando las secuencias del gen *NOD2* anotadas en Ensemble (ENST00000647318.2

ENSG00000167207). Los primers fueron evaluados con la herramienta de PCR *in silico* de UCSC Genome Browser (https://genome.ucsc.edu/) para identificar el tamaño y verificar si los primers amplificaba solo el segmento elegido en cada SNP. Las secuencias de los primer usados en la PCR y el tamaño del fragmento amplificado están descritos en la Tabla 5

Tabla 5. **Secuencia de primers usados en estudio para ampliación de segmentos para análisis de cada SNP por metodología Sanger**

SNP	**Forward (5´- 3´) DNA**	**Rever (5´- 3´) DNA**	**Tamaño (pb)**
NOD2 (rs7194886)	5´CCAGAGGCCAAACAGCAATT-3´	CATCTTCTC TCAGCCCCACT	346bp
NOD2 (rs2111234)	5´GTCGAGAACATGCTGGACCTG 3´	TTGAGCGCAGGAATTCAAGG	371bp
NOD2 (rs8057341)	5´AGGGACTTGGTCTGGCTTTT3´	AGATGGCCACCAGTTCAAACA	447pb
NOD2 (rs3135499)	5´GGCAGCCTCTTCAAAATGAG 3´	GCAGGCTAAGGTGTAGCCCTTC	558pb

El volumen final fue de 20 µl. Cada muestra contenía 10 µl de OneTaq® 2X Master Mix (NEW ENGLAND BioLabs Inc), 0,4 µl de cada primer (10 µM) y 2 µl de DNA (2,5 ng/ µl) y 7,2 µl de agua grado biología molecular. Las condiciones de amplificación fueron: denaturación inicial de 95°C/3m y 40 ciclos: denaturación a 95°C/10s, annealing a 60°C/30 s y extensión 72°C/30s y extensión final a 72°C/2 m. Posteriormente, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% y los productos de PCR fueron purificados usando el kit de extracción en gel Monarch® de New England BioLabs Inc y usados para secuenciación.

Secuenciación de DNA

Para la reacción de secuencia se usó el kit Big Dye Terminator v.3.1 cycle sequencing (4336917) Applied Byositems, Austin, TX, USA. Se secuencio el segmento forward y reverse mediante mediante uso del equipo GA3500 Applied Biosystems®. Las secuencias fueron analizadas usando BioEdit v7.2 de uso libre (Tom Hall; Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA) y verificados en la base de datos UCSC Genome Browser

Análisis estadístico Hardy-Weinberg.

Los análisis estadísticos fueron realizados usando la herramienta SNPStats® (disponible en https://www.snpstats.net/start.htm). Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron estimadas por el método de conteo directo. El equilibrio de Hardy Weinberg (H-W) fue realizado usando la prueba de X^2 para evaluar el sesgo de distribución de los genotipos y el intervalo de confianza (IC) del 95% para cada grupo (casos frente a controles). El OR fue calculado usando 5 modelos de herencia (dominante, codominante, recesivo, sobredominante y aditivo) usando al programa SNPStats®. Las covariables ajustadas fueron edad y sexo. Los valores *p* y la significancia estadística fue definida como $p>0,05$.

RESULTADOS

Características demográficas en pacientes con lepra e individuos sanos del departamento de Norte de Santander.

Se estudio una cohorte de 570 personas procedentes del departamento de Norte de Santander de las cuales 114 (20%) correspondían a pacientes que desarrollaron lepra y 456 (80%) a personas naturales sin contacto previo o relación con pacientes o enfermos de lepra. Las edades de los participantes incluían desde los 13 años hasta los 89 años aclarando que solo se vincularon menores en la categoría de casos, manejando una media en edad de 41 años en general, y de 57 años para los casos y de 37 años para los controles; asimismo 283 (50%) mujeres y 287 (50%) hombres. En la tabla No.6 se relacionan las variables categóricas de sexo y edad con sus respectivos valores.

Tabla 6. **Características de los casos de lepra y controles**

	TOTAL	**Rango de edad**	**Media de Edad**	**Sexo**	
				Femenino	**Masculino**
Todos los sujetos	570	13-86	40,99	283 (50%)	287 (50%)
Casos	114 (20%)	13-86	57,05	56 (49%)	58 (51%)
Controles	456 (80%)	18-86	36,97	227 (50%)	229 (50%)

Se muestra el rango y promedio de edad de acuerdo a sexo en casos y controles.

Características clínicas de pacientes con lepra del departamento de Norte de Santander.

La lepra es una enfermedad con múltiples presentaciones clínicas y ellas dependen del sistema inmune y de su entorno, dentro de los 114 casos observados se evidenció que en la población de Norte de Santander existe un mayor predominio frente a la presentación de manifestaciones

clínicas asociadas a lepra multibacilar encontrándose un 88,60% para este tipo de lepra (101 casos) y 11.40% con lepra paucibacilar (13 casos).

Asociación entre las variantes de nucleótido sencillo rs3135499, rs2111234, rs8057341 y rs7194886 en el gen NOD2 y el desarrollo de lepra en individuos del departamento de Norte de Santander.

- **Frecuencias alélicas de las variantes rs3135499, rs2111234, rs8057341 y rs7194886 en el gen *NOD2*.**

Los SNP analizados se muestran en la tabla No. 07. Se describen las distribuciones de frecuencias alélicas de cada uno de los SNP. El SNP rs7194886 no se encontró en equilibrio de H-W (p=0.00012**)

Tabla 7. **Descripción de rs3135499, rs2111234, rs8057341 y rs7194886 del gen NOD2 analizados.**

SNP ID	**Posición(GRCh38)**	**Ubicación**	**Alelos A/B**	**FAM**		**H-W**	**OR (95% CI)**	***p-valor***
				Casos	**Controles**	***p-valor***		
rs3135499	16:50732216	3'-UTR	A/C	0.36	0.37	0.069	1.06 (0.7873-1.4363)	*0,6866*
rs2111234	16:50700122	intronico	G/A	0.38	0.34	0.2	0.77 (0.5762-1.0446)	*0,094*
rs8057341	16:50704069	Intronico	A/G	0.34	0.45	0.93	0.63 (0.4681-0.8583)	***0.0032****
rs7194886	16:50691282	2.3kb 5' de NOD2	C/T	0.22	0.24	0.00012**		

