

Titulo:

Los polimorfismos genéticos en IL-26 inhiben su inducción en respuesta a la traslocación de DNA bacteriano en pacientes con Enfermedad de Crohn

Lema:

Traslocación bacteriana en Enfermedad de Crohn

Introducción

La enfermedad inflamatoria intestinal crónica (EIIIC), que engloba principalmente, la enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU), es una enfermedad de causa desconocida, en cuya patogenia se han implicado diversos factores ambientales como el consumo de tabaco y los agentes infecciosos, factores genéticos y la alteración de la respuesta inmune. Entre las teorías patogénicas destacan la existencia de una infección intestinal permanente, defectos en la barrera mucosa defensiva frente a antígenos lumenales o una respuesta inmunitaria defectuosa a patógenos comensales.

Agentes microbiológicos implicados en la EIIIC

Son diversas las evidencias que apoyan la etiología infecciosa de la EIIIC: (i) las infecciones en la infancia constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de EC (1); (ii) la mejoría en la higiene doméstica se ha asociado a un aumento en la incidencia de EC (2); (iii) el beneficio obtenido en alcanzar la remisión clínica en pacientes con EC activa, sobre todo con afectación colónica mediante el uso de combinaciones de antibióticos, ciprofloxacino y metronidazol (3); (iv) la utilidad clínica del uso de probióticos en la CU y en la pouchitis (4); (v) la detección frecuente de anticuerpos frente a bacterias intestinales en el suero de pacientes con EIIIC (5); (vi) la detección de *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) en tejidos, sangre y leche materna de pacientes con EC, y en menor proporción con CU (6-8); (vii) la incidencia incrementada de *Escherichia coli* en la recurrencia postoperatoria de EC; (viii) el predominio de enterobacterias en la flora intestinal de pacientes con EC frente a sujetos sanos (9); (ix) el desarrollo de EIIIC en áreas de alta concentración bacteriana como el ileon terminal y el colon y la prevención de la inflamación intestinal tras la diversión del torrente fecal con recurrencia tras el restablecimiento del mismo (10); (x) la reactividad de los linfocitos de los pacientes con EIIIC frente a antígenos fecales; (xi) la presencia de un genotipo variante para el gen NOD2 (receptor del peptidoglicano bacteriano) en un tercio de los pacientes con EC (11) y su asociación con EC ileal, fibroestenósante y de inicio a edades tempranas (12); (xii) la presencia de *Helicobacter bilis* y *hepaticus* en colitis grave murina experimental (13).

Defectos en la barrera mucosa defensiva frente a antígenos lumbales

El epitelio intestinal es considerado como parte del sistema inmune innato jugando un papel activo en el mantenimiento de la homeostasis mucosa. Las células epiteliales forman una barrera altamente selectiva entre el organismo y el microambiente intraluminal. Estudios en animales de experimentación han puesto de manifiesto que la manipulación genética de la permeabilidad intestinal conduce a la inflamación (14). Asimismo en pacientes con EC existen defectos de la barrera epitelial tales como aumento de la permeabilidad (15,16), adherencia aumentada de las bacterias y expresión disminuida de las defensinas (péptidos producidos por los enterocitos para controlar los niveles de microorganismos comensales).

Una expresión de este hecho lo constituye la demostración de la existencia de niveles elevados de endotoxina en estos pacientes, y de la activación de la vía metabólica correspondiente (LBP-CD14-TLR4) (17). Cabe considerar por tanto que en estos pacientes puede haber un incremento de paso de endotoxina probablemente por vía transcelular.

Alteración de la respuesta inmunitaria

Existe evidencia científica que apoya que el daño tisular en la EIIC es consecuencia de una respuesta inflamatoria anómala debida a una disfunción de la respuesta inmune: (i) la activación de los linfocitos T CD4+ es antígeno dependiente y las lesiones intestinales en la EIIC están repletas de células T CD4+; (ii) los pacientes con EC que desarrollan SIDA o son sometidos a trasplante de médula ósea pueden entrar en remisión clínica y el tratamiento con fármacos que inhiben los linfocitos T son útiles en estos pacientes (18); (iii) la inflamación crónica es la consecuencia de la actividad excesiva de los linfocitos efectores y de las citoquinas proinflamatorias, pudiendo contribuir a la misma el déficit de los linfocitos reguladores y de citoquinas que controlan la inflamación, tales como la IL10 o el TGF β (19); (iv) las células T en la EC tienen disminuida su capacidad de sufrir apoptosis tras su activación, fenómeno asociado a un incremento en el cociente entre la proteína antiapoptótica Bcl-2 y la molécula pro-apoptótica Bax; (v) en el tejido inflamado de los pacientes con EC existe un aumento de la IL-15, citocina que incrementa la expresión de Bcl-2; (vi) el perfil de citocinas en la EC es prototípicamente Th1, IL12, Interferon-g y TNF α

(20) son frecuentes mediadores inflamatorios. El INF-g facilita la activación de macrófagos y la liberación de otras citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF-a, que a su vez mantienen y perpetúan la inflamación; (vii) entre los efectos biológicos del TNF-a destacan la activación de los macrófagos y liberación de otros mediadores inflamatorios como el óxido nítrico, prostaciclina y factor de activación plaquetar, la inducción de expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular, la alteración de la integridad de las membranas de las células epiteliales, la estimulación de síntesis de metaloproteasas que destruyen la estructura de la lamina propia y la estimulación de producción de factores de crecimiento epitelial por células del estroma que podría ser causa de la hiperplasia de criptas; (viii) en la CU existe una respuesta inmune mediada por anticuerpos, con una intensa producción intramucosa de IL-4, IL-5 e IL-10; (ix) las células plasmáticas de la mucosa colónica de pacientes con CU producen gran cantidad de inmunoglobulinas, sobre todo de Ig G1, capaz de activar el complemento y liberar mediadores proinflamatorios (PGE2, TBXA2), mecanismo que contribuye a la perpetuación de la inflamación; (x) los linfocitos T en la CU liberan gran cantidad de IL5, la cual facilita la respuesta de anticuerpos (20).

