

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**Influencia de las mutaciones del gen
NOD2/CARD15 y de los receptores toll-like en
la susceptibilidad para la enfermedad de Crohn
en la población gallega y su influencia en la
respuesta a las terapias biológicas**

Dr Manuel Barreiro de Acosta

Santiago de Compostela, 2009

Dr. D. Joaquín Potel Lesquereux, Catedrático Emérito del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela y el Dr. D. Juan Enrique Domínguez Muñoz, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor Asociado del Departamento de Medicina

CERTIFICAN

Que el trabajo de Tesis Doctoral titulado *Influencia de las mutaciones del gen NOD2/CARD15 y de los receptores "toll-like" en la susceptibilidad para la enfermedad de Crohn en la población gallega y su influencia en la respuesta a las terapias biológicas*, presentado por D. Manuel Barreiro de Acosta, ha sido realizado bajo nuestra dirección y cumple los requisitos legales para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para aspirar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Lo que se hace constar a los efectos oportunos en Santiago de Compostela a tres de marzo de dos mil nueve.



Para mis Anas y mis padres Teresa y Paco

AGRADECIMIENTOS

- Al Profesor Joaquín Potel Lesquereux director de mi tesis doctoral por su apoyo, paciencia, disponibilidad total y dedicación en la lectura crítica y corrección del presente trabajo.
- Al Profesor Enrique Domínguez-Muñoz, Jefe de Servicio de Aparato Digestivo y codirector de la tesis por su apoyo para mi dedicación “casi exclusiva” a la enfermedad inflamatoria intestinal y su influencia a la hora de dedicarme a lo que más me gusta: la investigación clínica en la enfermedad inflamatoria.
- A mi compañero y amigo de Unidad Monográfica, Aurelio Lorenzo, sin su ayuda diaria y su apoyo incondicional en todas y cada una de mis “ideas” de investigación sería imposible realizarlas. Él sabe que su ayuda es fundamental para la realización de todos los trabajos; por ello todos los logros, incluyendo la presente tesis doctoral, son de los dos.
- Al Profesor Salvador Peña siempre cercano a pesar la distancia, en primer lugar por ser la persona que me ha inculcado mi “pasión” por estas enfermedades y por su apoyo en todos los niveles: logístico por permitirme la utilización de su Laboratorio de Investigación de Ámsterdam incondicionalmente, intelectual por sus consejos e ideas a la hora de realizar este trabajo y sobre todo personal por acogerme como alguien de su familia durante mis estancias en Ámsterdam.
- A mis amigos y compañeros de Residencia (Julio, Augusto y Jose) por haberme apoyado incondicionalmente durante la residencia y después a que me dedicase a lo que me gusta, la enfermedad inflamatoria intestinal.

- A mis compañeros de Servicio, tanto a los “clásicos” (Matilde, Manolo, Miguel, Pepe, los hepatólogos) como a los “jóvenes” (Fer, Susana, Mera y las resis) por su apoyo y confianza en mi cuando se tratan temas de inflamatoria.
- A los Doctores Concepción Núñez, Sander Ouburg y Servaas Morre, investigadores básicos del Laboratorio de Inmunogenética de la Vrije Universiteit de Ámsterdam que sin su ayuda y conocimientos en el laboratorio no hubiese sido posible realizar este trabajo.
- A todos los becarios de FIENAD por su apoyo en la investigación, en especial en esta tesis a María Vilariño y Marta Iglesias por su ayuda fundamental en la recogida y codificación de las muestras de los pacientes.
- A todo el personal de Consulta Externa de Aparato Digestivo (Montse “la enfermera de inflamatoria” y “las dos auxiliares de inflamatoria”), por su ayuda diaria en “mi segunda casa”.
- A mi madre Teresa, por su insistencia y apoyo en la realización de este trabajo, su disposición continua a la ayuda, sus múltiples correcciones ortográficas y de estilo a cualquier hora y en cualquier lugar.
- A mi padre Paco, para mi mucho más que un ejemplo de trabajo, capacidad y superación continua. Sin él no hubiese podido realizar esta tesis, él ha sido la persona que me ha sabido transmitir la importancia de realizar este trabajo. Su ayuda ha sido fundamental desde el primer hasta el último día y sé la alegría que supone para él ver el trabajo terminado.
- A mi mujer Ana, por ayudarme todos los días, por “permitirme” estar horas y horas delante del ordenador escribiendo sin enfadarse, por en sus escasísimos ratos libres corregirme lo que escribo, pero sobre todo por quererme como soy.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición, criterios diagnósticos y clasificación de la enfermedad de Crohn

1.2. Historia

1.3. Epidemiología

1.4. Fisiopatología integrada

1.5. Genética en la enfermedad de Crohn

1.5.1. Introducción

1.5.2. Epidemiología Genética

1.5.3. Identificación de genes de susceptibilidad

1.5.4. Gen NOD2/CARD15: estructura, mutaciones

1.5.5. Receptores toll-like

1.6. Importancia de las terapias biológicas en el tratamiento de la enfermedad de Crohn

1.7. Características de Galicia y su población

2. OBJETIVOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Población de estudio

3.1.2. Características clínicas de los pacientes del estudio

3.2. Métodos

3.2.1. Extracción de ADN en muestras de sangre periférica

3.2.2. Genotipado

3.2.3. Análisis estadístico

4. RESULTADOS

4.1. Características de los pacientes

- 4.2. Frecuencia de mutaciones en el gen NOD2/CARD15 y relación con la susceptibilidad para enfermedad de Crohn
- 4.3. Frecuencia de mutaciones en los receptores toll-like y CD14 y relación con la susceptibilidad para enfermedad de Crohn
- 4.4. Relación de las mutaciones en gen NOD2/CARD15 con los distintos fenotipos según la Clasificación de Viena
- 4.5. Relación de las mutaciones en gen NOD2/CARD15 con factores demográficos y ambientales
- 4.6. Relación de las mutaciones en gen NOD2/CARD15 con las manifestaciones extraintestinales
- 4.7. Relación de las mutaciones en el gen NOD2/CARD15 con los antecedentes quirúrgicos por enfermedad de Crohn
- 4.8. Relación de las mutaciones en el gen NOD2/CARD15 con los antecedentes de corticodependencia y corticorresistencia
- 4.9. Relación de las mutaciones en el gen NOD2/CARD15 y en RTL4 y CD14 con la respuesta al tratamiento con terapias biológicas

5. DISCUSIÓN

- 5.1. Frecuencia de mutaciones en el gen NOD2/CARD15 y relación con la susceptibilidad para enfermedad de Crohn
- 5.2. Influencia de las mutaciones en las formas de presentación de la enfermedad
- 5.3. Frecuencia de mutaciones en los receptores toll-like y relación con la susceptibilidad para enfermedad de Crohn
- 5.4. Influencia de las mutaciones en la respuesta al tratamiento con las terapias biológicas

6. CONCLUSIONES

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición, criterios diagnósticos y clasificación de la enfermedad de Crohn

La enfermedad de Crohn (EC) pertenece al grupo de las enfermedades inflamatorias intestinales. Existen dos grandes entidades que representan más del 80% de estas enfermedades, que son la EC y la colitis ulcerosa (CU). Sin embargo existen otras enfermedades inflamatorias mucho menos comunes que éstas, que son fundamentalmente la colitis indeterminada y la colitis colágena.

La EC es una inflamación crónica que puede afectar cualquier tramo del tracto gastrointestinal, de la boca hasta el ano, pero que fundamentalmente afecta a ileon terminal y colon. La inflamación asociada con la enfermedad es discontinua a lo largo del eje longitudinal del intestino, pudiendo alternarse áreas afectas o inflamadas con otras zonas con la mucosa normal. Otra característica de la EC es que suele afectar a todas las capas del intestino (desde la mucosa hasta la serosa) (1-3).

En muchas ocasiones se ha postulado que la EC y la CU fuesen la misma enfermedad con distintas presentaciones, sin embargo, existen importantes diferencias tanto macroscópicas como microscópicas entre ambas entidades, como se pone de manifiesto en la tabla 1.

Criterios diagnósticos:

No existen signos patognomónicos para el diagnóstico de la EC. El diagnóstico de EC se fundamenta en los criterios clásicos de Lennard-Jones que incluyen 4 grupos o categorías: clínicos, radiológicos, endoscópicos y anatomopatológicos (4).

Criterios clínicos:

La enfermedad suele manifestarse con alteraciones digestivas inespecíficas que aparecen con carácter recurrente, generalmente en pacientes jóvenes.

TABLA 1: Diferencias entre enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa

	ENFERMEDAD DE CROHN	COLITIS ULCEROSA
Distribución	Discontinua	Continua
Localización	Todo el tracto digestivo	Colónica
Grosor	Transmural	Limitado a mucosa
Estenosis	Frecuentes	Raras
Granulomas	Si	No
Fisuras	Probables	No

El síntoma más frecuente suele ser el dolor abdominal, cuyas características varían dependiendo del patrón clínico y localización de la enfermedad.

También son frecuentes la diarrea, normalmente con más presencia de moco que de sangre, la fiebre (bien como expresión del propio proceso inflamatorio o de una complicación) y la pérdida de peso. En ocasiones también puede presentarse con alguna de las complicaciones de la enfermedad como fístulas o abscesos, y, más raramente, con alguna de las manifestaciones extraintestinales asociadas a la EC: cutáneas (eritema nodoso, pioderma gangrenoso), articulares (artritis, sacroileítis, espondilitis anquilopoyética) y oculares (epiescleritis, uveítis).

Criterios radiológicos:

Los datos radiológicos de la EC reflejan las características de la afectación intestinal, que usualmente es de forma asimétrica y discontinua, con cambios inflamatorios transmurales que se caracterizan por la presencia de edema, ulceración y fibrosis. El estudio radiológico con bario del intestino delgado permite observar la

existencia de alteraciones mucosas y del calibre, así como determinadas complicaciones de la enfermedad.

Criterios endoscópicos:

En el estudio de todo paciente con sospecha de EC se realizará en algún momento una colonoscopia con ileoscopia y toma de biopsias, bien de entrada si la sospecha clínica es de afectación en colon, o bien para determinar la extensión de la enfermedad.

Los hallazgos endoscópicos en la EC suelen ser segmentarios (alternancia de áreas sanas con áreas de la mucosa afecta) y se observan aftas, zonas de eritema, mucosa en empedrado y la presencia de úlceras profundas “en sacabocados” y serpiginosas (figura 1).



FIGURA 1: Imagen endoscópica de enfermedad de Crohn

Criterios anatomopatológicos:

El hallazgo anatomopatológico más característico de la EC son los granulomas no caseificados, pero solo se hallan en un 10-30% de las biopsias endoscópicas y en un 50% de las piezas quirúrgicas. La presencia de inflamación transmural, ulceraciones y agregados linfoides sin centro germinal son también altamente sugestivos de EC. Otros

criterios que pueden respaldar el diagnóstico son la presencia de inflamación de carácter discontinuo, inflamación submucosa con arquitectura epitelial conservada y la presencia de fisuras.

Clasificación según la gravedad de los brotes:

A la hora de valorar la gravedad no siempre existe una buena correlación entre la actividad clínica, los parámetros de laboratorio y los hallazgos radiológicos y endoscópicos. Se acepta que el tratamiento deba adecuarse principalmente en función de los síntomas.

Se han diseñado múltiples índices con el objetivo de cuantificar la actividad inflamatoria, especialmente, desde el punto de vista clínico. El más utilizado es el *Crohn's disease activity index* (CDAI) (5), que incluye ocho variables independientes, siete de ellas clínicas, y solo un parámetro analítico (tabla 2).

El CDAI es el índice más utilizado en los ensayos clínicos, sin embargo, es difícil de aplicar en la práctica clínica diaria, pues precisa 7 días para la recogida de los datos, y su cálculo es engorroso. Además alguna de las consecuencias de la EC puede ser infravalorada por el CDAI, por ejemplo, una fístula rectovaginal incapacitante puede asociarse a un CDAI inferior a 150, con el paciente aparentemente en situación de inactividad.

Posteriormente se han intentado introducir en la práctica clínica otros índices de actividad clínica más completos y sobre todo más manejables en la clínica del día a día como eran el índice de Harvey-Bradshaw (6), capaz de valorar con 5 preguntas sencillas del día a día de la práctica clínica (estado general, dolor abdominal, número de deposiciones líquidas, presencia o no de masa abdominal y presencia o no de complicaciones) la actividad clínica de cada paciente. Este índice, de sencillo manejo en la práctica diaria, no resulta suficiente para la investigación. Un grupo holandés

desarrolló en 1980 el índice de Van Hess (7), que incluía variables más objetivas que el CDAI, como son parámetros analíticos y resecciones previas. Sin embargo este índice ha tenido escasa repercusión clínica y aplicabilidad posterior.

Un índice que ha tenido una mayor repercusión clínica es el índice de Actividad de la Enfermedad Perianal (PDAI), desarrollado por un grupo canadiense (8), fundamentalmente debido a la escasa aplicabilidad del CDAI en los pacientes con enfermedad perianal. Este índice incluye las deposiciones, el dolor, el grado de induración, la restricción de la actividad sexual y el tipo de enfermedad perianal.

TABLA 2: Índice de actividad clínica de la enfermedad de Crohn (CDAI)

Número de deposiciones	x2	en los últimos 7 días
Dolor abdominal (no=0,leve=1,moderado=2,grave=3)	x5	en los últimos 7 días
Estado general (bueno=0,aceptable=1,regular=2,malo=3,muy malo=4)	x7	en los últimos 7 días
Síntomas asociados: Artritis, fiebre, fistulas, eritema nodoso	x20	
Toma de antidiarreicos (no=0,si=1)	x30	
Masa abdominal (no=0,dudosa=1,sí=2)	x10	
Hematocrito (Restar el valor del Hematocrito: en hombres 47-; en mujeres 43-)	x6	
Porcentaje por debajo del peso estándar	x1	
(CDAI: <150=inactivo, 150-250=brote leve, 250-350=brote moderado, >350=brote grave)		

Clasificación según las características de la enfermedad:

La dificultad para valorar la actividad clínica de esta enfermedad solo es un dato objetivo más a la hora de demostrar la heterogenicidad de la EC. Esta complejidad

radica en la variedad de localizaciones anatómicas de esta enfermedad, pero fundamentalmente de los distintos patrones evolutivos clínicos; que se hace más patente al observarse que hasta hace pocos años no existía ninguna clasificación validada de los distintos fenotipos de la enfermedad. En 1998, en el Congreso Mundial de Gastroenterología celebrado en Viena, se estableció la Clasificación de Viena (9) (tabla 3), que estratificaba a los pacientes según la edad del diagnóstico (A: age en inglés), localización de la enfermedad (L: location en inglés) y el patrón evolutivo o de comportamiento (B: behavior en inglés).

Todos los pacientes incluidos en esta serie han sido estratificados de acuerdo con esta clasificación; aunque en el capítulo de resultados se explicará detalladamente los criterios para asignar cada paciente a cada grupo, en especial en lo que se refiere a el patrón de comportamiento y su agresividad, a continuación se exponen las definiciones generales de cada uno de los grupos de la clasificación.

- A1: Pacientes diagnosticados antes de los 40 años.
- A2: Pacientes diagnosticados a partir de los 40 años.
- L1: Ileal. Se considera como tal la enfermedad limitada al ileon terminal, entendido como tal el tercio distal del intestino delgado.
- L2: Colónica. Afectación de cualquier localización entre el recto y el ciego sin participación de intestino delgado ni otros tramos.
- L3: Ileo-colónica. Enfermedad que afecta al ileon terminal y a cualquier parte del intestino grueso.
- L4: Gastrointestinal alta. Cualquier afectación proximal a ileon independientemente de que exista afectación de ileon terminal o colon.
- B1: No obstructivo no fistulizante (Inflamatorio). Presencia de úlceras, sin observarse estenosis ni fístulas.

- B2: Obstructivo (Fibroestenósante). Se caracteriza por la disminución del calibre de la luz intestinal sin evidencia de fistulas y en ausencia de actividad.
- B3: Fistulizante (Penetrante). Se caracteriza por la presencia de fistulas perianales o intraabdominales, así como masas o abscesos en el curso de la enfermedad.

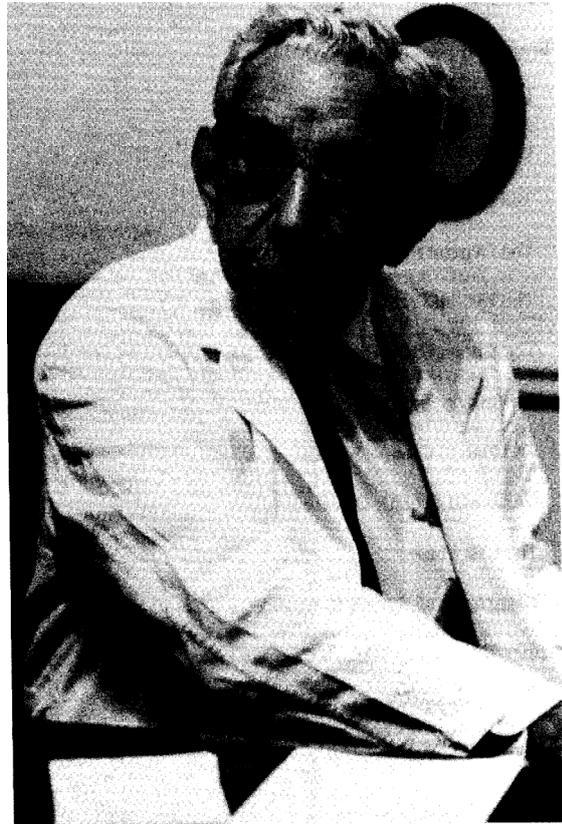
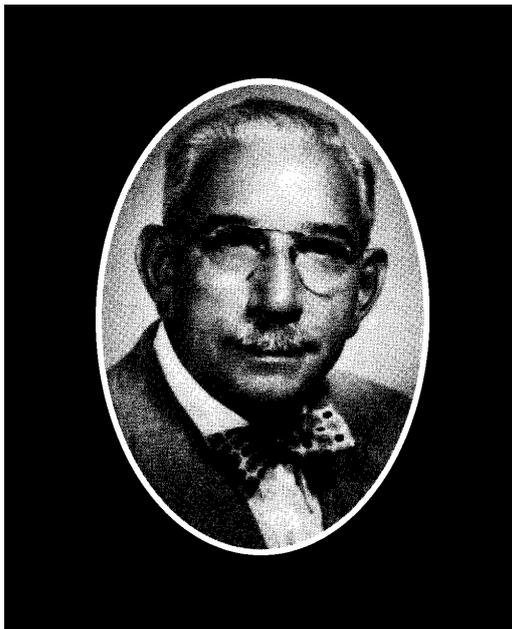
En los últimos meses, se ha realizado una modificación de la Clasificación de Viena, la llamada Clasificación de Montreal, renombrada así por haber sido discutida durante el Congreso Mundial de Gastroenterología celebrado en octubre de 2005 en esta ciudad canadiense. La principal novedad ha sido la de dotar de una mayor importancia a la enfermedad perianal. A día de hoy no se sabe si sustituirá a la Clasificación de Viena, en mi opinión es difícil que esto ocurra, ya que basada en esta se han desarrollado un número amplísimo de estudios en los últimos 5 años, con el fin de que factores epidemiológicos y etiopatológicos, como es el presente trabajo, nos ayuden a conocer mejor el porqué del comportamiento heterogéneo de la enfermedad de Crohn.

TABLA 3: Clasificación de Viena de la enfermedad de Crohn

Extensión Anatómica	Patrón Evolutivo	Edad Diagnóstico
L1- Íleon terminal	B1- Inflamatorio	A1- <40 años
L2- Colon	B2- Estenosante	A2- >40 años
L3- Ileocolónica	B3- Penetrante	
L4- Tracto alto digestivo		

1.2. Historia

El nombre de la enfermedad de Crohn se debe a Burrill B. Crohn (Figura 2), médico del Hospital Mount Sinai de Nueva York, debido a que era el primer autor de un artículo titulado “ileítis regional” publicado en el Journal of the American Medical Association en octubre de 1932 (Figura 3). Sin embargo previamente se habían descrito casos muy similares, como explicaré a continuación.



Burrill B. Crohn, 1955

FIGURA 2: Fotografías de Burrill B. Crohn

Algunos historiadores refieren que Hipócrates de Cos (año 400 AC), en su enciclopedia médica que consta de más de 70 libros ofrece detalles clínicos que podían estar en relación con la colitis ulcerosa, que posteriormente fueron también descritos por Soranus de Éfeso (año 130) en los que se hablaba de cuadros crónicos de diarrea con sangre en gente joven.

Los historiadores británicos refieren que el rey Alfred (871-899) murió a los 20 años por un cuadro de larga evolución de dolor abdominal, pérdida de apetito y deterioro, que a posteriori algunos autores han sugerido que fuese un caso de EC.

En 1612 el patólogo alemán W.H. Fabry realizó una autopsia en un adolescente que había fallecido tras una enfermedad con fiebre y dolor abdominal, y encontró un íleon terminal engrosado y obstruido. Para algunos autores es la primera descripción de un caso de EC (10).

En el año 1769 G.B. Morgagni describió los datos de necropsias de un varón de 20 años, quien toda su vida tuvo diarrea frecuente. El cuadro previo al fallecimiento consistió en dolores intensísimos de los intestinos y expulsión de excremento sanguinolento, asimismo surgió fiebre, que desapareció en un mes. La diarrea persistió y de nuevo apareció fiebre, falleciendo el paciente a las dos semanas de aparecer este último cuadro. En la autopsia se habla de "... el vientre contenía un gran volumen de un íleon sanguinolento que manaba de los intestinos en muchos sitios, en que estaba perforado en tramos notables. Tal trayecto abarcaba la extremidad del íleon y la zona más cercana del colon en un tramo equivalente a dos anchos de mano. En esta zona los intestinos mostraban erosiones y úlceras, y su superficie interior estaba afectada de gangrena y se advertía que fácilmente podría perforarse...".

A partir de estas descripciones iniciales de "enfermedad inflamatoria intestinal granulomatosa", otros autores han ido refiriéndose a ella a través de sus experiencias médicas y quirúrgicas publicadas. En 1806 Coombe y Sanders reportaron en el Colegio Médico de Londres un caso singular de estenosis y engrosamiento del íleon y afirmaron en una posterior publicación en 1813 que "la porción baja del íleon, hasta llegar al colon, tenía un tramo de contracción de unos tres pies (90 cms), hasta alcanzar el calibre del cañón de una pluma de pavo". En 1828 Abercrombie describió el caso de

una joven de 13 años, que durante un año había tenido dolor abdominal y vómitos. En todas las capas del íleon se observó engrosamiento con úlceras y afectación del ciego y un segmento corto del colon ascendente. En 1859 S. Wilks describe un caso de una mujer embarazada con ulceraciones en intestino delgado y grueso. Este mismo autor publica en *Lectures on Pathological Anatomy* sus descripciones de varios casos en los que encuentra “varias ulceraciones sobre una base inflamatoria en el intestino delgado,...conteniendo el tramo inicial del intestino grueso el mismo tipo de lesiones, siendo uno de los sitios preferidos de localización de las ulceraciones la válvula ileocecal”. Fenwich en 1889 describió un caso de una mujer joven con una fístula intestinal que estaba comunicada con una estenosis. Sin ninguna duda en todos estos casos se nos ha descrito lo que más tarde se conocería como enfermedad de Crohn (11).

Fielding (Ir J Med Sci 1984) revisó los archivos de la Sociedad de Londres de Patología de la segunda mitad del siglo XIX y resumió que “en los hospitales de enseñanza de Londres entre 1852 y 1899 se atendieron entre 31 y 56 pacientes con enfermedad de Crohn”. Estos tenían ataque del intestino delgado, el colon, o ambos órganos.

En 1913 aparece una publicación en el *British Medical Journal*, firmada por Dalziel (cirujano de Glasgow) en la que refiere una serie de 9 casos que probablemente hubiesen padecido EC, pues padecieron de ataque del íleon, yeyuno, colon, o una combinación de los tres. En seis de ellos se practicaron métodos quirúrgicos satisfactorios, observando que el pronóstico era fatal en los casos no operados. Al describir las anormalidades de estos enfermos destacó la presencia de células gigantes, que posteriormente sería un signo importante en la descripción anatomopatológica de la EC. Dalziel afirmó que: “las asas afectadas tienen la consistencia y la lisura de una

anguila en estado de rigidez cadavérica, y las glándulas, a pesar de estar agrandadas, evidentemente no son caseosas”.

En el propio Hospital Mount Sinai se refirieron casos antes de la publicación del artículo de 1932. En este artículo titulado “ileítis regional” los autores B. Crohn, L. Ginzburg y G. Oppenheimer afirman que “pretenden descubrir en detalle clínico e histopatológico” una enfermedad de la porción Terminal del íleon que afectaba más bien a adultos jóvenes y que se caracterizaba por inflamación necrosante y cicatrizante subaguda o crónica. Las úlceras de la mucosa se acompañaban de una reacción desproporcionada del resto de la pared del intestino afectado, fenómeno que a menudo originaba estenosis de la luz de dicho órgano, acompañado con la formación de múltiples fístulas”. Describieron una serie de 14 enfermos, casi todos jóvenes adultos; el menor tenía 17 años y sólo dos superaban los 40 años. Todos habían sido operados por Berg, cirujano en jefe de vías gastrointestinales del mismo hospital.

La adopción del término de Crohn es una historia curiosa. En Europa se aceptó el término casi inmediatamente después de la publicación del artículo, sin embargo, en Estados Unidos ha prevalecido también el término de enteritis regional, al entender los médicos americanos que Crohn no descubrió la enfermedad, sino que fue el primer autor de un trabajo realizado en el Hospital Mount Sinai. Actualmente, para evitar problemas de nomenclatura, existe unanimidad para el uso de este epónimo para definir la patología. Cuestión aparte sería si el cirujano Berg no hubiese rehusado participar en el artículo, ya que su nombre hubiese sido el primero por orden alfabético.

Burrill B. Crohn nació en el año 1884 en New York, en una familia con grandes raíces judías, sus abuelos paternos eran de origen polaco y alemán, siempre ejerció su profesión en el Hospital Mount Sinai, en sus primeros años como gastroenterólogo se dedicó al estudio del páncreas, hasta que se dedicó al estudio de las enfermedades

intestinales, ejerció su profesión hasta los 91 años, habiendo publicado más de 150 artículos de alto nivel, falleció en el año 1983 (12).

Desde 1932 se publicaron más artículos que describían casos de sujetos con la enfermedad, aumentando de manera considerable la incidencia de la enfermedad como se expondrá en el capítulo de epidemiología.

En los siguientes años se produjeron avances relevantes en la enfermedad, así Kantor describió el clásico signo radiológico de la cuerda, Hadfield publicó los hallazgos anatomopatológicos definitivos, y progresivamente se fueron descubriendo y publicando las afectaciones duodenales, gástricas y esofágicas de la enfermedad.

La mayor publicidad y difusión de la misma se produjo en 1956, cuando el presidente Eisenhower de Estados Unidos fue operado por obstrucción intestinal aguda como consecuencia de EC, que había sido diagnosticada unas pocas fechas antes.

Desde aquella primera publicación, ha persistido un gran interés de los médicos por la enfermedad, al introducir la clave enfermedad de Crohn en el MEDLINE se encuentran 18815 artículos a día de hoy, cuando en este mismo buscador médico se limita al año 2004, se observan 886 artículos publicados durante dicho año. Esta enfermedad continúa en auge, siendo cada vez más el número de jóvenes investigadores que nos dedicamos a la misma; como ejemplo, en la reciente Digestive Digestive Week (DDW) celebrada entre el 14 y el 19 de mayo de 2005 en Chicago se presentaron alrededor de 300 trabajos originales exclusivamente sobre esta enfermedad.

En España han destacado los trabajos de Marina Fiol, que a principio de los años 50 define muy claramente para la época las características clínicas, histológicas y radiológicas de la enfermedad, diferenciando entre unas formas “malignas” con estenosis y fistulas y otras “benignas” sin dichas complicaciones. En 1955 Julio Monereo comunica en el Congreso Español de Patología Digestiva celebrado en

Santiago de Compostela los resultados operatorios de 59 casos de enfermedad de Crohn que intenta relacionar histología y anatomía patológica con el pronóstico de supervivencia, así como establecer unas recomendaciones quirúrgicas.

Los estudios sobre esta enfermedad se han ido multiplicando en los últimos años en nuestro país, recientemente se ha creado el grupo Español de Trabajo de Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa (GETECCU) que engloba a los gastroenterólogos y cirujanos interesados en estas enfermedades y que promueve estudios a nivel nacional.

En Galicia, a nivel histórico cabe destacar los estudios epidemiológicos realizados por los doctores V. Ruiz Ochoa y J. Potel, pioneros en nuestra comunidad, que, como se expondrá a continuación, proporcionan unos datos de vital importancia para el conocimiento del desarrollo de la EC en nuestra comunidad.

VOLUME 99
NUMBER 16

REGIONAL ILEITIS—CROHN ET AL.

1323

REGIONAL ILEITIS
A PATHOLOGIC AND CLINICAL ENTITY
BURRILL B. CROHN, M.D.
LEON GINZBURG, M.D.
AND
GORDON D. OPPENHEIMER, M.D.
NEW YORK

We propose to describe, in its pathologic and clinical details, a disease of the terminal ileum, affecting mainly young adults, characterized by a subacute or chronic necrotizing and cicatrizing inflammation. The ulceration of the mucosa is accompanied by a disproportionate connective tissue reaction of the remaining walls of the involved intestine, a process which frequently leads to stenosis of the lumen of the intestine, associated with the formation of multiple fistulas.

The disease is clinically featured by symptoms that resemble those of ulcerative colitis, namely, *fever, diarrhea and emaciation*, leading eventually to an obstruction of the small intestine; the constant occurrence of a mass in the right iliac fossa usually requires surgical intervention (resection). The terminal ileum is alone involved. The process begins abruptly at and involves the ileocecal valve in its maximal intensity, tapering off gradually as it ascends the ileum orally for from 8 to 12 inches (20 to 30 cm.). The familiar fistulas lead usually to segments of the colon, forming small tracts communicating with the lumen of the large intestine; occasionally the abdominal wall, anteriorly, is the site of one or more of these fistulous tracts.

The etiology of the process is unknown; it belongs in none of the categories of recognized granulomatous or accepted inflammatory groups. The course is relatively benign, all the patients who survive operation being alive and well.

Such, in essence, is the definition of a disease, the description of which is based on the study, to date, of fourteen cases. These cases have been carefully observed and studied in their clinical course; the pathologic details have resulted from a close inspection of resected specimens from thirteen of fourteen patients operated on by Dr. A. A. Berg.

RELATIONSHIP OF REGIONAL ILEITIS TO OTHER BENIGN INTESTINAL PROCESSES

There exists in the medical literature a heterogeneous group of benign intestinal lesions which have now and then been described under the caption of "benign granulomas." The latter loose term covers a multiplicity of conditions in which both large and small intestines may be involved; it includes all chronic inflammatory lesions of the intestine whose etiology is either unknown or attributable to an unusual physical agent. It represents a *hodge-podge or melting-pot* in which are thrown all those benign inflammatory intestinal tumors which are neither neoplastic nor due to a specific bacterial agent. Within this group one finds descriptions of foreign body tumors, chronic perforating lesions with gross inflammatory reactions, traumas of the mesentery with intestinal reactions, Hodgkin's granuloma, a late productive reaction to released strangulated hernias of the intestinal wall and numerous other and similar conditions. The so-called benign granulomas all present a tumor-like inflammatory mass which usually simulates carcinoma

From the Mount Sinai Hospital.
Read before the Section on Gastro-Enterology and Proctology at the Eighty-Third Annual Session of the American Medical Association, New Orleans, May 13, 1932.

FIGURA 3: Página principal de la revista JAMA en la que B. Crohn describió la ileítis regional

1.3. Epidemiología

La epidemiología de las enfermedades intestinales crónicas ha sido uno de los grandes campos de estudio de estas entidades durante muchos años, al igual que ocurre con otras áreas de conocimiento relacionadas con estas enfermedades, durante mucho tiempo ha sido muy difícil establecer diferencias (y aún continúa siéndolo en la actualidad) entre la CU y la EC, porque prácticamente todos los datos aportados se referían a ambas entidades en común, sin embargo, dado que mi trabajo se ha realizado exclusivamente con pacientes con EC, intentaré centrarme en los datos exclusivos de esta entidad.

Al realizarse un estudio epidemiológico siempre se han buscado varios aspectos interrelacionados, el principal es “medir” la magnitud del problema en un área geográfica determinada, pero suelen tener otros dos objetivos más difíciles de extrapolar, como son ver la influencia de las características específicas ambientales en la frecuencia de la enfermedad, y, aportar posibles pistas sobre la etiología de la enfermedad.

El presente trabajo consiste en conocer las principales características genéticas de una población, en un contexto geográfico muy determinado, con sus propias características epidemiológicas, por ello es de vital importancia entender la gran heterogeneidad geográfica y étnica de estas entidades, para poder entender la aplicación clínica de las características genéticas del trabajo, y así solamente extrapolar a otras poblaciones alguno de los resultados obtenidos.

Epidemiología descriptiva:

Incidencia: (es el número de casos nuevos de la enfermedad en un período determinado de tiempo, generalmente un año). Se ha descrito un importante aumento de la incidencia de la EC en los países más desarrollados, de este modo se observó una alta

incidencia de la misma en el norte de Europa en comparación con los países más meridionales. Esta diferencia se ha denominado durante años gradiente Norte-Sur; sin embargo, en los años más recientes, con la llegada, y por tanto el igual acceso, a las técnicas diagnósticas más avanzadas, se ha visto que estas diferencias son cada vez menores, con una tendencia futura a igualarse entre todos los países desarrollados. Otra característica es que en los últimos años parece que la incidencia de la enfermedad de Crohn tiende a igualarse con la de colitis ulcerosa.

En la tabla 4 se exponen los datos de incidencia de EC de varias regiones del mundo, con sus respectivas referencias; además de las diferencias debido a los factores ambientales, debe tenerse en cuenta la que no todos los estudios tienen la misma definición de enfermedad.

En cuanto a nuestra población de estudio, Galicia, los únicos datos de incidencia que existen son del área de Vigo (26,27), donde la incidencia de EC pasó en 10 años de 0,8 a 5 por 100.000 habitantes.

Prevalencia: Es la proporción de individuos de una población que presentan el evento en un momento, o periodo de tiempo, determinado. En los procesos crónicos, como es el caso de la EC, la prevalencia suele exceder considerablemente las cifras de incidencia. Al igual que en la incidencia se ha observado una gran variabilidad geográfica como se observa en la tabla 5.