SNP, polimorfismo de un solo nucleótido; FAM, frecuencia de alelos menores; H-W, Equilibrio de Hardy Weimberg; OR, Odds ratio, IC, Intervalo de confianza
**SNP con H-W, p<0,05, se excluyen del análisis
* Los valores de *p* se calcularon utilizando la prueba de Chi-cuadrado

- **Frecuencias genotípicas de las variantes rs3135499, rs2111234, rs8057341 y rs7194886 en el gen *NOD2*.**

La tabla 8 se muestran las frecuencias de los genotipos evaluados en la población estudiada. Las frecuencias genotípicas de los SNP rs3135499 (*p*=0,55 y *p*=0,085), rs2111234 (*p*= 0,84 y *p*=0, 13), rs8057341 (*p*=0,53 y p=0,57) en casos y controles respectivamente. Se encontró que hay diferencia significativa en la frecuencia de los genotipos del rs8057341 entre casos y controles (p=**0.006286**)**

Tabla 8 **Frecuencias genotípicas de los SNP rs3135499, rs2111234, rs8057341 y rs 7194886 en casos y controles (n=570).**

.

SNP	Alelo/genotipo	Total n=570	Controles n= 456 n (frecuencias)	Casos n= 114 n (frecuencias	X2	*p-valor*
rs3135499	A/A	222 (0.39)	179 (0.39)	43 (0.38)	0,190	0,9063
	A/C	284 (0.5)	227 (0.5)	57 (0.5)		
	C/C	64 (0.11)	50 (0.11)	14 (0.12)		
rs8057341	A/A	104 (0.18)	89 (0.2)	15 (0.13)	10.138	**0.006286****
	G/A	281 (0.49)	233 (0.51)	48 (0.42)		
	G/G	185 (0.32)	134 (0.29)	51 (0.45)		
rs 7194886	C/C	315 (0.55)	240 (0.55)	66 (0.58)	1.068	0.586
	C/T	239 (0.42)	193 (0.42	46 (0.4)		
	T/T	16 (0.03)	14 (0.03)	2 (0.02)		
rs2111234	A/A	177 (0.31)	133 (0.29)	44 (0.39)	3.805	0.1492
	A/G	295 (0.52)	242 (0.53)	53 (0.46)		
	G/G	98 (0.17)	81 (0.18)	17 (0.15)		
*p-valor <0.05 *Estadísticamente significativo*						

Asociación entre SNP y susceptibilidad a lepra

Los SNP fueron evaluados para los modelos codominante, dominante, recesivo, Sobredominante y aditivo. Los análisis mostraron que el SNP rs8057341 es un factor de protector para desarrollar lepra en el modelo codominante en el genotipo A/A OR=0.45; 95%IC=0.22-0.91, *p*=0,044, con el modelo dominante para los genotipos A/G-A/A OR=0.57; 95%IC=0.36-0.92, *p*=0,021 y con el modelo aditivo OR=0.66; 95%IC=0.47-0.92, *p*=0,013 en datos ajustados por edad y sexo. Los SNP rs2111234 y rs3135499 no mostraron estar asociados al desarrollo de lepra post-infección en ninguno de los modelos analizados como es mostrado en la tabla 9.

Tabla 9 . Asociación entre los polimorfismos (SNPS) y la susceptibilidad a lepra en los diferentes modelos de herencia ID_ SNP

	Modelo	**Genotipo**	**Frecuencias**		**Sin ajuste**		**Con ajuste**	
			Casos	**Controles**	**OR (95%CI)**	**p-valor***	**OR (95%CI)**	**p.-valor****
rs8057341	Codominante	G/G	51 (44.7%)	134 (29.4%)	1	**0.0073 *****	1	**0,044*** **
		A/G	48 (42.1%)	233 (51.1%)	**0.54 (0.35-0.85)**		0.62 (0.38-1.03)	
		A/A	15 (13.2%)	89 (19.5%)	**0.44 (0.23-0.84)**		**0.45 (0.22-0.91))**	
	Dominante	G/G	51 (44.7%)	134 (29.4%)	1	**0.0021 *****	1	**0,021*** **
		A/G-A/A	63 (55.3%)	322 (70.6%)	**0.51 (0.34-0.78)**		**0.57 (0.36-0.92)**	
	Recesivo	G/G-A/G	99 (86.8%)	367 (80.5%)	1	0.1	1	0,095
		A/A	15 (13.2%)	89 (19.5%)	0.62 (0.35-1.13)		0.58 (0.30-1.12)	
	Sobredominante	G/G-A/A	66 (57.9%)	223 (48.9%)	1	0.085	1	0,32
		A/G	48 (42.1%)	233 (51.1%)	0.70 (0.46-1.05)		0.79 (0.50-1.25)	
	Log-aditivo	---			**0.63 (0.46-0.86)**	**0.0027 *****	**0.66 (0.47-0.92)**	**0,013**
rs3135499	Codominante	A/A	43 (37.7%)	179 (39.2%)	1	0.91	1	0,94
		A/C	57 (50%)	227 (49.8%)	1.05 (0.67-1.63)		0.95 (0.58-1.56)	
		C/C	14 (12.3%)	50 (11%)	1.17 (0.59-2.30)		1.07 (0.51-2.27)	
	Dominante	A/A	43 (37.7%)	179 (39.2%)	1	0.76	1	0,91