Todas estas evidencias han motivado el interés de nuestro grupo en el estudio de la traslocación bacteriana (presencia de fragmentos genómicos bacterianos en sangre) en la EIIC, especialmente en EC y las consecuencias de la misma. Así, nuestro grupo ha descrito que la presencia de fragmentos genómicos bacterianos (bactDNA) en sangre es un fenómeno frecuente en pacientes con EC, apareciendo hasta en un 40% de los casos (21,22). Esta presencia es sugestiva de un incremento en el paso de bacterias desde la luz intestinal a ganglios linfáticos y sangre, un fenómeno conocido como traslocación bacteriana. Al mismo tiempo, un genotipo mutado del gen NOD2 (mutNOD2), asociado al desarrollo de la enfermedad (23, 24) está igualmente presente en un subgrupo de pacientes. Tampoco se ha podido correlacionar hasta el momento la presencia de esta mutación con un peor índice de actividad clínica de la enfermedad (22).

La respuesta inmune innata implica un complejo sistema en el que diversos tipos celulares y moléculas inmunológicamente activas cooperan en una defensa efectiva. Los péptidos antimicrobianos, defensinas y catelicidina (LL37) constituyen una parte

importante de esta respuesta inmune. Las defensinas son pequeñas proteínas catiónicas ricas en cisteína con actividad antimicrobiana frente a bacterias, hongos y multitud de virus. Diversos estudios revelan la actividad moduladora de las defensinas, principalmente a nivel inflamatorio local. La EC colónica se ha asociado a una expresión incrementada de defensina beta2. Otros trabajos han relacionado una expresión reducida de péptidos antimicrobianos (a y b defensinas) a nivel local en las células de Paneth de pacientes con EC ileal y la existencia de mutaciones en el gen NOD2 (25-27), aunque hay datos contradictorios recientes (28). Nuestro grupo ha descrito la existencia de una reacción inflamatoria aumentada en los pacientes con el genotipo NOD2 salvaje (wtNOD2) en respuesta a bactDNA y por el contrario el desarrollo de una respuesta antimicrobiana deficiente en respuesta a este antígeno cuando el genotipo NOD2 estaba mutado (22).

Por otra parte, la terapia antiTNFa constituye uno de los grandes avances en la terapéutica de la EC de la última década. Estos fármacos interactúan con la respuesta tolerigénica en pacientes con EC modulando la inflamación. Sin embargo, los niveles de fármaco antiTNFa y el perfil genético podrían afectar esta interacción. Se ha descrito un incremento de los linfocitos T reguladores CD4+CD25-FoxP3+, en pacientes con EC en terapia antiTNFa, incluso una asociación significativa entre el porcentaje incrementado de células T reguladoras y la mejoría clínica de los pacientes. No obstante, no se conoce completamente el efecto directo del tratamiento antiTNFa sobre las células T reguladoras en EC. Por ello nuestro grupo diseñó un estudio con el fin de evaluar el porcentaje de células T reguladoras en sangre periférica de pacientes con EC distribuidos por genotipo NOD2 y uso de fármaco biológico y su papel en la regulación sistémica inflamatoria (29). Observamos que el porcentaje de células T reguladoras y los niveles de antiTNF fueron significativamente superiores en pacientes wtNOD2 independientemente de la intensificación de la terapia antiTNF. Además, en el sobrenadante de células cultivadas de pacientes wtNOD2 cantidades crecientes de infliximab aumentaban de manera significativa la expresión de células FoxP3+ no sucediendo así en los pacientes mutNOD2. Los niveles de IL-10 y TNF-a presentaban correlación con el porcentaje de población de cel T FoxP3+ y de los niveles séricos de antiTNF-a independientemente del genotipo NOD2. Por todo lo anterior concluimos que la pérdida de respuesta a antiTNF se asocia a un descenso del porcentaje de células T

reguladoras en pacientes con EC y un genotipo NOD2 variante.

En línea con el estudio previo planteamos la hipótesis de que la traslocación bacteriana en pacientes con EC puede estar influenciada por las mutaciones en los genes NOD2 y ATG16L1, afectando la eficacia de las terapias antiTNF. Para explorarla, nuestro grupo diseñó un estudio (30) incluyendo 179 pacientes con EC detectando presencia de DNA bact en un 44% de los pacientes con actividad clínica vs un 23% en pacientes en remisión ($p=0,01$). La presencia de variantes NOD2 o ATG16L1 se asoció a presencia de DNA bact, alcanzando una OR de 12,6 (95% IC 4.2 - 37.8; $p=0,001$) en pacientes portadores de la doble variante. Estudiamos, asimismo, en neutrófilos de sangre periférica las actividades fagocítica y bactericida y los niveles valle de antiTNF, observando que en pacientes con mutación NOD2 estaban disminuidos en respuesta al DNAbact. Por otra parte, la proporción de pacientes con terapia antiTNF intensificada fue significativamente superior en los pacientes con la variante NOD2. En conclusión, los resultados de este trabajo caracterizaban un subgrupo de pacientes con EC susceptible de requerir una terapia más agresiva para controlar la inflamación y el riesgo de recaída.