Mortalidad y morbilidad: Clásicamente se ha asumido que la EC es una enfermedad de baja mortalidad pero de alta morbilidad. Existe una gran discrepancia entre estudios, así mientras que algunos como el de Palli et al (29) refieren que en estos pacientes está aumentada la mortalidad, en otros no se observan diferencias con respecto a la población general, como ocurre en un estudio danés (30) con un gran diseño. La morbilidad es muy difícil de estudiar porque no existen medidas estándar. La

EC presenta una gran implicación socioeconómica al ser una enfermedad crónica en pacientes jóvenes, con un gran número de hospitalizaciones; en un estudio canadiense (31) se observó el doble de desempleo en estos pacientes que en la población general.

TABLA 4: Incidencia de Enfermedad de Crohn (EC) en distintas áreas geográficas

AUTOR (REFERENCIA)	LOCALIZACIÓN	INCIDENCIA DE EC (*)
Stowe et al (13)	USA	3.9
Bernstein et al (14)	Canadá	14.6
Bjornsson et al (15)	Islandia	5.5
Moum et al (16)	Noruega	5.8
Rubin et al (17)	Reino Unido	8.3
Russel et al (18)	Holanda	6.9
Gower – Rousseau et al (19)	Francia	4.9
Maté – Jimenez et al (20)	España	1.6
Vucelic et al (21)	Croacia	0.7
Tragnone et al (22)	Italia	2.3
Odes et al (23)	Israel	4.2
Morita et al (24)	Japón	0.5
Linares de la Cal et al (25)	Panamá	0

(*) Casos por 100.000 personas – año.

TABLA 5: Prevalencia de Enfermedad de Crohn en distintas áreas geográficas

AUTOR (REFERENCIA)	LOCALIZACIÓN	PREVALENCIA DE EC
Pinchbeck et al (28)	USA	44.4
Bernstein et al (14)	Canadá	198.5
Rubin et al (17)	Reino Unido	144
Maté – Jimenez et al (20)	España	19.8
Vucelic et al (21)	Croacia	8.3
Odes et al (23)	Israel	50.6
Morita et al (24)	Japón	5.8

Raza: Clásicamente se han descrito dos etnias con comportamiento antagónico: la raza negra con una incidencia mínima y la raza judía con elevada influencia, sin embargo los últimos estudios realizados en California (USA) (32) y Derby (Reino Unido) (33) no han mostrado diferencias de incidencia entre blancos y negros (tanto afroamericanos como afrocaribeños). Sin embargo no se ha visto un crecimiento tan exponencial de la incidencia de la enfermedad en otras minorías como pueden ser los hispanos y los asiáticos (32). Hoy en día los estudios publicados siguen mostrando una mayor prevalencia de la enfermedad entre los judíos, así en un estudio llevado a cabo en el sur de Gales se observó que el riesgo de desarrollar EC era entre 5 y 8 veces mayor entre judíos que entre no judíos (34). Incluso entre judíos existen diferencias geográficas según su origen y el país donde residan. Este tema de la variación geográfica y racial será tratado de nuevo con mayor profundidad cuando hablemos de la

epidemiología genética, y también será objeto de comentarios en la discusión de los resultados obtenidos en este trabajo.

Sexo: A pesar de que generalmente no se relacionan estas enfermedades con ningún sexo en particular, en la gran mayoría de los estudios la proporción de mujeres es superior a los hombres con EC, así se describió que en la mayoría de los estudios la proporción de mujeres varía entre el 50 y el 65% (35).

Edad: La enfermedad de Crohn (EC) es más común entre la gente joven, suele diagnosticarse al final de la adolescencia o al principio de la edad adulta; al contrario de lo que ocurre con la colitis ulcerosa, en la EC no se observa un segundo pico de edad más tardío en el diagnóstico de la misma.

Rural/Urbano: Los estudios sobre las diferencias rural y urbana de esta enfermedad nos pueden proporcionar pistas sobre su etiología (polución, alimentos...). La gran mayoría de los estudios, aunque no todos, han descrito que la EC es más común en las áreas urbanas, es cierto que estos estudios admitieron sesgos-críticas razonables tales como el mayor acceso de la población urbana a los hospitales y, en general a todos los ámbitos de la salud. Sin embargo, en Suecia, donde se realiza un registro nacional, y todas las personas tienen un igual y libre acceso a la sanidad se ha descrito que la EC es más común en las áreas urbanas (36).

Estos tres últimos puntos han sido incluidos en el estudio genético realizado, tanto en pacientes como en controles, con el fin de poder establecer algún tipo de relación de los mismos con los factores genéticos estudiados. Se ha prestado especial interés en el origen rural o urbano de los pacientes y me he remontado también al origen rural-urbano de los padres para establecer un mayor control de estos datos al compararlo con los datos genéticos analizados.

Factores de riesgo:

En un trabajo como este, que estudia la influencia de una serie de mutaciones genéticas en el riesgo de desarrollar EC, no se puede dejar de clarificar que se espera que los resultados solo justifiquen la EC en un porcentaje de los casos, además el propósito final del mismo es valorar la influencia de las mutaciones en las distintas formas clínicas de la enfermedad. Con todo ello se asume que puedan existir otros factores de riesgo para el desarrollo de la EC, pero son tantos los estudios que se han llevado o se están llevando a cabo en el ámbito de descubrir probables factores de riesgo para esta entidad, que solo nombrarlos sería innumerable, así que en las siguientes líneas haré un resumen de los más importantes, con su correspondiente justificación con estudios de la literatura.

Dieta: El gran caballo de batalla con el que nunca se han extraído conclusiones relevantes; como consecuencia de las previamente descritas diferencias geográficas se intentó relacionar algunos tipos de comida con el desarrollo de EC; los estudios más extensos han relacionado la EC con un mayor consumo de hidratos de carbono refinados (37), mientras que con la comida rápida ni con los lácteos se han encontrado asociaciones.

Anticonceptivos orales: Existen múltiples estudios con diferentes resultados, sin embargo en el único meta-análisis publicado (38) concluyen que el uso de anticonceptivos se asocia con un discreto riesgo de desarrollar EC.

Tabaco: Múltiples estudios han demostrado que fumar aumenta el riesgo de desarrollar EC. En los meta-análisis publicados se ha observado que los fumadores tienen el doble de riesgo de desarrollar la enfermedad (39). La asociación parece ser mayor en mujeres; no parece haber causa dosis respuesta. Los ex-fumadores también parecen tener un riesgo aumentado con respecto a la población normal, aunque menor

que los fumadores actuales. Claramente se ha implicado el tabaco con un peor curso evolutivo de la EC (peor respuesta a terapias biológicas, mayor necesidad de cirugía, etc...). En el presente estudio se han incluido los hábitos tabáquicos (fumador actual, ex-fumador) tanto en los pacientes como en controles, con el fin de poder relacionar el, hasta ahora, único factor de riesgo demostrado, con las mutaciones genéticas estudiadas.

Otros factores de riesgo estudiadas son la apendicectomía, el sarampión, las vacunaciones, los antiinflamatorios no esteroideos, las alergias, etc...; aunque muchas de las evidencias son solo debidas a artículos aislados, que, en la mayoría de los casos deberán ser confirmadas en el futuro.

1.4. Fisiopatología integrada

La enfermedad de Crohn (EC) es el resultado de la interacción de una serie de acontecimientos que incluyen la predisposición genética a padecer la enfermedad, la exposición a factores ambientales, y la flora intestinal, pudiéndose incluir factores infecciosos (40). Estos predisponentes entrarían en acción debido a la acción de un desencadenante, cuya naturaleza se desconoce, que conduciría a la activación de sistemas de defensa inmune y no inmune en el intestino (figura 4). Una vez activados, ambos sistemas intercambiarían señales, por acción de mediadores solubles y moléculas de adhesión celular, de tal forma que el resultado de estas interacciones celulares y moleculares sería la producción de una gran cantidad de moléculas activas (citokinas, neuropéptidos, factores de crecimiento, enzimas...) cuya acción combinada produciría inflamación intestinal y daño tisular (41).

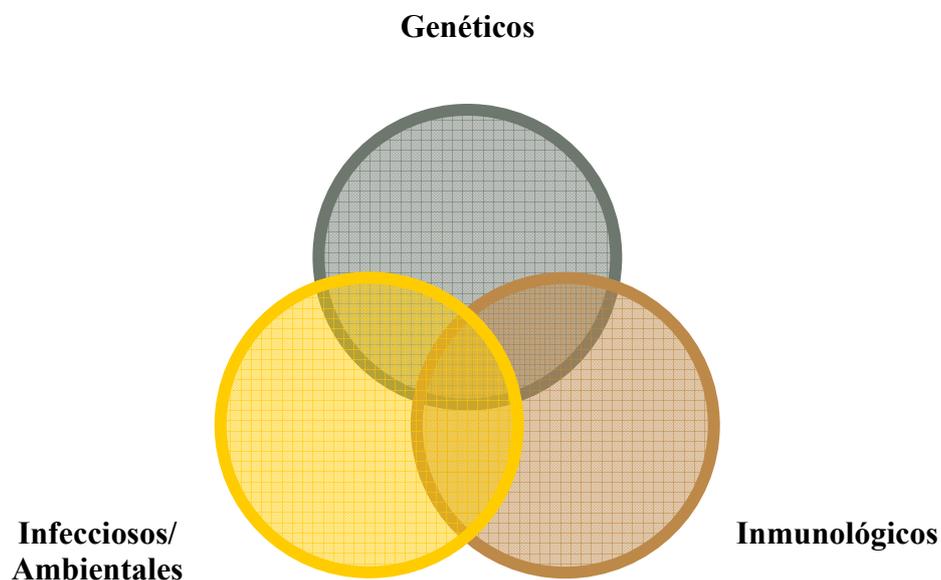


FIGURA 4: Patogénesis de la enfermedad de Crohn. Interacción de los factores genéticos, ambientales/infecciosos

En la epidemiología se han abordado algunos de los factores ambientales que pueden ayudar a explicar mejor la gran heterogeneidad de esta enfermedad. En cuanto a los factores genéticos serán abordados en profundidad en el siguiente capítulo.

Factores microbianos:

Uno de los grandes campos de estudio desde siempre en la EC son los factores infecciosos y microbianos, desde hace muchos años se ha intentado relacionar la enfermedad de Johne, que es una inflamación crónica del intestino con presencia de granulomas cuyo agente causal es el *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP) y que se presenta en el ganado vacuno. Esta entidad guarda una gran similitud con la EC de los humanos. En los últimos años se han presentado evidencias de asociación entre MAP y EC (42,43), aunque no han sido corroborados en todas las poblaciones, incluida la nuestra (44,45).

Actualmente, el papel de los agentes microbianos en la patogenia de la EC debe buscarse más en la flora normal. En condiciones normales, existe una interacción fisiológica recíproca entre la la flora entérica normal y el sistema inmune de la mucosa. Durante una de las infecciones intestinales que podemos considerar como habituales (salmonelosis o shigelosis) se produce una interacción patológica entre una flora intestinal anormal y un sistema inmune de la mucosa que responde adecuadamente mediante un proceso inflamatorio autolimitado. En la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), sin embargo, nos encontramos con una situación en que una flora intestinal normal produce una respuesta inmune mucosa anormal en el huésped, lo cual conduce a un proceso patológico que se expresa como una inflamación crónica del tracto gastrointestinal (46).

Por otra parte existe una evidencia acumulada de la flora intestinal es un requisito fundamental para desarrollar EII. Así, para que se desarrolle una “colitis

espontánea” en ratas y ratones con una deficiencia genética de determinadas citocinas (Interleukina (IL)-2, IL-10) o en los modelos de transfección de células inmunes, se requiere de la flora luminal; la colitis no se desarrolla en ninguna de las cepas de animales mutantes cuando se mantienen en ambientes libres de gérmenes, pero sí cuando son colonizados por bacterias comensales (47).

Existen otros factores que ayudan a corroborar la influencia microbiana en el desarrollo de la EC, como es el hecho comprobado de que algunos antibióticos de amplio espectro como el metronidazol y el ciprofloxacino han demostrado su eficacia en el tratamiento de algunos subgrupos específicos de pacientes con EC (48-50). En los últimos años se han estado empleando tratamientos con prebióticos y probióticos (suplemento dietético con microorganismos vivos que tienen un efecto beneficiosos sobre el huésped al mejorar su equilibrio bacteriano) en un amplio número de situaciones en las enfermedades inflamatorias, aunque su desarrollo final y, por consiguiente, su aplicabilidad en la práctica clínica diaria aún no está totalmente aceptada por todos los clínicos, salvo en algunas condiciones especiales como puede ser la reservoritis o “pouchitis” (51).

Factores inmunológicos:

En el intestino existen un gran número de tipos de células inmunes que constituyen el sistema inmunológico; entre ellas se incluyen los linfocitos T, los linfocitos B, eosinófilos, basófilos, mastocitos, monocitos y neutrófilos. Hasta hace pocos años en que la genética molecular ha hecho su gran aparición, el sistema inmune había sido el gran campo de estudio en la patogenia de la EC.

En algunas ocasiones estos estudios han ayudado al desarrollo de potenciales herramientas diagnósticas, así la detección de pANCA (anticuerpos anticitoplasma de

los neutrófilos) en combinación con los ASCA (anticuerpos anti-*saccharomyces cerevisiae*) puede ser de utilidad en el diagnóstico diferencial entre la EC y la CU (52).

Recientemente se han conseguido caracterizar una serie de alteraciones en el control de la respuesta inmune que ocasionan una amplificación de la misma ante determinados estímulos, resultando un daño tisular y alteraciones de la función intestinal. Los pacientes con EC, y en menor grado los afectados de CU, tienen en la mucosa intestinal una mayor concentración de interleuquina-1 (IL-1). Los pacientes con EC presentan también una activación de los linfocitos T_{H1} , lo cual resulta en una mayor producción de IL-2 y interferón gamma (IFN- γ), mientras que los pacientes con CU muestran unos niveles normales de estas citoquinas, con activación de las derivadas de los linfocitos T_{H2} (IL-4, IL-10) (53). Diversos factores, entre los que se encuentran la IL-1 y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) producen una amplificación de la respuesta inflamatoria, estimulando la producción de citoquinas y metabolitos del ácido araquidónico y la liberación de proteasas por parte de los macrófagos, neutrófilos, células musculares lisas y células endoteliales. Tanto la IL-1 como el TNF- α y el IFN- γ incrementan la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y en las células inmunes circulantes, resultando en la adhesión de neutrófilos, monocitos, linfocitos y eosinófilos a las células endoteliales de las vénulas del intestino, con posterior migración hacia el intersticio (54). Los productos solubles liberados por los fagocitos activados, los linfocitos y los fragmentos terminales del complemento son los mediadores de la necrosis celular y de la destrucción de la matriz proteica del tejido que resulta en la aparición de ulceraciones. Por otra parte, las citoquinas y algunos factores de crecimiento producidos en el intestino inflamado estimulan la proliferación de células mesenquimales y la síntesis de colágeno, conduciendo a la fibrosis y formación de estenosis.

Entre todos estos factores, TNF- α se ha incluido claramente como uno de los mediadores claves en la patogénesis de la EII, basándose en la gran eficacia de la terapia con anticuerpos anti-TNF- α en el tratamiento de la EC refractaria y fistulizante (55). Muchas de las propiedades biológicas de TNF- α sobre el intestino son relevantes en la inflamación de la mucosa; los primeros datos se obtuvieron en modelos experimentales animales, donde se observó que en la colitis de las ratas tras ser tratadas con anticuerpos anti-TNF- α se producía una mejoría tanto sintomática como histológica (56). A pesar de los efectos beneficiosos de la terapia con anticuerpos anti-TNF- α en los modelos animales de inflamación intestinal, los estudios clínicos que miden los niveles de TNF en la sangre o en tejido lesionado han generado resultados un poco más controvertidos, pues en algunos de ellos no se han descrito niveles incrementados de TNF (57).

El principal objetivo de intentar comprender o al menos acercarse a la comprensión de la patogenia de esta compleja enfermedad es que esto pueda incidir en el tratamiento de la misma. Durante años los principales tratamientos de esta enfermedad habían sido los aminosalicilatos y los córticoesteroides, previamente se han nombrado la eficacia de los antibióticos y el prometedor futuro de los probióticos; sin embargo el gran avance en el tratamiento de la EC en los últimos años, los fármacos inmunosupresores y, fundamentalmente las terapias biológicas (anticuerpos anti-TNF α) se han desarrollado en relación directa con los avances en la etiopatogenia.

1.5. Genética en la enfermedad de Crohn

1.5.1. Introducción

La etiología de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), tanto la enfermedad de Crohn (EC), como la colitis ulcerosa (CU), continúa siendo uno de los grandes campos de estudio de estas enfermedades. Son numerosos los factores etiológicos (fundamentalmente ambientales, infecciosos y genéticos) que se han intentado implicar en estas enfermedades, aunque hoy en día todavía existen pocos resultados concretos, por lo que el modelo de la influencia multifactorial con complejas interacciones entre los distintos factores constituye actualmente la principal teoría etiopatogénica. En los últimos años, numerosos hallazgos sugieren que los factores genéticos están implicados en la predisposición a sufrir una EII, presentando una mayor importancia en la EC que en la CU. La búsqueda de los genes implicados es difícil porque la EC no es una entidad única, son un grupo de trastornos heterogéneos, tanto en la localización como en sus formas clínicas. Teniendo en cuenta que la EC pertenece al grupo de trastornos poligénicos complejos, la teoría etiopatogénica más actual es que la EC sería el resultado de la interacción de los factores ambientales e inmunológicos en sujetos genéticamente predispuestos.

Hasta hace poco tiempo las pruebas sobre la función de la herencia en EC provenían de datos indirectos y fundamentalmente de la epidemiología genética. En los últimos años se han identificado una serie de genes candidatos, aunque el principal ha sido el gen NOD2/CARD15, descubierto en el año 2001 por dos grupos independientes (58,59), que se ha asociado con la EC, del que se hablará en profundidad, intentando establecer su relación con las formas clínicas de la enfermedad. Otro área de estudio actual es la farmacogenética; se ha comprobado que los genes interfieren con las rutas

metabólicas de los fármacos, pudiendo influir en su toxicidad y en la respuesta clínica a los mismos.

1.5.2. Epidemiología genética

En 1934 Crohn y sus colaboradores describieron la primera agregación familiar en esta enfermedad, fundamentando la primera base genética de la misma. Desde entonces múltiples investigadores han confirmado que las enfermedades inflamatorias intestinales, fundamentalmente la EC, se asocian a un componente familiar. Las principales líneas de investigación que se han realizado en el ámbito de la epidemiología genética han sido los estudios de las diferencias étnicas de prevalencia, las asociaciones con otros síndromes de origen claramente genético, los estudios realizados en gemelos, y, fundamentalmente, los estudios de agregación familiar. En el ámbito de la epidemiología genética la mayoría de los estudios se han realizado conjuntamente en EC y CU, siendo muy difícil en algunos casos extrapolar datos concretos sobre la EC.

Diferencias étnicas:

En el capítulo de epidemiología ha quedado de manifiesto la gran variedad existente entre los datos de incidencia y de prevalencia en las distintas áreas geográficas, aunque tras un análisis más detallado lo que se observa es que lo que los estudios han confirmado es una gran variación en la prevalencia entre los distintos grupos étnicos, siendo más elevada en los caucásicos.

Las tasas de prevalencia de los estudios realizados en Estados Unidos (país desarrollado con sociedad más multirracial), casi siempre han mostrado una menor prevalencia de EC entre razas no caucásicas que en caucásicos. Así en un estudio poblacional realizado en California se observó que la prevalencia de EC en caucásicos era 43.6, 29.8 en afro-americanos, 4.1 en hispanos, y de 5.6 en asiáticos (60). Un

reciente estudio realizado en niños afro-americanos de Georgia mostró una incidencia de 7-12/100.000 (61), lo que sugiere que la prevalencia está aumentando en estos grupos. Otro estudio mostró que los jóvenes de origen asiático nacidos en el Reino Unido tenían un riesgo de padecer EII muy superior al de sus países de origen y al de la gente que hubiese emigrado de mayor (62).

Resulta de especial interés la alta prevalencia de EC en la etnia judía. Los judíos tienen una prevalencia de la enfermedad entre 2 y 9 veces superior a los caucásicos no judíos (63), independientemente de la localización geográfica. El mayor riesgo se ha observado entre los judíos Ashkenazi (originarios de Europa Central y del Este), en comparación con los judíos orientales Sefardíes (64). Se ha sugerido que esta mayor prevalencia en estas sociedades muy heterogéneas (son raros los matrimonios con miembros de otras etnias) sería como consecuencia de una predisposición genética más fuerte (65).

Agregación familiar:

El principal factor de riesgo para desarrollar EII es tener un familiar afectado (66). Como veremos a continuación, los familiares de primer grado, fundamentalmente los hermanos son los de mayor riesgo, aunque este puede extenderse en menor grado a familiares más lejanos. Sin embargo el verdadero riesgo familiar de la EC es muy difícil de cuantificar; los estudios de los centros de referencia tienden a magnificar los datos con respecto a otros hospitales. Otro problema es que en muchas ocasiones el grado de afectación familiar varía de unos estudios a otros (67).

Los mayores porcentajes de familiares de primer grado afectados se han visto en los estudios americanos, probablemente por una mayor proporción de población judía y por una mayor centralización de los casos graves (68,69). En cambio, los estudios suecos, que por su sistema de salud totalmente codificado abarcan todo tipo de

hospitales, muestran uno de los porcentajes más bajos de familiares afectados de EC (70). En la tabla 6 se muestran los resultados algunos de los estudios más relevantes sobre la afectación de familiares de primer grado con EC.

TABLA 6: Estudios de familiares de primer grado con enfermedad de Crohn (EC)

AUTOR (REFERENCIA)	POBLACIÓN	Nº PACIENTES	%FAMILIARES DE PRIMER GRADO CON EC
Farmer et al (68)	USA	522	15.1
Bayless et al (69)	USA	554	12.2
Monsen et al (70)	Suecia	1048	6.9
Freeman et al (71)	Canadá	1000	8.7
Carbonnel et al (72)	Francia	1316	7.5
Peeters et al (73)	Bélgica	640	13.6
Probert et al (73)	Reino Unido	424	9.4
Weterman et al (75)	Holanda	400	8
Halme et al (76)	Finlandia	257	10.9

En los estudios familiares, se ha comprobado que los familiares de primer grado con un mayor riesgo son los hermanos (65,77,78), en estos estudios se comprobó una vez más que el riesgo es mayor en EC que en CU.

Uno de los grupos de familiares más difícil de estudiar es el de la descendencia, fundamentalmente porque debido a la temprana edad del diagnóstico de los pacientes, en un gran número de casos sus hijos no han alcanzado la edad suficiente para presentar síntomas de la enfermedad. Esta circunstancia ha provocado que las cifras actuales en la literatura sean muy dispares, con riesgos relativos que varían desde 2 a 30 (74, 79). En

los anecdóticos e inusuales casos descritos de un hijo nacido de ambos progenitores con EC, se ha descrito una posibilidad del 33% de desarrollar la enfermedad (80). En los casos más comunes, de un solo padre con EC, el riesgo es sustancialmente menor, curiosamente estos pacientes también tienen un mayor riesgo de desarrollar otra E.I.I que no sea EC. En un estudio se ha un mayor riesgo en las hijas (12.6%) en comparación con los hijos varones (7.9%) (73).

Los padres de los hijos con EC son claramente, de entre los familiares de primer grado, el grupo con un menor riesgo para desarrollar la enfermedad. Los riesgos relativos en EC son de 12 a 16 (74), muy similares a los descritos en CU. Solamente se ha observado un ligero mayor riesgo en la etnia judía (81).

El riesgo de familiares de segundo grado (tíos, sobrinos, abuelos...) y tercer grado (primos) no ha sido estudiado en profundidad, aunque los pocos datos de la literatura sugieren un ligero incremento con respecto a la población general.

Una vez confirmado que existe una importante agregación familiar en la EC, es muy importante saber si existe una concordancia entre los miembros de la misma familia con la enfermedad y los distintos fenotipos de la misma. La gran dificultad para establecer estas comparaciones es que en el momento de realizarse la mayoría de los estudios no existía un estándar común o una clasificación reglada de los distintos fenotipos de la EC. En este ámbito, la utilización de la clasificación de Viena (9) ha supuesto un gran avance para posteriores estudios.

Las características fenotípicas que se han estudiado con mayor profundidad son la edad de debut de la enfermedad, la localización, el patrón evolutivo o comportamiento, las manifestaciones extraintestinales y la necesidad de cirugía. En cifras globales se observa una gran concordancia entre familiares con EC, con tasas que varían del 78 al 100% (67,82).

En un estudio reciente que utilizaba la Clasificación de Viena, Halme y colaboradores (76) demostraron una mayor frecuencia de enfermedad puramente ileal en los casos de EC familiar. Dos de los principales estudios familiares en EC (77,78) establecieron unas concordancias cercanas al 80% tanto en localización como en comportamiento de la enfermedad.

Dos estudios han reportado una alta tasa de concordancia en cuanto a la presencia de manifestaciones extraintestinales (67-80%) (77, 83). En nuestro medio no hemos observado relación entre la historia familiar de EC y el desarrollo de manifestaciones extraintestinales (84).

Anticipación:

El término anticipación describe un fenómeno genético que consiste en que aumenta la severidad de la enfermedad y disminuye la edad de diagnóstico de la misma según las distintas generaciones hayan ido padeciendo la enfermedad. Este fenómeno, muy característico de otras enfermedades como la corea de Huntington o la ataxia de Friedrich's, se ha intentado demostrar en la enfermedad a estudio. Aunque debe tenerse en cuenta que la EC es una enfermedad poligénica, mientras que las otras en las que se ha descrito la anticipación son enfermedades monogénicas.

El primer autor en confirmar la anticipación en la EC fue Polito (85) que en un grupo de 59 familias describió 15 años de diferencia media en el diagnóstico de los hijos con respecto a los padres, siendo además el 91% de los hijos diagnosticados antes. En los hijos también observó una enfermedad más extensa en la mayoría de los casos. Posteriormente otros estudios han confirmado el fenómeno de anticipación en cuanto a la edad de diagnóstico (86,87), aunque serán necesarios más estudios para confirmar la anticipación en cuanto a la mayor gravedad de la enfermedad.

Estudios en gemelos:

Los estudios realizados en gemelos han sido un método eficaz para evaluar el papel relativo de los factores genéticos y ambientales. Desde los años 80 se han reportado casos de concordancia de EC entre gemelos, sin embargo existen pocos estudios poblacionales; los principales son un estudio británico (88), otro danés (89) y otro sueco, recientemente actualizado (90), cuyos datos globales se expresan en la tabla 7.

TABLA 7: Resumen de los grandes estudios con gemelos

POBLACIÓN	E.C MZ	E.C. DZ	C.U MZ	C.U DZ
Gran Bretaña (88)	5/25	3/46	6/38	1/34
Dinamarca (89)	5/10	0/27	3/21	3/45
Suecia (90)	9/18	1/26	3/16	0/20

E.C = enfermedad de Crohn MZ = monozigóticos

C.U = colitis ulcerosa DC = dizigóticos

De estos y otros estudios se puede extrapolar, desde el punto de vista práctico, una mayor influencia genética en la EC que en la CU. En la EC se observó una concordancia media de 38-40% en gemelos monozigóticos, y de un 14-16% en gemelos monozigóticos con CU. La concordancia en cuanto a gemelos dizigóticos fue del 4-6% en EC y del 2-4% en CU. En cuanto a la influencia en el fenotipo de la enfermedad se observó que los pares de gemelos con EC presentaban la misma localización de la enfermedad en el 64% de los casos, y que el 57% habían sido diagnosticados con menos de dos años de diferencia (67).

Enfermedades asociadas:

Las enfermedades inflamatorias intestinales en ocasiones se asocian con síndromes genéticamente bien definidos como son el síndrome de Turner (91), el

síndrome de Hermansky-Pudlak (92) y la fibrosis quística (93). Los pacientes con estos síndromes pueden ayudarnos a conseguir un mayor conocimiento de la susceptibilidad genética de las enfermedades inflamatorias, de hecho, la asociación de la EC con el síndrome de Turner ha sido la causa por lo que se está intentando buscar en el cromosoma X un gen de susceptibilidad para la EC (94).

También se ha observado que la EC es más común en pacientes con espondilitis (95), esclerosis múltiple (96) y enfermedad celíaca (97). Todas ellas son enfermedades de origen multifactorial con una fuerte evidencia de susceptibilidad genética y una importante influencia del sistema inmune. De todas maneras las asociaciones reportadas entre EC y otras enfermedades autoinmunes deben ser reportadas y confirmadas en estudios poblacionales.

1.5.3. Identificación de genes de susceptibilidad

Los análisis de segregación no respaldan un modelo de herencia simple (método Mendeliano) para la EII, sino que tanto la EC como la CU se consideran trastornos poligénicos complejos resultando de la contribución e interacción de varios genes, que junto a con factores medioambientales generan el fenotipo final. El número de genes de susceptibilidad que determinan la EC y como interaccionan entre ellos y con los factores medioambientales aún se desconoce.

Existen varias estrategias para identificar genes en enfermedades multifactoriales, como es el caso de la EC: la clonación posicional (basada en las técnicas de *linkage*), la estrategia del gen candidato y el estudio de *microarrays* (microseries de ADN).

El estudio del clonado posicional se basa en que se rastrea todo el genoma a través de análisis estadísticos, tales como el análisis de ligamiento (*linkage*) y en estudios de asociación intrafamiliar. Se evalúa el parecido de miembros afectos, para un gran

número de marcadores altamente polimórficos. Si se detecta un exceso de parecido, la región donde se localiza el marcador es estudiada con mayor profundidad. La mayor dificultad de este método es la falta de potencia, y que a menudo se necesitan grandes muestras para poder demostrar diferencias.

Los estudios de genes candidatos comparan las frecuencias alélicas entre pacientes portadores de la enfermedad y controles emparejados, pudiendo las diferencias apuntar a la implicación del gen en la patogénesis de la enfermedad estudiada. Esta estrategia necesita siempre de una hipótesis previa, que establezca una relación fisiopatológica entre el gen candidato y la enfermedad. Uno de los grandes problemas de estos estudios es la correcta selección de los controles (98).

En los estudios con microarrays se analiza la expresión de un gran número de genes, comparando la expresión entre grupos con diferentes enfermedades, con lo que se pueden detectar genes sobrexpresados. Ninguno de estos métodos es completo si no se demuestra una correlación entre el genotipo y el fenotipo (99).

Por otra parte, basándose en los estudios de *linkage*, se ha completado el análisis del genoma para la EII dando como resultado la identificación de un número de regiones de susceptibilidad en múltiples cromosomas (1,3,4,5,6,7,10,12,14,16,19 y X) (100). Según el orden cronológico en el que fueron descubiertos, las regiones en los cromosomas 16,12,6,14,5 se han ido nombrando desde EII1 hasta EII5, respectivamente. En el año 1997, se fundó un consorcio internacional sobre la genética de la EII para acelerar la identificación de los genes que juegan un papel en la EII. A pesar de haberse identificado un gran número de regiones de susceptibilidad para la EC en diversos cromosomas, el problema ha sido la gran dificultad para la reproducibilidad de los hallazgos entre los distintos grupos. Sin embargo, el hallazgo más relevante de la genética de la EII en los últimos años ha sido la identificación del gen NOD2/CARD15.

1.5.4. Gen NOD2/CARD15: estructura, mutaciones

En el año 1996 Hugot y cols presentaron el primer *locus* que confería susceptibilidad para la EC, al que se denominó IBD1, y estaba en el cromosoma 16 (101). Esta fue la primera piedra que ha llevado a la identificación del gen CARD15/NOD2 como el primer gen de susceptibilidad fuertemente asociado a la EC. A pesar de que, como se ha dicho previamente, el descubrimiento de este gen ha supuesto el mayor avance en la genética de esta enfermedad tan heterogénea, todavía no se conoce con certeza el papel funcional y molecular del NOD2/CARD15, ni su influencia en las distintas poblaciones y en los fenotipos de esta enfermedad. En la actualidad un gran número de centros estamos trabajando en esta área, que se encuentra en continua evolución.

La identificación y caracterización del gen NOD2, localizado en la región pericentromérica del cromosoma 16 (16q12) fue identificado en el año 2001 por dos grupos independientes utilizando dos técnicas distintas, ya previamente descritas, como son la clonación posicional (58), y la estrategia del gen candidato (59). Por su gran similitud y alta homología con un gen previamente descrito, denominado NOD1 (34% de homología) (102), se denominó en un primer momento como NOD2. El gen fue oficialmente rebautizado CARD15 por el comité de nomenclatura HUGO.

Estructura y características del gen NOD2/CARD15 normal (*wild type*)

La región promotora del gen NOD2 tiene un sitio al que se uniría el factor de transcripción nuclear kappa- β (NF- κ -B), el cual es un importante regulador de la expresión de múltiples genes involucrados en diferentes procesos inflamatorios (103,104). El gen CARD15/NOD2 tiene 12 exones codificantes, que sintetizan una proteína de 1040 aminoácidos. La estructura básica de la proteína sintetizada se divide en tres regiones (figura 5):

- La región aminoterminal con 2 dominios N-Terminales, implicados en la activación de caspasas (CARD). Este dominio ha dado nombre al gen y a su proteína.
- La región central con un dominio de unión a nucleótidos (NBD).
- La región carboxiterminal (C-terminal) con 10 secuencias repetidas ricas en leucinas (LRR), de forma similar a los dominios extracelulares de los receptores de membrana toll-like, implicados en reconocer patógenos extracelulares.

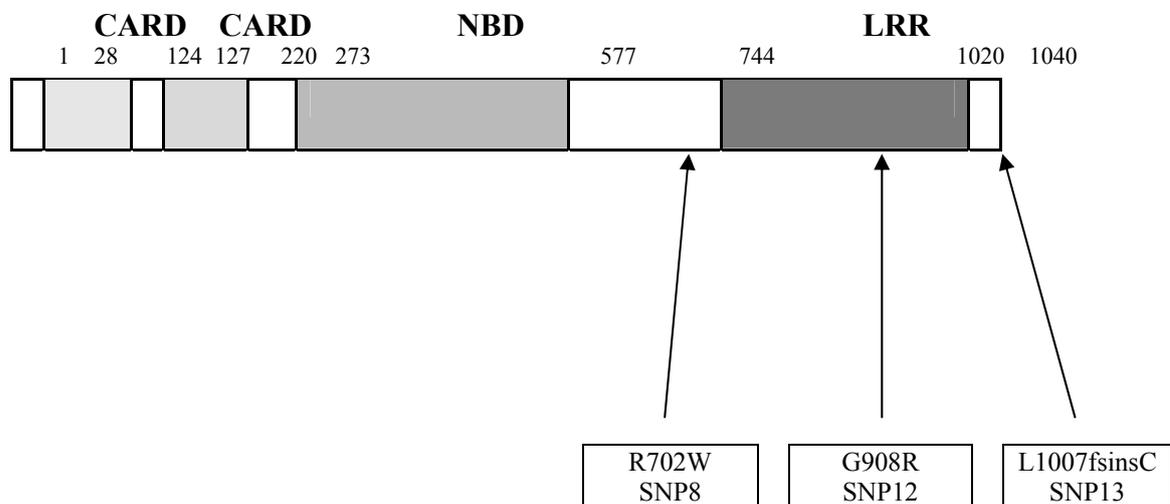


FIGURA 5: Estructura del gen NOD2/CARD15 con la localización de las variantes o polimorfismos asociados a la enfermedad de Crohn

Lugar y regulación de la expresión del gen NOD2/CARD15

Este gen se expresa fundamentalmente en las células inmunes de la línea monolítica (monocitos, macrófagos y células dendríticas), aunque también a niveles más bajos en los granulocitos y linfocitos. También se ha encontrado que su expresión a nivel epitelial es más marcada en las células de Paneth, que son células epiteliales intestinales (localizadas fundamentalmente en el ileon terminal) con funciones de defensa frente a patógenos entéricos (105).