		A/C-C/C	71 (62.3%)	277 (60.8%)	1.07 (0.70-1.63)		0.97 (0.61-1.56)	
	Recesivo	A/A-A/C	100 (87.7%)	406 (89%)	1	0.69	1	0,78
		C/C	14 (12.3%)	50 (11%)	1.14 (0.60-2.14)		1.11 (0.55-2.21)	
	Sobredominante	A/A-C/C	57 (50%)	229 (50.2%)	1	0.97	1	0,77
		A/C	57 (50%)	227 (49.8%)	1.01 (0.67-1.52)		0.93 (0.59-1.48)	
	Log-aditivo	---	---	---	1.07 (0.78-1.46)	0.68	1.01 (0.71-1.43)	0,95
rs2111234	Codominante	A/A	44 (38.6%)	133 (29.2%)	1	0.16	1	0,27
		A/G	53 (46.5%)	242 (53.1%)	0.66 (0.42-1.04)		0.75 (0.45-1.24)	
		G/G	17 (14.9%)	81 (17.8%)	0.63 (0.34-1.18)		0.58 (0.29-1.17)	
	Dominante	A/A	44 (38.6%)	133 (29.2%)	1	0.055	1	0,15
		A/G-G/G	70 (61.4%)	323 (70.8%)	0.66 (0.43-1.00)		0.70 (0.44-1.13)	
	Recesivo	A/A-A/G	97 (85.1%)	375 (82.2%)	1	0.46	1	0,24
		G/G	17 (14.9%)	81 (17.8%)	0.81 (0.46-1.43)		0.69 (0.36-1.30)	
	Sobredominante	A/A-G/G	61 (53.5%)	214 (46.9%)	1	0.21	1	0,64
		A/G	53 (46.5%)	242 (53.1%)	0.77 (0.51-1.16)		0.89 (0.57-1.42)	
	Log-aditivo	---	---	---	0.76 (0.56-1.04)	0.083	0.76 (0.54-1.06)	0,1

SNP, polimorfismo de un solo nucleótido; OR, razón de probabilidades; IC del 95%, intervalo de confianza del 95%.
* Los valores se calculan sin fechas de ajuste.
**Valores calculados con ajuste por edad y sexo
*** valor de p < 0,05, estadísticamente significativo

Asociación entre haplotipos y susceptibilidad a lepra

El análisis de haplotipos mostró que los SNP rs2111234 y rs3135499 presentan un bajo LD (desequilibrio de ligamiento) con un valor de D´=0,68 (r^2=0,20) mientras que los SNP rs2111234 y rs8057341 presentan un moderado LD con un valor D´= 0,89 (r^2=0,79). (Figura 1) Se encontró que el haplotipo GAG (rs2111234, rs3135499, rs8057341) con frecuencia de 2,01%, representa un factor de riesgo para el desarrollo de lepra OR 3.17 ; $IC_{95\%}$=1.26 - 7.94; *p=0,014* en

datos ajustados por edad y sexo tanto en datos sin ajustar (OR=3.61; $IC_{95\%}$=1.54 - 8.46, *p=0,0034*) (Tabla 10). De igual manera al realizar el análisis por subgrupos se evidenció que el mismo haplotipo en mujeres representa un factor de riesgo (OR=6,14, $IC_{95\%}$ =1,59-23,7 *p*=0,0091) (Tabla 11), sin embargo, en hombres no se encontró esta asociación.

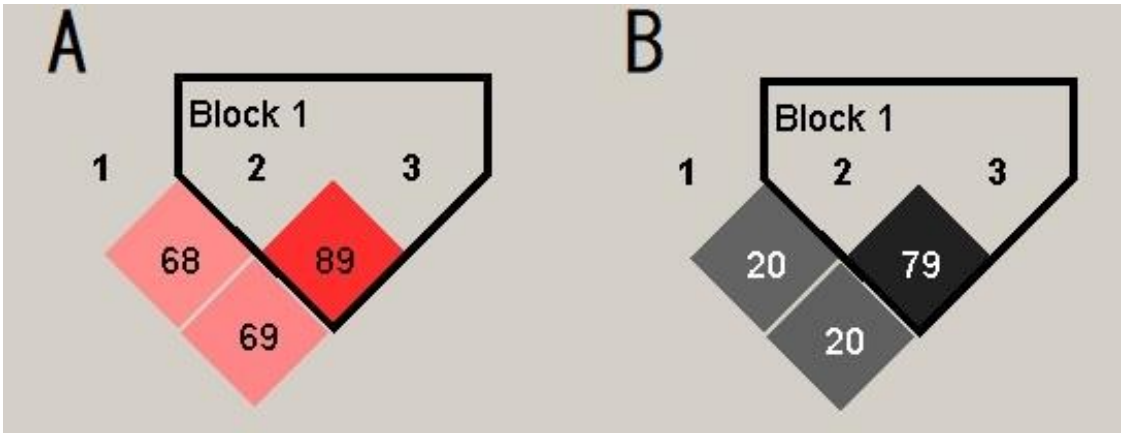

FIGURA 1 . **BLOQUE DE HAPLOTIPO FORMADO POR LOS SNP ANALIZADOS EN EL GEN NOD2**

NOTA. *A.* **LOS SNP RS2111234 Y RS8057341 FORMAN UN BLOQUE CON UN LD MODERADO (D´=89, R^2=0,79) B. MUESTRA EL MISMO BLOQUE CON LOS VALORES R2, ENTRE EL SNP RS2111234 Y RS8057341 PRESENTAN UN R2=0,79.**

Tabla 10. **Frecuencias de haplotipos asociado con rs2111234, rs3135499, rs3135499, rs8057341.**

SNPs y susceptibilidad a lepra (n=570, ajustado por edad y sexo)

SNP/Haplotipo	rs2111234	rs3135499	rs8057341	Frecuencia	Sin ajuste		Con ajuste	
					OR (95%CI)	*p-valor**	OR (95%CI)	*p.-valor***
1	G	A	A	0.3618	1	---	1	---
2	A	C	G	0.3088	1.40 (0.94 - 2.07)	0.098	1.35 (0.88 - 2.08)	*0.17*

3	A	A	G	0.2352	1.47 (0.98 - 2.19)	0,062	1.31 (0.84 - 2.05)	*0.24*
4	G	C	A	0.0419	0.49 (0.14 - 1.73)	0.27	0.34 (0.09 - 1.25)	*0.11*
5	A	A	A	0.0215	1.63 (0.67 - 3.98)	0.028	2.34 (0.88 - 6.23)	*0.089*
6	G	A	G	0.0201	**3.30 (1.42 - 7.68)*** **	**0.005 9**	**3.17 (1.26 - 7.94)*** **	***0.014***
Asociación global de haplotipos					***p-valor: 0.0061***		***p-valor: 0.0089***	