Finalmente nuestro grupo ha explorado la posibilidad de que la presencia de DNAbact en la sangre de los pacientes con EC tenga capacidad pronóstica en la recaída a corto plazo. Con este fin diseñamos un estudio prospectivo, multicéntrico en pacientes con EC en remisión, considerando como objetivo primario la recaída clínica a los 6 meses (31). Incluimos 288 pacientes, detectando DNA bact en un 34% de los casos. Identificamos la variante NOD2 en un 39,6% de los pacientes. Un 14% de los pacientes sufrió recaída a los 6 meses. El estudio multivariante identificó el DNAbact como factor de riesgo de brote. Un análisis de regresión logística mostró que el DNAbact es un factor independiente y significativo de hospitalización, necesidad de esteroides o cambio de tratamiento a los 6 meses. La combinación de existencia de la mutación NOD2 y DNAbact se asoció a niveles disminuidos de antiTNF-a y a un porcentaje superior de pacientes en terapia intensificada. En resumen, los resultados de este estudio apoyan que la traslocación de DNAbact es un factor de riesgo independiente de recaída a los 6 meses en pacientes con EC, así como de sufrir hospitalización, cambio de tratamiento y uso de esteroides.

Justificación del estudio.

Las citocinas, como mediadores de la respuesta inmunológica, son fundamentales en el inicio y la resolución de los procesos inflamatorios. El perfil de secreción de citocinas en la EIIC muestra diferencias entre la EC y la CU. Mientras que la respuesta en EC está polarizada hacia la vía Th1, con la secreción de IL-12 e IFN-gamma, la vía Th2 se encuentra favorecida en la CU, con un incremento de citocinas como IL-5 o IL-13 (32-35). No obstante, el uso de anticuerpos anti-IL12 y anti-IFNgamma han mostrado una eficacia parcial en pacientes con EC activa (36-38) sugiriendo la implicación de otras vías y otros mediadores en la respuesta inflamatoria establecida en la EC. En este sentido, la identificación de la vía Th17 (39-41) caracterizada por la secreción de citocinas como IL-17, IL-21 o IL22 e incrementada tanto en EC como CU, ha supuesto una caracterización mucho más precisa y compleja del conjunto de mediadores implicados en la EIIC. Por ejemplo, diferentes genes de esta ruta están implicados en una respuesta pro-inflamatoria, como es el caso del receptor de IL-17A (IL1-17AR) (42), mientras otros como IL-22 muestran protección frente a colitis en modelos experimentales (43).

La IL-26 es un miembro de la familia de citocinas IL-20 y forma parte de la vía Th17. Su expresión está incrementada en EIIC. Además, se han identificado variantes alélicas en la región génica de IL-26 asociadas a EIIC (44). A través del receptor heterodimérico IL-10R2-IL20R1, IL-26 inhibe la proliferación de células epiteliales intestinales e induce la expresión de citocinas como IL-10, TNF-alfa e IL-8 (45). Un estudio reciente ha demostrado que IL-26 tiene la capacidad de formar poros en las bacterias extracelulares y condensar el ADN bacteriano liberado, formando complejos con las células dendríticas a través del receptor tipo Toll (TLR)-9 y desencadenando una respuesta inflamatoria (46). En consecuencia, IL-26 puede suponer un marcador de traslocación bacteriana en la EC, y la presencia de sus variantes alélicas pueden afectar al aclaramiento del ADN bacteriano. Esto aumentaría el tiempo de exposición antigénica en estos pacientes y podría tener un impacto en la eficacia de la terapia anti-TNF.

Hipótesis y Objetivos

IL-26 modula la actividad proinflamatoria y bactericida en respuesta a la traslocación de ADN bacteriano. Los pacientes con mutaciones en IL-26 no aclaran el ADN bacteriano aumentando el tiempo de exposición antigénica y la respuesta inflamatoria.

Objetivos:

- Determinar la expresión de IL-26 y sus variantes alélicas en pacientes con EC en remisión distribuidos en función de la traslocación de ADN bacteriano en sangre.
- Evaluar la expresión de IL-26 como marcador sérico de traslocación bacteriana en pacientes con EC en remisión.
- Definir la incidencia de polimorfismos en la región génica de IL-26 y su asociación con la tasa de traslocación bacteriana en pacientes con EC en remisión.

Pacientes y Metodología de análisis

Pacientes y diseño del estudio:

Estudio observacional prospectivo en el que se incluyeron de forma consecutiva pacientes con EC en remisión, controlados en el Hospital de Día de Inflammatoria del HGUA, que aceptaran participar en el estudio y firmaran el consentimiento informado. El diagnóstico de EC se estableció de acuerdo con criterios clínicos, endoscópicos, histológicos y/o radiológicos habituales. Los pacientes que recibieron antibióticos en las dos semanas previas fueron excluidos del estudio. Se recogieron todos los datos clínicos y analíticos de los pacientes, estratificando a los mismos de acuerdo con la clasificación de Montreal y su índice de actividad CDAI. El estudio contó con el informe favorable del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Alicante.

A todos los pacientes se les recogió una muestra de sangre periférica en el momento de inclusión para realizar las determinaciones experimentales. Igualmente, se recogieron las variables clínicas y analíticas habituales en estos pacientes.

Cuantificación sérica y genotipado de IL-26

La cuantificación sérica de IL-26 se realizó mediante enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se empleó Human IL-26 ELISA kit (Antibodies-online). El genotipado de polimorfismos se realizó por secuenciación de los SNPs *rs1558744*, *rs7134599* y *rs2870946* en la región génica de IL-26 en el cromosoma 12 (12q15 region) descritos en la bibliografía.

Detección de DNA bacteriano

La detección de fragmentos genómicos bacterianos se realizó mediante broad-range PCR de una región conservada del gen 16SrRNA de procariotas seguido de secuenciación automática parcial de nucleótidos.

Análisis estadístico:

Para las variables continuas se utilizó la media y la desviación estándar y para las variables categóricas se empleó frecuencia o porcentajes. Se analizaron las diferencias estadísticas utilizando el test χ^2 para datos categóricos y el test U Mann–Whitney no paramétrico para datos cuantitativos. Las correlaciones bivariadas se analizaron utilizando el test de Spearman. Se consideró un valor $p < 0,05$ como significativo. Los análisis se llevaron a cabo mediante el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 19.