En cuanto a la regulación de la expresión recientemente se ha observado que diferentes citoquinas y otros productos bacterianos pueden modular su expresión. Un aumento de los niveles del factor de necrosis tumoral (TNF) aumenta la expresión del gen NOD2 a través de la activación del NF- κ -B, el cual se uniría a la región promotora del gen, lo que estimularía su expresión. Existen otras citoquinas como el interferon gamma, y productos bacterianos, como los peptidoglicanos (PG) y lipopolisacáridos (LPS), que también actúan a través del NF- κ -B y son capaces de inducir este gen. La regulación de su expresión frente a citoquinas y productos bacterianos sugiere que NOD2/CARD15 juega un papel muy importante en la respuesta inmune innata a nivel intestinal (106).

Función de la proteína NOD2/CARD15

Como consecuencia de las características de la proteína existen varias hipótesis sobre su función. Los dominios CARD son dominios efectores y están implicados, entre otras funciones, en la activación y reclutamiento de las caspasas, que son enzimas implicadas en la muerte celular; de este modo es posible que exista una influencia de NOD2/CARD15 sobre los procesos de apoptosis (107). El dominio NBD influye en los cambios de forma de la proteína, permitiendo que los ligandos con los que interactúan los dominios CARD se aproximen a esta zona. La zona más estudiada y de mayor interés es la región C-terminal, que debido a sus secuencias LRR, como se ha dicho muy similares a las de los receptores toll-like, podría funcionar como un sensor intracelular de determinados microorganismos.

Las células epiteliales intestinales están expuestas a una enorme cantidad de microorganismos y deben tener la capacidad de tolerar la mayor parte de ellos y de responder frente a los agresores. Esta propiedad de las células epiteliales se observa en los experimentos in vitro, en el que este tipo de células no responden a los LPS que se

presentan externamente y si lo hacen a los productos bacterianos que se inyectan de forma intracelular, por lo que se desarrolló la hipótesis de la existencia de receptores intracelulares como NOD2/CARD15 (108). Así, siguiendo esta línea es de especial importancia un estudio que evaluó in vitro el papel de la proteína NOD2/CARD15 en la eliminación de *Salmonella typhimurium*. En líneas celulares epiteliales transfectadas con diferentes tipos de NOD2/CARD15, e infectadas intracelularmente, se observó que la capacidad de eliminar esta bacteria estaba muy disminuida en las células sin NOD2/CARD15 o con un NOD2/CARD15 mutado en la región LRR, mientras que las células con un NOD2/CARD15 normal sí eliminaban la bacteria. Estos hallazgos sugieren que el NOD2/CARD15 es crítico en la defensa de las células epiteliales contra los microorganismos intracelulares (109). Apoyando estas hipótesis, se ha visto que algunas mutaciones del NOD2/CARD15 se asocian a una deficiente activación del NF- κ -B en respuesta a productos bacterianos como PGN y LPS (110).

En otros estudios in vitro se ha observado que la región LRR del NOD2/CARD15 es la que interactúa con los productos bacterianos; en un principio se pensó que el producto bacteriano sobre el que interactuaba era un LPS, posteriormente se observó que eran zonas específicas del PGN sobre lo que interactúa específicamente la proteína NOD2/CARD15 (111). Los efectos de NOD2/CARD15 son independientes de los receptores de membrana plasmática *toll-like*, lo que hablaría de un nuevo eje de señales intracelulares en respuesta al PGN (112). Por otra parte se ha descrito que la activación de NOD2/CARD15 puede producir un cambio conformacional de la estructura del mismo, haciendo exponer su dominio CARD, que se asociaría a proteino-quinasa específicas (RICK/RIP2/CARDIAK). Este complejo proteico activaría a su vez el NF- κ -B (113).

Mutaciones del gen NOD2/CARD15

Como se ha comentado previamente, dos grupos independientes (europeo y norteamericano) comunicaron la existencia de tres variantes relativamente poco comunes del gen NOD2/CARD15 que se encontraban asociadas de forma independiente a la EC (58,59):

- R702W (también denominada Arg702Trp o SNP8): Existe un cambio de un solo nucleótido en el que aparece una timidita en vez de una citosina en una determinada posición dentro del exón 4 del gen. Esto produce la sustitución de un aminoácido en la posición 702 de la proteína.
- G908R (también denominada Gly908Arg o SNP12): Existe un cambio de un solo nucleótido en el que aparece una citosina en vez de una guanina en una determinada posición dentro del exón 8 del gen. Esto produce la sustitución de un aminoácido en la posición 908 de la proteína.
- L1007fsinsC (también denominada 3020insC o SNP13): Existe una inserción de un nucleótido de citosina (mutación tipo *frameship*) en una determinada posición dentro del exón 11 del gen, lo que codifica un codón de terminación en la síntesis de la proteína (*stop codon*) en la posición 1007 de la misma.

Existe otra mutación dentro de este gen que se ha asociado a EC, es el polimorfismo 268 (P268S), pero los estudios ya han demostrado que no es una mutación independiente y que sólo aparece asociada a las otras 3 mutaciones.

Estas mutaciones producen una serie de efectos estructurales, funcionales y clínicos (estos últimos no serán tratados ahora, sino con más detenimiento en la discusión).

A) Estructurales:

Las 3 mutaciones están en el tercio carboxi-terminal distal del gen, es decir, dentro del dominio LRR o cercanas a él (figura 5). Las dos primeras mutaciones (R702W y G908R) causan cambios de aminoácidos puntuales, mientras que la L1007fsinsC causa una proteína truncada, ya que, al producirse la inserción C, se produce una mutación de tipo *frameship* que lleva a que se codifique precozmente un codón de parada en la síntesis de la proteína, por lo que la proteína sintetizada carece de los 33 aminoácidos terminales. La región LRR suele adoptar forma de herradura, por lo que estas variantes pueden estar asociadas a una alteración de la configuración espacial de la proteína.

B) Funcionales:

Existen diferentes y múltiples hipótesis que pueden explicar la asociación entre las distintas variantes génicas encontradas y la EC; los principales campos de estudio se han desarrollado sobre la interacción microorganismo-sistema inmune y sobre la apoptosis.

El hallazgo de estas variantes en la región LRR de la proteína NOD2/CARD15, que posiblemente esté implicada en el reconocimiento de los microorganismos, ha supuesto un fuerte respaldo para la teoría del papel de los agentes microbianos en la EC (41). En los receptores de membrana plasmática *toll-like*, las diferencias secuenciales de LRR de cada receptor determinan el tipo de patógeno extracelular que éste reconoce, por lo que las variaciones en la zona LRR de la proteína NOD2/CARD15 podrían alterar el reconocimiento de tales patógenos a nivel intracelular (114).

Un aspecto de especial interés y que refuerza la hipótesis de que las variantes del NOD2/CARD15 asociadas a la EC alterarían la respuesta inmune, es que el fenotipo de la EC más frecuentemente asociado a las variantes de NOD2/CARD15 es la afectación ileal, que es la región del intestino con mayor densidad de nódulos linfoides (placas de

Peyer) y, probablemente, el segmento intestinal en el que ocurre una mayor interacción entre las bacterias y el sistema inmune (115).

El NOD2/CARD15 tiene dos dominios CARD que activan caspasas y se asocia funcionalmente a determinadas quinasas (RICK/RIP2/CARDIAK) que intervienen activamente en la apoptosis, por lo que es posible que tengan algún efecto en la modulación de la misma. En la EC se ha visto que las células T tienen disminuidos sus mecanismos de apoptosis, lo que podría condicionar, de forma compensatoria, un aumento de la producción de TNF, que es un fuerte inductor de la apoptosis que, a la vez, tiene importantes efectos proinflamatorios (116). Sin embargo, el efecto funcional de las variantes de NOD2/CARD15 sobre la apoptosis no ha sido estudiado extensamente. Los estudios preliminares no han encontrado asociación entre la presencia de alguna de las variantes y los distintos niveles de apoptosis *in vitro* (110).

1.5.5. Receptores *Toll-like* (TLR)

El descubrimiento de la familia de moléculas denominadas receptores *Toll-like* (TLR) en los mamíferos (ya se conocían previamente en invertebrados como la *Drosophila*) ha supuesto un importante avance en la investigación del sistema inmune innato. Los TLR juegan un papel importante en la transducción de la señal para la activación de la inmunidad innata y están localizados en la superficie de macrófagos, células dendríticas y tejidos como el epitelio intestinal y fosas nasales. Los TLR participan en la defensa contra la infección microbiana en distintas especies que van desde las plantas hasta los humanos (117).

Los TLR contienen una fijación extracelular en la superficie que incluye repeticiones ricas en leucina (LRRs), un único dominio transmembrana y un dominio intracelular que interviene en la transducción de la señal, pero no tiene actividad catalítica (figura 6). El primer TLR, el ahora llamado TLR4, fue identificado en 1997

(118); posteriormente se han localizado otros 9. También ha sido importante el descubrimiento del gen que codifica al receptor TLR4 en el cromosoma 9 (9q32-q33) (119).

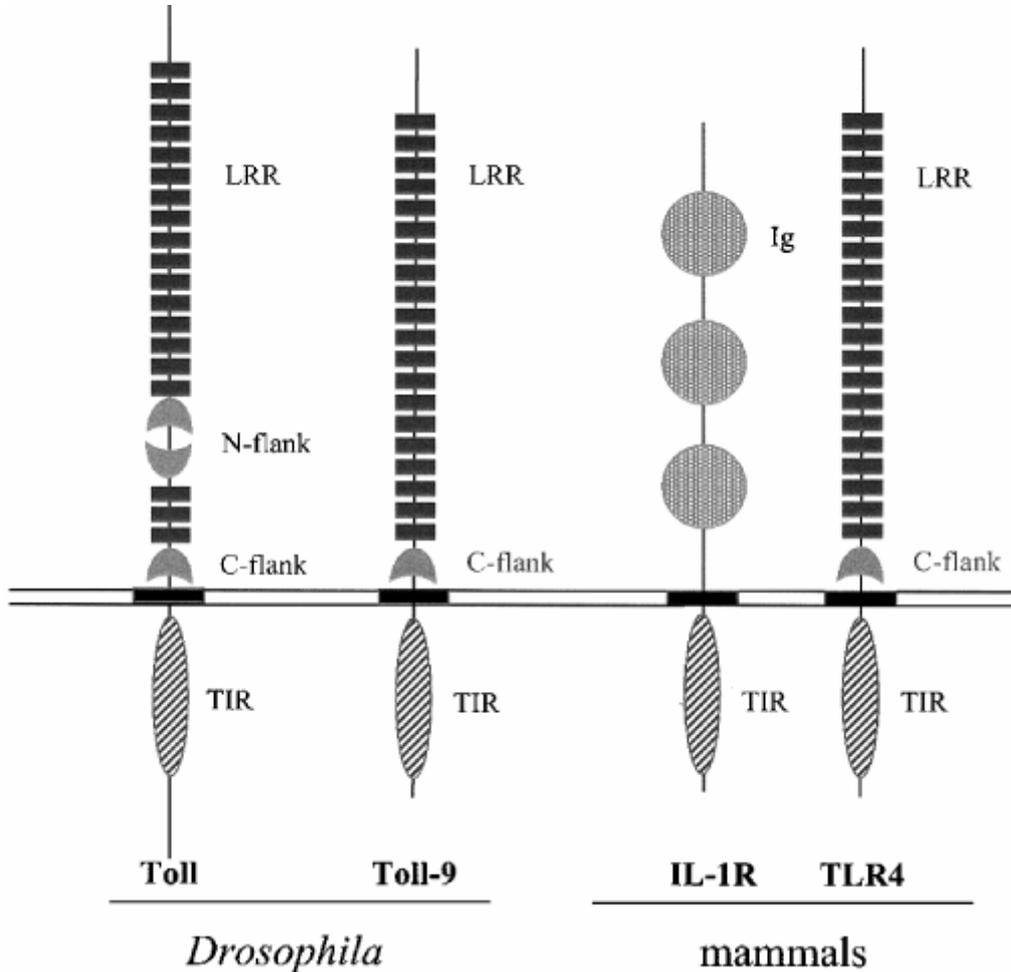


FIGURA 6: Estructura de los receptores *Toll-like* en invertebrados y mamíferos

Las moléculas TLR constituyen por tanto, los elementos de reconocimiento principales del sistema inmune para luchar contra determinados agentes infecciosos. Se ha descubierto que cada tipo de TLR reconoce un patrón molecular específico al que están asociados los diferentes patógenos o PAMP (una macromolécula patógena codificada). Como cada tipo de microorganismo se asocia a diferentes PAMPs, un macrófago o célula dendrítica puede utilizar su familia de TLRs para clasificar al invasor y responder de forma personalizada.

En la inmunidad innata los receptores de las superficies de las células al unirse con los LPS de las bacterias, inician una vía de transducción de la señal que libera directamente NF- κ -B, en concreto la unión del LPS al recetor toll-like TLR4 permite la activación final de NF- κ -B. Todas las evidencias conducen a pensar que los LPS interactúan directamente con TLR4 en la activación de la señal de transducción (120).

CD14 es una proteína glicosilfosfatidilinositol que se une a la membrana celular sin tener dominio intracelular, se expresa en monolitos, macrófagos y polimorfonucleares. Tiene alta afinidad por el LPS de las bacterias gram negativas. Los receptores CD14 son fundamentales para el reconocimiento de LPS, pero al no tener dominio intracelular tienen que interactuar con un receptor que lo tenga para poder enviar información transmembrana. De esa manera CD14 se une a TLR2 y TLR4 formando los complejos: CD14-TLR2 y CD14-TLR4 que son de gran importancia en la inmunidad innata y en la generación de la respuesta inflamatoria (121).

Es importante resaltar que los TLR pueden estar implicados en enfermedades inflamatorias produciendo una activación crónica de los macrófagos, así, si ciertas vías de señales relacionadas con los TLR fueran bloqueadas sin comprometer la vulnerabilidad a la infección, se podrían diseñar terapias que prevengan el proceso inflamatorio antes de que se extienda (122).

Recientemente se ha descrito en TLR4 una variante (A299G) que podría estar asociada a la EC; esta variante, también llamada Asp299Gly, se había descrito que podría predisponer a la sepsis en sujetos con infecciones por gram negativos. Esta variante consiste en un cambio de un solo nucleótido en la región rica en leucina en la proteína TLR4 (123). También se ha identificado una débil asociación de un polimorfismo del gen que codifica CD14 con la EC (124).

1.6. Importancia de las terapias biológicas en el tratamiento de la enfermedad de Crohn

Las terapias biológicas han supuesto una verdadera revolución en el tratamiento de la enfermedad de Crohn, hasta hace 10 años los corticoesteroides eran la primera línea de tratamiento por su alta eficacia en inducir la remisión, pero sin embargo su perfil de efectos secundarios no permitía el tratamiento a largo plazo de estos pacientes. La introducción de infliximab, un anticuerpo quimérico anti TNF α de administración intravenosa, en el año 1999 en Estados Unidos y en el 2000 en Europa ha modificado de forma importante la evolución clínica de los pacientes con EC refractarios a tratamientos convencionales, pudiendo afirmarse que las terapias biológicas han cambiado la historia natural de la EC.

Este fármaco ha demostrado su eficacia en ensayos clínicos multicéntricos controlados con placebo tanto para la inducción de la respuesta y remisión clínica como para el mantenimiento de de la respuesta en pacientes con EC moderada-grave tanto en los fenotipos inflamatorios como en las formas fistulizantes (125-127). Este tratamiento además de su eficacia, en principio muy superior a las otras terapias empleadas en la enfermedad, nos ha aportado otros avances como son que con su empleo se puede reducir el requerimiento de corticoesteroides, puede inducir y mantener la curación mucosa, disminuir las tasas de hospitalización, disminuir el número de intervenciones quirúrgicas y, por último, pero tremendamente importante, mejorar la calidad de vida de los pacientes con EC (128-130). En un estudio de cohortes poblacional realizado en Suecia, se realizó un seguimiento a 191 pacientes con EC tratados con infliximab durante dos años (131) y se comprobó que la tasa de respuesta era del 75%, incluso superior al referido en los ensayos clínicos, en los cuales en ocasiones no superaba el

50%. Todos estos datos nos han hecho plantearnos en qué pacientes y en qué momentos debemos utilizar estas terapias, pues se trata de medicación muy costosa y el conocimiento de potenciales factores pronósticos que pudiesen influir en la respuesta a este fármaco podría ser de gran ayuda para una correcta selección de los mismos.

En la actualidad existe comercializado en nuestro país una segunda terapia biológica, se trata del adalimumab, un anticuerpo monoclonal IgG anti-TNF 100% humanizado de administración subcutánea. Adalimumab ha demostrado su eficacia en ensayos clínicos controlados con placebo, tanto para la inducción como para el mantenimiento de la remisión en pacientes naive (no tratados previamente con terapias biológicas, fundamentalmente infliximab) tanto en formas inflamatorias como en fistulizantes (132,133). Este fármaco también ha demostrado su eficacia en pacientes con pérdida de respuesta o reacción adversa al infliximab, así el estudio GAIN (134), un ensayo clínico doble ciego controlado con placebo en pacientes con EC moderada-grave previamente tratados con infliximab, demostró que los pacientes tratados con adalimumab tenían mayores tasas de respuesta que los tratados con placebo, si bien estas cifras resultaron en todos los casos inferiores a las registradas en los pacientes tratados con adalimumab y que nunca habían recibido otras terapias biológicas.

Recientemente también se ha publicado que los pacientes tratados con adalimumab reducen el número de ingresos hospitalarios, disminuye el riesgo de cirugías y, se produce en ellos una marcada mejoría en su calidad de vida (135,136).

Sin embargo, al igual que ocurría con infliximab la gran duda clínica que nos plantea este tratamiento es el saber qué pacientes obtendrán una buena respuesta clínica a los mismos; con este fármaco esta área de estudio aún permanece más oscura al ser de más reciente aparición.

En general en las terapias biológicas, el conocimiento de potenciales factores de respuesta podría suponer un avance muy importante; actualmente existen muy pocos datos sobre la potencial influencia de las mutaciones genéticas implicadas en la susceptibilidad de la EC en la respuesta clínica de estos fármacos, esperamos que este trabajo permita aportar algo de luz a este tema.

1.7. Características de Galicia y su población

Galicia está situada en el extremo nor-occidental de la península ibérica, ocupando una superficie de 29.575 Km². Es una extensión similar a la de un pequeño país europeo (Bélgica o la República Checa) o a la de un estado de tamaño medio/pequeño en Estados Unidos (por ejemplo, Massachussets o Maryland). Su peculiar situación y su especial morfología le confieren unas características geográficas realmente diferentes al resto de la península, destacando, tanto sus costas como su interior, por su gran riqueza y diversidad. De hecho son estas dos palabras las que mejor definen la geografía gallega.

Galicia es la región más antigua de la Península Ibérica. Esto, unido a una intensa actividad orográfica en el pasado, ha formado una verdadera red de pequeñas y suaves montañas: el Macizo Galaico. Este macizo montañoso, unido a la humedad climatológica ha favorecido la formación de una densa red fluvial, que se articula en torno a una principal vía de agua (el río Miño) y a otras menores que desembocan directamente en el mar. Estos últimos han formado las Rías Gallegas: una serie de pequeñas bahías formadas por la desembocadura de los ríos, que le dan a la costa un perfil sinuoso. El clima cálido y húmedo, la suavidad de los montes y los numerosos ríos, han favorecido el crecimiento de una variada y rica vegetación. Junto a las especies autóctonas (fundamentalmente bosques de hoja caduca y sotobosque), se han introducido numerosa especies foráneas que se han adaptado perfectamente a nuestras condiciones.

La población gallega es aproximadamente de 2.800.000 habitantes, resultando en una densidad de población de 94,4 habitantes por Km². Esta elevada densidad de población se concentra especialmente en las zonas costeras, y más en el eje A Coruña -

Santiago - Vigo. Las principales ciudades gallegas (con más de 50.000 habitantes) son 7: A Coruña, Ferrol, Santiago, Pontevedra, Vigo, Lugo y Ourense. En torno a ellas se concentra un 40% de la población de Galicia. El resto se halla desperdigado en multitud de pequeños asentamientos que cubren la práctica totalidad de la región, especialmente en las citadas zonas costeras. Esta atomización de la población convierte a Galicia en uno de los lugares del mundo con una mayor densidad de núcleos de población: el 50% de los núcleos de población de España está en Galicia, y casi $\frac{1}{4}$ de los topónimos Europeos (aquí se incluirían los nombres de accidentes geográficos) son igualmente gallegos.

La historia

Por su situación geográfica, la actual Galicia quedó fuera de las rutas marítimas del Mediterráneo, que servían para relacionar las culturas florecientes de su ribera, aislamiento que se vio compensado por la riqueza minera de su suelo, y cuya población, se mantuvo prácticamente al margen de las características culturales de finales de la Edad del Bronce.

Hasta el establecimiento de los celtas, Galicia no empezó a tener una cultura con identidad histórica propia. Los celtas, procedentes de la zona del Mar Caspio y del Cáucaso, penetraron en la península ibérica en dos grandes oleadas, a partir del 950 a.C., llegando a esta región a través de la cuenca del río Sil a lo largo del siglo VI a.C., empujados por los íberos.

Desde finales de la Edad del Bronce hasta la llegada de los romanos, se desarrolló la cultura castreña, pueblo formado fundamentalmente de raza céltica y que tomó su nombre de los llamados castros, que eran cabañas de planta circular erigidas en

lugares estratégicos fácilmente defendibles, pudiendo estar rodeadas de recintos amurallados. Un ejemplo puede ser apreciado en la cima del Monte de Santa Tegra (Santa Tecla), en el extremo sudoeste, con vista al Miño y al Atlántico. Los celtas, de intensa religiosidad, introdujeron la técnica del hierro, desconocida por ese entonces en esta zona.

Los romanos llegaron a Galicia bastante tardíamente; una primera campaña, fue dirigida por Décimo Bruto hasta el Miño, (entre 138 y 136 a.C.), luego Julio César consiguió llegar hasta Brigantium (A Coruña), y el final de la resistencia se produjo en el año 26 a.C., en época de Augusto, siendo los celtas gallegos, junto a los cántabros y los vascos, las últimas y menos influenciadas comunidades que fueron integradas al imperio romano. La cultura celta conservó su hegemonía en las zonas rurales, y los romanos construyeron calzadas que unían ciudades y comarcas mineras (137).

Desde siempre hasta ahora Galicia se ha mantenido relativamente aislada del exterior, por lo que se puede concluir que su población es considerada como relativamente homogénea, con las connotaciones que esto tiene a la hora de realizar un estudio genético.

Por todo esto tenemos muchos indicios de que el origen de la población gallega es celta, al igual que la población irlandesa y escocesa. Sin embargo existen tendencias que discuten estas afirmaciones y es difícil asegurarlo al 100%.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

- Determinar la influencia de las tres principales mutaciones del gen NOD2/CARD15 en la susceptibilidad para la enfermedad de Crohn en la población gallega y su posible influencia en los distintos fenotipos de la enfermedad.

2.2. Objetivos secundarios

- Determinar la influencia de las mutaciones de los receptores del lipopolisacárido: RTL-4, RTL-9 y CD14 en la susceptibilidad para la enfermedad de Crohn en la población gallega.
- Determinar la influencia de las mutaciones del gen NOD2/CARD15 en las distintas cirugías que se realizan en la enfermedad de Crohn y determinar si estas mutaciones podrían tener un valor pronóstico para alguna de ellas.
- Determinar la influencia de las mutaciones del gen NOD2/CARD15 y de las de RTL-4 y CD14 en la respuesta clínica a las terapias biológicas, tanto infliximab como adalimumab, en la enfermedad de Crohn.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio casos-contróles, para analizar la asociación de los polimorfismos del gen NOD2/CARD15 y los polimorfismos de los genes que codifican los receptores toll-like tipo 4, tipo 9 y CD14 como factor de riesgo para padecer la enfermedad de Crohn (EC), y posteriormente poder establecer potenciales relaciones con los fenotipos y características clínicas de los pacientes.

Tomando como base los porcentajes de mutaciones en casos y controles de los primeros estudios poblacionales publicados, en concreto el que incluyó un mayor número de pacientes (138), (41,5% de mutaciones de NOD2 en casos y 14,6% en controles), se realizó un cálculo del tamaño muestral con el programa EPIDAT. Dio por resultado que para un nivel de confianza del 95% se necesitaban como mínimo 78 casos y 78 controles.

3.1. Material

3.1.1. Población de estudio

Se incluyeron 165 pacientes adultos (mayores de 18 años) que acudían regularmente a las consultas Monográficas de Enfermedad Inflamatoria Intestinal Crónica del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico Universitario de Santiago y 165 controles sanos que acudían al Servicio de Laboratorio para una extracción rutinaria de sangre. Los controles fueron pareados en edad, sexo, origen rural o urbano y raza con los casos.

- Los criterios de inclusión de los casos fueron los siguientes:

- Sujetos con edad superior a los 18 años.

- Diagnóstico de enfermedad de Crohn establecida por hallazgos clínicos, radiológicos, endoscópicos e histopatológicos, de acuerdo con los criterios de la clasificación de Lennard-Jones (4).
- Pacientes gallegos y residentes en Galicia y con ambos progenitores también gallegos.
- Firma del consentimiento informado.
 - Los criterios de exclusión de los casos consistieron en:
 - Pacientes con colitis ulcerosa.
 - Pacientes con colitis indeterminada.
 - En los pacientes con familiares de primer o segundo grado con enfermedad inflamatoria intestinal crónica solamente se incluyó aleatoriamente uno de ellos, excluyéndose el resto.
 - Los criterios de inclusión de los controles fueron:
 - Edad superior a los 18 años.
 - Firma del consentimiento informado.
 - Los criterios de exclusión de los controles fueron:
 - Padecer cualquier tipo de enfermedad inflamatoria intestinal.
 - Tener familiares con enfermedad inflamatoria intestinal.
 - Padecer cualquier enfermedad gastrointestinal o reumatológica de tipo crónico.

Todos los pacientes y controles recibieron un consentimiento informado, escrito tanto en gallego como en castellano, que tras leer libremente y con la posibilidad de preguntar las dudas al investigador, fue firmado en presencia del investigador del estudio. En el Anexo 1 están los consentimientos informados tanto en gallego como en castellano de los participantes en el estudio.

El proyecto de investigación de esta tesis fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de Galicia. El número de protocolo que se le asignó y se aprobó fue el 2002/151.

3.1.2. Características clínicas de los pacientes del estudio

Para realizar una correcta y exhaustiva evaluación de las características demográficas y, sobre todo, fenotípicas y clínicas de los pacientes, todos y cada uno de ellos fueron entrevistados y explorados por el investigador, en presencia de su historia clínica hospitalaria con el fin de corroborar todos los datos y comprobar que cumpliera los criterios de inclusión y no presentase ningún criterio de exclusión.

Se investigó sobre las características demográficas de los pacientes, que incluyeron nombre, edad, sexo, procedencia rural o urbana tanto de los pacientes como de sus progenitores, número de hijos, número de años desde el diagnóstico de la EC y sobre la presencia de algún familiar afecto bien con EC, bien con CU, y en caso de respuesta positiva especificar el grado de parentesco. Asimismo se preguntó sobre los hábitos tabáquicos, tanto previos al diagnóstico como durante el momento de la entrevista.

Posteriormente, y tras comprobar y revisar las pruebas radiológicas y endoscópicas se procedió a la clasificación fenotípica de acuerdo con la clasificación de Viena (9) (tabla 3). Los pacientes que presentasen los dos fenotipos estenosante (B2) y fistulizante (B3), fueron considerados para los análisis como fenotipo fistulizante (B3).

Se analizaron las manifestaciones extraintestinales de la enfermedad, y se incluyeron tanto las manifestaciones directamente relacionadas con la inflamación intestinal (eritema nodoso, pioderma gangrenoso, uveítis, aftas orales recidivantes y artritis periférica), como las manifestaciones no directamente asociadas con la

inflamación aguda intestinal (espondilitis anquilosante, sacroileítis, tromboembolismos y enfermedades bilio-hepáticas asociadas como colangitis esclerosante y litiasis biliar sintomática). Las sacroileítis fueron confirmadas por radiología. Las manifestaciones reumatológicas, dermatológicas y oftalmológicas fueron todas ellas confirmadas por sus correspondientes especialistas. Se descartaron las artralgias, debido a su difícil definición concreta y, se excluyeron aquellas manifestaciones secundarias a la cronicidad de la enfermedad (anemia, hipoalbuminemia...) y las secundarias a efectos adversos de fármacos (139).

En colaboración con el Servicio de Cirugía General del Hospital Clínico de Santiago todos los pacientes se estratificaron según hubiesen sido sometidos a cirugía previa en relación con la EC o no. Así mismo se subestratificaron y se evaluaron de forma individual las principales cirugías relacionadas con la EC: Resección ileal y cirugía de fistulas. También se objetivó el haber sido apendicectomizados previamente, en el momento del diagnóstico, o bien en el transcurso clínico de la enfermedad.

Se analizaron todos los tratamientos recibidos por los pacientes: aminosalicilatos orales y tópicos, corticoesteroides orales y tópicos, budesonida, antibióticos, prebióticos e inmunosupresores tiopurínicos. Se prestó especial atención y un exhaustivo seguimiento a los pacientes que hubiesen recibido terapias biológicas. Como en la actualidad existen dos terapias biológicas en el mercado, los dos anticuerpos monoclonales anti-tnf alfa, uno de administración intravenosa hospitalaria (infliximab) y otro totalmente humanizado de administración subcutánea (adalimumab), realizamos un análisis individualizado de cada uno de ellos para evaluar las posibles influencias de las mutaciones en la respuesta a cada uno de ellos. Se definió respuesta a las terapias biológicas como disminución de al menos 100 puntos en el CDAI en los pacientes con EC inflamatoria y en las formas fistulizantes como cierre de más del 50% de las fistulas.

El reciente aumento de estas medicaciones hizo que la evaluación de la respuesta al mismo en todos los pacientes se llevase a cabo anualmente hasta el año 2008.

Se analizaron condiciones especiales de la EC como son la corticodependencia y la corticorresistencia, que podrían condicionar el pronóstico de la enfermedad. Definimos corticodependencia como la recidiva del brote en los 30 días siguientes a retirar los corticoides o tras al menos dos intentos de reducir los corticoides sistémicos en los últimos 12 meses y corticorresistencia se definió como la falta de respuesta clínica y biológica al tratamiento con corticoides a dosis plenas (mínimo 50 mg de prednisolona) durante al menos 7 días (140).

Con todos estos datos se rellenaron unos cuestionarios que incluían un número, que correspondería con el de las muestras sanguíneas para conferir anonimato a las mismas. En el anexo 2 se muestran los formularios de recogida de datos tanto de los pacientes como de los controles.

3.2. Métodos

3.2.1. Extracción de ADN en muestras de sangre periférica

Se realizó una recogida de 15 ml de sangre venosa periférica en cada paciente y en cada control para la posterior extracción del ADN genómico de los leucocitos. La sangre se recolectó en tubos con EDTA y fue almacenado a -20°C. Todos los tubos de cada paciente y cada control fueron rotulados con un número y con un código de letras, que también se escribió en cada uno de los formularios, con la idea de mantener el anonimato, pero sin poder confundirse unas muestras con otras.

Tras solicitar los permisos correspondientes, la sangre se trasladó de manera urgente, utilizando un Servicio de Correo de muestras que garantizaba el correcto

mantenimiento de las condiciones, al laboratorio de inmunogenética de la VU University Medical Center en Ámsterdam (Holanda).

La sangre fue centrifugada a 1500 rpm durante 15 minutos y a continuación se extrajo la capa leucocitaria o también llamado coágulo blanco (*buffy-coat*), que fue transferido a tubos de *eppendorf*, con la misma identificación que los tubos de EDTA, y almacenado a -20°C.

3.2.2. Genotipado

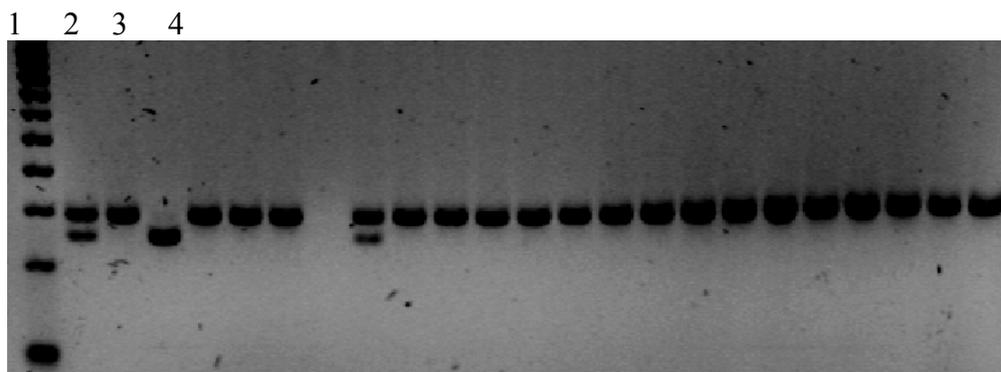
El ADN fue aislado de las muestras sanguíneas utilizando el kit de aislamiento de ADN de Roche (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).

Todos los participantes del estudio fueron genotipados para las tres principales variantes del gen NOD2/CARD15 asociadas con la EC (R702W, G908R y 1007fs). Estas variantes han sido etiquetadas como SNP 8, 12 y 13, respectivamente (58). El genotipado se llevó a cabo a través de la reacción en cadena de la polimerasa con restricción de longitud de los polimorfismos (PCR-RFLP). Tras la digestión, los productos resultantes fueron aislados al 2% (G908R) o al 4% (R702W y 1007fs) en geles de agarosa.

La variante R702W fue analizada utilizando los “primers” o cebadores: 5’CGCACAACCTTCAGATCACAA3’ (“sense” o sentido) y 5’GGATGGAGTGGAAGTGCTTG3’ (“antisense” o contrasentido). Las condiciones de la PCR fueron: Desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, recocidos a 59°C durante 30 segundos y estirado a 72°C durante 30 segundos, llevándose a cabo un alargamiento final a 72°C durante 7 min. Los fragmentos de PCR fueron cortados con el enzima de restricción HpaII (5 horas a 37°C).