SNP, polimorfismo de un solo nucleótido; OR, razón de probabilidades; IC del 95%, intervalo de confianza del 95%.
* Los valores se calculan sin fechas de ajuste.
** Valores calculados con ajuste por edad y sexo
*** valor de p < 0,05, estadísticamente significativo

Tabla 11. **Asociación de haplotipos de los SNPs rs2111234, rs3135499, rs8057341 y la susceptibilidad a lepra en mujeres (n=283, ajustado por edad).**

SNP/Haplotipo	**rs2111234**	**rs3135499**	**rs8057341**	**Frecuencia**	**Sin ajuste**		**Con ajuste**	
					OR (95%CI)	***p-valor****	**OR (95%CI)**	***p.-valor****
1	G	A	A	0.3634	1	---	1	---
2	A	C	G	0.3099	1.53 (0.85 - 2.77)	0.16	1.48 (0.80 - 2.76)	0.21
3	A	A	G	0.2298	1.65 (0.91 - 3.00)	0.1	1.50 (0.79 - 2.85)	0.21
4	G	C	A	0.0367	1.01 (0.22 - 4.67)	0.99	0.73 (0.15 - 3.63)	0.7
5	A	A	A	0.0292	2.32 (0.86 - 6.26)	0.097	2.69 (0.93 - 7.75)	0.068
6	G	A	G	0.0225	**6.75 (1.95 - 23.35)**	**0.0028 *****	**6.14 (1.59 - 23.79)**	***0.0091 *****
Asociación global de haplotipos					**p-valor: 0.015**		**p-valor: 0.041**	

DISCUSION

La enfermedad de Hansen se ha convertido en una enfermedad de tiempos y se ha caracterizado por presentarse en todos los individuos sin distinción de clase social, y sin predominio hacia algún rango de en edades según lo descrito por el boletín epidemiológico de la semana 52 del año 2021 de Colombia presente en el sistema de salud pública (SIVIGILA) es de resaltar dentro de las características sociodemográficas que el 3,03% de los casos se presentaron en menores de 15 años, y el 63,97% se encontró en población de 40 a 79 años, y el 60,94% fueron hombres. En este estudio se destaca que la presencia de 2 casos correspondiente a menores de edad que presentaban la enfermedad con edades de 16 y 17 años. Así mismo se evidenció que el sexo masculino y femenino en este estudio no presenta diferencias significativas en cuanto a la presentación de la enfermedad, de los casos se resalta que la población que sigue viéndose afectada por esta enfermedad está en edades alrededor de los 57 años, pero es evidente que la transmisión y la presentación de la enfermedad puede ser a cualquier edad. Esto indica que la expresión de la enfermedad no está relacionada de manera directa con la edad, sino que puede estar relacionada con el tiempo en el cual se realizó la exposición a la micobacteria, el sistema inmunológico del paciente, las condiciones genéticas, y los factores ambientales en los cuales se desarrolla el individuo.

La enfermedad de Hansen se ha caracterizado por ser una enfermedad con diferentes presentaciones clínicas e histopatológicas las cuales dependen del tipo de respuesta inmunológica que se desarrolle frente a ciertos componentes que expresa la micobacteria en especial el muramildipéptido, lo que está relacionado con la presentación de la lepra: lepra lepromatosa y lepra tuberculoide y otras aún sin definición inmunológica como las bordeline (Bordeline-lepromatosa, Bordeline-Bordeline, Bordeline-tuberculoide). De acuerdo con la información

suministrada por los pacientes, se infiere desde el punto de vista inmunológico y clínico que los casos de Norte de Santander presentan una respuesta nula a moderada frente a *M. leprae*, dado que se encontró mayor prevalencia la forma lepromatosa. La forma tuberculoide se se caracteriza por presentar placas únicas o escasas, con pérdida de sensibilidad, anhidroticas, alopécicas, limitadas, eritematosas, hipocrómicas, algunos con máculas, pápulas o nódulos, las cuales se ubican principalmente en las extremidades, glúteos, cara y espalda, lesiones que se suelen estar acompañadas de escasos bacilos, así mismo los efectos de la inmunidad celular estarían presentes de manera moderada, entendiendo que los linfocitos T proliferarían en esta población una vez entran en contacto con la micobacteria. (Rada et al., 2009). Mientras que la lepra lepromatosa se caracteriza por una pobre respuesta inmunológica donde el paciente va a presentar afeccion de la piel, de los nervios, el hígado, el bazo, la nariz, lo ojos y otras ubicaciones anatómicas, son los pacientes más difíciles de controlar y se caracterizan por presentar engrosamiento de los nervios perifericos, multiples lesiones cutáneas, congestión nasal y epistaxis.

Los estudios de asociación de variantes de nucleótido sencillo han tenido gran importancia para entender la fisiopatología de las enfermedades y predecir la susceptibilidad a desarrollo de la misma. En este estudio se evaluó la presencia de SNP presentes en gen *NOD2* en un grupo de individuos con lepra y sujetos sanos del Norte de Santander, Colombia y se estableció estadísticamente su papel en la susceptibilidad para el desarrollo de lepra. Para ello un elemento clave cuando se estudian las asociaciones entre polimorfismos genéticos y enfermedades es el equilibrio de Hardy-Weinberg (HW), el cual me determina que no existe un sesgo en la segregación de los alelos en la población general ni en la población sana que pueda confundir el efecto del SNP en la enfermedad. Los estudios de casos y controles son ampliamente usados para validar la asociación de un SNP en una población especifica. Los controles representan la forma sana de la población en donde la población de be encontrarse en equilibrio para la segregación de