Resultados

La Tabla 1 resume las características clínicas y analíticas de los pacientes incluidos en el estudio. Se incluyeron 288 pacientes con EC en remisión clínica. La edad media de los pacientes fue de 42 años y el 53% eran varones. El CDAI medio fue de 62.6 ± 33.1 y el de calprotectina fecal de 52.4 ± 35.7 $\mu\text{g/g}$. El 40% de la población de estudio era fumadora activa y el 25% tenían historia previa de cirugía abdominal. A la inclusión, el 28% de los pacientes recibían terapia biológica, única o combinada, y el 55% recibían inmunosupresores.

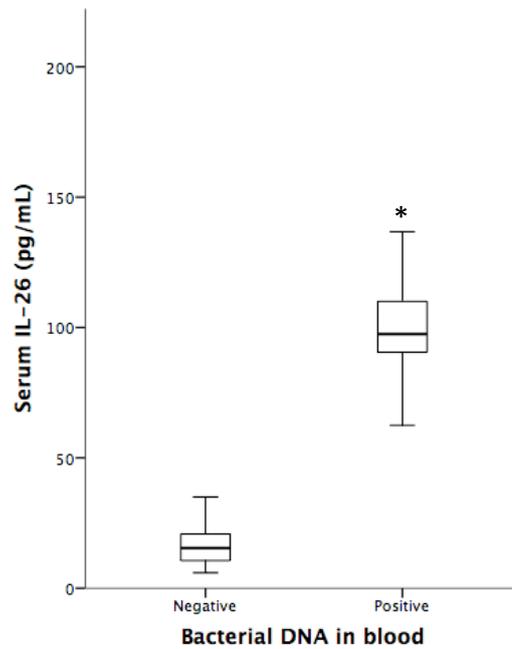
Tabla 1.

	All patients (n=288)	BactDNA-negative patients (n=190)	BactDNA-positive patients (n=98)	<i>P</i> value	
Age (years)	42 ± 15	42 ± 15	43 ± 14	0.61	
Weight (Kg)	70.65 ± 14.71	71.05 ± 12.80	69.88 ± 17.91	0.16	
Gender (male/female), n (%)	103 (35.7%) / 185 (64.3%)	103 (54.2%) / 87 (45.8%)	50 (51.5%) / 48 (48.5%)	0.76	
Smoking habit (yes / no / ex), n (%)	115 (40%) / 110 (38.2%) / 63 (21.8%)	72 (37.9%) / 80 (42.1%) / 38 (20%)	43 (43.8%) / 30 (30.6%) / 25 (25.5%)	0.34	
Disease duration (months)	115.13 ± 114.49	114.55 ± 126.92	116.26 ± 85.66	0.29	
Resection, n (%)	71 (25.3%)	51 (26.8%)	20 (20.4%)	0.28	
CDAI	82.64 ± 43.14	82.08 ± 43.09	83.74 ± 43.45	0.68	
Montreal A (age of onset), n (%)					
A1 (<=16)	16 (5.5%)	10 (5.3%)	6 (6.1%)	0.68	
A2 (17-40)	203 (70.5%)	136 (71.5%)	67 (68.4%)		
A3 (>40)	69 (24%)	44 (23.2%)	25 (25.5%)		
Montreal L (location), n (%)					
L1	131 (45.4%)	91 (47.9%)	40 (40.8%)	0.3	
L2	65 (22.7%)	41 (21.5%)	24 (24.5%)		
L3	79 (27.4%)	50 (26.4%)	29 (29.6%)		
L4	13 (4.5%)	8 (4.2%)	5 (5.1%)		
Montreal B (behavior), n (%)					
B1 (non-stricturing, non-penetrating)	138 (48%)	87 (45.8%)	51 (52%)	0.7	
B1p (non-stricturing, non-penetrating, penetrating perianal disease)	37 (12.8%)	24 (12.6%)	13 (13.2%)		
B2 (stricturing)	46 (16%)	32 (16.8%)	14 (14.3%)		
B2p (stricturing, perianal disease associated)	13 (4.5%)	10 (5.3%)	3 (3.1%)		
B3 (penetrating)	42 (14.5%)	31 (16.3%)	11 (11.2%)		
B3p (penetrating, penetrating perianal disease)	12 (4.2%)	6 (3.2%)	6 (6.2%)		
Therapy, n (%)					
Mesalazine	65 (22.5%)	47 (24.7%)	18 (18.3%)	0.25	
Azathioprine	96 (34%)	64 (33.7%)	32 (32.6%)		
Metotrexate	9 (3.1%)	8 (4.2%)	1 (1%)		
Mesalazine and Azathioprine	16 (5.5%)	11 (5.7%)	5 (5.1%)		
Mesalazine and Steroids	4 (1.3%)	2 (1%)	2 (2%)		
Azathioprine + Steroids	4 (1.3%)	2 (1%)	2 (2%)		
Metotrexate + Steroids	1 (0.3%)	1 (0.5%)	-		
Infliximab	22 (7.6%)	15 (7.9%)	7 (7.1%)		
Adalimumab	26 (9%)	12 (6.3%)	14 (14.3%)		
Infliximab + Azathioprine	15 (5.2%)	12 (6.3%)	3 (3.1%)		
Adalimumab + Azathioprine	9 (3.5%)	5 (2.6%)	5 (5.1%)		
Infliximab + Steroids	1 (0.3%)	1 (0.5%)	-		
Adalimumab + Steroids	4 (1.3%)	2 (1%)	2 (2%)		
Infliximab + Metotrexate	2 (0.7%)	-	2 (2%)		
Infliximab + Azathioprine + Steroids	1 (0.3%)	1 (0.5%)	-		
No therapy	12 (4.1%)	7 (3.6%)	5 (5.1%)		
Groups of therapy, n (%)					
No IS / no anti-TNF	78 (27.1%)	54 (28.4%)	24 (24.4%)		0.46
IS	129 (44.7%)	88 (46.3%)	41 (41.8%)		
Anti-TNF	50 (17.3%)	28 (14.7%)	22 (22.4%)		
IS + anti-TNF	31 (10.7%)	20 (10.5%)	11 (11.2%)		
CRP (mg/dL)	0.58 ± 1.11	0.59 ± 1.09	0.57 ± 1.17	0.82	
Fecal Calprotectin (ug/g)	52.35 ± 35.73	54.95 ± 45.02	49.80 ± 23.65	0.12	
ASCAs, n (%)	115 (39.9%)	76 (40%)	39 (39.7%)	0.78	
Haemoglobin (g/dL)	13.93 ± 2.37	13.76 ± 1.49	14.26 ± 3.48	0.22	
ESR (mm)	19.2 ± 15.8	18.8 ± 15.3	19.7 ± 15.5	0.15	
Albumin (g/dL)	4.13 ± 4.62	4.11 ± 4.61	4.13 ± 4.51	0.53	
Total WBCs (mm ³)	6880.5 ± 2648.2	6721.4 ± 2579.4	7186.2 ± 2765.2	0.13	
Temperature (°C)	36.07 ± 0.22	36.05 ± 0.17	36.12 ± 0.31	0.18	
Pulse rate (bpm)	70.72 ± 6.21	70.30 ± 5.90	71.5 ± 6.75	0.13	