La variante G908R fue analizada utilizando los “primers” o cebadores: 5’AAGTCTGTAATGTAAAGCCAC3’ (“sense” o sentido) y 5’CCCAGCTCCTCCCTCTTC3’ (“antisense” o contrasentido). Las condiciones de la PCR fueron: Desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, recocidos a 59°C durante 30 segundos y estirado a 72°C durante 30 segundos, llevándose a cabo un alargamiento final a 72°C durante 7 min. Los fragmentos de PCR fueron cortados con el enzima de restricción HhaI (5 horas a 37°C).

La variante 1007fs fue recocida de acuerdo con Crane *y cols.* (141). Los “primers” o cebadores empleados fueron 5’GGCAGAAGCCCTCCTGCAGGGCC3’ (“sense” o sentido) y 5’CCTCAAAATTCTGCCATTCC3’ (“antisense” o contrasentido). Los fragmentos de PCR fueron cortados con el enzima de restricción ApaI (11 horas a 30°C). En la figura 7 se muestra la fotografía de un gel tras la realización de una PCR de la variante SNP 13 en las condiciones descritas anteriormente.



SNP13/CARD15/NOD2 x ApaI, 0.5xTBE gel, 4% agarosa.

1= 50bp marcador de ADN

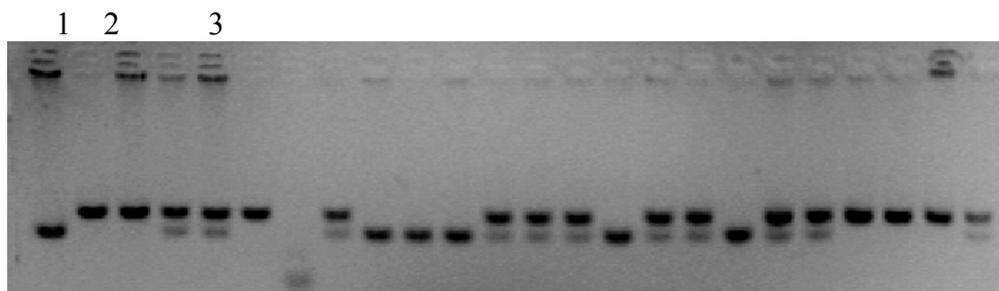
2 = 1.2

3 = 1.1

4= 2.2

FIGURA 7: Fotografía de gel tras la realización de PCR correspondiente al SNP 13 del gen NOD2

El genotipado del SNP CD14 -260 C<T se realizó con los primers 5'TCACCTCCCCACCTCTCT3' ("sense" o sentido) y 5'CCTGCAGAATCCTTCCTGTT3' ("antisense" o contrasentido). Las condiciones de la PCR fueron: Desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, recocidos a 59°C durante 30 segundos y estirado a 72°C durante 1 minuto, llevándose a cabo un alargamiento final a 72°C durante 7 min. Los fragmentos de PCR fueron cortados con el enzima de restricción HaeIII (142). En la figura 8 se muestra la fotografía de un gel tras la realización de una PCR de la variante SNP CD14 en las condiciones descritas anteriormente.



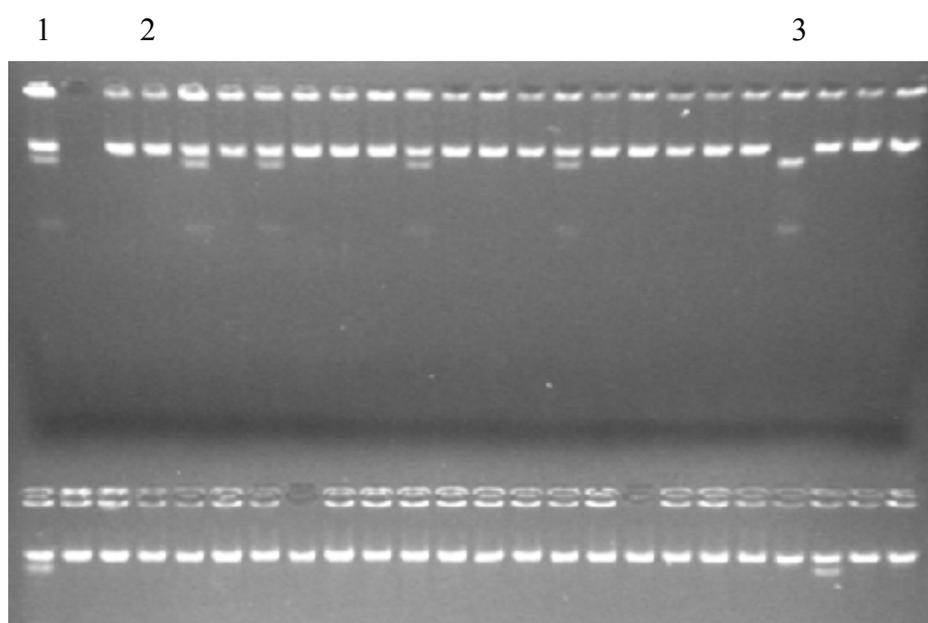
CD14-260 x HaeIII, 0.5xTBE gel, 4% agarosa.

1 = CC
2 = TT
3 = CT

FIGURA 8: Fotografía de gel tras la realización de PCR correspondiente al SNP-260 C<T de CD14

El genotipado del SNP TLR4+896 A>G fue llevado a cabo con los primers 5'TTACCCTTTCAATAGTCACACTCA3' ("sense" o sentido) y 5'AGCATACTTAGACTACCTCCATG3' ("antisense" o contrasentido). Las condiciones de la PCR fueron: Desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos,

seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, recocidos a 55°C durante 30 segundos y estirado a 72°C durante 30 segundos, llevándose a cabo un alargamiento final a 72°C durante 7 min (143). Los fragmentos de PCR fueron cortados con el enzima de restricción NcoI. En la figura 9 se muestra la fotografía de un gel tras la realización de una PCR de la variante SNP TLR4+896 A>G en las condiciones descritas anteriormente.



TLR4 x NcoI. 0.5xTBE gel, 4% agarosa.

1 = 1.2

2 = 1.1

3 = 2.2

FIGURA 9: Fotografía de gel tras la realización de PCR correspondiente al TLR4+896 A>G

El genotipado de de los SNPs de TLR9 fue llevado a cabo con el método Taqman, los primers o cebadores del SNP TLR9-1237 T>C fueron 5'GGCCTTGGGATGTGCTGCT3' (“sense” o sentido) y 5'GGTGACATGGGAGCAGAGACA3' (“antisense” o contrasentido), mientras que los preimers del SNP TLR)+2848 G>A fueron 5'CCGGTCTGCAGGTGCTAGAC3' (“sense” o sentido) Y 5'CCAAAGGGCTGGCTGTTGTA3' (144).

3.2.3. Análisis estadístico

Se calcularon las frecuencias genotípicas, alélicas y el equilibrio de Hardy-Weinberg en pacientes y controles. El desequilibrio gamético se estimó empleando el coeficiente D' de Lewontin (145).

Se realizaron análisis caso-control para averiguar la influencia global en la susceptibilidad para la EC de las 3 mutaciones, así como la individual de cada polimorfismo de CARD15.

La EC fue estratificada de acuerdo con múltiples características demográficas y, fundamentalmente fenotípicas y clínicas, para averiguar el posible efecto de las mutaciones de CARD15 individualmente en cada subgrupo.

Todas las comparaciones fueron estudiadas usando el test chi-cuadrado (χ^2) o el test exacto de Fisher cuando fue necesario, en caso de que la frecuencia de las observaciones en alguna de las celdas fuese menor de 10 se empleó la corrección de Yates. En ocasiones se han realizado análisis de regresión logística. Las asociaciones fueron expresadas bien en porcentajes o bien como riesgo relativo (RR) o con odds ratio OR con un intervalo de confianza del 95%. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SPSS 12.0 y el programa Epidat.

4. RESULTADOS

4.1. Características de los pacientes

Se realizó el análisis casos-controles de 165 pacientes con enfermedad de Crohn y de un número similar de sujetos sanos. Las principales características demográficas y clínicas de los pacientes se muestran en la tabla 8.

El tiempo medio de seguimiento de los pacientes desde su diagnóstico fue de $7,5 \pm 0,5$ años (con un rango desde 1 hasta 33 años). Alrededor de un 10% de los pacientes presentaban una historia familiar (bien de primer, bien de segundo grado) de EII; estos datos son ligeramente inferiores al rango encontrado en otras poblaciones estudiadas (66), si bien hemos de recordar que nosotros, de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión, solamente incluíamos en el presente estudio un miembro de cada familia. Se encontró un discreto predominio de mujeres entre los pacientes de EC, aunque esta parece ser la norma general de casi todos los estudios. Asimismo, se observó un porcentaje mayor de pacientes originarios del ámbito rural, aunque este dato no debería ser indicativo de una mayor prevalencia de la enfermedad en áreas rurales, sino como consecuencia de que la población del área geográfica estudiada es predominantemente rural. No se observaron diferencias entre pacientes y controles en relación a la edad, el sexo ni al origen rural o urbano. Sí que se han observado diferencias estadísticamente significativas en cuanto al hábito tabáquico, dato totalmente lógico pues es sabido que el tabaco es un factor de riesgo y de mal pronóstico para la EC.

En la tabla 9 se muestra una comparativa de las características demográficas entre el grupo de pacientes y el grupo control. Se describieron asociaciones estadísticamente significativas entre los diferentes subgrupos fenotípicos de los

TABLA 8: Características demográficas y clínicas de los pacientes

	Pacientes con EC
Número total	165
Sexo (Hombres/Mujeres)	70 (42,4)/95 (57,6)
Origen (Rural/Urbano)	91 (55,2)/74 (44,8)
Origen de los padres (Rural/Urbano)	104 (63,0)/ 61 (37,0)
Fumadores en la actualidad	75 (45,5)
Fumadores (actuales y ex-fumadores)	99 (60,0)
Edad	
Rango	18-76
Media \pm desviación	36,3 \pm 1,0
Edad diagnóstico	
Rango	9-65
Media \pm desviación	28,9 \pm 1,0
Historia familiar EII	17 (10,3)
Edad diagnóstico	
< 40 años (A1)	135 (81,8)
\geq 40 años (A2)	30 (18,2)
Patrón comportamiento- Fenotipo	
Inflamatorio (B1)	66 (40,0)
Estenosante (B2)	35 (21,2)
Penetrante (B3)	64 (38,8)
Localización de la enfermedad	
Ileon terminal(L1)	69 (41,8)
Colon (L2)	28 (17,0)
Ileocolon (L3)	66 (40,0)
Tracto gastrointestinal alto (L4)	2 (1,2)
Corticorresistencia	27 (16,4)
Corticodependencia	35 (21,2)
Cirugía	85 (51,5)
Manifestaciones extraintestinales	58 (35,2)

Los porcentajes (%) se expresan entre paréntesis

pacientes con EC. De este modo, los pacientes de origen urbano presentaban una edad de diagnóstico más precoz que los pacientes de origen rural (origen vs. edad de diagnóstico de acuerdo con la Clasificación de Viena, $p < 0,05$). Se observó más frecuentemente corticodependencia en los pacientes fumadores y en los que presentaban historia familiar positiva de EII ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente).

TABLA 9: Comparativa entre las características demográficas de los pacientes y de los controles

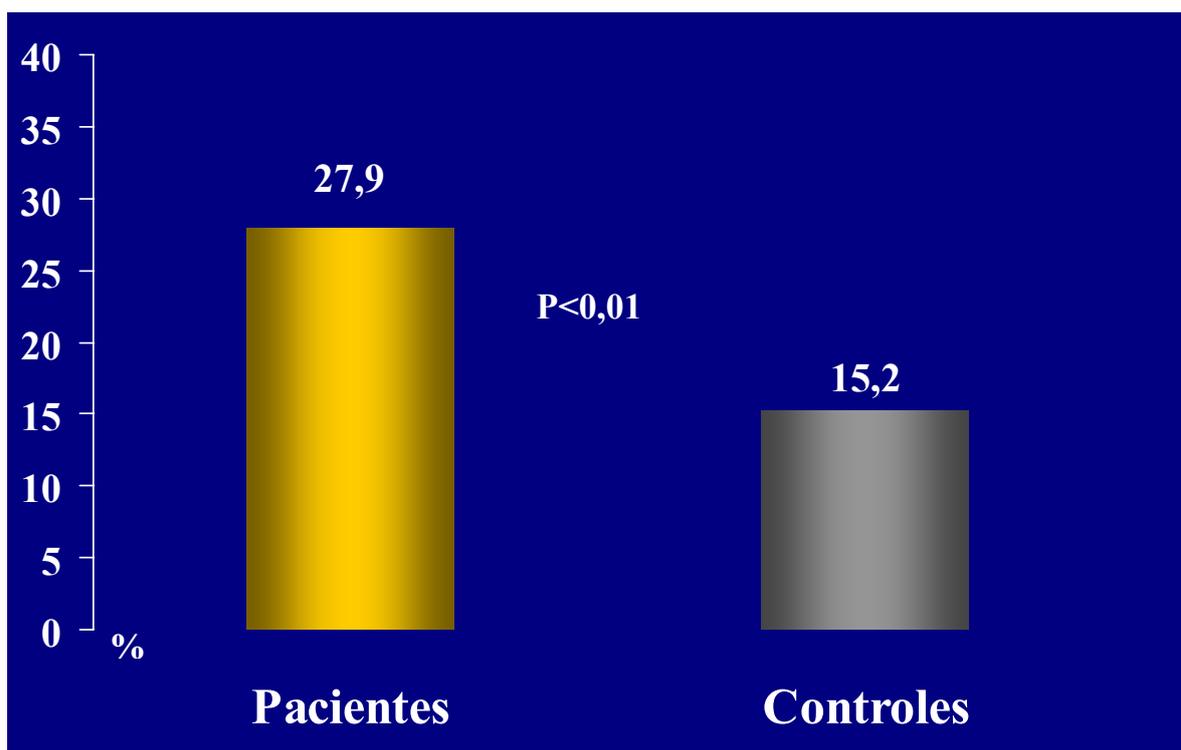
	Pacientes con EC	Controles	Valor de P
Número total	165	165	
Sexo (Masculino/Femenino)	70/95	71/94	0,911
Origen (Rural/Urbano)	91/74	78/87	0,152
Origen Progenitores (Rural/Urbano)	104/61	96/69	0,367
Fumadores actuales	75	31	0,000
Fumadores (actuales y ex-fumadores)	99	40	0,000
Edad			0,093
Rango	18-76	18-84	
Media \pm Desviación estandar	36,3 \pm 1,0	41,5 \pm 1,4	

4.2. Frecuencia de mutaciones en el gen NOD2/CARD15 y relación con la susceptibilidad para enfermedad de Crohn

La mutación R702W fue la que mostró una frecuencia más alta en los pacientes con EC gallegos (6,7%), sin embargo esta mutación fue la que se encontró con mayor frecuencia en los controles (5,8%). De este modo, este polimorfismo parece que no tiene influencia en la susceptibilidad para padecer EC en la población estudiada. Por otra parte, los alelos mutantes de G908R y 1007fs se observaron significativamente más frecuentes en los pacientes con EC que en los controles sanos (4,5% vs. 1,0 en ambos grupos, $p < 0,01$). La presencia de ambas mutaciones incrementaba el riesgo de desarrollar EC (OR = 5,2 95% IC 1,5-18,1). Se observaron unos resultados similares cuando se consideraron para el análisis los portadores (es decir, las personas que presenten al menos una copia del alelo mutante) de cada polimorfismo, aunque en este caso el riesgo de desarrollar EC fue ligeramente superior en los portadores de mutación en 1007fs (OR = 4,6 95% IC 1,3-16,5, $p < 0,05$; y OR = 5,0 95% IC 1,4-17,8, $p < 0,01$, para G908R y 1007fs, respectivamente).

El mismo análisis se llevó a cabo teniendo en cuenta los portadores de al menos una copia de alelos mutados en cualquier variante, así como en los portadores de 2 copias. El 27,9% de los pacientes con EC eran portadores de al menos un alelo mutante en cualquiera de las tres variantes estudiadas del gen NOD2, en contraste con el 15,2% de los controles (OR 2,17 95%IC 1,26-3,73 $p < 0,01$) (figura 10). El 3,6% de los pacientes con EC eran portadores de dos copias de alelos mutados (bien homocigotos para una variante o bien heterocigotos compuestos), mientras que ningún paciente resultó ser homocigoto para más de una mutación ($p < 0,05$) (figura 11). En el grupo control, ningún individuo presentó 2 copias de ninguna de las variantes. Los portadores de al menos una copia de alelos mutados del gen NOD2/CARD15 tienen un mayor

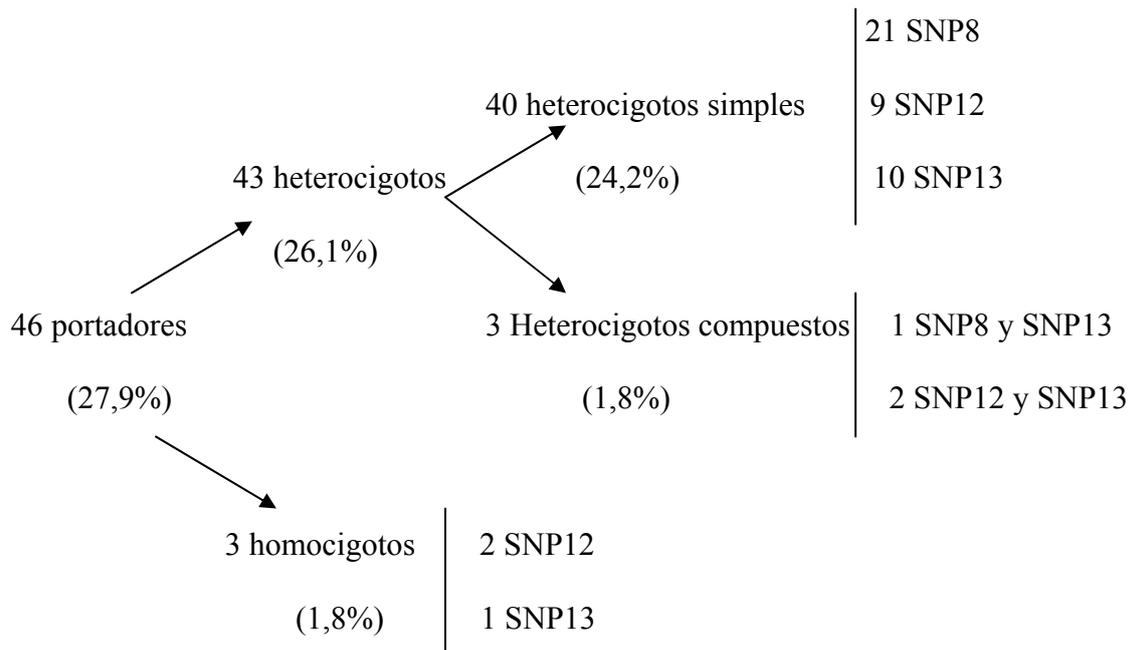
riesgo de desarrollar EC (OR 2,23 95% IC 1,36-3,72, $p < 0,01$), y este riesgo es el doble cuando consideramos solamente a los individuos portadores de las mutaciones G908R y 1007fs (las dos implicadas en esta población en cuanto a susceptibilidad para EC) (OR 4,73 95% IC 1,88-11,86, $p = 0,001$) (figura 12).



(OR 2,17 95%IC 1,26-3,73 $p < 0,01$)

FIGURA 10: Porcentaje de portadores de al menos un alelo mutante en cualquiera de las tres variantes estudiadas del gen NOD2

Pacientes



Controles

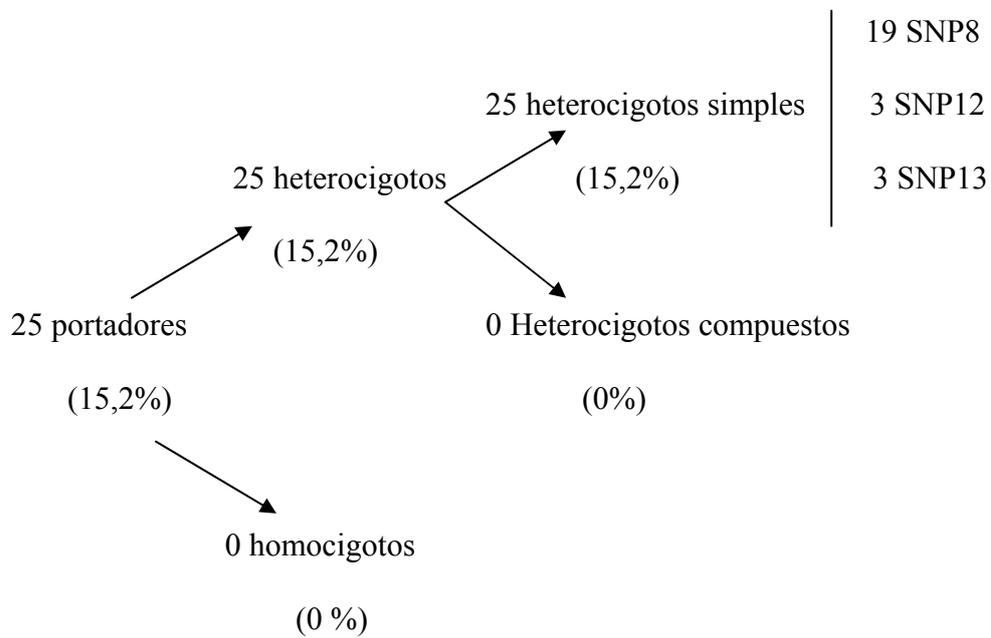
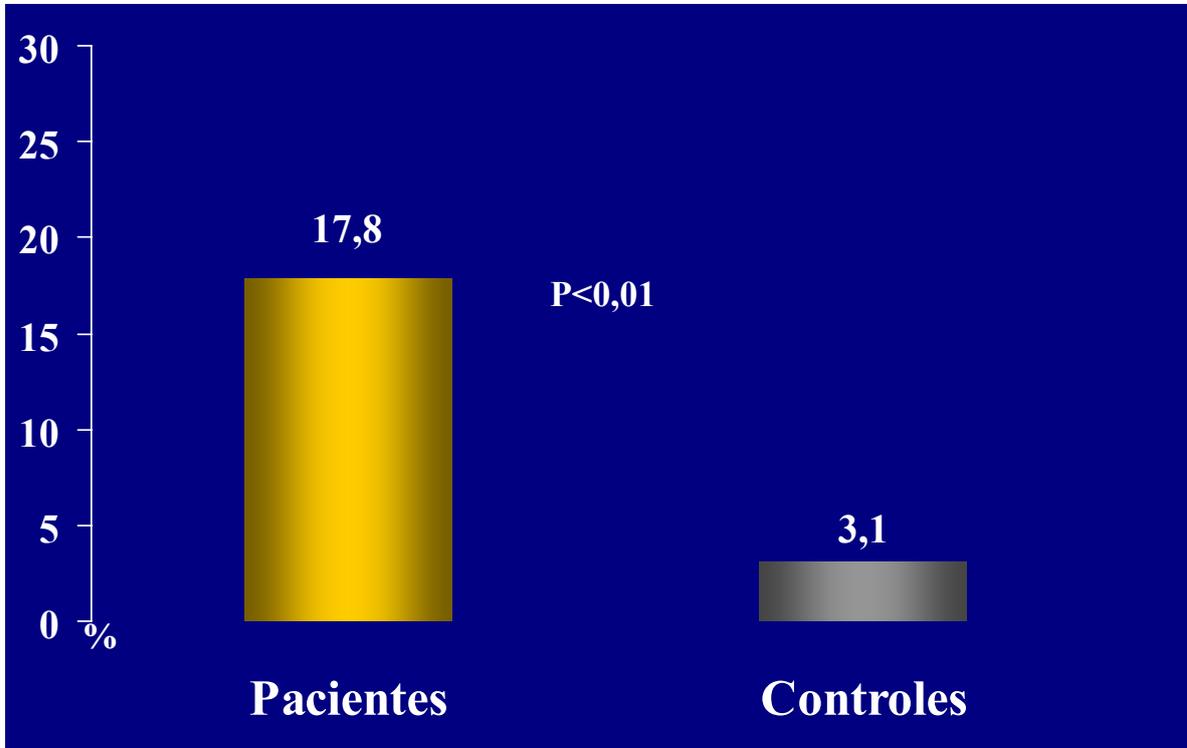


FIGURA 11: Número de portadores heterocigotos y homocigotos en pacientes y controles



(OR 4,73 95%IC 1,88-11,86 $p < 0,01$)

FIGURA 12: Porcentaje de portadores de al menos una variantes de NOD2 de las dos que influyen en el riesgo de EC en nuestra población (SNP12 y SNP13)

El riesgo que confiere el hecho de ser portador de dos alelos mutados no ha podido ser calculado porque no hay ningún sujeto con dos copias mutadas en la muestra de los controles. Estos hallazgos han sido comunes en otras poblaciones estudiadas, lo cual es indicativo del alto riesgo que confiere tener más de una mutación. En la tabla 10 se muestran las frecuencias de alelos y de portadores de las variantes de NOD2/CARD15 en pacientes y controles.

TABLA 10: Frecuencia de alelos y de portadores de las variantes de NOD2/CARD15 en pacientes y controles

	N	Frecuencia alélica (%)			Frecuencia de portadores (%)			Portador de cualquier mutación	Portador de 2 copias ¹
		Snp8	Snp12	Snp13	Snp8	Snp12	Snp13		
Pacientes	165	6,7	4,5** ^a	4,5** ^a	13,3	7,9* ^b	8,5** ^c	27,9** ^d	3,6* ^e
Controles	165	5,8	1,0	1,0	11,5	1,8	1,8	15,2	0,0

¹ Homocigotos o heterocigotos compuestos

^a $P < 0,01$ (Con y sin corrección de Yates) OR = 5,19 95% IC 1,49-18,11

^b $P < 0,05$ (Con y sin corrección de Yates) OR = 4,62 95% IC 1,29-16,52

^c $P < 0,01$ ($P = 0,013$ con corrección de Yates) OR = 5,01 95% IC 1,41-17,77

^d $P < 0,01$ (Con y sin corrección de Yates) OR = 2,17 95% IC 1,26-3,73

^e $P < 0,05$ (Con y sin corrección de Yates)

Las frecuencias de los genotipos en controles y pacientes estaban en las proporciones de Hardy-Weinberg excepto para G908R en el grupo de pacientes. Debido a que la estimación de la frecuencia de haplotipos usando el algoritmo esperanza-

maximización o algoritmo EM puede ser influenciada por desviaciones de las proporciones de Hardy-Weinberg, las frecuencias de haplotipos cuando estaban presentes heterocigotos compuestos se obtuvieron empleando el algoritmo EM y directamente de la muestra tras eliminar los heterocigotos compuestos. Los resultados obtenidos resultaron muy similares a los previamente expuestos y se muestran en la tabla 11. Los alelos mutantes de esas variantes no fueron encontrados en los mismos haplotipos. Una vez más las diferencias entre pacientes y controles fueron debidas a las variantes G908R y 1007fs, y no a la R702W. Por lo tanto, sólo los haplotipos que contienen alelos mutantes en las variantes G908R y 1007fs se encontraron aumentados significativamente en los pacientes con EC de esta población. Al igual que en estudios previos (146), no se encontró desequilibrio gamético entre ninguno de los pares de variantes estudiadas.

TABLA 11: Frecuencias de haplotipos en pacientes y controles

Frecuencias de haplotipos

R702W	G908R	1007fs	Pacientes	Controles	Valor P	OR (95%IC)
1	1	1	85,8	92,4	<0,01	0,5 (0,3-0,8)
2	1	1	6,5	5,8	n.s.	1,1 (0,6-2,2)
1	2	1	4,0	0,9	<0,05	4,6 (1,2-16,2)
1	1	2	3,7	0,9	<0,05	4,2 (1,2-15)

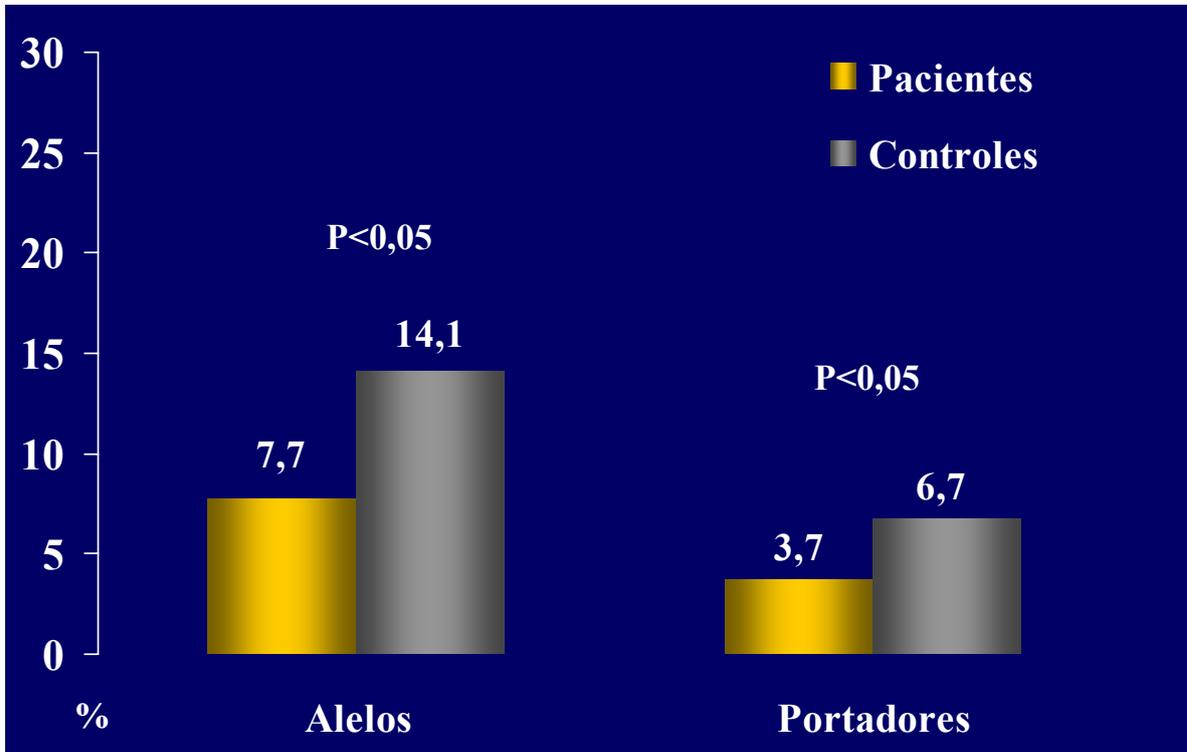
1, Alelo salvaje (wild); 2 Alelo mutante

4.3. Frecuencia de mutaciones en los receptores toll-like y CD14 y relación con la susceptibilidad para enfermedad de Crohn

Las frecuencias de los alelos mutados de $TLR4^{+299}$ fueron significativamente más bajas en el grupo de pacientes en comparación con en el grupo de controles (3,7% vs 7,7%; $p < 0,05$, OR: 0,45, 95% IC: 0,22-0,92). Cuando se analizaron las frecuencias de portadores también se observó que la frecuencia de pacientes portadores del alelo mutado de $TLR4^{+299}$ era significativamente inferior que la frecuencia hallada en los controles sanos (6,7% vs 14,1%; $p < 0,05$, OR: 0,43, 95% IC: 0,20-0,92). En la figura 13 se muestran las frecuencias de alelos y de portadores de $TLR4^{+299}$ en pacientes y controles.

La frecuencia de alelos mutados de $CD14^{-260}$ fue del 51,5% en los pacientes y del 50,9% en los controles (OR: 1,01, 95% IC: 0,70-1,47; n.s). Analizando los individuos portadores observamos que 128 pacientes (77,6%) y 128 controles (78,5%) fueron portadores del alelo mutado de $CD14^{-260}$ (OR 0,94, 95% IC: 0,56-1,59; n.s). En la figura 14 se muestran las frecuencias de alelos y de portadores de $CD14^{-260}$ en pacientes y controles.

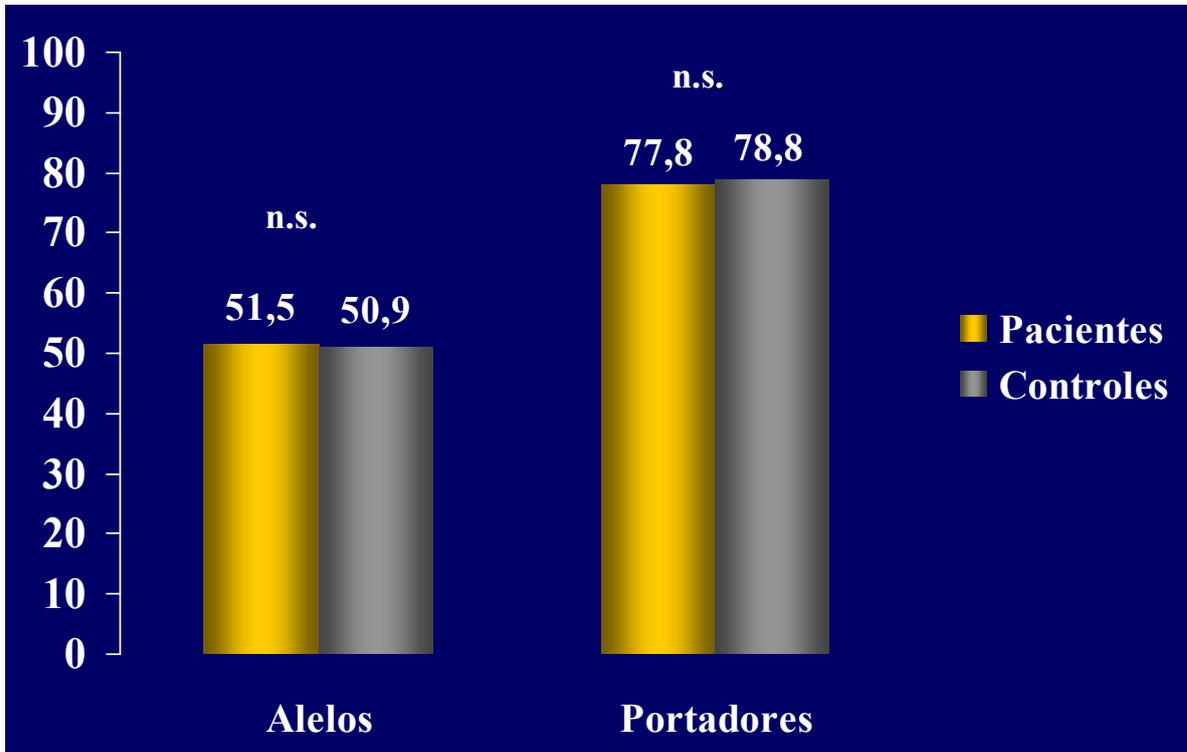
No se encontraron diferencias en cuanto a la presencia de mutaciones entre pacientes y controles en ninguna de las dos variantes estudiadas de RTL9. La frecuencia de pacientes portadores de mutación en $TLR9^{-1237}$ fue del 28% y de controles el 33% (OR 0,66, 95% IC: 0,19-2,24; n.s). Tampoco se observaron diferencias entre la presencia de pacientes con mutaciones en $TLR9^{+2848}$ (74%) y de controles portadores (75%) (OR 1,01, 95% IC: 0,63-1,63; n.s).