los alelos y de esta forma permitir la asociación o no del SNP con la enfermedad . En este estudio se encontró que el SNP rs7194886 no se encontraba en equilibrio lo que indica que en esa población los alelos de ese SNP lo que muestra un sesgo en la segregación. Dado que en el estudio se recolectaron muestras de pacientes y controles de diferentes municipios de Santander, y que los otros SNP (rs 3135499, rs2111234, rs8057341) se encontraban en equilibrio es difícil establecer o por lo menos especular la posible causa en el sesgo de segregación de este SNP. De acuerdo a la literatura, el acervo genético étnico puede afectar la expresión de la susceptibilidad a la lepra (Altshuler et al., 2008) presentando variabilidad en el papel que tienen los SNPs de acuerdo a la población en estudio. Mediante la ecuación de Hardy Weinberg se determinó que frecuencia debía observarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos y se encontró que la presencia de los genotipos de los SNP rs3135499, rs2111234 y rs8057341 se presentan en equilibrio tanto para sujetos control (*p =: 0,085; 0,13 y 0,57* respectivamente), lo que significa que lo observado en este estudio se está presentando de generación en generación mostrándose como una estructura poblacional estable en donde la trasmisión de los alelos de los progenitores a los descendientes es independiente y no se evidencian fenómenos que distorsionen este comportamiento y se presenta una combinación de alelos, es decir un genotipo, el cual depende de las frecuencias de cada alelo, pero al realizar el análisis del equilibrio de Hardy Weinberg para el SNP rs7194886 se observa que los individuos que participaron como casos estaban en equilibrio (*p=0,096*) pero al realizar el análisis en los controles se evidencia que están en desequilibrio (*p=0,00088),* lo cual puede deberse a factores externos que pueden estar influyendo en el genoma. Dentro de estos factores se puede especular que el desequilibrio es por la presencia de poblaciones genómicas endogámicas o con algún grado de consanguinidad, las migraciones de población venezolana al ser una zona fronteriza, las condiciones geológicas- ambientes, o que se esté dando una selección del alelo el cual puede

estar asociado con la longevidad. Sin embargo, dado que las otros SNP no se encuentran en desequilibrio, es posible que la región genómica donde se encuentra el SNP SNP rs7194886 que es a 2.3kb 5' del gen NOD2 sea una región en desequilibrio, pero no se ha reportado.

Dentro de los estudios publicados se encuentra el de Sales-Marques et al, quienes en Brasil extrapolaron un estudio de validación y replicación realizado en china(Zhang et al., 2009b) identificando dos polimorfismos en el gen *NOD2,* asociados con la resistencia del hospedero a la lepra. La asociación entre el gen *NOD2* y la susceptibilidad a la lepra documentada en china ha sido validada en nepalí y muestras de población vietnamita (Berrington et al., 2010; Zhang et al., 2009a) pero no en población india y africana. Dentro de los datos del estudio chino se encontró el alelo G estaba asociado con un mayor riesgo de lepra (Zhang et al., 2009a), mientras que el estudio con la población brasileña mostró que el alelo A del SNP rs8057341 está asociado con la resistencia del hospedero a la lepra en las muestras analizadas. Esto permite argumentar la importancia del gen *NOD2* en la susceptibilidad a la lepra reflejando diferencias biológicas asociadas con la población en estudio.(Sales-Marques et al., 2014)

La replicación del estudio de asociación entre *NOD2* rs8057341 en diferentes poblaciones de Brasil (Rondonópolis, Bauru y Río de Janeiro) (Sales-Marques et al., 2014) , permitió observar en todas las poblaciones de casos y controles, que el genotipo AA genera resistencia a la lepra (p=1,39× 10^6, OR = 0,49; $IC_{95\%}$= 0,36 –0,65), así mismo, el análisis de casos, controles y familias) encontró un valor OR protector (alelo A= 0.80, p=0.0001) confirmando que el alelo A del SNP rs8057341 del gen *NOD2* es un factor genético de resistencia a la lepra.(Sales-Marques et al., 2014). Estos datos concuerdan con lo encontrado en este estudio en donde la presencia del genotipo AA es un factor protector (OR=0.44; $IC_{95\%}$= 0.23-0.84, p= *0.0073*). En China (Mazini et al., 2016) se encontró que el SNP rs7194886 es una variante que conduce a la susceptibilidad con un riesgo dos veces mayor (OR 2.25; $IC_{95\%}$=1.58-3.21, $p= 4{,}43 \times 10^{-7}$) así mismo el SNP

rs3135499 en un estudio de familias en la población brasileña se mostró como factor protector para esta población (*p= 0.023*)(Sales-Marques et al., 2014) En el presente estudio se encontró alelo A del SNP rs8057341 es un factor protector (OR 0.63 , $IC_{95\%}$=0.4681-0.8583, *p=0.0032*), en la población de Norte de Santander . Cuando estos genotipos se analizaron con los modelos de herencia se encontró que este mismo SNP se asoció con la susceptibilidad a lepra, donde se evidencia que el alelo A es un factor de protección y que se conserva la protección cuando se en cuentra en forma homocigota u heterocigota en el modelo de herencia codominante con el genotipo AA y AG, , dominante con el genotipo AG o AA y en el modelo aditivo .

Los datos fueron ajustados de acuerdo a la edad debido a las diferencias en las frecuencias entre casos y controles y cuando se realizó el ajuste se mantuvo el factor de protección para el SNP rs8057341 para el modelo codominantes el genotipo A/A OR=0.45; $IC_{95\%}$=0,22-0.91, *p*=0,044 y en el modelo dominante el genotipo A/G-A/A OR=0.57; $IC_{95\%}$=0.36-0.92, *p*=0,021 y para el modelo aditivo con un OR=0.66; $IC_{95\%}$==0.47-0.92, *p*=0,013.

El análisis de un único polimorfismo no genera mayor información frente al desarrollo de la enfermedad, por lo cual se analizan varios los polimorfismos de manera simultánea en un gen, lo cual podría ser más útil para para identificar el papel que juega un gen con el desarrollo de la enfermedad, es por ello que es de interés identificar el conjunto de alelos que se transmiten desde los padres en cada cromosoma, denominando a este conjunto de alelos: haplotipo, (Iniesta et al., 2005) por lo anterior en esta investigación se realizó la construcción de los haplotipos de los polimorfismos estudiados y se encontró que el haplotipo GAG (rs2111234, rs3135499, rs8057341) se comporta como un factor de riesgo frente al desarrollo de la enfermedad (OR 3.17 ; $IC_{95\%}$=1.26 - 7.94; *p=0,014)*, en especial cuando se realiza un ajuste por sexo y edad donde se logra observar que es significativa esta protección en el sexo femenino.