All values shown as mean ± SD or percentage. *P* values correspond to the comparison between bactDNA-negative vs bactDNA-positive patients. CDAI: Crohn's Disease Activity Index; IS: immunosuppressors; CRP: C-reactive protein; ASCAs: anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies; ESR: erythrocyte sedimentation rate; WBC: white blood cells.

Se detectó DNA bacteriano en 98 de los 288 pacientes incluidos (34,0%). Los niveles de IL-26 en sangre de los pacientes incluidos se encuentra representado en la Figura 1. Como puede observarse, los pacientes con DNA bacteriano en sangre muestran niveles de IL-26 significativamente superiores a los presentes en pacientes sin DNA bacteriano.

Figura 1.



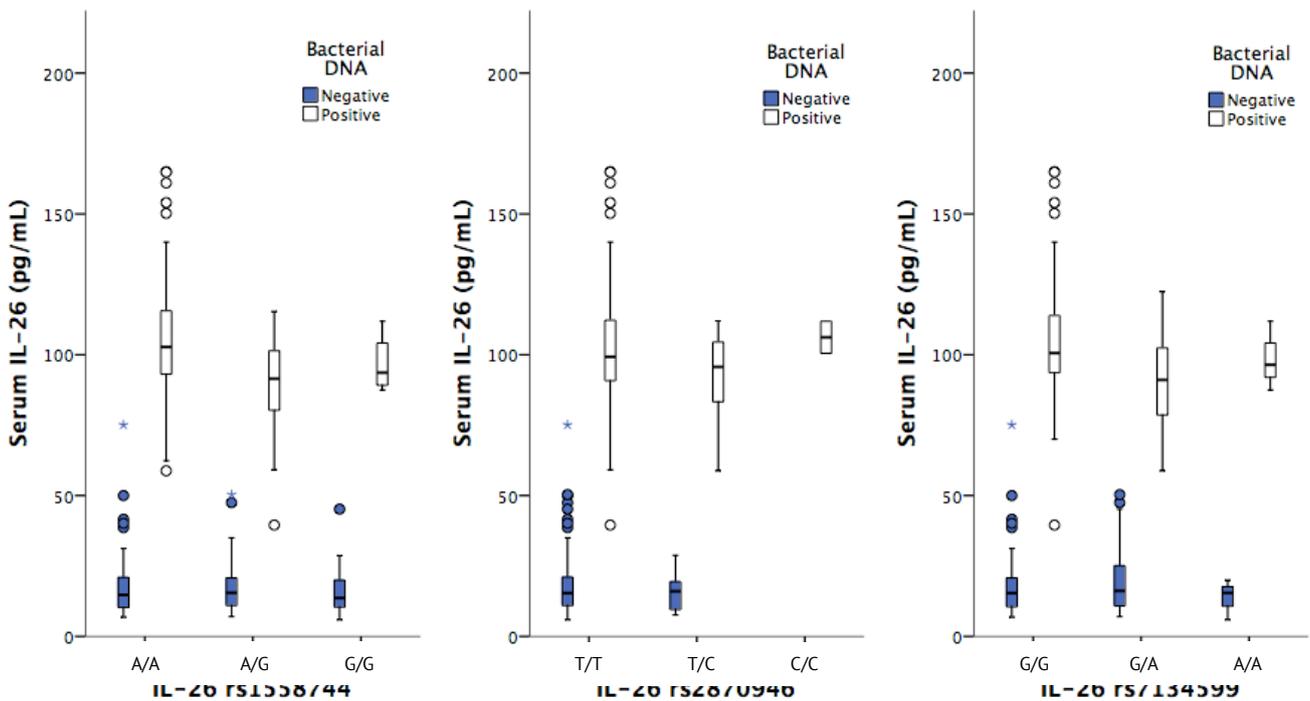
A continuación se evaluó el genotipo de las distintos SNPs de IL-26. La Tabla 2 muestra la distribución de las frecuencias alélicas en la población de estudio y en una cohorte de controles sanos.

Tabla 2.