(OR: 0,45, 95% IC: 0,22-0,92 p<0,05)

(OR: 0,43, 95% IC: 0,20-0,92 p<0,05)

FIGURA 13: Frecuencias de alelos y de portadores de $TLR4^{+299}$ en pacientes y controles



(OR: 1,01, 95% IC: 0,70-1,47; n.s)

(OR 0,94, 95% IC: 0,56-1,59; n.s)

FIGURA 14: Frecuencias de alelos y de portadores de *CD14*⁻²⁶⁰ en pacientes y controles

4.4. Relación de las mutaciones en gen NOD2/CARD15 con los distintos fenotipos según la Clasificación de Viena

En el momento de estratificar y seleccionar los pacientes aún estaba vigente la Clasificación de Viena, pues todavía no había sido publicada la Clasificación de Montreal, por lo que la primera fue la empleada para clasificar a los pacientes en los distintos fenotipos. En la tabla 12 se muestra la frecuencia de alelos y de portadores en los pacientes estudiados en relación con los distintos fenotipos según la Clasificación de Viena.

En cuanto a la edad de diagnóstico, parece que no existe influencia de ninguna de las mutaciones de gen NOD2/CARD15 estudiadas. No se observaron diferencias significativas en cuanto a las frecuencias de alelos o las frecuencias de portadores entre el grupo de pacientes diagnosticados más jóvenes A1 (<40 años) y el grupo de pacientes diagnosticados con mayor edad A2 (>40 años). Además, analizando individualmente cada una de las tres variantes no se observaron diferencias en cuanto a la edad de debut de la EC, al igual que tampoco se observaron diferencias en cuanto a la edad de diagnóstico entre los pacientes portadores de al menos una mutación y los no portadores. Sin embargo, hemos observado que todos los pacientes con EC portadores de dos copias de alguna de las tres variantes tenían una edad de debut de la enfermedad más precoz (media 22 años con un rango entre 18 y 29 años); a pesar de estos hallazgos es difícil establecer una conclusión robusta, debido a que el número de pacientes de este subgrupo es muy limitado, tan solo 6 pacientes. En la tabla 13 se muestra la edad media y el rango de debut de la enfermedad de los pacientes en relación a la presencia de las mutaciones.

TABLA 12: Frecuencia de alelos y de portadores en los pacientes estudiados en relación con los distintos fenotipos según la Clasificación de

Viena

	N	Frecuencia de alelos (%)			Frecuencia de portadores (%)			Portador de cualquier mutación	Portador de 2 copias ¹
		Snp8	Snp12	Snp13	Snp8	Snp12	Snp13		
Edad debut	A1 135	5,9	5,2	4,4	11,9	8,9	8,1	26,7	4,4
	A2 30	10,0	1,7	5,0	20,0	3,3	10,0	33,3	0,0
Comportamiento	B1 66	8,3	2,3	1,5 ^{*a}	16,7	3,0	3,0	21,2	3,0
	B2 35	7,1	2,9	5,7	14,3	5,7	11,4	28,6	2,9
	B3 64	4,7	7,8 ^{*b}	7,0	9,4	14,1 ^{*c}	12,5	34,4	4,7
Localización (\$)	L1 69	5,1	4,3	5,1	10,1	8,7	10,1	27,5	1,4
	L2 28	12,5	1,8	1,8	25,0 ^{*d}	3,6	3,6	32,1	0,0
	L3 66	5,3	6,1	4,5	10,6	9,1	7,6	25,8	6,1

¹ Homocigotos o heterocigotos compuestos

^a $P < 0,05$ ($P = 0,06$ con corrección de Yates) $RR = 0,23$, 95% IC 0,05-1,01

^b $P < 0,05$ (Con y sin corrección de Yates) $RR = 3,16$, 95% IC 1,10-9,03

^c $P < 0,05$ (Con y sin corrección de Yates) $RR = 3,55$, 95% IC 1,14-11,06

^d $P < 0,05$ ($P < 0,1$ con corrección de Yates) $RR = 2,28$, 95% IC 1,03-5,08

(\$) No se muestran los resultados de L4 por el escaso número de pacientes con dicha localización (n=2)

TABLA 13: Edad media y rango de debut de la enfermedad de los pacientes en relación a la presencia de las mutaciones

	PORTADOR	NO PORTADOR	PORTADOR DE ALGUNA VARIANTE	NO PORTADOR DE VARIANTES	PORTADOR DE DOS COPIAS
SNP8	30,1 ± 2,5 (15-65)	28,7 ± 1,0 (9-63)	29,9 ± 1,8 (15-85)	28,5 ± 1,0 (9-58)	22,2 ± 2,1 (18-29)
SNP12	27,3 ± 2,9 (16-54)	29,0 ± 1,0 (9-65)			
SNP13	30,1 ± 4,0 (18-63)	28,8 ± 0,9 (9-65)			

Edad media (rango)

Tras realizar el análisis univariante se observó que el comportamiento de la enfermedad (B) estaba influenciado por la presencia de los polimorfismos alterados del gen NOD2 (ver tabla 12) y el análisis aislado de los portadores de alguna de las dos mutaciones que conferían susceptibilidad a la población gallega (SNP12 y SNP13) nos mostró un riesgo relativo de 3,4 para el desarrollo de formas penetrantes-fistulizantes. Sin embargo todos los resultados estadísticamente significativos se perdieron cuando realizamos el análisis multivariante teniendo en cuenta los años de evolución de la enfermedad desde el momento del diagnóstico. De este modo, la relación entre el comportamiento de la EC y las mutaciones de NOD2/CARD15 parece deberse a la influencia de los años de enfermedad en el comportamiento de la EC. De hecho, un análisis más detallado de la población de nuestro estudio mostró un predominio significativo de las formas inflamatorias (no estenosante-no penetrante) en los primeros 5 años de la enfermedad y con el paso del tiempo un predominio del fenotipo penetrante-fistulizante. En la figura 15 se muestran los porcentajes de pacientes del estudio con los distintos fenotipos de comportamiento de la enfermedad según

pertenezcan al grupo de diagnosticados en lo últimos 5 años o al grupo con más de 5 años de diagnóstico. Estos datos sugieren que la mayoría de los casos que en principio son diagnosticados como formas inflamatorias con el tiempo evolucionan hacia formas más complicadas.

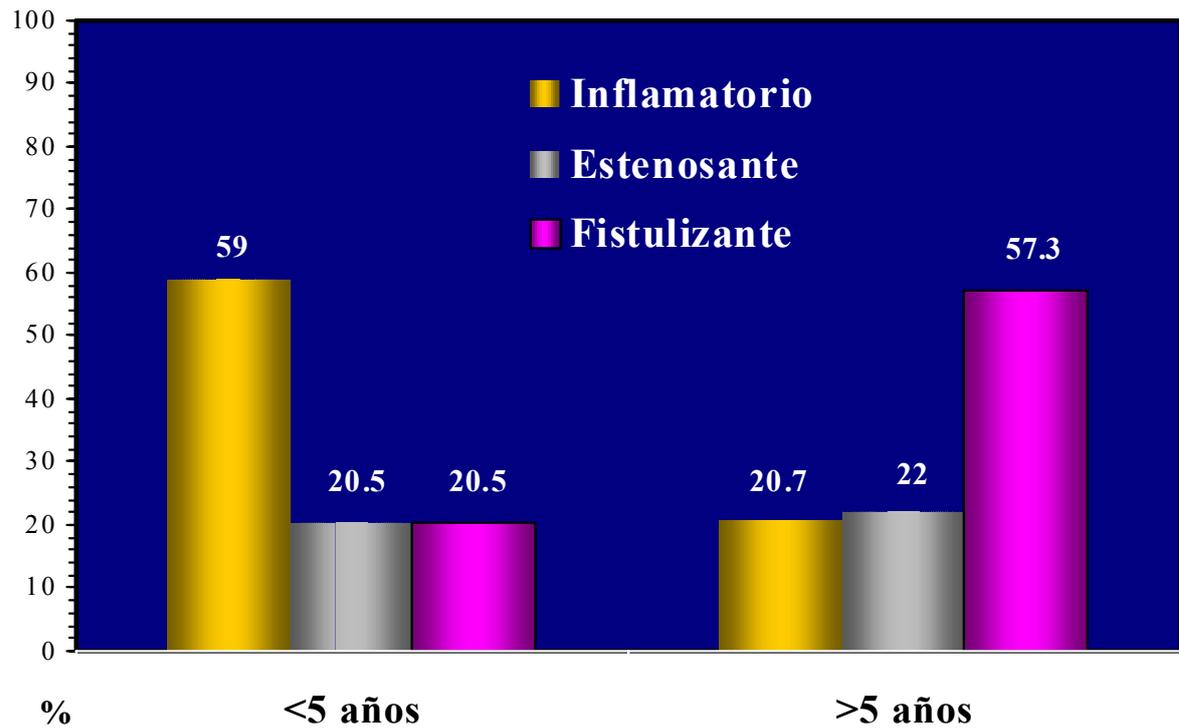


FIGURA 15: Porcentajes de pacientes con los distintos fenotipos de comportamiento de la enfermedad según pertenezcan al grupo de diagnosticados en lo últimos 5 años o al grupo con más de 5 años de diagnóstico

Apenas existe influencia de las mutaciones del gen NOD2/CARD15 en la localización de la enfermedad. En nuestra muestra tan solo observamos una ligera tendencia a la asociación con las formas ileales, hallazgo previamente descrito en otras poblaciones. Así, todos aquellos pacientes con dos mutaciones, tanto homocigotos como heterocigotos compuestos tenían una EC ileal o ileocolónica y en ninguno de ellos se observó una forma colónica pura; una vez más debido al escaso número de pacientes con dos mutaciones es complicado sacar conclusiones. Por otra parte, a pesar de que la frecuencia de alelos mutados de G908R y1007fs fue siempre más alta en los pacientes con afectación ileal o ileocolónica que en los pacientes con formas exclusivamente colónicas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Los pacientes que presentaban alelos mutados en R702W (la mutación sin influencia en la EC en nuestra población) presentaban una mayor afectación colónica, aunque tampoco estadísticamente significativa. En la figura 16 se muestra el porcentaje de pacientes portadores de cada una de las tres mutaciones del gen NOD2 en cada una de las localizaciones de la enfermedad de acuerdo con la Clasificación de Viena. Como tan solo dos pacientes presentaban afectación de tramos digestivos altos (L4), y a pesar de que uno de ellos presentaba mutaciones, no se pudieron realizar cálculos estadísticos específicos para este subgrupo.

Tras el análisis aislado de los pacientes que presentaban solo las mutaciones en las variantes del gen NOD2 que conferían susceptibilidad a nuestra población (SNP12 y SNP13), no se observaron asociaciones estadísticamente significativas con ninguno de los distintos fenotipos de la Clasificación de Viena a excepción de lo explicado con el patrón fistulizante.

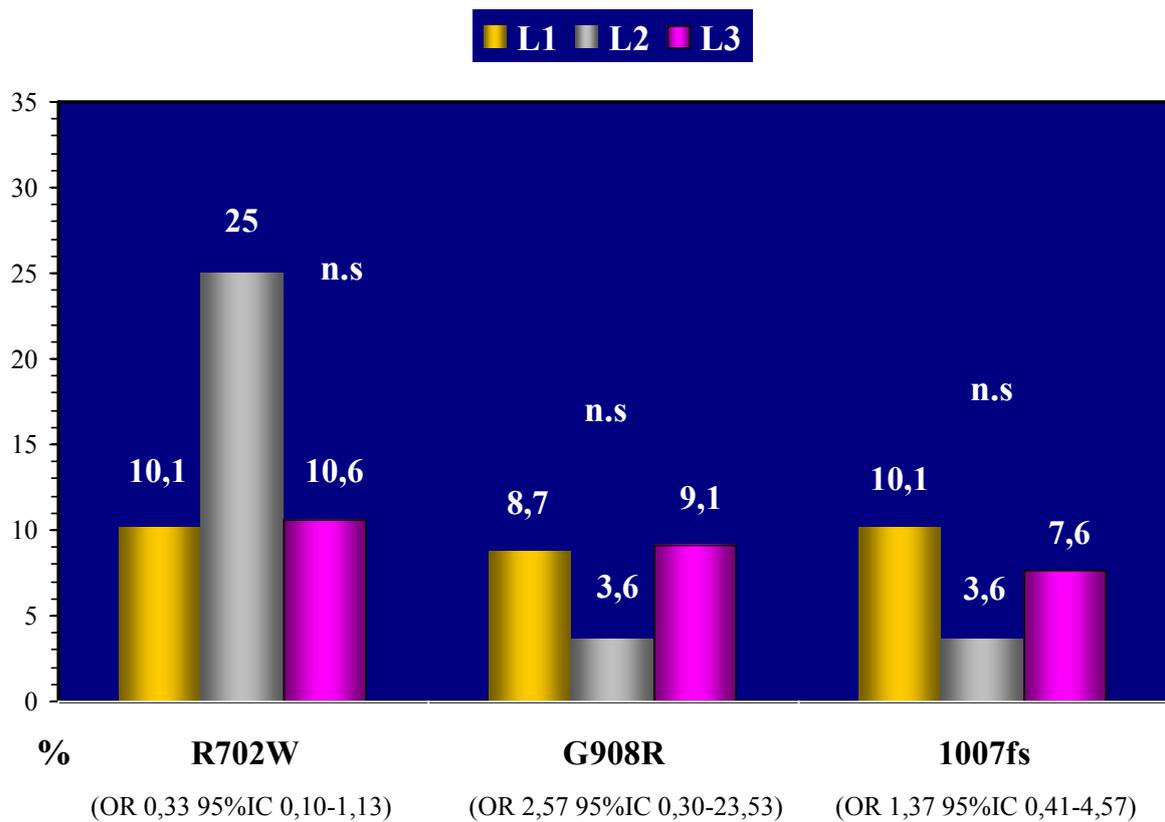


FIGURA 16: Porcentaje de pacientes portadores de cada una de las tres mutaciones del gen NOD2 en cada una de las localizaciones de la enfermedad de acuerdo con la Clasificación de Viena

4.5. Relación de las mutaciones en gen NOD2/CARD15 con factores demográficos y ambientales

Analizamos si podía existir algún tipo de influencia en la presencia de mutaciones del gen NOD2/CARD15 en pacientes con EC en dependencia del sexo, del origen rural o urbano, del hábito tabáquico, así como de la existencia de familiares de primer grado con EII.

Analizando de manera global las tres mutaciones e individualmente cada una de ellas, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres y el riesgo de padecer EC (figura 17).

Tampoco se observaron de manera global ni individualizada diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de las mutaciones y los pacientes de origen urbano y los de origen rural (figura 18).

En cuanto al hábito tabáquico tampoco se encontró ninguna diferencia en cuanto el porcentaje de pacientes portadores de las mutaciones según fuesen fumadores o no fumadores en el momento del diagnóstico de su enfermedad, aunque analizando individualmente las mutaciones se observó una tendencia a un mayor número de mutaciones de la inserción (1007fs) entre los individuos no fumadores (OR 0,33 95%IC 0,10-1,05, $p=0,05$)(figura 19).

No se observó una mayor presencia de mutaciones entre los pacientes con familiares de primer grado con EII (figura 20), pero estos resultados no deben ser tenidos de todo en cuenta, pues en el presente estudio solamente se incluyó un familiar por cada familia de sujetos con EC. Esta misma situación puede haber condicionado el hecho de que no observásemos el fenómeno de anticipación (debut previo de la enfermedad en generaciones posteriores); así en nuestra población los pacientes con familiares con EII no presentaban una edad de debut más temprana de la enfermedad.

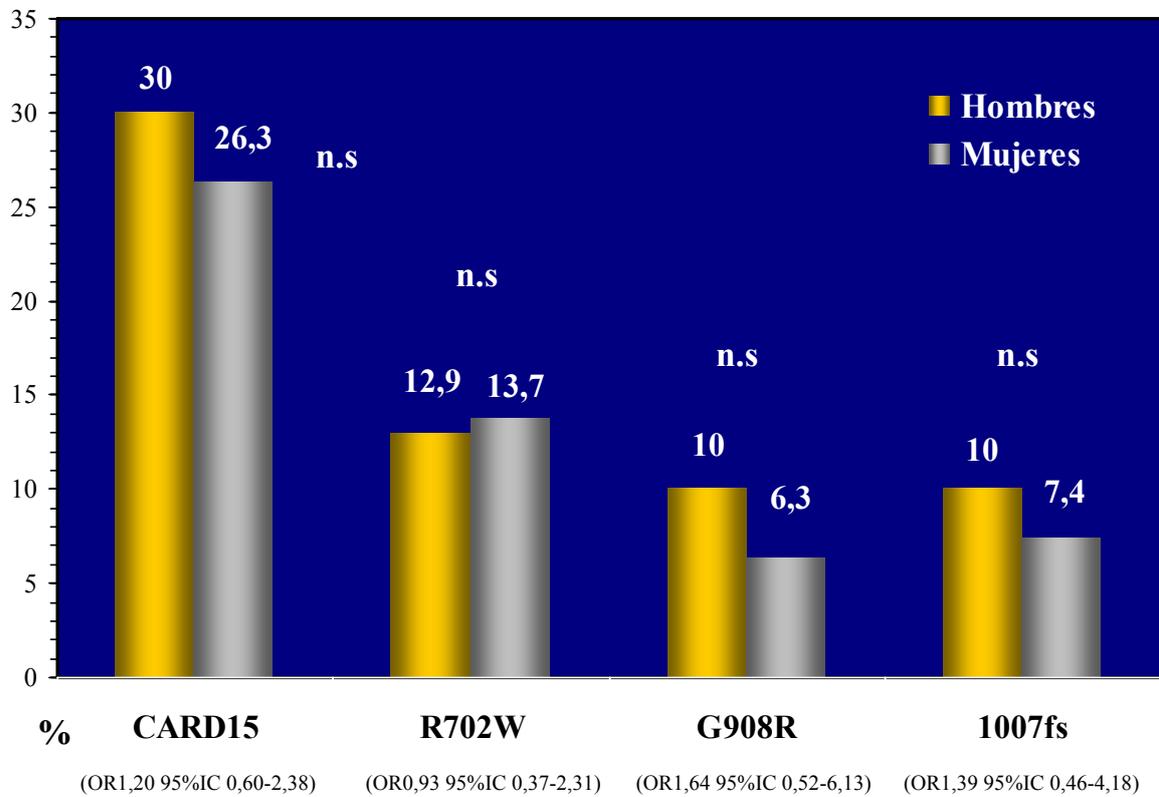


FIGURA 17: Porcentaje de pacientes portadores (tanto global como individualmente) de cada una de las tres mutaciones del gen NOD2 según el sexo

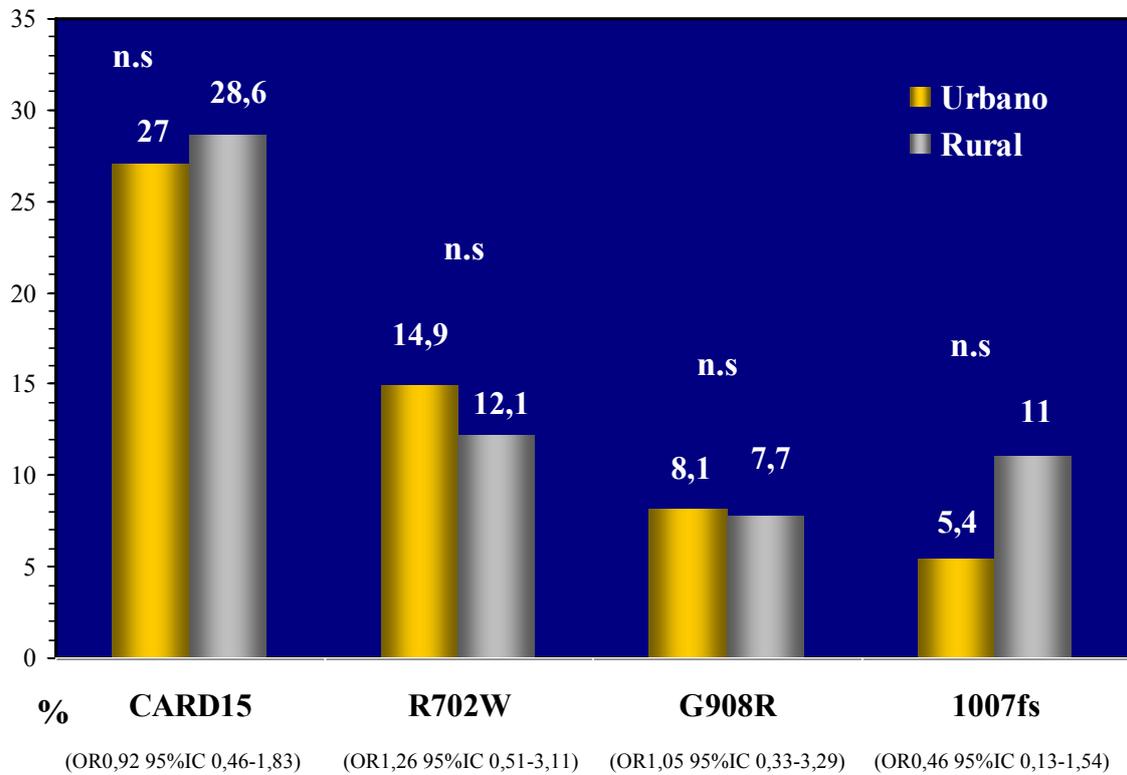


FIGURA 18: Porcentaje de pacientes portadores (tanto global como individualmente) de cada una de las tres mutaciones del gen NOD2 según el origen urbano o rural de los pacientes

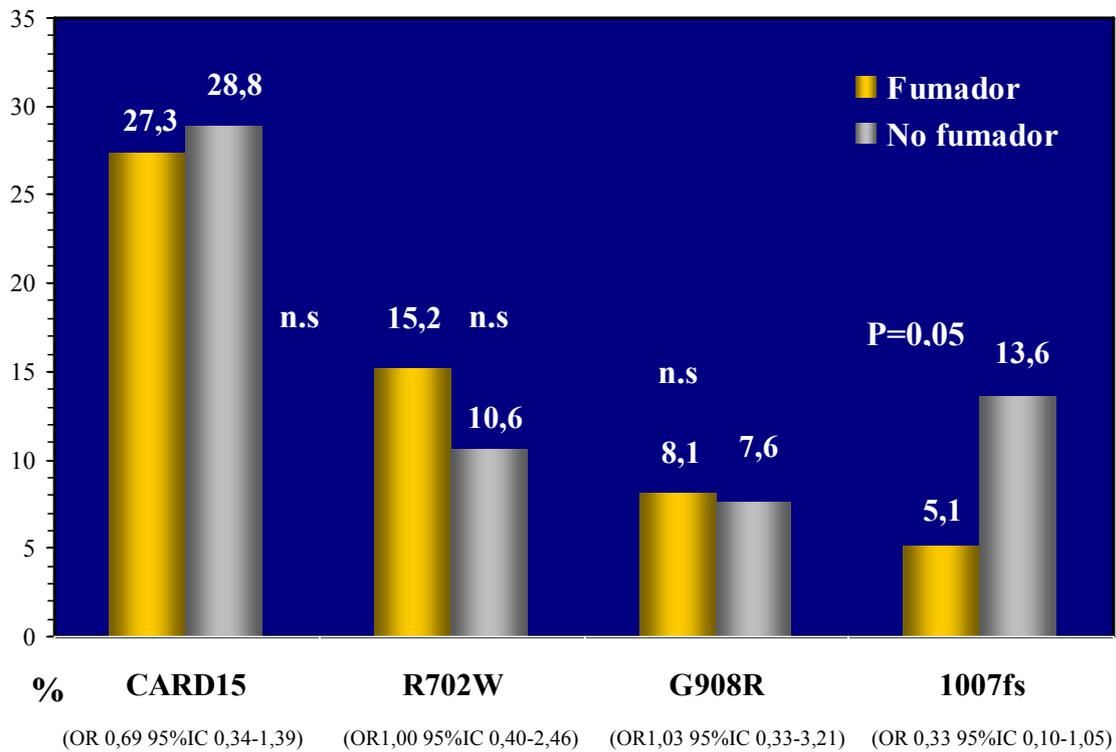


FIGURA 19: Porcentaje de pacientes portadores (tanto global como individualmente) de cada una de las tres mutaciones del gen NOD2 según su hábito tabáquico en el momento del diagnóstico

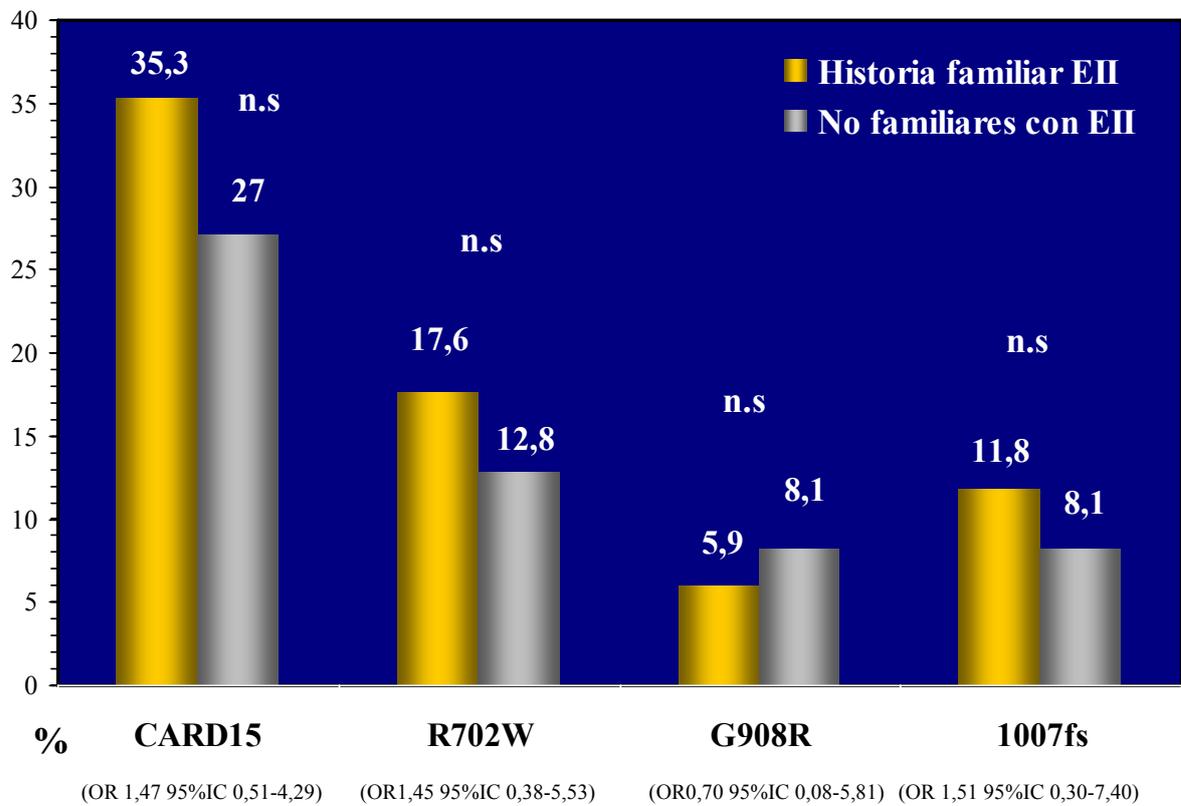


FIGURA 20: Porcentaje de pacientes portadores (tanto global como individualmente) de cada una de las tres mutaciones del gen NOD2 según tuviesen o no historia familiar de primer grado de enfermedad inflamatoria intestinal

Tras el análisis de los pacientes portadores de solamente alguna de las dos variantes del gen NOD2 con influencia en nuestra población, tampoco se observaron asociaciones estadísticamente significativas con ninguno de los parámetros demográfico-epidemiológicos analizados (sexo, tabaco, origen rural o urbano ni antecedentes familiares de EII).

4.6. Relación de las mutaciones en gen NOD2/CARD15 con las manifestaciones extraintestinales

Desarrollaron al menos una manifestación extraintestinal de la EC 58 pacientes (35,2%), 17 de ellos (10,3% del total) habían presentado dos o más manifestaciones extraintestinales distintas durante el curso de la enfermedad. La manifestación extraintestinal más comúnmente observada fue la artritis periférica, estando presente en el 17,6% de los pacientes. En la tabla 14 se muestran todas las manifestaciones extraintestinales observadas.

TABLA 14: Frecuencia de las diferentes manifestaciones extraintestinales observadas

Manifestaciones	Numero	% de pacientes
Artritis periférica	29	17,6
Eritema nodoso	12	7,3
Sacroileítis	12	7,3
Litiasis biliar sintomática	10	6,0
Manifestaciones oculares *	6	3,6
Espondilitis anquilopoyética	4	2,4
Estomatitis recidivante	4	2,4
Colangitis esclerosante primaria	1	0,6
Tromboembolismos	1	0,6

*Uveítis y epiescleritis

Observamos que el 24,4% de los pacientes que tenían manifestaciones extraintestinales presentaban alguna de las tres mutaciones estudiadas del gen CARD15, mientras que entre los pacientes que no presentaban manifestaciones extraintestinales, el

29,9% de los mismos presentaba alguna variante mutada. Estos resultados no mostraron significación estadística (OR 0,74, 95%IC: 0,36-1,55; n.s.), al igual que tampoco se observaron tras analizar solamente los pacientes portadores de las dos mutaciones implicadas en el riesgo de EC en nuestra población (OR 0,84, 95%IC: 0,34-2,10; n.s.). A pesar de estos resultados, analizamos individualmente las tres manifestaciones extraintestinales más comunes de nuestra población y tampoco observamos diferencias entre la presencia o no de mutaciones con cada una de estas manifestaciones (figura 21).

En el análisis detallado e individualizado de cada una de las tres mutaciones estudiadas, tanto con la presencia global de manifestaciones extraintestinales como individualmente con las tres manifestaciones más frecuentes, solamente observamos que los pacientes con eritema nodoso tenían una mayor presencia de la mutación G908R (25%) en comparación con los pacientes sin eritema nodoso (6,1%)(OR 4,76 95%IC 1,11-20,43; $p < 0.05$), el resto de las asociaciones no fueron estadísticamente significativas (tabla 15). Debido al escaso número de pacientes en alguno de los subgrupos en ocasiones es difícil interpretar los cálculos y establecer datos definitivos.

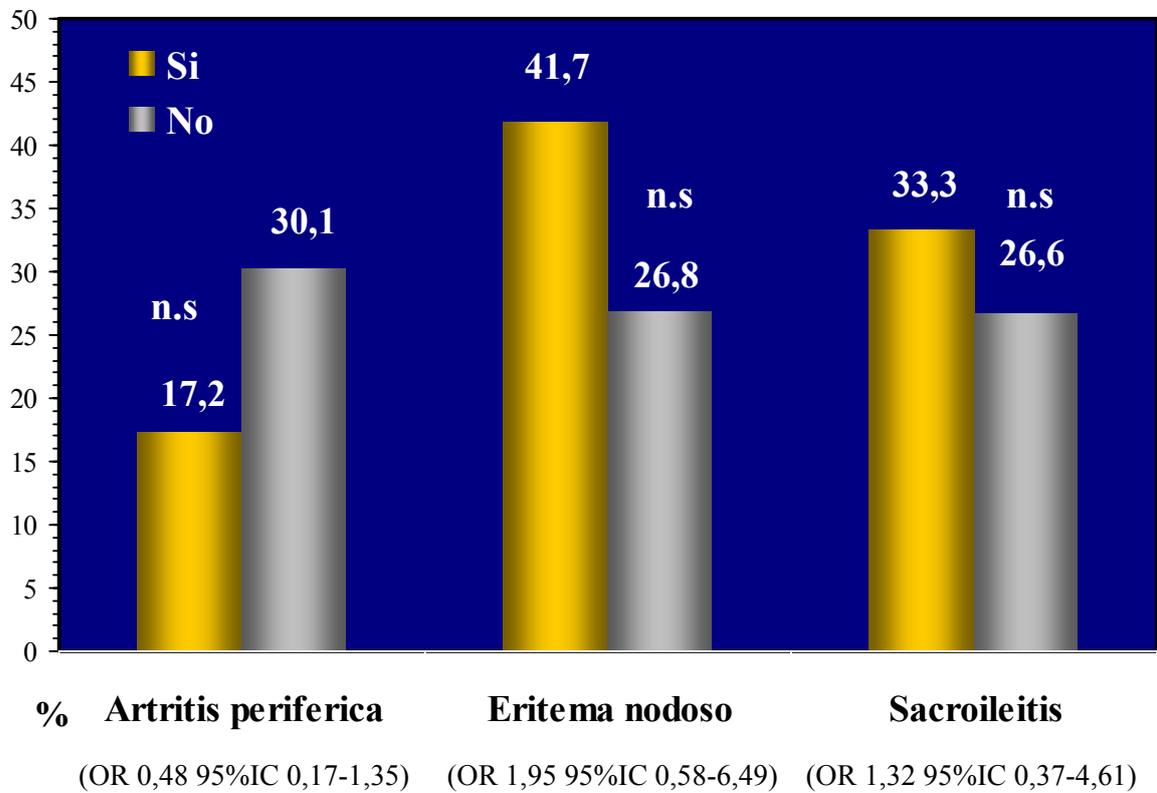


FIGURA 21: Porcentaje de pacientes portadores de al menos una de las tres mutaciones del gen NOD2 según la presencia o no de las tres manifestaciones extraintestinales más comunes observadas

TABLA 15: Frecuencia de portadores y OR 95%IC de cada una de las tres mutaciones estudiadas en los pacientes estudiados en relación con la presencia o no de manifestaciones extraintestinales, así como de las tres manifestaciones más frecuentes

	N	Frecuencia de portadores (%) y OR95%IC		
		Snp8	Snp12	Snp13
Manifestaciones extraintestinales	Sí	10,3	10,3	5,2
	No	OR 0,65 (0,24-1,78) (n.s.) 15	OR 1,64 (0,52-5,15) (n.s.) 6,5	OR 0,47 (0,12-1,78) (n.s.) 10,3
Artritis periférica	Sí	3,4	10,3	6,9
	No	OR 0,19 (0,02-1,15) (n.s.) 15,4	OR 1,45 (0,37-5,65) (n.s.) 7,4	OR 0,76 (0,16-3,61) (n.s.) 8,8
Eritema nodoso	Sí	16,7	25	0
	No	OR 1,33 (0,27-6,51) (n.s.) 13,1	OR 4,76 (1,11-20,43) (p<0,05) 6,5	- 9,2
Sacroileítis	Sí	8,3	16,7	16,7
	No	OR 0,57 (0,07-4,65) (n.s.) 13,7	OR 2,58 (0,50-13,27) (n.s.) 7,2	OR 2,35 (0,46-11,9) (n.s.) 7,8

4.7. Relación de las mutaciones en el gen NOD2/CARD15 con los antecedentes quirúrgicos por enfermedad de Crohn

Un total de 85 pacientes (51,5%) fueron intervenidos quirúrgicamente en relación con la EC. Entre ellos, 51 pacientes (60%) habían sufrido algún tipo de resección ileal, en ocasiones más de una, mientras que 19 pacientes (22,4%) se habían sometido a algún tipo de intervención en relación con su enfermedad fistulizante. Así mismo, 32 pacientes (19,4%) habían sido apendicectomizados, ya fuese antes o en el momento de diagnóstico de la enfermedad.