Como se ha descrito los polimorfismos genéticos son los responsables de la gran variabilidad presente entre los individuos de una misma especie, siendo esta diversidad la responsable de evolución de las especies y de las características diferenciales entre individuos de una misma especie. (Torrades, 2002) Los polimorfismos se pueden presentar en regiones codificantes dentro del genoma (regiones involucradas en la información que codifica para la proteína) estos polimorfismos se denominan polimorfismos génicos, también pueden aparecer en regiones no codificantes siendo regiones que no codifican para ningún producto génico, pero pueden estar implicados en funciones reguladora o simplemente estructural denominándose polimorfismos genéticos. (Torrades, 2002).

CONCLUSIONES

La lepra continúa siendo una enfermedad con una incidencia significativa en Colombia presentando en los últimos años una variación en la cantidad de casos nuevos, pero aun así sigue manteniendo el comportamiento en cuanto a los departamentos que presentan la mayor cantidad de casos, en esos se encuentran incluidos Valle del Cauda, Norte de Santander, Cesar, Huila y Bogotá.

En la población de Norte de Santander se evidenció que los municipios de Cúcuta, Ocaña, Villa del rosario y Puerto Santander son los municipios donde se encuentran la mayoría de los pacientes con presentaciones clínicas de la enfermedad y se hace necesario el control de esta en el departamento.

Los análisis realizados muestran que en el grupo poblacional estudiado del Norte de Santander se presenta una concordancia frente al papel que juegan estos SNP rs8057341 en el desarrollo de lepra, pero los otros SNP analizados presentan un comportamiento diferente a lo reportado en otras poblaciones.

De igual manera en la población de Norte de Santander se muestra que el haplotipo GAG (rs2111234, rs3135499, rs8057341) es un factor de riesgo en esta población para el desarrollo de la enfermedad con un efecto más fuerte en el género femenino.

Debido a las pocas investigaciones realizadas en el país y en especial en el departamento, se considera indispensable seguir en el proceso de realizar más estudio en esta población, dada la alta incidencia que presenta el departamento la lepra y aún más importante las implicaciones que puede generar esta enfermedad en los pacientes.

RECOMENDACIONES

Se recomienda a la comunidad científica seguir evaluando la respuesta inmunológica frente a la enfermedad de Hansen, estudiando los comportamientos de otros SNPs no solo en el Gen *NOD2* sino en otros genes implicados en la defensa frente a *Mycobacterium leprae*, así mismo evaluar la secreción de citoquinas en estos pacientes y realizar una correlación con estos SNPs.

De igual forma se recomienda realizar estos estudios en otras regiones del país con la finalidad de reconocer el comportamiento de estos polimorfismos en el país, considerando que en estudios en otros países los comportamientos no fueron reproducibles y la expresión de cada uno de los SNPs es propia de cada región estudiada. De acuerdo a lo observado también se recomienda realizar estudios de familias y de genomas completos para lograr comprender un poco más el comportamiento de la micobacteria, la genética de los pacientes, el sistema inmunológico y el ambiente principalmente en esta zona geográfica. Por último, se recomienda mantener la vigilancia y la búsqueda activa de pacientes con la enfermedad de Hansen para intentar mitigar la extensión de la enfermedad y las secuelas a largo plazo de los pacientes.

BIBLIOGRAFIA

2020_Boletin_epidemiologico_semana_3.pdf. (s. f.). Recuperado 31 de mayo de 2022, de https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2020_Boletin_epidemiologico_semana_3.pdf

2022_Boletin_epidemiologico_semana_2.pdf. (s. f.). Recuperado 1 de junio de 2022, de https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2022_Boletin_epidemiologico_semana_2.pdf

Altshuler, D., Daly, M. J., & Lander, E. S. (2008). Genetic Mapping in Human Disease. *Science (New York, N.Y.)*, *322*(5903), 881-888. https://doi.org/10.1126/science.1156409

Barba Evia, J. R. (2021). Lepra. Enfermedad milenaria aún vigente. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, *68*(1), 18-33. https://doi.org/10.35366/101567

Berrington, W. R., Macdonald, M., Khadge, S., Sapkota, B. R., Janer, M., Hagge, D. A., Kaplan, G., & Hawn, T. R. (2010). Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *The Journal of infectious diseases*, *201*(9), 1422-1435. https://doi.org/10.1086/651559

Brain, O., Owens, B. M. J., Pichulik, T., Allan, P., Khatamzas, E., Leslie, A., Steevels, T., Sharma, S., Mayer, A., Catuneanu, A. M., Morton, V., Sun, M.-Y., Jewell, D., Coccia, M., Harrison, O., Maloy, K., Schönefeldt, S., Bornschein, S., Liston, A., & Simmons, A. (2013). The Intracellular Sensor NOD2 Induces MicroRNA-29 Expression in Human Dendritic Cells to Limit IL-23 Release. *Immunity*, *39*(3), 521-536. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.035

Caruso, R., Warner, N., Inohara, N., & Núñez, G. (2014). NOD1 and NOD2: Signaling, Host Defense, and Inflammatory Disease. *Immunity*, *41*(6), 898-908. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.010

Chakravartti, M. R. (1973). *A Twin Study on Leprosy*. Cambridge University Press. https://www.cambridge.org/core/journals/amg-acta-geneticae-medicae-et-gemellologiae-twin-research/article/a-twin-study-on-leprosy-by-mr-chakravartti-waltair-ap-india-and-f-vogel-

heidelberg-gfr-georg-thieme-verlag-stuttgart-1973-vol-1-in-the-series-topics-in-human-genetics-edited-by-pe-becker-w-lenz-f-vogel-gg-wendt-soft-cover-17-24-cm-ix-124-pp-111-illustrations-and-12-tables-price-dm-54-approximately-us-2200/C7E280F8212FA04317CF844CFDE2005B