	Genotype n (%) patients/ controls			Variant allele frequency (%)
	Homozygous wild type	Heterozygous	Homozygous variant	
IL-26 rs1558744 (A>G)	16 (16,5%) / 88 (17,5%)	58 (59,8%) / 229 (45,5%)	23 (23,7%) / 186 (37%)	52,9 / 59,7
IL-26 rs2870946 (T>C)	71 (76,34%) / 431 (85,7%)	21 (22,6%) / 68 (13,5%)	1 (1,08%) / 4 (0,8%)	12,3 / 7,6
IL-26 rs7134599 (G>A)	23 (23,96%) / 208 (41,4%)	55 (57,3%) / 76 (15,1%)	18 (18,75%) / 219 (43,5%)	46,65 / 36,9

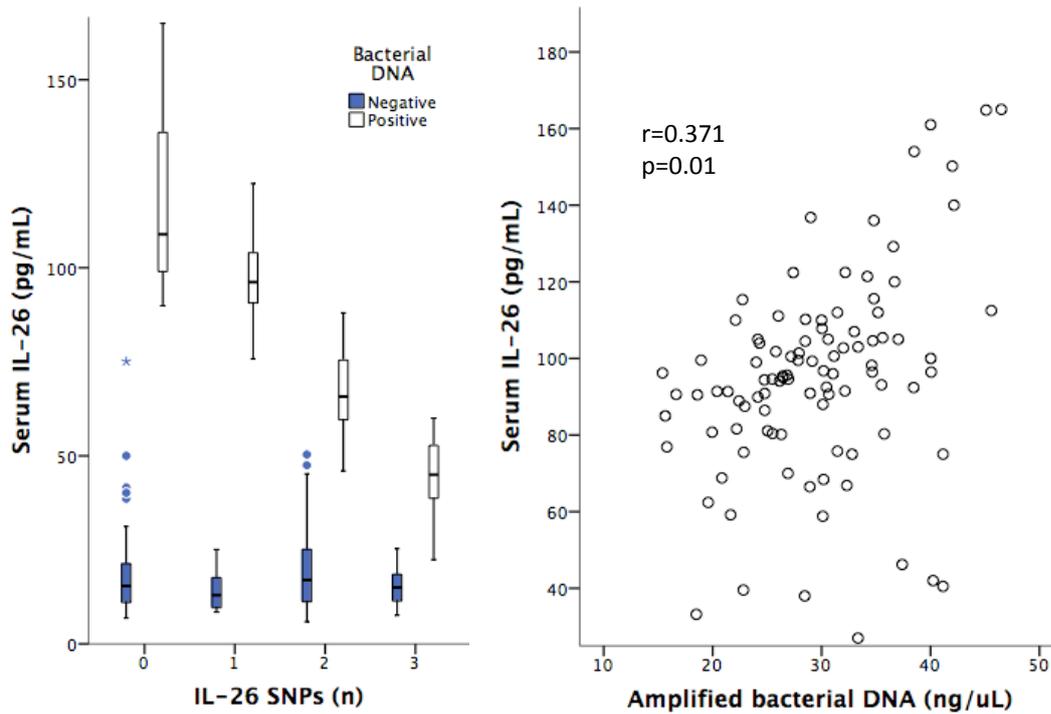
La Figura 2 muestra los niveles séricos de IL-26 en pacientes distribuidos por los genotipos de los tres SNPs estudiados y la presencia de DNA bacteriano. La presencia del antígeno bacterianos se asocia significativamente con unos niveles superiores de IL-26 en todos los casos.

Figura 2.