Analizando los resultados de forma global, se observa que el 39,1% de los pacientes que habían sido intervenidos quirúrgicamente en alguna ocasión por su EC (cirugía de fistulas o resección ileal) presentaban al menos una de las tres principales mutaciones en el gen CARD15, frente al 19,8% en los pacientes con EC que no habían sido intervenidos en ninguna ocasión. Las diferencias entre ambos grupos eran estadísticamente significativas (OR 2,50 95%IC 1,25-5,03 $p < 0,01$) (figura 22). Al considerar únicamente las dos mutaciones que parecían estar asociadas con la EC en población gallega, G908R y 1007fs, el 27,5% de los individuos que portaban ambas mutaciones habían sido sometidos a algún tipo de cirugía, frente a tan sólo el 6,3% de individuos portadores no intervenidos quirúrgicamente, observándose también diferencias estadísticamente significativas (OR 3,55 95%IC 1,33-9,42; $p < 0,001$) (figura 23). El análisis más detallado de las intervenciones realizadas, mostró que las mutaciones en CARD15 eran significativamente más frecuentes en pacientes que habían sufrido algún tipo de resección ileal (43,1%) que en los que no habían presentado esta cirugía (21,1%) (OR 2,84 95%IC 1,39-5,80 $p < 0,01$) (figura 24), observándose del mismo modo diferencias estadísticamente significativas cuando se consideraban únicamente portadores de G908R y 1007fs (29,4% frente al 8,8% de individuos

portadores con o sin cirugía, respectivamente, (OR 4,33 95%IC 1,81-10,33 $p < 0,01$) (figura 25). En el caso de los pacientes que habían sido intervenidos por sus fistulas, aunque en ambos casos se observaba una mayor frecuencia de mutaciones en CARD15 en pacientes que habían experimentado este tipo de cirugía (figura 24), las diferencias sólo eran significativas cuando se consideraban pacientes portadores de las dos mutaciones asociadas a EC en población gallega. Así, el 31,6% de los pacientes que habían experimentado cirugía de fistulas portaban las variantes G908R ó 1007fs, frente al 13,3% en pacientes sin este tipo de cirugía (OR 3,08 95% IC 1,08-8,86 $p < 0,05$) (figura 25).

Analizando de forma individual cada una de las tres mutaciones, se observa que la variante R702W aparece aproximadamente con igual frecuencia en pacientes intervenidos o no quirúrgicamente (13,0% frente al 13,5%, respectivamente). Sin embargo, la situación es muy diferente al observar la frecuencia de las otras dos mutaciones. La mutación G908R se observó más frecuentemente en pacientes con cirugía previa (14,5%) que en los que no habían sido intervenidos (3,1%), siendo estas diferencias significativas. La variante de inserción (1007fs) se observó en el 14,5% de los pacientes operados y en el 4,2% de los no intervenidos ($p < 0,05$). La frecuencia de cada una de las tres variantes con respecto a los tres tipos de cirugía considerados en este estudio se muestra en la tabla 16. Al analizar los resultados para cada tipo de cirugía en particular, se observa que los individuos portadores de G908R presentan significativamente una mayor frecuencia de intervenciones por fistulas (31,6% frente al 4,8% en los no intervenidos, $p < 0,01$). En cuanto a las intervenciones por cirugía ileal, la mutación 1007fs se encontró significativamente asociada a este tipo de cirugía (el 17,6% de los pacientes con cirugía ileal portaban esta mutación frente al 4,4% de los pacientes sin cirugía ileal, $p < 0,05$). La variante G908R también era más frecuente en

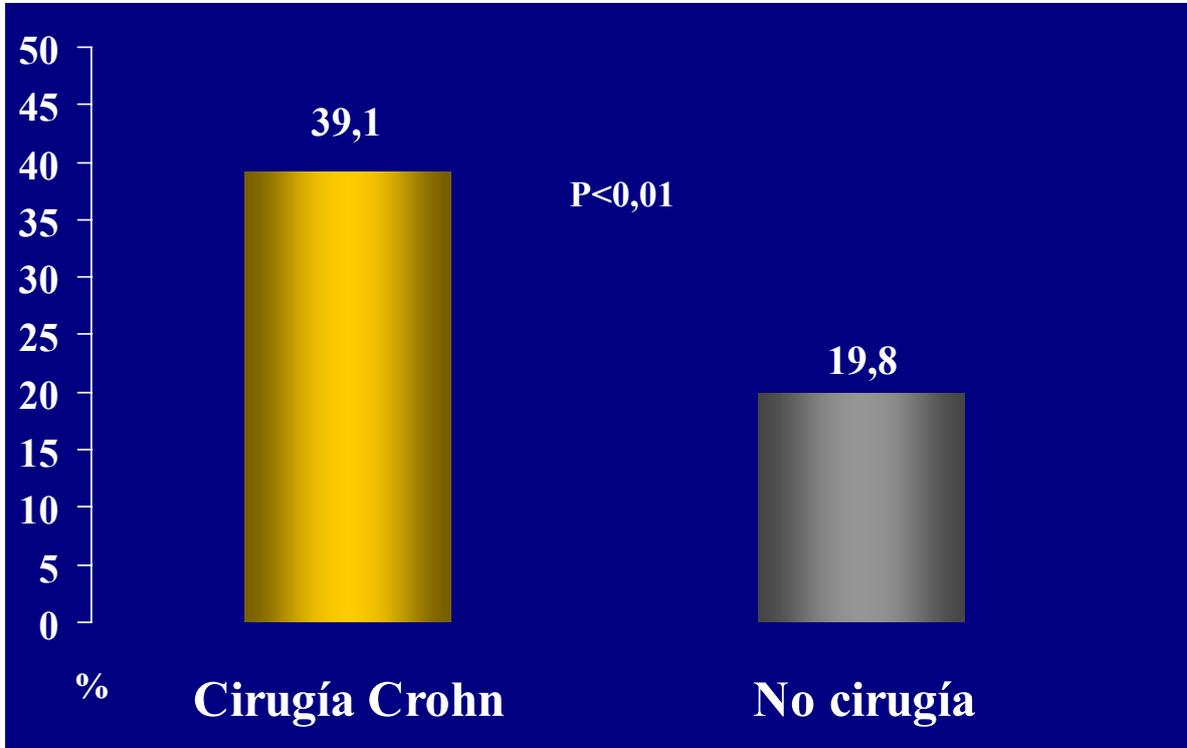
pacientes intervenidos quirúrgicamente por fistulas (13,7% frente al 5,3%) y las diferencias se aproximaban a la significación ($p < 0,01$).

El análisis de la relación entre las mutaciones en *CARD15* y la apendicectomía no reflejó en ningún caso resultados significativos, si bien se observó en todos los casos que la frecuencia de mutaciones en *CARD15* era siempre mayor en los pacientes que no habían experimentado apendicectomía.

TABLA 16: Frecuencia de portadores de las principales mutaciones del gen *CARD15* en cada tipo de cirugía estudiada

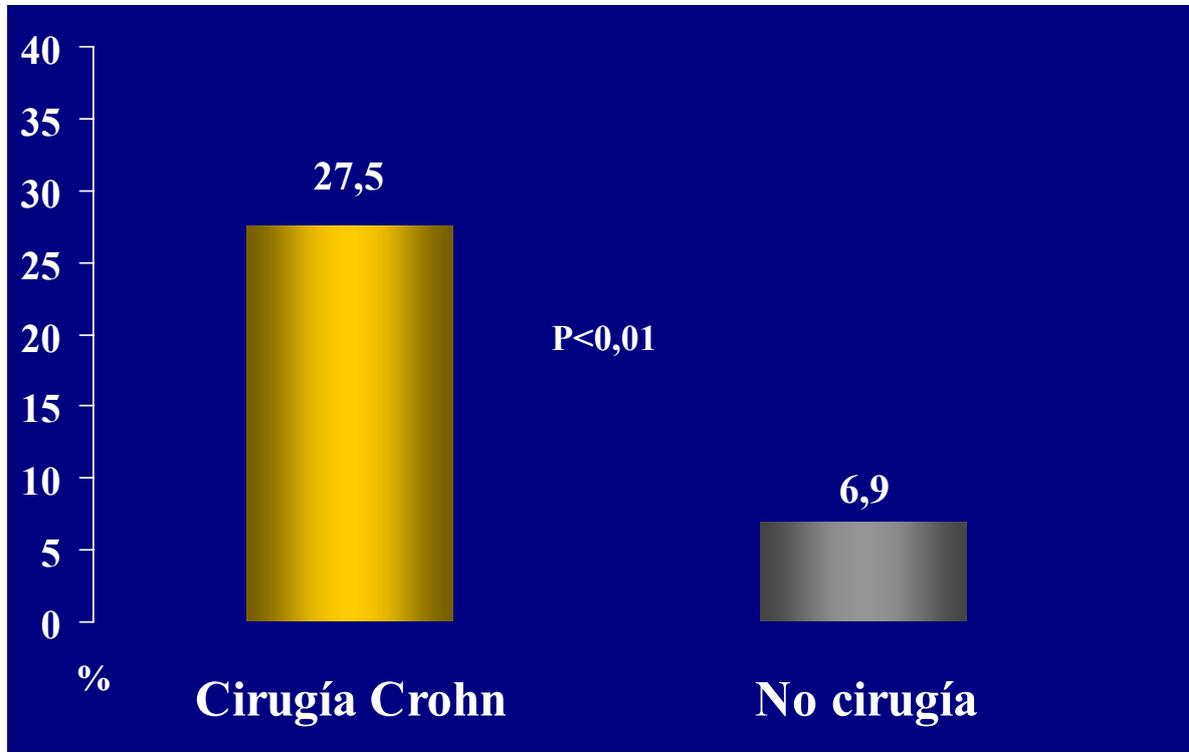
		R702W		G908R		1007fs	
Resección Ileal	SÍ	15,7	P = 0,55	13,7	P = 0,06	17,6	P = 0,01
	NO	12,3		5,3		4,4	
Cirugía Fístulas	SÍ	5,3	P = 0,27	31,6	P = 0,001	0	P = 0,16
	NO	14,4		4,8		9,6	
Apendicectomía	SÍ	12,5	P = 0,88	0	P = 0,07	6,3	P = 0,61
	NO	13,5		9,8		9,0	

Las frecuencias se expresan en porcentajes.



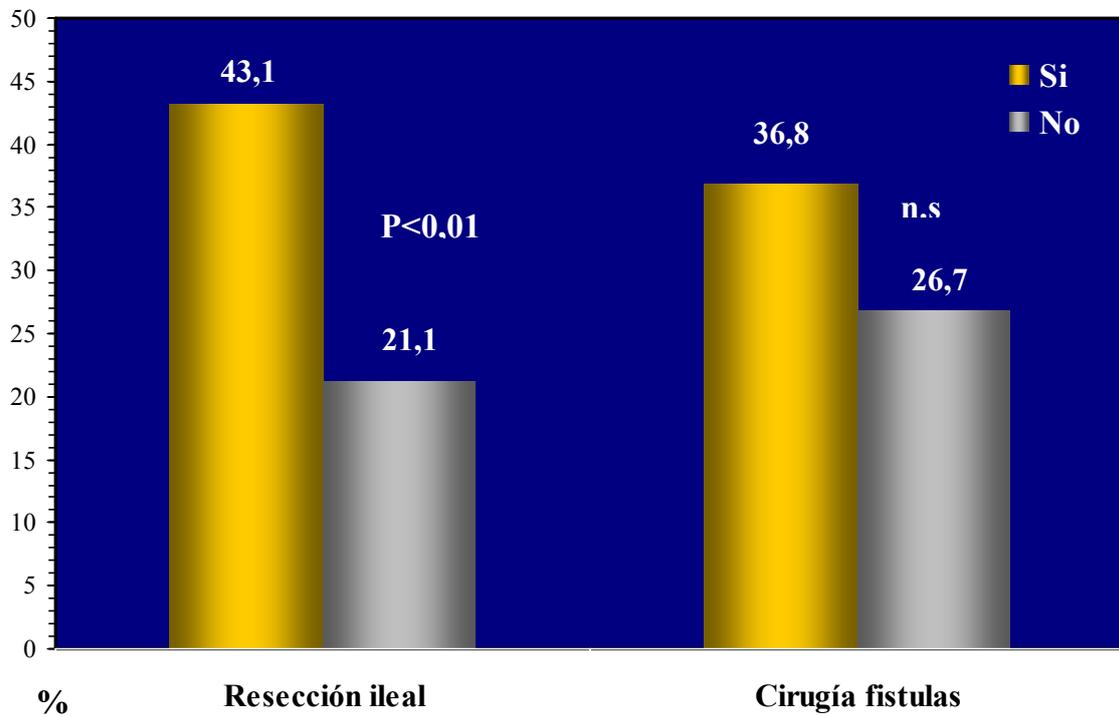
(OR 2,50 95%IC 1,25-5,03 p< 0,01)

FIGURA 22: Porcentaje de portadores de al menos un alelo mutante en cualquiera de las tres variantes estudiadas del gen NOD2 y su relación con la cirugía de la enfermedad de Crohn



(OR 3,55 95%IC 1,33-9,42; p<0,001)

FIGURA 23: Porcentaje de portadores de al menos un alelo mutante de las dos variantes estudiadas del gen NOD2 que confieren susceptibilidad a la población gallega y su relación con la cirugía de la enfermedad de Crohn



(OR 2,84 95%IC 1,39-5,80 p < 0,01) (OR 1,60 95%IC 0,58-4,35 n.s)

FIGURA 24: Porcentaje de pacientes portadores de al menos una de las tres mutaciones del gen NOD2 en relación con las principales cirugías de la enfermedad (resección ileal y cirugía fistulas)

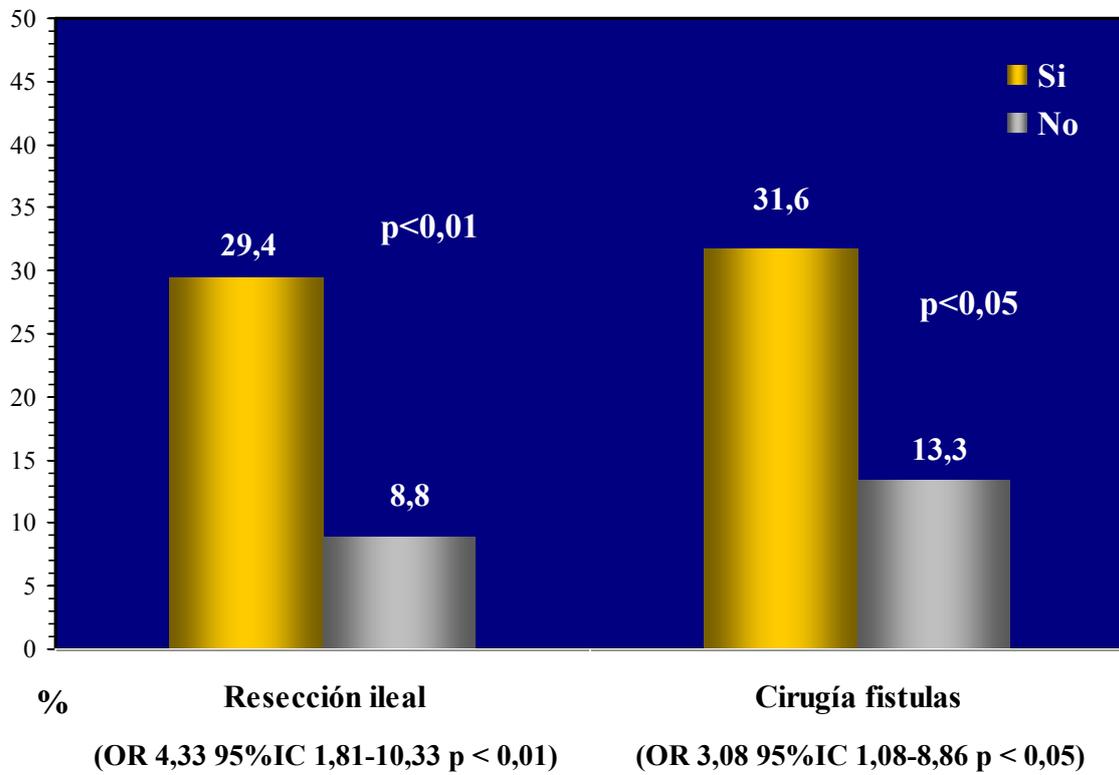


FIGURA 25: Porcentaje de pacientes portadores de al menos una de las dos mutaciones del gen NOD2 que influyen en la población gallega y su relación con las principales cirugías de la enfermedad (resección ileal y cirugía fistulas)

4.8. Relación de las mutaciones en el gen NOD2/CARD15 con los antecedentes de corticodependencia y corticorresistencia

En el momento de realizar la estratificación de los pacientes el 16,4% de los pacientes con EC habían presentado criterios de corticorresistencia y 21,2% criterios de corticodependencia.

A pesar de que el 40,7% de los pacientes corticorresistentes presentaba alguna mutación en alguna variante del gen NOD2 y, éstas solo se encontraban presentes en el 25,4% de los pacientes que no habían desarrollado corticorresistencia, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (OR 2,02 95% IC 0,85-4,77 $p=0,08$) (figura 26). El 22,9% de los pacientes previamente diagnosticados como córticodependientes presentaban alguna mutación del gen NOD2 en comparación con el 29,2% de los pacientes no corticodependientes que las presentaban, sin observarse diferencias entre ambos grupos (OR 0,79 95% IC 0,29-1,72, $p=n.s.$) (figura 26).

Analizando solo las dos mutaciones que confieren susceptibilidad a nuestra población, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre los corticorresistentes y los no corticorresistentes ni entre los corticodependientes y los no corticodependientes (figura 27).

Tras realizar un análisis individualizado de las tres mutaciones tanto con los antecedentes de corticorresistencia como de corticodependencia, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre corticodependientes y no corticodependientes en ninguna de las tres (figura 28), mientras que entre corticorresistentes y no corticorresistentes no se observaron diferencias en las mutaciones G908R y 1007fs, pero sí observamos que los pacientes con antecedentes de corticorresistencia eran portadores de más mutaciones de R702W que los pacientes sin corticorresistencia previa (OR 2,87 95% IC 1,04-7,91, $p<0,05$) (figura 29).

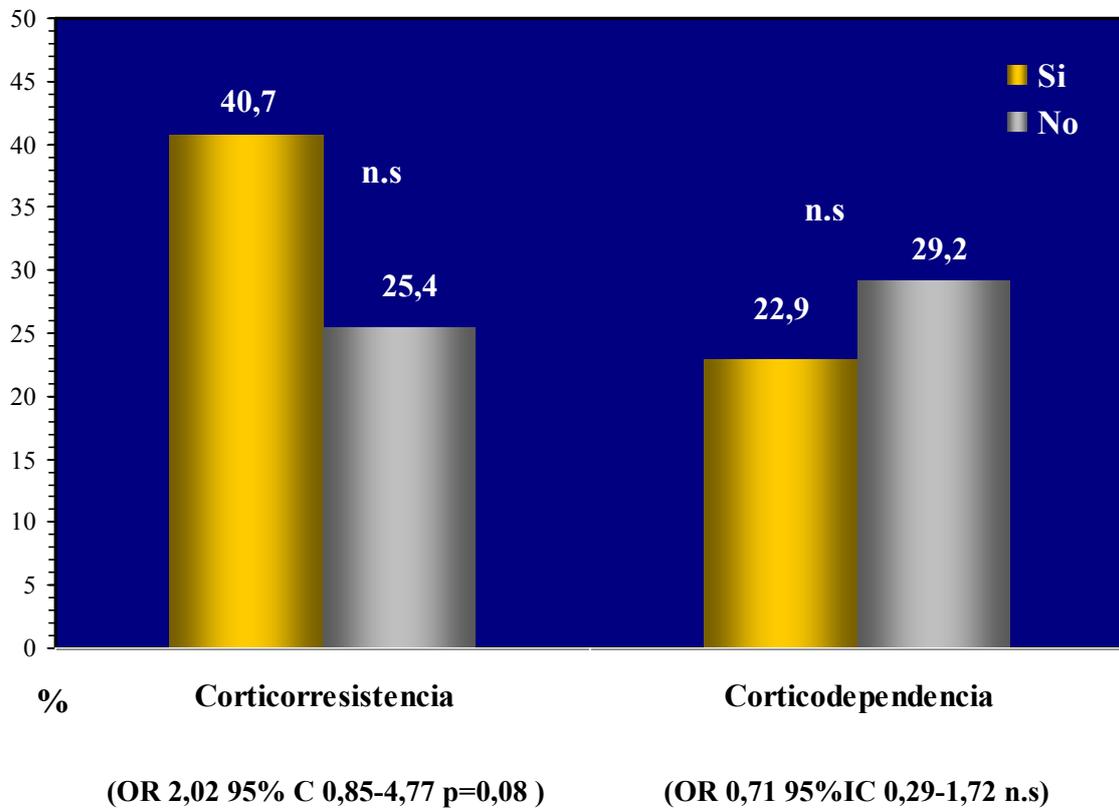


FIGURA 26: Porcentaje de pacientes portadores de al menos una de las tres mutaciones del gen NOD2 en relación con los antecedentes de corticorresistencia o corticodependencia

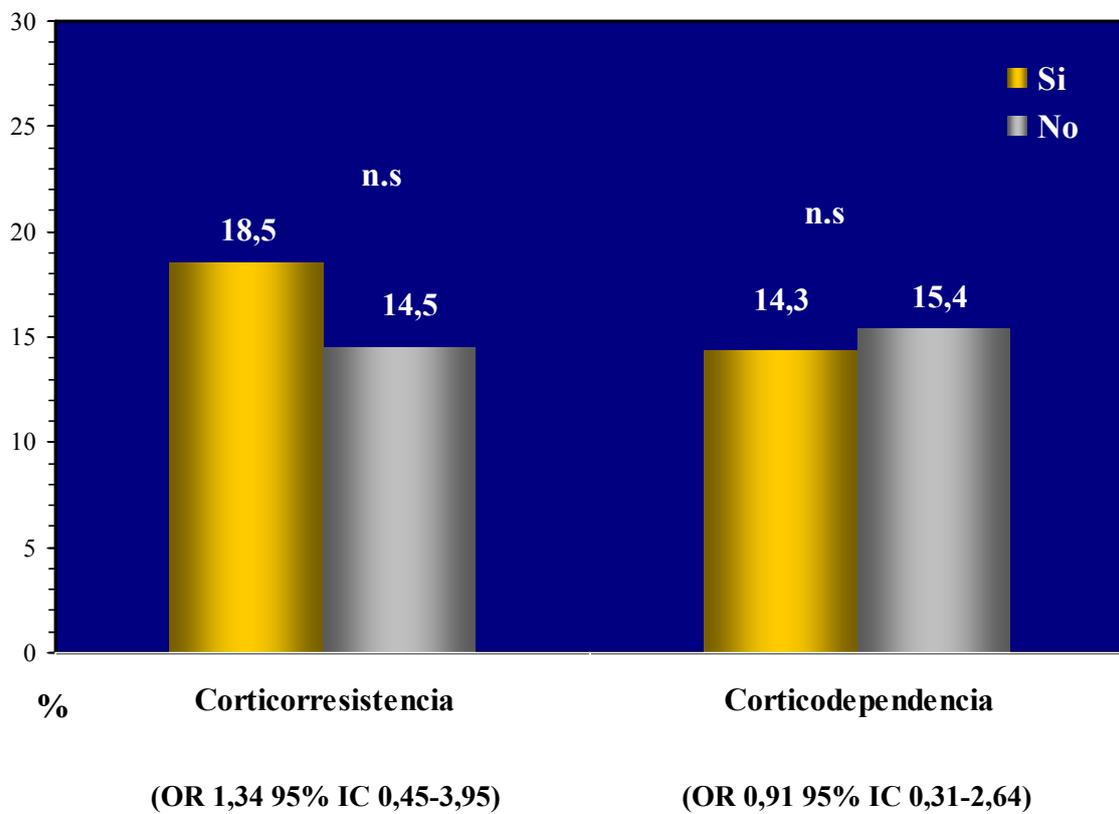


FIGURA 27: Porcentaje de pacientes portadores de al menos una de las dos mutaciones del gen NOD2 que confieren susceptibilidad para la EC en nuestra población en relación con los antecedentes de corticorresistencia o corticodependencia

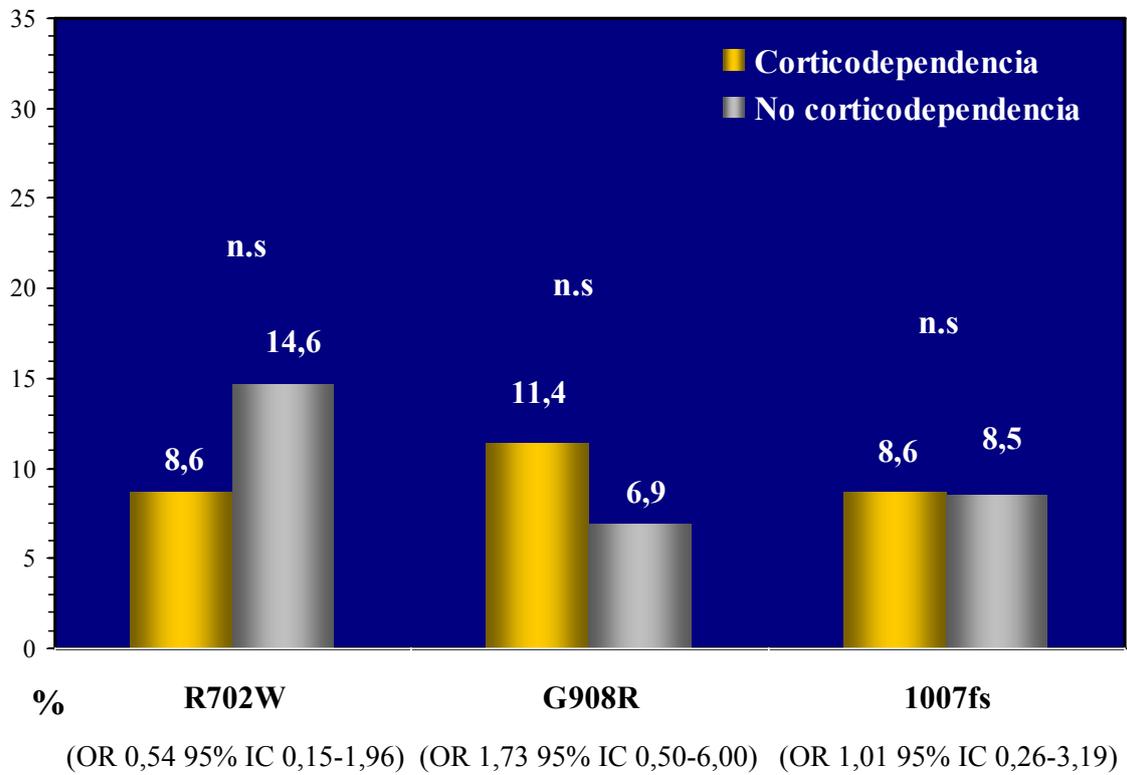


FIGURA 28: Porcentaje de pacientes portadores individualmente de cada una de las tres mutaciones del gen NOD2 según tuviesen o no antecedentes de corticodependencia

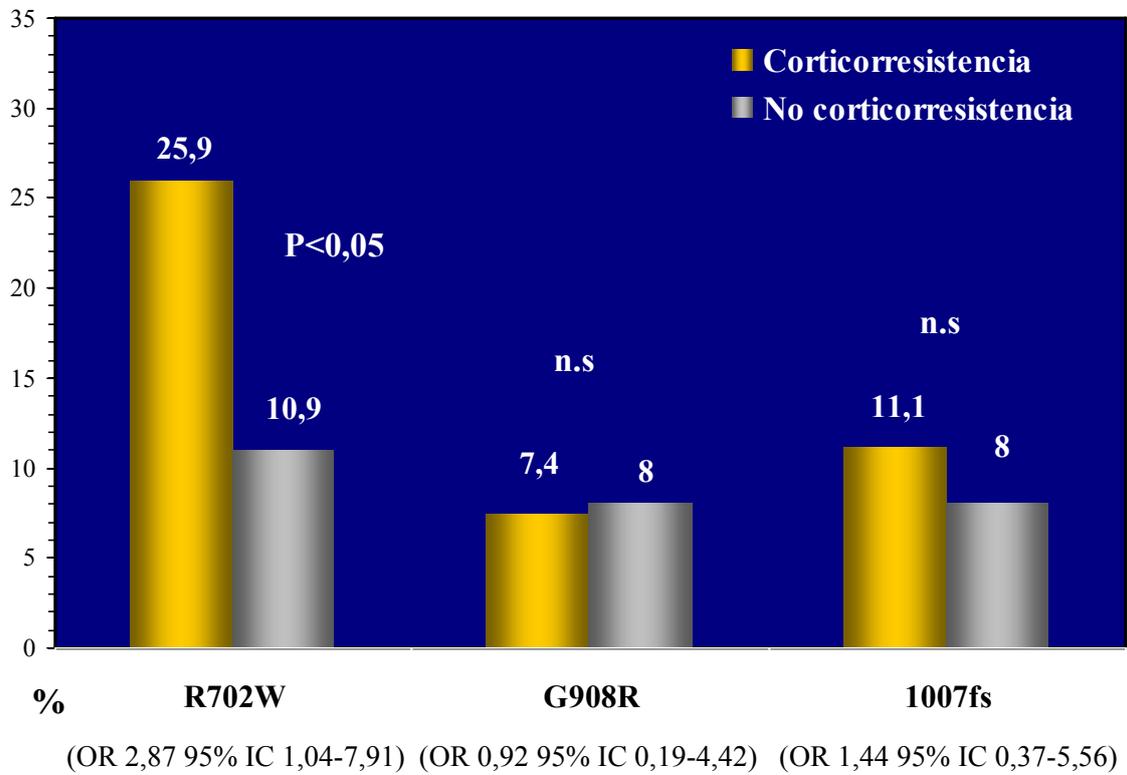


FIGURA 29: Porcentaje de pacientes portadores individualmente de cada una de las tres mutaciones del gen NOD2 según tuviesen o no antecedentes de corticorresistencia

4.9. Relación de las mutaciones en el gen NOD2/CARD15 y en RTL4 y CD14 con la respuesta al tratamiento con terapias biológicas

En total 67 pacientes, es decir el 40,6% han recibido tratamientos con terapias biológicas. De este grupo el 58,2% había recibido tratamiento por tener un patrón fistulizante perianal, mientras que el 41,9% eran pacientes con una EC inflamatoria.

El 26,9% de los pacientes que recibieron estos tratamientos presentaban alguna mutación de las tres variantes estudiadas, si consideramos solamente las dos variantes que se observó que conferían susceptibilidad a nuestra población, el 19,4% de los pacientes que recibieron terapias biológicas presentaba alguna de las mutaciones. En la tabla 17 se muestra el porcentaje de portadores de cada una de las tres variantes en los pacientes que recibieron terapias biológicas.

TABLA 17: Porcentaje de pacientes portadores de cada una de las tres mutaciones del gen NOD2 que han recibido tratamiento con terapias biológicas

Mutación	N	%
R702W (SNP8)	5	7,5
G908R (SNP12)	9	13,4
1007fr (SNP13)	6	9,0

El 6% de los pacientes presentaba mutación en la variante $TLR4^{+299}$, mientras que el 76,1% presentaba mutaciones en $CD14^{260}$.

Se observó que el 70,1% de los pacientes que recibieron terapias biológicas presentaron una respuesta positiva a las mismas. Analizando por separado los dos patrones evolutivos observamos que el 78,6% de los pacientes con patrón inflamatorio

presentó buena respuesta a estas terapias, mientras que entre los pacientes con patrón fistulizante la respuesta fue del 64,1% (figura 30).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la respuesta a las terapias biológicas entre los pacientes con mutaciones en CARD15 (respondieron el 66,7%) y los pacientes sin mutaciones (respuesta en el 71,4%) (OR 0,80 95%IC 0,25-2,55). Si analizamos solamente los pacientes que tienen alguna de las mutaciones que confieren susceptibilidad a la población gallega, tampoco se observaron diferencias en cuanto a la respuesta a las terapias biológicas entre el grupo con mutaciones y que no las tenía (OR 0,61 95%IC 0,17-2,18). En el análisis individualizado de cada una de las tres mutaciones de CARD15, tampoco se observaron diferencias en cuanto a la respuesta a las terapias biológicas dependiendo de si tuviesen o no mutaciones (figura 31).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la respuesta a las terapias biológicas entre los pacientes portadores de mutaciones en *TLR4*⁺²⁹⁹ (100%) y los que no las tenían (66,7%) ($p=0,17$), ni entre los que tenían mutaciones en *CD14*⁻²⁶⁰ y los que no (OR 1,58 95%IC 0,48-5,18).

Con el fin de valorar la posible influencia de las mutaciones en la respuesta a las terapias biológicas se analizaron por separado los pacientes con patrón inflamatorio y patrón fistulizante; en ninguno de los dos subgrupos se observó diferencias en cuanto a las respuestas a las terapias biológicas entre los pacientes con mutaciones y los que no las tenían (figura 32). El análisis de la respuesta según la presencia de alguna de las mutaciones que como se observó previamente conferían susceptibilidad para la EC en nuestra población tampoco mostró diferencias en ninguno de los dos subgrupos (figura 33). En el análisis individualizado de las tres mutaciones de CARD15, ni en el subgrupo de pacientes con patrón inflamatorio (figura 34) ni en el de patrón fistulizante (figura 35) se observaron diferencias en cuanto a la respuesta a los biológicos.