Eichelmann, K., González González, S. E., Salas-Alanis, J. C., & Ocampo-Candiani, J. (2013). Lepra: Puesta al día. Definición, patogénesis, clasificación, diagnóstico y tratamiento. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, *104*(7), 554-563. https://doi.org/10.1016/j.ad.2012.03.003

Fischer, M. (2017). Leprosy – an overview of clinical features, diagnosis, and treatment. *JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, *15*(8), 801-827. https://doi.org/10.1111/ddg.13301

Franchi, L., Warner, N., Viani, K., & Nuñez, G. (2009). Function of Nod-like Receptors in Microbial Recognition and Host Defense. *Immunological reviews*, *227*(1), 106-128. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00734.x

Fritz, J. H., Bourhis, L. L., Sellge, G., Magalhaes, J. G., Fsihi, H., Kufer, T. A., Collins, C., Viala, J., Ferrero, R. L., Girardin, S. E., & Philpott, D. J. (2007). Nod1-Mediated Innate Immune Recognition of Peptidoglycan Contributes to the Onset of Adaptive Immunity. *Immunity*, *26*(4), 445-459. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.03.009

Global leprosy update, 2018: Moving towards a leprosy-free world. (2019, agosto 29). https://www.who.int/publications-detail-redirect/who-wer9435-36

Grant, A. V., Alter, A., Huong, N. T., Orlova, M., Van Thuc, N., Ba, N. N., Thai, V. H., Abel, L., Schurr, E., & Alcais, A. (2012). Crohn's Disease Susceptibility Genes are Associated With Leprosy in the Vietnamese Population. *The Journal of Infectious Diseases*, *206*(11), 1763-1767. https://doi.org/10.1093/infdis/jis588

Guevara, J. B., & Cruz, A. V. V. (2021). Reconocimiento clínico de la enfermedad de Hansen. *Revista Medica Sinergia*, *6*(6), e684-e684. https://doi.org/10.31434/rms.v6i6.684

Iniesta, R., Guinó, E., & Moreno, V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gaceta Sanitaria*, *19*, 333-341. https://doi.org/10.1590/S0213-91112005000400011

Lastória, J. C., & Abreu, M. A. M. M. de. (2014). Leprosy: Review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, *89*, 205-218. https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142450

Lepra- Organizacion mundial de la Salud. (2022, enero 11). https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leprosy

Lepra—OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. (s. f.). Recuperado 28 de abril de 2022, de https://www.paho.org/es/temas/lepra

Leturiondo, A. L., Noronha, A. B., Mendonça, C. Y. R., Ferreira, C. de O., Alvarado-Arnez, L. E., Manta, F. S. de N., Bezerra, O. C. de L., Carvalho, E. F. de, Moraes, M. O., Rodrigues, F. da C., & Talhari, C. (2020). Association of NOD2 and IFNG single nucleotide polymorphisms with leprosy in the Amazon ethnic admixed population. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *14*(5), e0008247. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008247

Magalhaes, J. G., Fritz, J. H., Le Bourhis, L., Sellge, G., Travassos, L. H., Selvanantham, T., Girardin, S. E., Gommerman, J. L., & Philpott, D. J. (2008). Nod2-dependent Th2 polarization of antigen-specific immunity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *181*(11), 7925-7935. https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.11.7925

Malhotra, D., Darvishi, K., Sood, S., Sharma, S., Grover, C., Relhan, V., Reddy, B. S. N., & Bamezai, R. N. K. (2005). IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Human Genetics*, *118*(2), 295-300. https://doi.org/10.1007/s00439-005-0042-8

Marcinek, P., Jha, A. N., Shinde, V., Sundaramoorthy, A., Rajkumar, R., Suryadevara, N. C., Neela, S. K., Tong, H. van, Balachander, V., Valluri, V. L., Thangaraj, K., & Velavan, T. P. (2013). LRRK2 and RIPK2 Variants in the NOD 2-Mediated Signaling Pathway Are Associated with Susceptibility to Mycobacterium leprae in Indian Populations. *PLOS ONE*, *8*(8), e73103. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073103

Maymone, M. B. C., Laughter, M., Venkatesh, S., Dacso, M. M., Rao, P. N., Stryjewska, B. M., Hugh, J., Dellavalle, R. P., & Dunnick, C. A. (2020). Leprosy: Clinical aspects and diagnostic techniques. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *83*(1), 1-14. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2019.12.080

Mazini, P. S., Alves, H. V., Reis, P. G., Lopes, A. P., Sell, A. M., Santos-Rosa, M., Visentainer, J. E. L., & Rodrigues-Santos, P. (2016). Gene Association with Leprosy: A Review of Published Data. *Frontiers in Immunology*, *6*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2015.00658

Moraes, M. O., Pacheco, A. G., Schonkeren, J. J. M., Vanderborght, P. R., Nery, J. a. C., Santos, A. R., Moraes, M. E., Moraes, J. R., Ottenhoff, T. H. M., Sampaio, E. P., Huizinga, T. W. J., & Sarno, E. N. (2004). Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes & Immunity*, *5*(7), 592-595. https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364122

Norte, entre los departamentos con el mayor número de reportes de lepra. (s. f.). Recuperado 1 de junio de 2022, de https://www.laopinion.com.co/region/norte-entre-los-departamentos-con-el-mayor-numero-de-reportes-de-lepra

Ozório Moraes, M., Batista silva, L. R., & Olmo Pinero, R. (2016, febrero 11). *Innate Immunity* [Text]. International Textbook of Leprosy. https://internationaltextbookofleprosy.org/chapter/innate-immunity

Park, J.-H., Kim, Y.-G., Shaw, M., Kanneganti, T.-D., Fujimoto, Y., Fukase, K., Inohara, N., & Núñez, G. (2007). Nod1/RICK and TLR Signaling Regulate Chemokine and Antimicrobial Innate Immune Responses in Mesothelial Cells. *The Journal of Immunology*, *179*(1), 514-521. https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.1.514

Peña, A. S. (2007). El significado de las mutaciones de CARD15 en la enfermedad de Crohn: La contribución española. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, *99*(10), 563-569.