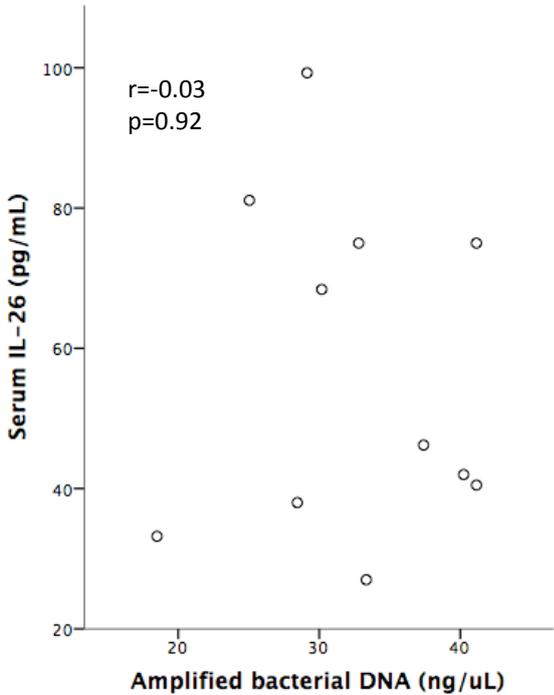
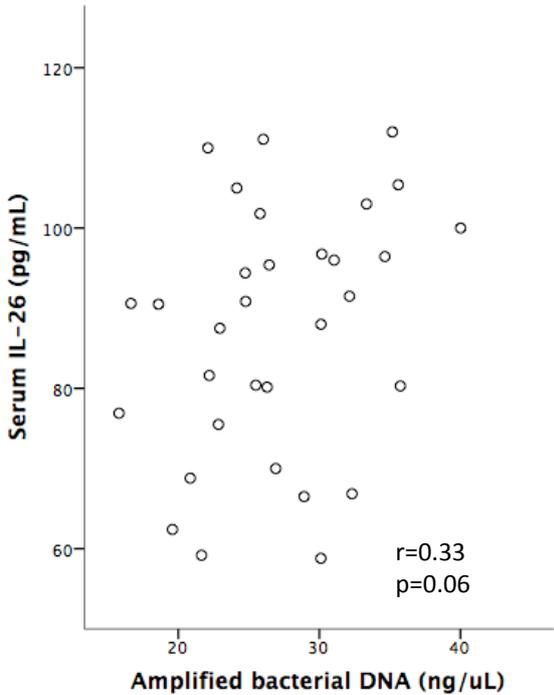
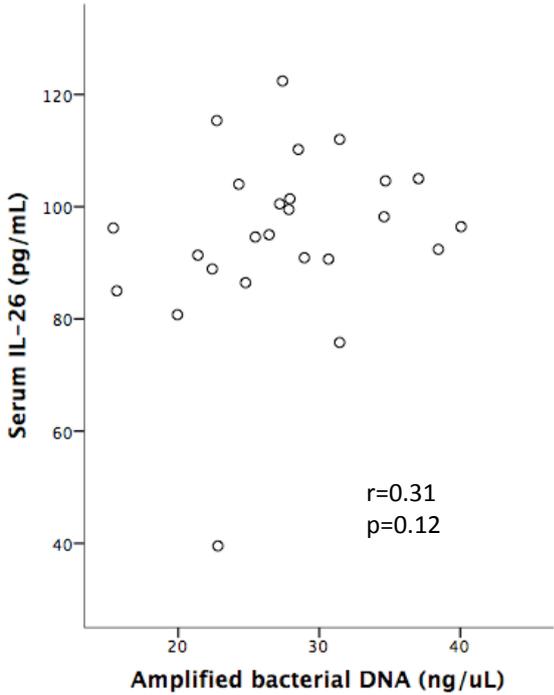
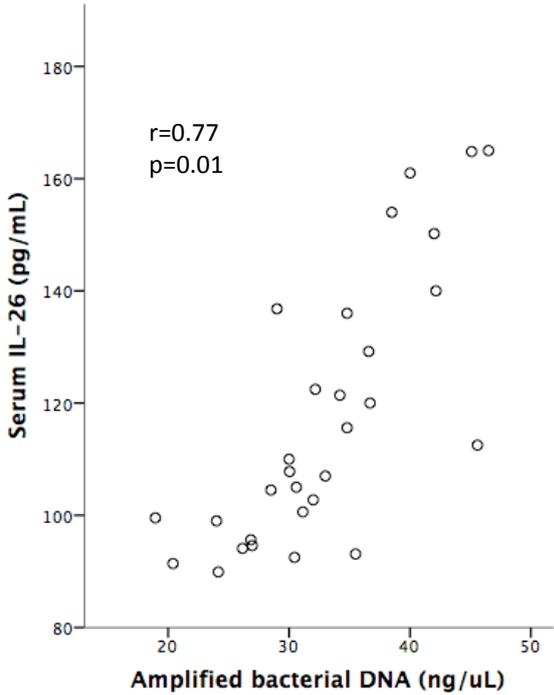
Los niveles séricos de IL-26 en los pacientes incluidos distribuidos por el número de genotipos variantes de IL-26 se encuentran representados en la Figura 3 y, como puede observarse, la presencia conjunta de varios genotipos variantes se asocia con una reducción en los niveles de IL-26 en los pacientes con DNA bacteriano, alcanzando los niveles presentes en pacientes sin la presencia del antígeno. También se representa en la figura la correlación entre la concentración de antígeno amplificado y la concentración de IL-26 en sangre de pacientes con EC en remisión. Como puede observarse, dicha correlación es muy débil e identifica la presencia de factores de variabilidad en la relación entre ambas variables.

Figura 3.



Finalmente, para estudiar esta variabilidad, distribuimos los pacientes por el número de genotipos variantes en los SNPs de IL-26 estudiados. Como puede observarse en la Figura 4, la correlación positiva entre los niveles de IL-26 y la concentración de DNA bacteriano se mantiene positiva únicamente en los pacientes con el genotipo IL-26 salvaje, mientras que la presencia de variantes en uno, dos o tres SNPs se asocia con una pérdida de la correlación entre ambos factores.

Figura 4.



Conclusiones y direcciones futuras

La traslocación bacteriana, detectable mediante la presencia de DNA bacteriano en sangre periférica, es un fenómeno frecuente en pacientes con EII, especialmente en EC. Se ha asociado a una respuesta inflamatoria incrementada en los pacientes que la presentan, evidenciada por un aumento de citocinas proinflamatorias en sangre. Así mismo, los pacientes con DNA bacteriano en sangre periférica presentan una peor evolución clínica con mayor necesidad de intensificación de terapia biológica, mayor tasa de recaídas a corto plazo, hospitalización o necesidad de uso de esteroides, todo ello modulado genéticamente por la presencia de ciertas mutaciones en genes como NOD2 o ATGL16L1.

IL-26 modula la actividad proinflamatoria y bactericida en respuesta a la traslocación, mostrando capacidad para unirse al DNA bacteriano y activar mecanismos moleculares para su degradación. Los pacientes con mutaciones en IL-26 podrían no aclarar el ADN bacteriano aumentando el tiempo de exposición antigénica y la respuesta inflamatoria. El presente trabajo confirma que los pacientes con EC y presencia de DNA bacteriano en sangre muestran niveles de IL-26 significativamente superiores a los presentes en pacientes sin DNA bacteriano. Por otra parte demostramos que la presencia conjunta de varios polimorfismos de IL26 se asocia con una reducción en los niveles de IL-26 en los pacientes con DNA bacteriano, disminuyendo hasta los niveles presentes en pacientes sin la presencia del antígeno. Por ello concluimos que los pacientes con polimorfismos de IL26 no responden adecuadamente a la traslocación de DNA bacteriano impidiendo la activación de una respuesta inmunológica completa. Como consecuencia, existiría un mayor tiempo de exposición antigénica y, probablemente, una peor respuesta a las terapias antiinflamatorias.

El estudio abre nuevas líneas de investigación futura destinadas por una lado a evaluar la relación entre los niveles de IL26, sus polimorfismos y la respuesta a diversos fármacos biológico, y por otro, a identificar posibles dianas terapéuticas para la restauración de la actividad de IL-26 para mejorar la respuesta inmunológica en los pacientes con polimorfismos en este gen.