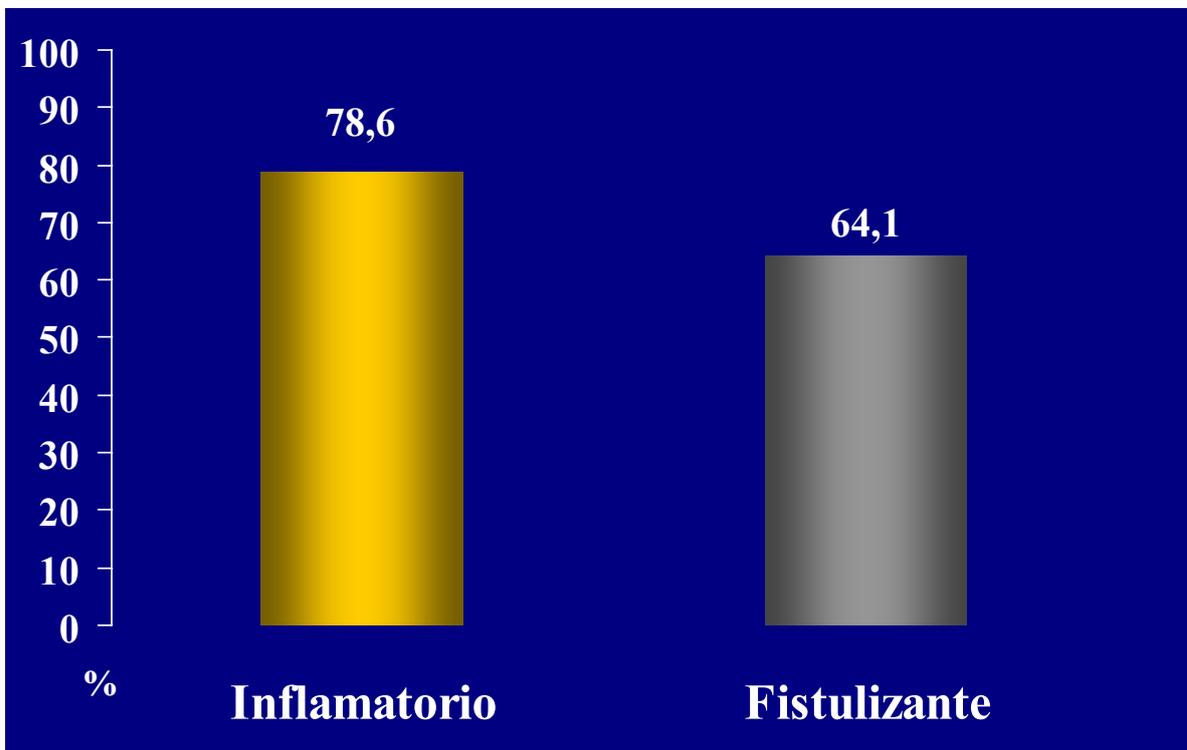


FIGURA 30: Porcentaje de pacientes respondedores a las terapias biológicas según el patrón evolutivo de su enfermedad

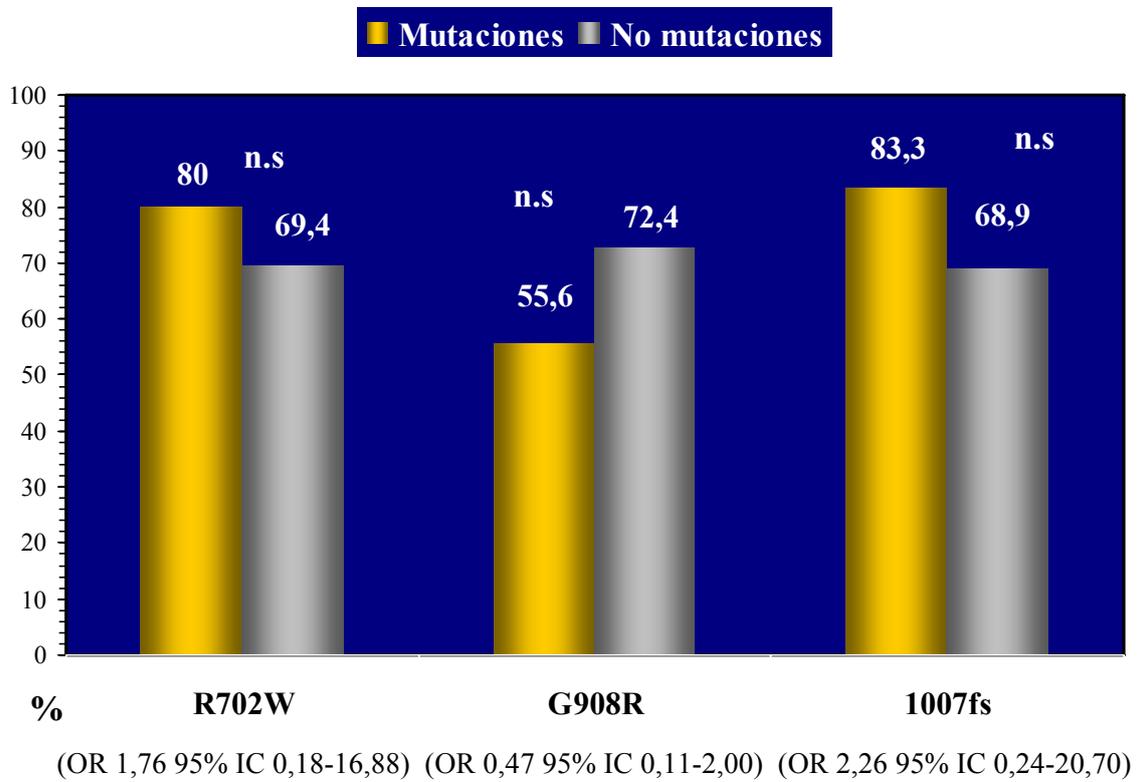


FIGURA 31: Porcentaje de pacientes respondedores al tratamiento con terapias biológicas según la presencia o no de cada una de las mutaciones en el gen NOD2

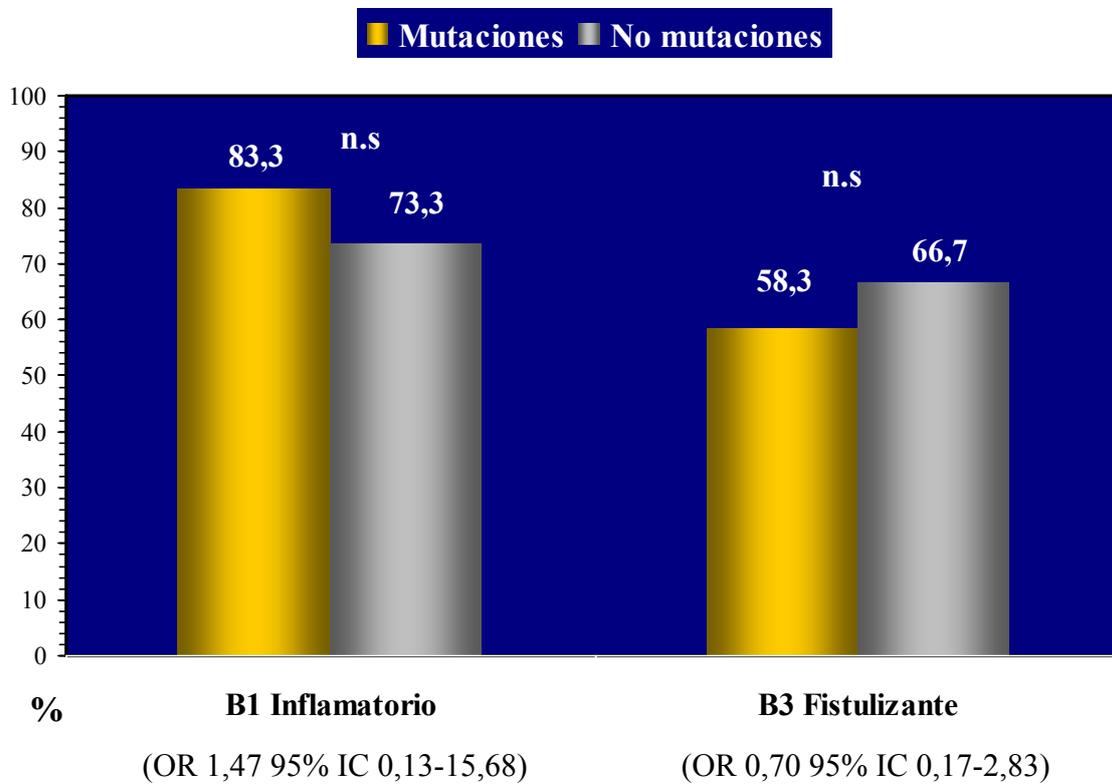


FIGURA 32: Porcentaje de pacientes respondedores al tratamiento con terapias biológicas según tuviesen o no mutaciones en CARD15 en cada uno de los dos subgrupos (inflamatorio o fistulizante de la clasificación de Viena)

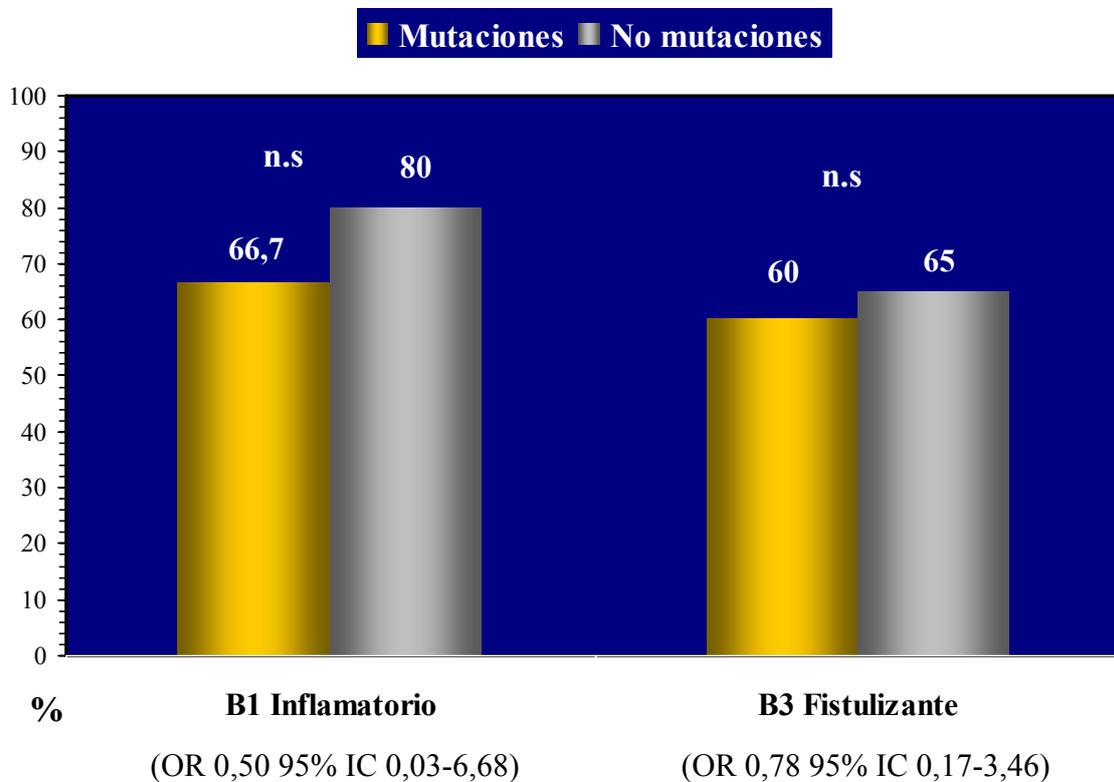


FIGURA 33: Porcentaje de pacientes respondedores al tratamiento con terapias biológicas según tuviesen o no alguna de las dos mutaciones en CARD15 que confieren susceptibilidad en nuestra población en cada uno de los dos subgrupos (inflamatorio o fistulizante de la clasificación de Viena)

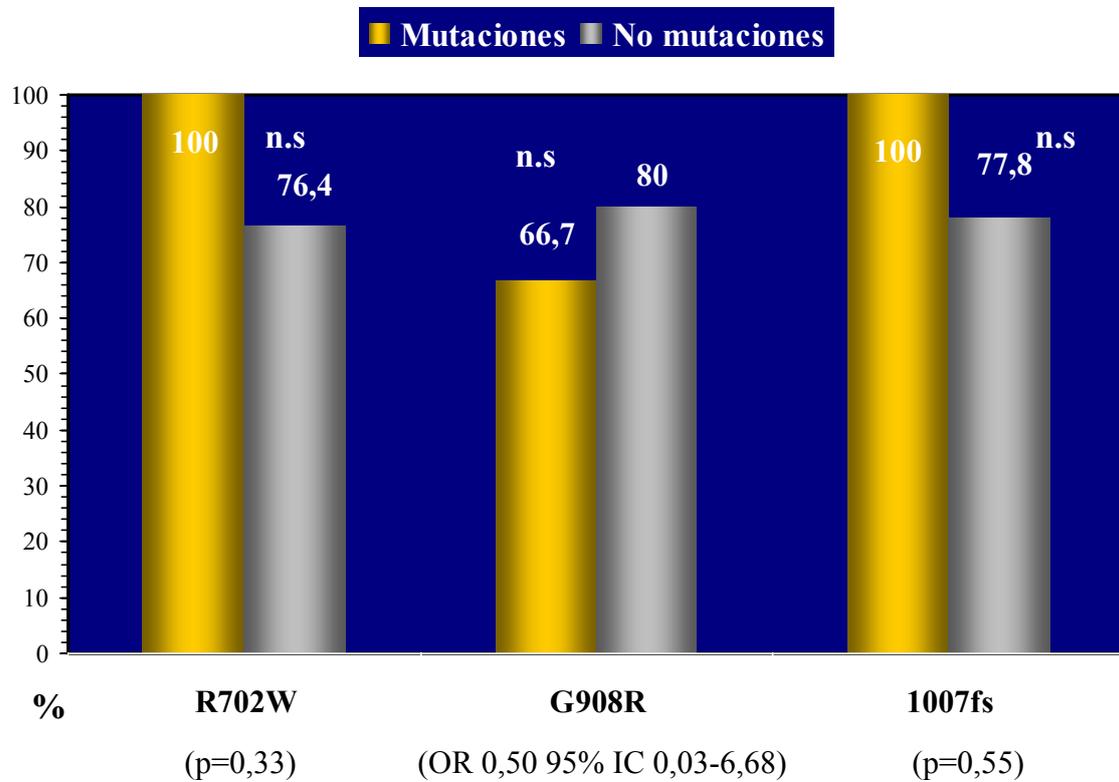


FIGURA 34: Porcentaje de pacientes con patrón inflamatorio (B1) respondedores al tratamiento con terapias biológicas según la presencia o no de cada una de las mutaciones en el gen NOD2

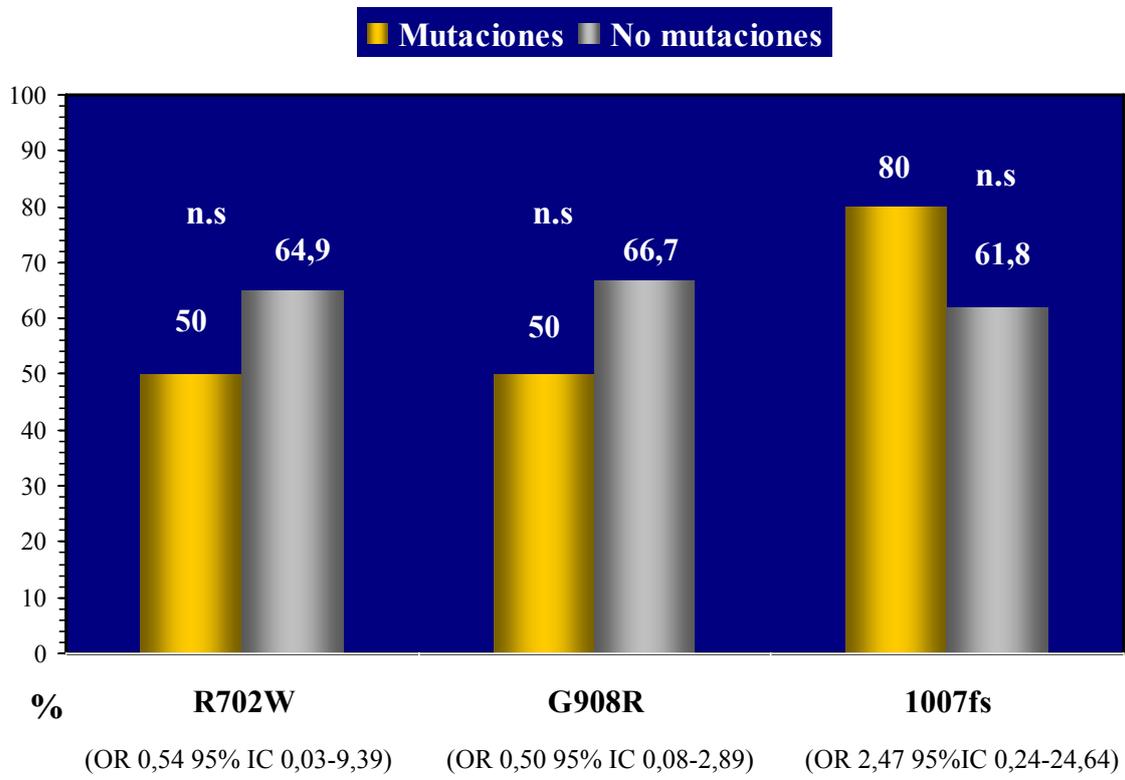


FIGURA 35: Porcentaje de pacientes con patrón fistulizante (B3) respondedores al tratamiento con terapias biológicas según la presencia o no de cada una de las mutaciones en el gen NOD2

En el análisis de las mutaciones en $TLR4^{+299}$ no se observaron diferencias en cuanto a la respuesta a las terapias biológicas ni en el patrón inflamatorio ($p=0,34$) ni en el fistulizante ($p=0,44$). En cuanto al análisis de las mutaciones en $CD14^{-260}$ se observó que los pacientes con patrón inflamatorio respondían mejor a las terapias biológicas aquellos que presentaban mutaciones (OR 6,80 95%IC 1,07-42,22; $p<0,05$), sin embargo en el patrón fistulizante no se encontraron diferencias (OR 0,66 95% IC 0,11-3,90; n.s.) (figura 36).

Recibieron tratamiento con infliximab 61 pacientes, de ellos el 60,7% obtuvo respuesta clínica al mismo, el 23% presentó pérdida de respuesta al tratamiento tras haber respondido inicialmente, mientras que el 11,5% presentó algún tipo de reacción adversa que obligó a suspenderlo.

No se observaron diferencias en cuanto a la respuesta al fármaco según la presencia o no de mutaciones de CARD15, ni de manera global (OR 0,89 95%IC 0,28-2,81; n.s), ni analizando solo las mutaciones con influencia en nuestra población (OR 0,70 95%IC 0,20-2,41; n.s), ni en el análisis individualizado de las tres mutaciones (figura 37). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la respuesta al infliximab entre los pacientes que portaban mutaciones en $TLR4^{+299}$ y los que no, pero los pacientes con mutaciones en $CD14^{-260}$ presentaban mejor respuesta al infliximab que los que no las tenían (68,1 vs 35,6%) (OR 3,84 95%IC 1,09-13,44; $p<0,05$).

En cuanto a la valoración de la pérdida de respuesta al infliximab, no se observó influencia de mutaciones en CARD15 ni en TLR4, pero sí que los pacientes que no tenían mutaciones en CD14 tenían una mayor pérdida de respuesta al tratamiento (figura 38). En cuanto a las reacciones adversas no se ha observado asociación entre ninguna de las mutaciones estudiadas y un mayor riesgo de reacciones adversas del fármaco.

Recibieron tratamiento con adalimumab 24 pacientes, 8 *naive* y 16 por fracaso, pérdida de respuesta o reacción adversa al infliximab. El 75% obtuvo respuesta clínica al adalimumab, el 16,7% presentó pérdida de respuesta al tratamiento tras haber respondido inicialmente, mientras que el 12,5% presentó algún tipo de reacción adversa que obligó a suspenderlo.

En cuanto a la respuesta, no se observaron diferencias en cuanto a la respuesta al fármaco según la presencia o no de mutaciones de *CARD15*, *TLR4*⁺²⁹⁹ ni *CD14*⁻²⁶⁰ (figura 39). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas para la pérdida de respuesta, ni para los efectos adversos del adalimumab en relación con la presencia o no de las mutaciones estudiadas, tanto en *NOD2*, como en *RTL4* o *CD14*.

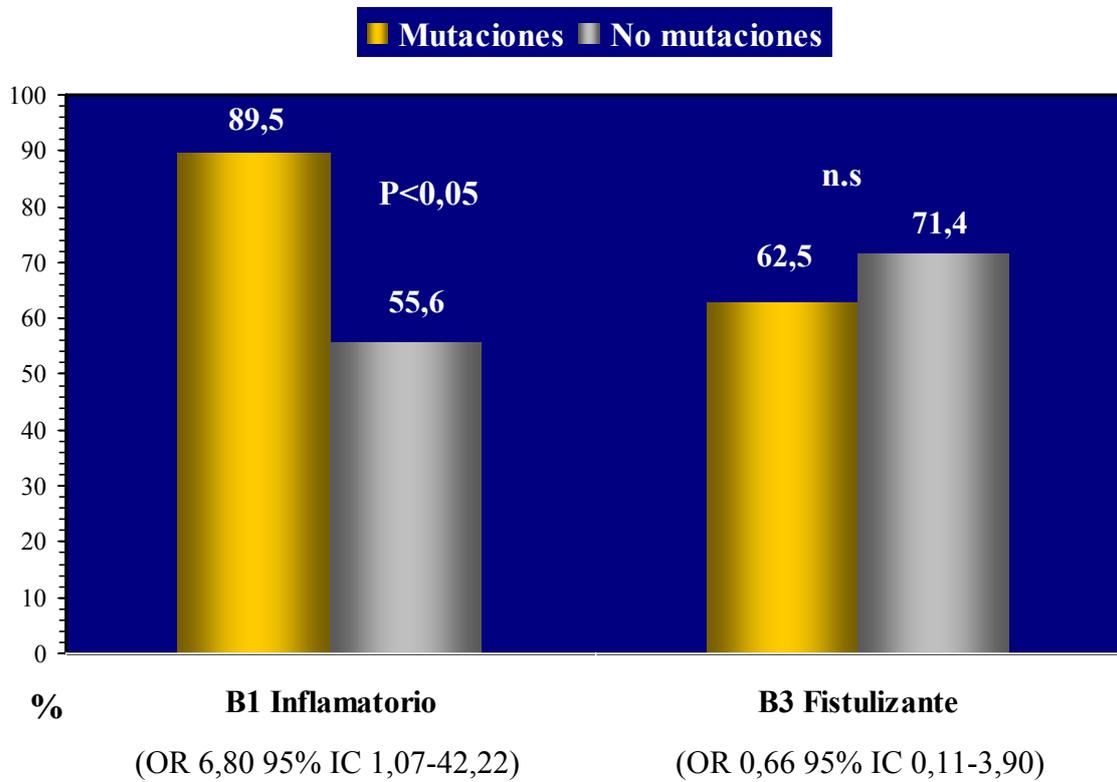


FIGURA 36: Porcentaje de pacientes respondedores al tratamiento con terapias biológicas según tuviesen o no mutación en $TLR4^{+299}$ en cada uno de los subgrupos (inflamatorio o fistulizante) de la clasificación de Viena

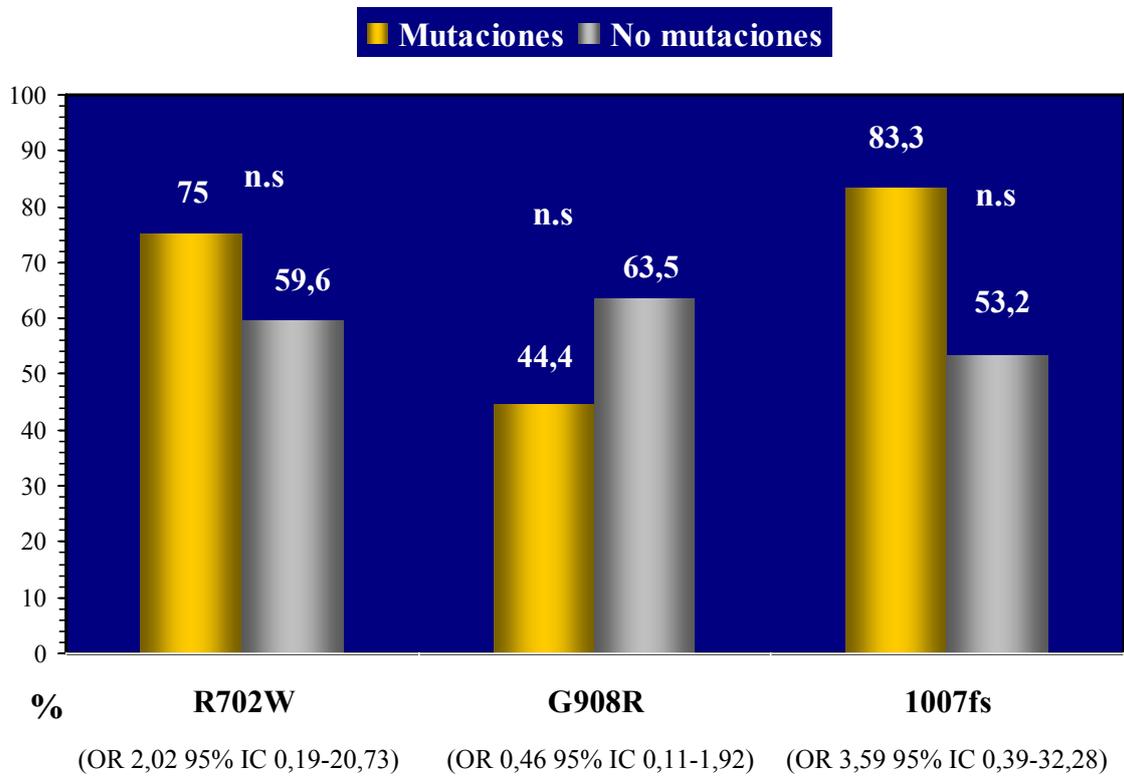


FIGURA 37: Porcentaje de pacientes respondedores al tratamiento con infliximab según la presencia o no de cada una de las mutaciones en el gen NOD2

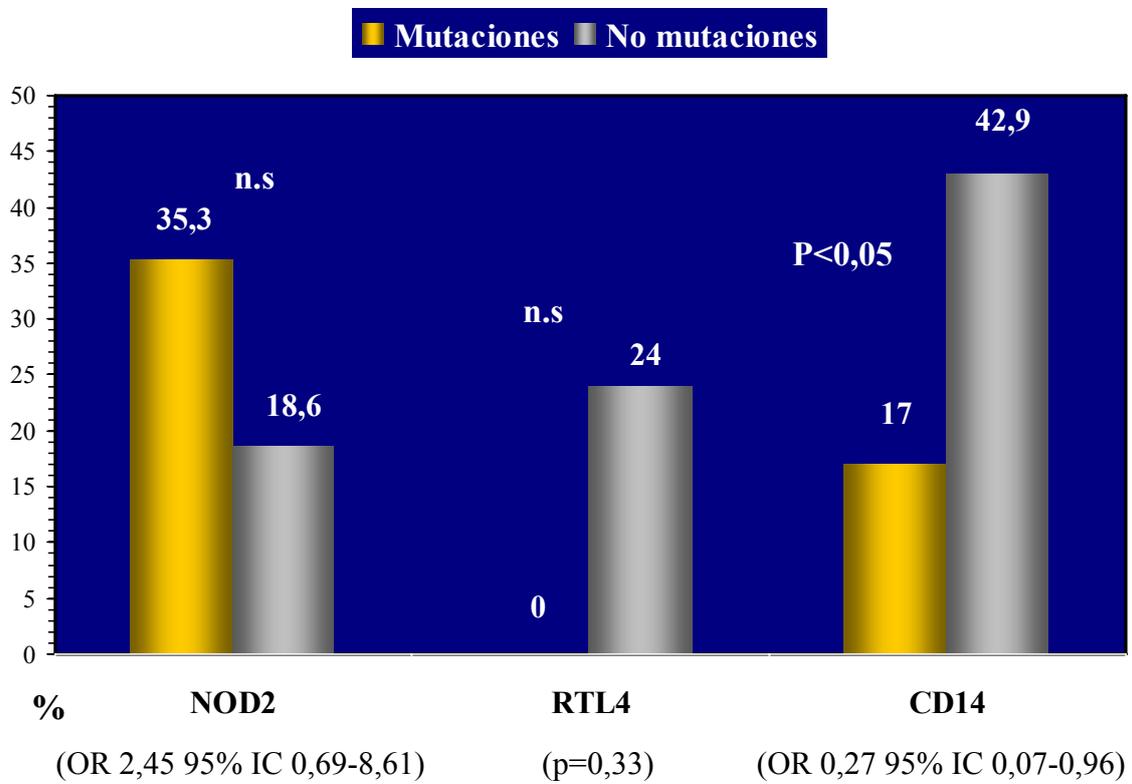


FIGURA 38: Porcentaje de pacientes con pérdida de respuesta al tratamiento con infliximab según la presencia o no de mutaciones en NOD2, RTL4 o CD14

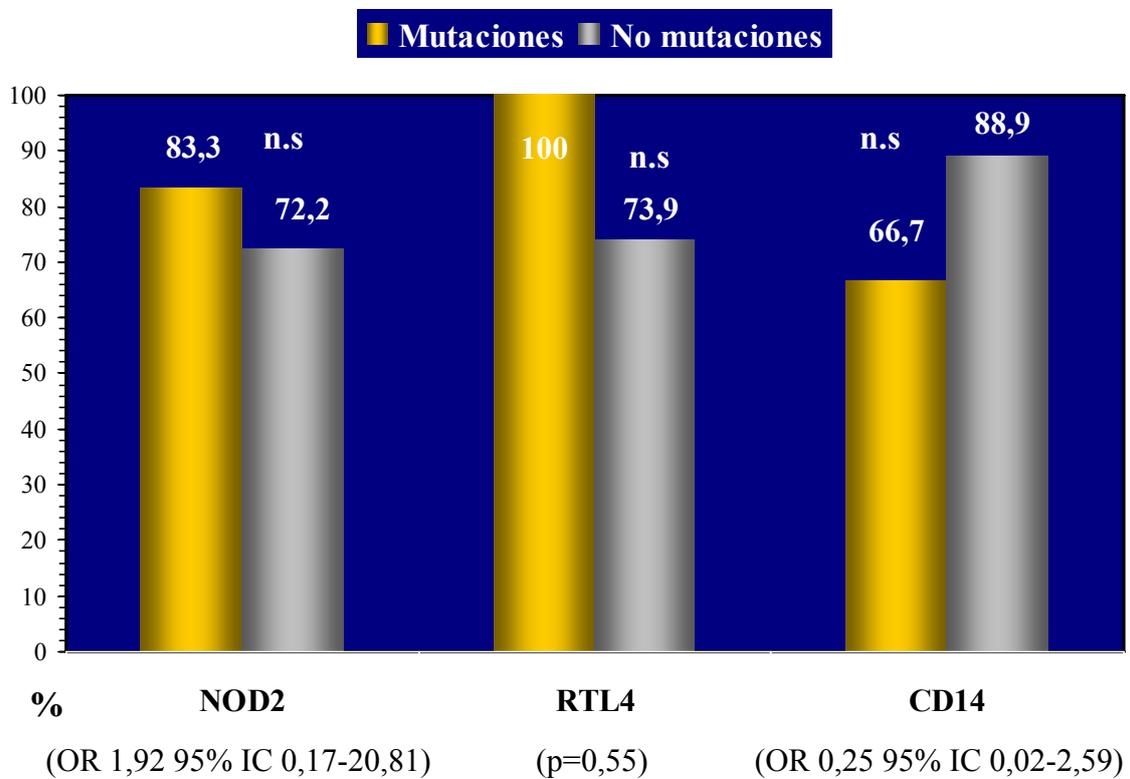


FIGURA 39: Porcentaje de pacientes con respuesta al tratamiento con adalimumab según la presencia o no de mutaciones en NOD2, RTL4 o CD14

5. DISCUSIÓN

5.1. Frecuencia de mutaciones en el gen NOD2/CARD15 y relación con la susceptibilidad para enfermedad de Crohn

Desde que en 2001 dos grupos independientes identificase al gen NOD2, posteriormente rebautizado como CARD15, como el primero que confería susceptibilidad para la EC (58,59), se ha confirmado y validado en diversas poblaciones que la presencia de las variantes de NOD2/CARD15 se asocian a la EC y no a la CU. El análisis de los resultados confirma la idea de la EC como una enfermedad poligénica, ya que, a pesar de las asociaciones descritas, la mutación en NOD2/CARD15 no es necesaria ni suficiente para el desarrollo de la enfermedad. En la actualidad se cree que la variante CARD15 puede explicar alrededor del 20% de la predisposición genética de la EC.

La mayoría de los estudios se han realizado en poblaciones caucásicas. Los datos aproximados que se han reportado de estudios multicéntricos y con un gran número de pacientes (147) indican que entre el 30-40% de los pacientes son heterocigotos para una de las tres mutaciones, y entre el 3 y el 15% son homocigotos (la misma mutación en ambos cromosomas) o heterocigotos compuestos (dos mutaciones diferentes, una en cada cromosoma), en comparación con la población de controles sanos, en la que un 7-12% son heterocigotos y un 0-1% son homocigotos. El riesgo relativo de desarrollar EC cuando se porta una mutación es de 2 a 3, pero aumenta hasta un 20-40 en el caso de dos mutaciones (heterocigoto compuesto u homocigoto), lo que sugiere un efecto gen-dosis para las tres mutaciones. En el supuesto de que la prevalencia de la EC sea de 1-2/1000, de estos riesgos relativos se deduce que la probabilidad de desarrollar EC es del 4-6% en el grupo con dos mutaciones. Con estos resultados se puede observar que menos del 10% de los pacientes portadores de dos

alelos de riesgo NOD2/CARD15 desarrollarán la enfermedad, lo que implica que otros genes y estímulos medioambientales están implicados en la misma (148).

La reciente publicación del primer metaanálisis sobre las variantes del NOD2 en las diferentes poblaciones (149) nos ha aportado nuevos datos, tanto de frecuencia como de variaciones geográficas. En el mismo se hace referencia a 42 poblaciones (en la actualidad hay aproximadamente 80 estudiadas), la mayoría de ellas europeas y de origen caucásico. En este metaanálisis se demostró un riesgo relativo de 2,39 (95% IC: 2,00-2,86) en los portadores de una mutación y de 17,1 (95% IC: 10,7-27,2) en los portadores de 2 o más variantes. Analizando por separado las tres variantes se observó un mayor riesgo de padecer EC en los que presentaban mutación de la variante de la inserción (SNP13).

En nuestra población, exclusiva de individuos gallegos, los portadores de al menos una copia de alelos mutados del gen NOD2/CARD15 tenían un mayor riesgo de desarrollar EC (OR 2,23 95% IC 1,36-3,72; $p < 0,01$). Nuestros datos, aunque ligeramente inferiores, se asemejan a la media de la mayoría de las poblaciones; pero si solo consideramos los estudios con individuos de raza caucásica, el riesgo que confieren las mutaciones en nuestra población es ligeramente inferior, pues el metaanálisis de *Economou et al* incluye poblaciones asiáticas (150-152) en las que no se encontró ni un solo individuo ni caso ni control con mutaciones, como posteriormente explicaremos con más detalle. El riesgo que confiere el hecho de ser portador de dos alelos mutados no ha podido ser calculado porque no hay ningún sujeto con dos copias mutadas en la muestra de los controles, aunque sí 6 pacientes homocigotos o heterocigotos compuestos ($p < 0,05$).