Peña-Sanoja, M. J., & De Sanctis, J. B. (2013). Autofagia y respuesta inmunitaria. *Investigación Clínica*, *54*(3), 325-337.

Philpott, D. J., Sorbara, M. T., Robertson, S. J., Croitoru, K., & Girardin, S. E. (2014). NOD proteins: Regulators of inflammation in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, *14*(1), 9-23. https://doi.org/10.1038/nri3565

Ploemacher, T., Faber, W. R., Menke, H., Rutten, V., & Pieters, T. (2020). Reservoirs and transmission routes of leprosy; A systematic review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *14*(4), e0008276. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008276

Rada, E., Aranzazu, N., & Convit, J. (2009). Respuesta inmunitaria de la enfermedad de Hansen: Revisión. *Investigación Clínica*, *50*(4), 513-527.

Röltgen, K., Pluschke, G., Spencer, J. S., Brennan, P. J., & Avanzi, C. (2020). The immunology of other mycobacteria: M. ulcerans, M. leprae. *Seminars in Immunopathology*, *42*(3), 333-353. https://doi.org/10.1007/s00281-020-00790-4

Ruiz-Larrañaga, O., Garrido, J. M., Iriondo, M., Manzano, C., Molina, E., Koets, A. P., Rutten, V. P. M. G., Juste, R. A., & Estonba, A. (2010). Genetic association between bovine NOD2 polymorphisms and infection by Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis in Holstein-Friesian cattle. *Animal Genetics*, *41*(6), 652-655. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02055.x

Salcedo, D. M., & Romero Sierra, K. (2020). *¿La lepra, caridad y degredo o negociaciones de frontera?* *25*(11), 362-372.

Sales-Marques, C., Salomão, H., Fava, V. M., Alvarado-Arnez, L. E., Amaral, E. P., Cardoso, C. C., Dias-Batista, I. M. F., da Silva, W. L., Medeiros, P., da Cunha Lopes Virmond, M., Lana, F. C. F., Pacheco, A. G., Moraes, M. O., Mira, M. T., & Pereira Latini, A. C. (2014). NOD2 and CCDC122-LACC1 genes are associated with leprosy susceptibility in Brazilians. *Human Genetics*, *133*(12), 1525-1532. https://doi.org/10.1007/s00439-014-1502-9

Santos, A. R., Suffys, P. N., Vanderborght, P. R., Moraes, M. O., Vieira, L. M. M., Cabello, P. H., Bakker, A. M., Matos, H. J., Huizinga, T. W. J., Ottenhoff, T. H. M., Sampaio, E. P., & Sarno, E. N. (2002). Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *The Journal of Infectious Diseases*, *186*(11), 1687-1691. https://doi.org/10.1086/345366

Sarode, G., Sarode, S., Anand, R., Patil, S., Jafer, M., Baeshen, H., & Awan, K. H. (2020). Epidemiological aspects of leprosy. *Disease-a-Month*, *66*(7), 100899. https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2019.100899

Sunny, W., Sailesh, G., Dheeraj, M., Fredrik H., P., Yik Y., T., Chiea C., K., Anna, R., & Stephen J., C. (2010, julio 1). *Leprosy and the Adaptation of Human Toll-Like Receptor 1*. https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000979

Tada, H., Aiba, S., Shibata, K.-I., Ohteki, T., & Takada, H. (2005). Synergistic Effect of Nod1 and Nod2 Agonists with Toll-Like Receptor Agonists on Human Dendritic Cells To Generate Interleukin-12 and T Helper Type 1 Cells. *Infection and Immunity*, *73*(12), 7967-7976. https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.7967-7976.2005

Toledo Pinto, T. G., Batista-Silva, L. R., Medeiros, R. C. A., Lara, F. A., & Moraes, M. O. (2018). Type I Interferons, Autophagy and Host Metabolism in Leprosy. *Frontiers in Immunology*, *9*, 806. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00806

Torrades, S. (2002). Diversidad del genoma humano: Los polimorfismos. *Offarm*, *21*(5), 122-125.

Travassos, L. H., Carneiro, L. A. M., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.-G., Magalhães, J. G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., Boneca, I. G., Allaoui, A., Jones, N. L., Nuñez, G., Girardin, S. E., & Philpott, D. J. (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nature Immunology*, *11*(1), 55-62. https://doi.org/10.1038/ni.1823

Vannberg, F. O., Chapman, S. J., & Hill, A. V. S. (2011). Human genetic susceptibility to intracellular pathogens. *Immunological Reviews*, *240*(1), 105-116. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00996.x

Walker, S. L., Withington, S. G., & Lockwood, D. N. J. (2014). 41—Leprosy. En J. Farrar, P. J. Hotez, T. Junghanss, G. Kang, D. Lalloo, & N. J. White (Eds.), *Manson's Tropical Infectious Diseases (Twenty-third Edition)* (pp. 506-518.e1). W.B. Saunders. https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5101-2.00042-X

Wen, Y., You, Y. G., Yuan, L.-C., Yuan, Y. H., Zhang, Y., Duthie, M. S., & Li, H.-Y. (2014). Evaluation of Novel Tools to Facilitate the Detection and Characterization of Leprosy Patients in China. *BioMed Research International*, *2014*, e371828. https://doi.org/10.1155/2014/371828

Xiong, J.-H., Mao, C., Sha, X.-W., Jin, Z., Wang, H., Liu, Y.-Y., & Ning, Y. (2016). Association between genetic variants in *NOD2, C13orf31* , and *CCDC122* genes and leprosy among the Chinese Yi population. *International Journal of Dermatology*, *55*(1), 65-69. https://doi.org/10.1111/ijd.12981

Zhang, F.-R., Huang, W., Chen, S.-M., Sun, L.-D., Liu, H., Li, Y., Cui, Y., Yan, X.-X., Yang, H.-T., Rong, -De Yang, Chu, T.-S., Zhang, C., Zhang, L., Han, J.-W., Yu, G.-Q., Quan, C., Yu, Y.-X., Zhang, Z., Shi, B.-Q., … Liu, J.-J. (2009a). Genomewide Association Study of Leprosy. *New England Journal of Medicine*, *361*(27), 2609-2618. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0903753