Bibliografía

1. Wurzelmann JL, Lyles CM, Sandler S. Childhood infections and the risk of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1994;39:555-60.
2. Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* 1994;343:766-67.
3. Greenbloom SL, Steinhart AH, Greenberg GR. Combination ciprofloxacin and metronidazole for active Crohn's disease. *Can J Gastroenterol* 1998;12:53-56.
4. Sanahan F. Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale? *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:107-15.
5. Mow WS, Vasiliauskas EA, Lin YC et al. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;126:414-24.
6. Naser SA, Ghobrial G, Romero C, Valentine JF. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* 2004;364:1039-44.
7. Naser SA, Schwartz D, Safran I. Isolation of *Mycobacterium avium* ssp. *tuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1094-95.
8. Autsbach F, Eisold S, Honz U et al. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut* 2005;54:944-49.
9. Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003;52:237-42.
10. Rutgeerts P, Goboes K, Peeters M et al. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet* 1991;338(8770):771-74.
11. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
12. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:867-74.
13. Maggio-Price L, Bielefeldt-Ohmann H et al. Dual infection with *Helicobacter bilis* and *Helicobacter hepaticus* in p-glycoprotein-deficient *mdr1a*^{-/-} mice results in colitis that progresses to dysplasia. *Am J Pathol.* 2005 Jun;166(6):1793-806.
14. Hermiston ML, Gordon JI. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* 1995;270:1203-7.
15. Secondulfo M, de Magistris I, Fiandra R et al. Intestinal permeability in Crohn's disease patients and their first degree relatives. *Dig Liver Dis* 2001 33(8):680-85.
16. Gitter AH, Wullstein F, Fromm M, Schulzke JD. Epithelial barrier defects in ulcerative colitis: characterization and quantification by electrophysiological imaging. *Gastroenterology* 2001;121(6):1320-28.
17. Oubborg S, Mallant-Hent R, Crusius JB et al. The toll-like receptor 4 (TLR4) Asp299Gly polymorphism is associated with colonic localisation of Crohn's disease without a major role for the *Saccharomyces cerevisiae* mannan-LBP-

- CD14-TLR4 pathway. *Gut*. 2005 Mar;54(3):439-40.
18. MacDonald TT, Monteleone G, Pender SLF. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 2000;51:2-9.
 19. Fuss IJ, Boirivant M, Lacy B, Strober W. The interrelated roles of TGF β and IL10 in the regulation of experimental colitis. *J Immunol* 2002;168:900-8.
 20. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M et al. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of INF-g, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996;157:1261-70.
 21. Gutierrez A, Frances R, Amoros A, Zapater P, Garmendia M, Ndongo M, et al. Cytokine association with bacterial DNA in serum of patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009 Apr;15(4):508-514.
 22. Gutierrez A, Holler E, Zapater P, Sempere L, Jover R, Perez-Mateo M, et al. Antimicrobial peptide response to blood translocation of bacterial DNA in Crohn's disease is affected by NOD2/CARD15 genotype. *Inflamm Bowel Dis* 2010 Nov 15.
 23. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001 May 31;411(6837):603-606.
 24. Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 1997 Dec;92(12 Suppl):5S-11S.
 25. Voss E, Wehkamp J, Wehkamp K, Stange EF, Schroder JM, Harder J. NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J Biol Chem* 2006 Jan 27;281(4):2005-2011.
 26. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, Schlee M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004 Nov;53(11):1658-1664.
 27. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, et al. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Dec 13;102(50):18129-18134.
 28. Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, Huang N, Fowler EV, Radford-Smith GL. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut* 2008 Jul;57(7):903-910.
 29. Juanola O, Moratalla A, Gutiérrez A, Sempere L, Zapater P, Giménez P, Almenta I, Peiró G, González-Navajas JM, Such JF, Francés R. Anti-TNF-alpha loss of response is associated with a decreased percentage of FoxP3+ T cells and a variant NOD2 genotype in patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol*. 2015 Jul;50(7):758-68. doi: 10.1007/s00535-014-1020-5. Epub 2014 Dec 11.
 30. Gutiérrez A, Scharl M, Sempere L, Holler E, Zapater P, Almenta I, González-Navajas JM, Such J, Wiest R, Rogler G, Francés R. Genetic susceptibility to increased bacterial translocation influences the response to biological therapy in patients with Crohn's disease. 2014 Feb;63(2):272-80. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303557. Epub 2013 Feb 1.
 31. Gutiérrez A, Zapater P, Juanola O, Sempere L, García M, Laveda R, Martínez A, Scharl M, González-Navajas JM, Such J, Wiest R, Rogler G, Francés R. Gut Bacterial DNA Translocation is an Independent Risk Factor of Flare at Short Term in Patients With Crohn's Disease. *Am J Gastroenterol*. 2016 Apr;111(4):529-40. doi: 10.1038/ajg.2016.8. Epub 2016 Feb 23.

32. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, et al. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996;157:1261-1270
33. Monteleone G, Biancone L, Marasco R, et al. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 1997;112:1169-1178.
34. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004;113:1490-1497.
35. Heller F, Florian P, Bojarski C, et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 2005;129:550-564.
36. Hommes DW, Mikhajlova TL, Stoinov S, et al. Fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, demonstrates safety and clinical activity in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut* 2006;55:1131-1137.
37. Sandborn WJ, Feagan BG, Fedorak RN, et al. A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 2008;135:1130-1141.
38. Reinisch W, de Villiers W, Bene L, et al. Fontolizumab in moderate to severe Crohn's disease: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled, multiple-dose study. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:233-242.
39. Fujino S, Andoh A, Bamba S, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;52:65-70.
40. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007;204:1849-1861.
41. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008;453:1051-1057.
42. Zhang Z, Zheng M, Bindas J, et al. Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:382-388.
43. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2008;118:534-544.
44. Silverberg MS, Cho JH, Rioux JD, et al. Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. *Nat Genet* 2009;41:216-220.
45. Dambacher J, Beigel F, Zitzmann K, et al. The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut* 2009;58:1207-1217.
46. Meller S, Di Domizio J, Voo KS, et al. TH17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26. *Nat Immunol* 2015;16:970-979.