Al igual que se ha referido una importante variación geográfica en cuanto al riesgo de desarrollar EII, los estudios poblacionales han demostrado grandes diferencias

poblacionales y geográficas en cuanto a la presencia de las variantes del gen NOD2/CARD15 en los pacientes con EC. La prevalencia de pacientes con EC portadores de al menos un alelo de susceptibilidad del gen CARD15 varía en general del 27% al 50% en la mayoría de las poblaciones europeas de raza caucásica. El estudio multicéntrico de *Lesage et al* (138), con participación de varios países europeos como Bélgica, Dinamarca, Francia, Alemania, Irlanda, Italia, España y Suecia mostró una frecuencia de portadores del 50%. Otros estudios en países centroeuropeos mostraron cifras similares, así en Gran Bretaña (Oxford) (153) la frecuencia de pacientes portadores era del 38,5%, en Bélgica (154) del 46,3%, en Italia (155) 38,2, en Francia (156) 38, en Alemania (157) 36,5 y del 46% en la Republica Checa (158). Curiosamente el estudio que ha descrito una mayor frecuencia de pacientes portadores de al menos un alelo del gen NOD2 ha sido en Grecia (159), donde se observaron mutaciones en el 81,7% de los pacientes. En el primer estudio realizado en España (el nuestro ha sido el segundo en tiempo), por el grupo del Hospital Clínico San Carlos de Madrid (160), se observó una frecuencia de portadores del 32,8%, ligeramente superior a la de nuestra población. En las poblaciones irlandesa (161) y escocesa (162) se encontraron frecuencias bastante similares a las de nuestra población, del 27,4 y 22,8% respectivamente. Sin embargo en los países escandinavos, generalmente caracterizados por ser poblaciones más homogéneas, se encontraron frecuencias mucho más bajas de lo esperado para población europea: en Finlandia (163) la frecuencia de portadores fue del 15,5%, en Suecia (164) del 15,2% y en Dinamarca (165) del 21%.

En las poblaciones caucásicas relativamente alejadas de Europa, pero descendientes directos sin apenas mestizaje de población europea, las frecuencias que se encontraron fueron similares a las de los países centroeuropeos. En Estados Unidos (166,167) los porcentajes de portadores varían desde el 36,5 al 45%, en Canadá

(168,169) entre el 32,5 y el 45% (esta última en la región de Québec); finalmente en Australia (170) se observaron mutaciones en el 36,7% de los portadores. Por otro lado ha sido muy llamativo el hecho de que no se hayan podido identificar ni una sola variante ni en pacientes ni en controles en las poblaciones asiáticas de Japón (150), Corea (151), China (152, 171) e India (172), con la característica añadida de que estas poblaciones son mucho más homogéneas. Muy recientemente se ha publicado un estudio en Irán (173), aunque es cierto que con un número escaso de pacientes, en el que se observaron mutaciones en el 32% de los pacientes con EC, con lo que se confirma el dato de que en poblaciones asiáticas también pueden estar presentes estas mutaciones. En otros países de origen árabe como Turquía (174) la frecuencia de pacientes con EC portadores de las mutaciones fue muy baja (10,7%), mientras que en Túnez (175) la frecuencia resultó tan baja que no se observaron diferencias estadísticamente significativas con el grupo control. En el otro estudio realizado en población africana, en concreto en pacientes de color de Sudáfrica (176), la frecuencia de mutaciones resultó muy baja.

Como curiosidad, en Latinoamérica se han realizado solamente dos estudios. Uno en Chile (177) con un número de pacientes tan escaso que apenas se pueden extrapolar conclusiones, aunque la tendencia de los resultados parece orientares a un número muy bajo de pacientes portadores. El otro se ha realizado en Brasil (178) y se han observado mutaciones en el 30% de los pacientes con EC; es importante recordar que la población de Brasil es muy heterogénea y existe un importante número de descendientes alemanes.

Con todos estos datos parece claro que el origen étnico de los pacientes juega un papel primordial en el número de portadores de las mutaciones. En un estudio realizado en Israel (179) en judíos tanto de origen Ashkenazi como de origen no Ashkenazi se

observaron mutaciones en el 27% de los mismos, sin observarse diferencias entre los orígenes Ashkenazi o no, pero en un reciente estudio realizado en Israel en población de origen árabe (180) se observó una frecuencia de mutaciones muy baja (menos del 9% de portadores) sin apreciarse diferencias con los controles. En más países se han encontrado diferencias étnicas. En un estudio realizado en pacientes pediátricos de Estados Unidos (181) se observó que tanto los niños afroamericanos con EC ($p < 0.001$) como los hispanos con EC ($p < 0,001$) presentaban unas tasas mucho más bajas de mutaciones que los de origen caucásico. Algo parecido se observó en Nueva Zelanda, donde se vio que los pacientes de origen Maorí tenían menos mutaciones (182). En las islas británicas se observaron importantes diferencias entre la población de Oxford (153) y la escocesa (162).

En España no existen tantas diferencias étnicas pero sí se observan grandes diferencias entre los habitantes de distintas comunidades autónomas. En cuanto a las mutaciones del gen CARD15 en los pacientes con EC no iba a ser distinto. Aunque posteriormente se analizarán más detalladamente todos los estudios, en cuanto al porcentaje de portadores de alguna de las mutaciones en el estudio del Hospital Clínico de Madrid (160) se observaron mutaciones en el 32,8% de los pacientes y el 10,7% los controles. El siguiente estudio realizado, unos pocos meses después, ha sido el nuestro, en población exclusivamente gallega y hemos visto mutaciones en el 27,9% de los pacientes y en el 15,2% de los controles. Posteriormente se han realizado dos estudios independientes en Cataluña, uno sin población control (183), en el que se observaron mutaciones en el 30,5% de los pacientes y otro con población control (184) en el que el porcentaje de portadores fue del 30,9% y del 6% para pacientes y controles respectivamente. Se ha realizado otro estudio en Toledo (185), donde la frecuencia de pacientes era del 27,3% y la de controles del 13,3%. El último estudio publicado hasta

ahora es el realizado en población asturiana (186), y fue el único realizado en nuestro país en el que no se han observado diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con EC portadores de mutaciones (17,3%) y los controles (17,6%); es decir parece que las mutaciones del gen NOD2 en la población asturiana no confieren susceptibilidad para la EC.

En un estudio realizado en Oporto (Portugal) (187) se observaron mutaciones en el 34,6% de los pacientes y en el 12,9% de los controles. Sin embargo en otro estudio realizado en Lisboa (188), aunque con un número muy limitado de pacientes, se observaron mutaciones en el 21% de los pacientes y en el 16% de los controles, sin observarse diferencias estadísticamente significativas.

Los estudios realizados inmediatamente después de los dos pioneros (58,59) (que descubrieron la susceptibilidad de las tres mutaciones (R702W, G908R y 1007fs) del gen NOD2/CARD15) confirmaron la influencia de las tres mutaciones en la susceptibilidad para la EC (138,147,153). Sin embargo según se fueron realizando más análisis, se fueron descubriendo poblaciones que tenían influencia de una o dos mutaciones, pero no siempre de las tres. En general un denominador común es que normalmente la mutación con más influencia es la de la inserción (1007fs), siendo excepcionales las poblaciones (solamente en un estudio sueco) (164), en las que habiéndose visto diferencias entre casos y controles en general con las tres mutaciones, no se observan en particular en la variante 1007fs. Sin embargo lo que no ha resultado tan raro son las poblaciones en las que la única mutación que confiere susceptibilidad para la EC es la 1007fs; este hallazgo suele observarse en poblaciones con un porcentaje bajo de pacientes portadores como la de Finlandia (163), Dinamarca (165) y Nueva Zelanda (189).

En el metaanálisis de *Economou et al* (149) se comprobó que la mutación que confería mayor riesgo era la de la inserción, siendo los riesgos relativos referidos en dicha publicación de 2,20 (95%IC 1,84-2,62) para R702W, de 2,99 (95%IC 2,38-3,74) para G908R y de 4,09 (95%IC 3,23-5,18) para 1007fs.

En nuestra población la única mutación que no confiere susceptibilidad para la EC es R702W (tabla 10). En ninguna de las poblaciones geográficamente cercanas a la nuestra se ha observado un resultado similar, curiosamente en los tres estudios realizados en España en Madrid (160), Toledo (185) y Barcelona (184), era esta mutación (SNP8) la que confería una mayor susceptibilidad. Como se dijo anteriormente en la población de Asturias (186) no se observaron diferencias entre pacientes y controles ni en general ni en particular en ninguna de las tres variantes. En el estudio realizado en Oporto (187) también fue SNP8 la que confería mayor susceptibilidad y la que se presentaba en mayor porcentaje en los pacientes portugueses, sin observarse influencia del SNP12. Estos hallazgos de Oporto coinciden plenamente con los referidos en la población de Brasil (178), que como es sabido es descendiente directa de la de Portugal. Con todos estos datos parece claro que la influencia de las mutaciones del gen NOD2/CARD15 en la población gallega es distinta a la del resto de la península ibérica.

Tras una revisión de los trabajos publicados puede comprobarse que las únicas poblaciones en las que los resultados coincidían con la nuestra, es decir presencia de portadores inferior al 30% e influencia de los SNP12 y SNP13 pero no del SNP8, fueron las poblaciones escocesa (162) e irlandesa (161). Ambas poblaciones, al igual que la nuestra podrían tener un origen común a la nuestra, en concreto raíces celtas. Existe una gran controversia en este tema, mientras que existen grandes defensores del origen celta de Galicia que agumentan una gran coincidencia a pesar de los siglos y los

kilómetros en cuanto a herencia cultural, folclórica y fundamentalmente de hallazgos arqueológicos como los petroglifos con otras poblaciones celtas, existen detractores de la teoría que se basan en la ausencia de datos históricos concretos que confirmen el origen.

Otros estudios recientes realizados sobre la transmisión del DNA mitocondrial han abierto nuevas puertas sobre esta teoría. Así, un estudio realizado en población británica con análisis de haplotipos del cromosoma Y, establece diferencias entre los escoceses y el resto de los habitantes de la isla, justificándolas por el origen celta de los primeros (190). En un estudio multicéntrico liderado por el Instituto de Medicina Legal de Santiago en el que se analizaban varios loci del cromosoma Y para determinar la variabilidad genética de varias poblaciones europeas concluyó que existía una alta asociación genética entre las poblaciones de Galicia e Irlanda (191).

Los hallazgos genéticos encontrados en nuestro estudio y que relacionan unas mutaciones de una determinada enfermedad con el origen genético común ¿celta? no son los primeros. En un estudio realizado en población gallega sobre las mutaciones del gen C282Y de la hemocromatosis hereditaria apunta la posible influencia celta al asemejarse los resultados a los de los países de ese origen y diferir mucho de los del resto de la península ibérica (192). En un estudio sobre hipercolesterolemia familiar multicéntrico español se observó que solamente la población gallega presentaba mutaciones en el gen R3500Q de la apolipoproteína B, siendo estos resultados plenamente coincidentes con los de otras poblaciones de origen celta, apuntándose una posible relación con la herencia genética celta (193). Así pues, creemos que los resultados de nuestro estudio en cuanto a la influencia de las mutaciones del gen NOD2/CARD15 en la susceptibilidad para padecer la EC son bastante concluyentes y aportan algunas novedades con respecto a lo previamente descrito.

5.2. Influencia de las mutaciones en las formas de presentación de la enfermedad

El primer análisis realizado sobre genotipo-fenotipo fue el referente a la edad de presentación de la enfermedad. En nuestra población no observamos influencia de las mutaciones con la edad de presentación de la enfermedad, aunque sí una tendencia a un debut más precoz en los pacientes portadores de dos copias (media de 22 años) que el resto de los pacientes (media 28 años). Probablemente, si hubiese un mayor número de pacientes hubiese resultado estadísticamente significativo, como previamente había sido descrito en los estudios de *Lesage et al* (138), en el que la edad de presentación de la enfermedad fue de 16,9 años en los portadores de dos mutaciones y de 19,8 en los pacientes sin mutaciones ($p < 0,001$), y en el del grupo de Oxford (153) en el que los pacientes portadores de dos mutaciones tenían una edad de presentación de 23,5 años en comparación con los 29 de los que no tenían mutaciones ($p < 0,05$). Si los resultados de la mayoría de los estudios hubiesen sido similares se hubiese podido comprobar la hipótesis de que los polimorfismos del gen CARD15 estarían asociados a una mayor precocidad de la enfermedad, ya que en los niños y jóvenes debería haber lógicamente una menor influencia de los factores ambientales y sí una mayor de los genéticos en el riesgo para padecer la EC. El problema es que casi ningún estudio recoge la influencia de los portadores de dos copias limitándose a los de una sola mutación, por lo que es difícil extrapolar los datos.

En general, los resultados respecto a la posible influencia en la edad de presentación de la enfermedad por la presencia de portadores de las mutaciones son muy controvertidos. Mientras un gran número de estudios (147, 160, 163, 168, 169, 194) incluyendo uno exclusivamente realizado en pacientes pediátricos en Estados Unidos (195), obtuvieron unos resultados muy similares a los nuestros, es decir no diferencias en cuanto a la edad de presentación en los portadores de una mutación, en

otros sí que se asoció la presencia de mutaciones (al menos una) con una edad más temprana de debut de la enfermedad (157,159,196,197). Son especialmente significativos los resultados que se obtuvieron en un estudio en población judía de Israel (179), en donde los portadores de al menos una mutación debutaban a los 18,7 años mientras que los pacientes sin mutación debutaban a los 25,8 años. Existen muy pocos datos con respecto a la posible influencia de alguna mutación en concreto en la edad de debut, tan solo en dos estudios, uno francés (156) y otro alemán (198) se observó que los pacientes portadores de mutaciones en la variante de la inserción (1007fs) tenían una edad de debut precoz.

En cuanto a la localización de la enfermedad, globalmente no se observan diferencias estadísticamente significativas a favor de la localización ileal (L1), estos hallazgos, a pesar de haberse descrito resultados similares en algunas poblaciones (178,179,194,199), difieren con la gran mayoría de las poblaciones estudiadas en las que se observa un claro predominio de las formas ileales en los pacientes con alguna mutación del gen NOD2 (155,157,163,165,187,197). En uno de los primeros estudios realizados, en concreto en población británica (153) se observó que las mutaciones sólo se asociaban significativamente con la enfermedad ileal, con un riesgo relativo de 4 cuando se portaba una mutación y de 30 con dos o más mutaciones. En otro de los primeros estudios multicéntricos europeos (146) realizado con 444 pacientes con EC, la frecuencia de mutaciones en NOD2 fue más alta en los pacientes con localización ileal (26,9%), intermedia en los pacientes con localización ileocolónica (19,7%) y muy baja en los de localización puramente colónica (12,7%). Estos resultados han sido corroborados en otros estudios posteriores como el del grupo de Madrid (160) en donde se refería un riesgo relativo de 1,6 para localización ileal en los pacientes, así como en el metaanálisis de *Economou et al* con un OR 2,53 (95% IC: 2,01-3,16) (149). Una

posible explicación acerca de esta asociación de las mutaciones con las formas ileales que recientemente aporta el grupo de Ann Arborg, liderado por el español Gabriel Núñez (uno de los codescubridores del papel de este gen en la EC) (59), podría ser el reciente descubrimiento del importante papel que juega NOD2 en la regulación de las respuestas mediadas por células de Paneth (de localización típicamente ileal) contra las bacterias intestinales (105,200).

Además de una mayor asociación con las formas ileales, otros estudios han descrito que las variantes CARD15/NOD2 se correlacionan inversamente con la enfermedad de Crohn de colon: el estudio pionero Francés (138) que en 612 pacientes mostró que los que tenían dos mutaciones tenían afectación de colon mucho menos frecuentemente que los que no tenían mutaciones (43% vs 62%, $p=0,0003$, $OR=0,44$) y el realizado en Québec (169) en el que las variantes del gen NOD2/CARD15 se relacionaban inversamente con la localización colónica con un OR de 2,86 (95%IC 1,41-5,78). Una probable hipótesis que justifica estos resultados es la gran diferencia entre los mecanismos de tolerancia inmune entre ileon y colon, estando este último expuesto a una mayor concentración de bacterias que el ileon, pudiendo el colon utilizar mecanismos inmunológicos que no dependieran de la función del CARD15 (201).

El análisis más detallado de nuestros resultados revela una ligera tendencia a la asociación con las formas ileales ya que todos aquellos pacientes con dos mutaciones, tanto homocigotos como heterocigotos compuestos tenían una EC ileal o ileocolónica y en ninguno de ellos se observó una forma colónica pura; una vez más debido al escaso número de pacientes con dos mutaciones es difícil sacar conclusiones, pero estos resultados podrían considerarse superponibles a los resultados de un estudio estadounidense (202) donde se consideraba que el mayor riesgo para tener una localización ileal era la presencia de dos mutaciones del gen NOD2 ($OR= 10,1$) y a los

previamente descritos en las poblaciones de Oxford (153) y de Québec (169) en donde la presencia de dos mutaciones confería mayor fuerza a la localización ileal.

En el análisis individualizado de las tres mutaciones observamos que en nuestra población la frecuencia de alelos mutados de G908R y1007fs fue siempre más alta en los pacientes con afectación ileal o ileocolónica que en los pacientes con formas exclusivamente colónicas. Sin embargo a pesar de esta tendencia no se encontraron diferencias estadísticamente significativas que hubiesen podido corroborar los resultados de algunos estudios previos que conferían a la mutación 1007fs una asociación directa con las formas ileales como el de *Ahmad et al* (153) con un riesgo relativo de 6,5 para los portadores de esta mutación y como los del multicéntrico europeo (146) y el realizado en Roma (203) en los que también se observó una asociación entre la mutación de la inserción y la localización ileal.

Un dato observado en nuestra población fue que los pacientes que presentaban alelos mutados en R702W (la mutación sin influencia en la EC en nuestra población) presentaban una mayor afectación colónica. Estos hallazgos no han sido referidos en ningún otro grupo, si bien es cierto que no todos los estudios han analizado individualmente las tres mutaciones. Esta mayor afinidad de las formas colónicas con la mutación sin susceptibilidad podría justificar el hecho de que globalmente no se hubiese encontrado relación estadísticamente significativa con las formas ileales a pesar de la tendencia hacia la asociación en las dos mutaciones que conferían susceptibilidad (SNP12 y SNP13).

De nuestra cohorte de pacientes solamente 2 presentaron localización de tramos gastroduodenales altos, pero uno de ellos presentó mutaciones en gen NOD2; además era un heterocigoto compuesto con mutaciones en SNP8 y SNP13. Es cierto que con dos pacientes es imposible extraer conclusiones relevantes, pero también es sabido que

los porcentajes de pacientes con estas localizaciones son muy bajos en general. Solamente existe un estudio que ha evaluado la asociación de las formas gastroduodenales de la EC con las mutaciones NOD2 y concluyó que son más frecuentes en los pacientes con mutaciones que en los que no las tienen y dentro de los pacientes con mutaciones son más específicas en los que tienen mutaciones del SNP13 y aún mucho más específicas en los portadores de dos mutaciones (204). Estos hallazgos parece que son coincidentes con los nuestros, pero el escaso número de pacientes con Crohn gastroduodenal no permite obtener información concluyente.

En nuestro estudio, a pesar de que los primeros resultados nos mostraron una asociación de la presencia de mutaciones con las formas fistulizantes, estos resultados se perdieron cuando realizamos el análisis multivariante teniendo en cuenta los años de evolución de la enfermedad desde el momento del diagnóstico. De este modo, la relación entre el comportamiento de la EC y las mutaciones de NOD2/CARD15 parece deberse a la influencia de los años de enfermedad en el comportamiento de la EC. Este resultado no es muy sorprendente, ya que previamente se ha descrito que el comportamiento de la EC (incluyendo los fenotipos de la Clasificación de Viena) cambia con el tiempo de evolución de la enfermedad (205), disminuyendo gradualmente el porcentaje de formas inflamatorias con el paso del tiempo (206).

El principal problema a la hora de comparar nuestros resultados con los de otras poblaciones es que en casi ninguna otra está referido si han realizado el factor de corrección con el tiempo. En líneas generales nuestros resultados en cuanto al comportamiento o patrón evolutivo de la enfermedad difieren con los de la mayoría de los estudios, sin embargo en algunos otros como el de *Louis et al* (199), utilizando la corrección del factor temporal tampoco encuentra diferencias en el comportamiento de

la enfermedad. Otros estudios en los que tampoco se han encontrado asociaciones genotipo-fenotipo han sido los realizados en Holanda (194), Israel (179) y Brasil (178).

Muy pocos estudios han establecido asociación aislada de las mutaciones del gen NOD2 con el desarrollo de formas fistulizantes de la enfermedad. En los dos estudios que han mostrado este aspecto (147,163), las mutaciones siempre estaban asociadas a las dos formas estenosante (B2) y fistulizante (B3), nunca aisladamente a la última. Por otra parte otros estudios como el de Oxford (153) encontraron una asociación negativa entre la presencia de mutaciones y el desarrollo de fístulas.

Varios estudios han encontrado asociación entre las formas estenosantes y los pacientes con mutaciones del gen NOD2; en el estudio de *Lesage et al* (138) se observó que los pacientes con una mutación presentaban más formas estenosantes, pero que la predisposición era aún mayor en los pacientes con dos mutaciones (53 vs 28% $p < 0,0001$, OR=2,92). Similares resultados se obtuvieron en el estudio de *Abreu et al* (166) en el que se observó que en los pacientes con estenosis tenían mutaciones el 46%, en comparación con el 23% de mutaciones de aquellos que no tenían estenosis (OR 2,8 95%IC 1,6-5,2, $p = 0,001$). Otros estudios relevantes con similares resultados son el de *Heresbach et al* (156) en el que se mantienen los resultados tras la realización de análisis multivariante y en uno británico recientemente publicado (207) en el que además de las formas estenosantes relacionan las mutaciones con la presencia de granulomas en el estudio histológico de la enfermedad. En mi opinión es de especial importancia un estudio realizado en población pediátrica (167) con una edad media de 12,4 años en el que se observó una mayor asociación del fenotipo estenosante con la presencia de mutaciones; teniendo en cuenta que la media de años de enfermedad en estos niños era de 3,2 años, este dato contradice en parte la teoría que relacionaba las mutaciones con el patrón evolutivo con los años de enfermedad desde el diagnóstico.

A pesar de que los resultados son menos consistentes que en la localización de la enfermedad, en el anteriormente citado metaanálisis (149) se ha observado una asociación de las variantes de CARD15 con los pacientes con formas fibroestenósicas de la EC con un OR de 1,94 (95% IC 1,61-2,34). En alguno de los pocos estudios que analiza individualmente las tres variantes se observó que la mayor asociación con este patrón de la enfermedad estaba presente en los pacientes que presentaban la variante de la inserción (L1007insC) (208).

La asociación de las mutaciones con las formas estenosantes necesitan estudios más detallados en el futuro, en primer lugar porque es sabido que los patrones evolutivos en la EC pueden variar con los años de enfermedad, y en segundo lugar porque la enfermedad estenótica se asocia positivamente con la enfermedad ileal, lo que podría suponer un sesgo a la hora de interpretar estos resultados. De hecho en nuestra opinión el hecho de que en nuestra población las mutaciones no se asocien claramente a una localización ileal influye directamente en que no se asocien con las formas fibroestenósicas.

En cuanto al análisis de los factores ambientales, intentar relacionarlos podría parecer controvertido ya que los factores genéticos deberían ser totalmente independientes de los ambientales, pero en el caso de hallar asociaciones negativas con alguno de ellos, como por ejemplo el tabaco, podría dar todavía más fuerza de asociación a los hallazgos genéticos. En nuestra población en líneas generales no encontramos ninguna asociación entre las mutaciones del gen NOD2/CARD15 con ninguno de los factores ambientales asociados.

En cuanto al sexo de los pacientes, es bien sabido que en la gran mayoría de los estudios demográficos no se han encontrado diferencias en cuanto a prevalencia e incidencia entre hombres y mujeres (35, 209), aunque excepcionalmente se ha descrito

alguno con mayor incidencia en varones como el Corporativo Europeo (210) y algún otro como el realizado en Aragón en mujeres (211). A tenor de nuestros resultados y de los obtenidos en otras poblaciones en las que tampoco se observaron diferencias entre hombres y mujeres (168,169,202), parece que el sexo no tiene ningún papel en la presencia de mutaciones del gen NOD2/CARD15. Desde el punto de vista genético tiene cierta lógica pues el gen NOD2 está situado en el cromosoma 16, sin diferencias entre hombres y mujeres; normalmente las enfermedades con carga genética en las que se observan diferencias entre sexos son aquellas en las que las mutaciones están en el cromosoma X o en el cromosoma Y. Sin embargo un interesante estudio del grupo de Leuven (154) evaluó la transmisión de los polimorfismos de CARD15 en las familias de pacientes con EII: los autores realizaron un estudio con 1670 individuos (570 EC, 173 CU, 165 controles sanos y 762 familiares de primer grado de pacientes con EC), concluyendo que la transmisión materna de los alelos de CARD15 está asociada a una menor proporción de individuos afectados en comparación con la transmisión paterna. Se especula con la posibilidad de que puedan existir factores protectores maternos, como un gen protector localizado en el cromosoma X o en el ADN mitocondrial.

En cuanto a las diferencias de hábitat urbano-rural clásicamente se ha considerado la EC como una enfermedad más frecuente en núcleos urbanos (212), datos confirmados en el primer estudio realizado en Galicia (213) y esto se ha justificado a través de estudios que evaluaban el estilo de vida urbano como la dieta (214) o la higiene (215). Esta relación no siempre ha sido corroborada, así en un estudio Nacional Sueco no se han observado diferencias en la incidencia en relación con el origen (36). En nuestro estudio no hemos encontrado tampoco ninguna asociación entre el origen rural o urbano de los pacientes y la presencia de mutaciones del gen NOD2/CARD15, ni

en el análisis global ni en el individual de las mismas. El único otro estudio de NOD2 que analizó esta posible relación tampoco encontró diferencias (202).

El tabaco es el factor ambiental claramente más relacionado con el riesgo de padecer EC (39). Además, se sabe que el tabaco es muy perjudicial en el curso evolutivo de la enfermedad (216). En el análisis global en nuestra población no encontramos relación entre el hecho de ser fumador en el momento del diagnóstico de la enfermedad y la presencia de mutaciones del gen NOD2, aunque en el análisis de las tres mutaciones por separado observamos una mayor frecuencia de la mutación 1007fs (una de las que confiere susceptibilidad en nuestra población) en los pacientes no fumadores. Este resultado tiene su cierta lógica ya que en estos pacientes la tasa de riesgo de padecer la enfermedad que hubiesen reducido por el hecho de no ser fumadores estaría neutralizada por la presencia de la mutación. De hecho en ninguna de las poblaciones que se ha estudiado el factor tabaco se han establecido relaciones entre las mutaciones y el hecho de ser fumador (165,168,202,217).

Una de las grandes incógnitas con grandes diferencias de unos estudios a otros ha sido saber si existen disparidad en cuanto a la frecuencia de portadores entre los individuos con EC esporádico y aquellos con EC con antecedentes familiares. En nuestro estudio no encontramos ni globalmente ni en el análisis individualizado de cada mutación diferencias en cuanto al porcentaje de portadores de mutaciones entre los casos esporádicos y los familiares, pero estos resultados no deben ser tenidos de todo en cuenta, pues en el presente estudio solamente se incluyó un familiar por cada familia de sujetos con EC. La gran mayoría de los estudios (155,160,202,217), incluyendo uno en población pediátrica (195) presentaron resultados totalmente coincidentes con los nuestros, es decir ausencia de relación entre formas familiares y mutaciones del gen. Sin embargo otros estudios como el de *Lagui et al* (218) y el de *Zhou et al* (219) se

observaron mayores contribuciones de los polimorfismos del gen CARD15 en los casos familiares en comparación con los esporádicos. El análisis global de los datos en el metaanálisis que incluía más de 40 estudios (149) nos muestra que la presencia de al menos una mutación incrementa el riesgo de EC con un OR de 1,41 (95% IC: 1,17-1,69), resultados en principio sorprendentes teniendo en cuenta que en la mayoría de los estudios no se habían observado diferencias entre los casos familiares y los esporádicos. Se pueden obtener datos indirectos del estudio de Leuven (154) que analizaba las mutaciones de CARD15 en pacientes y familiares. En el se observó que presentaban mutaciones el 46,3% de los pacientes, el 37,3% de los familiares de los pacientes con EC, el 22% de los pacientes con CU y el 20,6% de los controles.

En cuanto al análisis individualizado de las mutaciones solamente en dos estudios, uno finlandés (163) y otro italiano (203), se observó una asociación entre los casos de EC familiar y una mutación, en concreto fue la 1007fs; en el último de ellos solo se observó en los pacientes homocigotos para dicha mutación.

En nuestra población no observamos relación entre las mutaciones y las manifestaciones extraintestinales de la enfermedad, en líneas generales casi todos los estudios que analizaron esta posible relación obtuvieron resultados muy similares al nuestro (138,160,169,187) con excepción del de *Crawford et al* (220) en el que sí que se observó una asociación entre la presencia de mutaciones y un mayor número de manifestaciones extraintestinales.

En nuestro estudio analizamos las tres principales manifestaciones extraintestinales presentes en nuestra población (artritis periférica, eritema nodoso y sacroileítis) sin observarse tampoco influencias de las mutaciones para ninguna de ellas, tan solo observamos una mayor presencia de la mutación G908R en los pacientes con eritema nodoso. Casi ningún estudio ha analizado en detalle las principales

manifestaciones extraintestinales, pero alguno de los pocos grupos que las analizaron (187) no encontraron diferencias entre las mismas. En el estudio de *Lakatos et al* (217), aunque no encontraron diferencias estadísticamente significativas como en el nuestro, observaron un mayor porcentaje de mutaciones de G908R en los pacientes con eritema nodoso. La manifestación extraintestinal individualmente más estudiada ha sido la sacroileítis, en la cual en un primer estudio (221) se encontró una asociación entre las mutaciones de NOD2 y sacroileítis asociada a EC, pero el mismo grupo en un nuevo trabajo más reciente no pudieron confirmar aquella relación (222) por lo que los resultados se asemejan más a los nuestros.

En el caso de la cirugía debida específicamente a la EC, sí parece existir una clara influencia del gen CARD15. El número de casos que han requerido intervención quirúrgica es significativamente superior para individuos portadores de al menos una de las mutaciones descritas como previamente asociadas a EC. Cuando se analiza cada mutación en particular, se observa que las mutaciones G908R y 1007fs son también más frecuentes de manera individual en individuos operados. Resultados similares ofrece el estudio específico de cada uno de los subgrupos quirúrgicos: resección ileal y cirugía de fístulas. En ambos casos, los individuos portadores de una de las mutaciones G908R ó 1007fs presentan un mayor riesgo a sufrir intervenciones quirúrgicas. El hecho de que la mutación R702W no parezca relacionada con la necesidad de cirugía no debe sorprender, puesto que esta mutación no se había encontrado asociada a EC en la población gallega.

Con respecto a la mayor necesidad de cirugía ileal en los individuos con mutaciones en CARD15 estos datos son coincidentes con la mayoría de los estudios publicados (147,155,163,187,196,198,217) con la excepción de uno de Israel (179) y otro de Italia (223) en el que no se encontró esa asociación. En la mayoría de los

estudios la mutación asociada con más fuerza ha sido la de la inserción (1007fs); de hecho en un estudio en el que solamente se analizó esta mutación también se encontró asociación con la cirugía (208). Algunos estudios merecen especial atención al aportar conceptos diferentes al nuestro, así *Kugathasan et al* (167) observaron que en población pediátrica los pacientes con mutaciones en CARD15 tenían un riesgo mayor de cirugía (hazard ratio, 5,8; $p < 0,0001$) y de que la cirugía era más precoz (hazard ratio, 2.24). En dos estudios independientes, uno realizado en Alemania (157) y otro por el grupo del Hospital Clinic de Barcelona (183) con una tasa de cirugía en los pacientes con mutaciones muy similar a la nuestra, observaron además que los pacientes con mutaciones del gen presentaban más riesgo de reoperaciones y que estas además eran más precoces.

Si consideramos la necesidad de cirugía como un índice de gravedad, estos resultados estarían de acuerdo con las afirmaciones que apuntan un importante papel del gen CARD15 en la susceptibilidad para casos más graves de la EC. En nuestra opinión estos resultados en nuestra población aún adquieren más fuerza e importancia que en otras, pues como previamente se ha referido en nuestro estudio las mutaciones no estaban asociadas a localización ileal ni a patrón fibroestenotante, así que las mutaciones están directamente relacionadas con una mayor agresividad de la enfermedad independientemente de su patrón evolutivo. Por otra parte, continuando con el mismo razonamiento, probablemente la asociación con la cirugía fistulizante de las mutaciones pueda estar sesgada por la tendencia en nuestros pacientes a un mayor número de mutaciones en las formas penetrantes.

Sin embargo, hay que resaltar que a pesar de la relación existente entre estas mutaciones y la necesidad de cirugía en la EC, la proporción de pacientes portadores de mutaciones dentro de aquellos que requieren cirugía es todavía demasiado baja como

para poder utilizar esta relación como método predictivo. Además, hay que considerar que existe siempre un porcentaje de individuos que requieren intervención quirúrgica y no portan mutaciones en este gen.

Es interesante observar que en nuestro estudio en ningún caso la apendicectomía parece significativamente asociada con las mutaciones en el gen CARD15. Sin embargo, llama la atención que existe en todos los casos una mayor frecuencia de mutaciones en pacientes que no han sido intervenidos por apendicectomía, datos contrarios al estudio de Madrid (160) que encontró asociación entre la mutación G908R y la apendicectomía previa y también contrarios a un estudio reciente (224) que, en este caso, encontró asociación entre la mutación de la inserción y la apendicectomía previa.

Se sabe que la apendicectomía tiene un papel protector frente al desarrollo de la colitis ulcerosa. Sin embargo, con respecto a la EC, los resultados son todavía contradictorios. Parece que aquellos pacientes que requieren apendicectomía en una fase de desarrollo activo de la enfermedad presentan una forma más grave de la misma, mientras que en aquellos que han experimentado la apendicectomía previamente, ésta podría tener un papel protector para la EC, sugiriéndose además que retrasa la edad de aparición de la enfermedad. (225,226) Por tanto, los resultados observados en este estudio podrían ser debidos a que la apendicectomía estaría previniendo la aparición de la EC en individuos con genes de susceptibilidad a la misma, lo que podría romper la asociación entre mutaciones en CARD15 y la EC. La posible asociación negativa podría además estar indicando que los casos de EC en individuos que han sufrido apendicectomía se deben a un mecanismo independiente de CARD15.

No se encontró asociación entre la presencia de mutaciones del gen NOD2/CARD15 y los antecedentes de corticorresistencia o corticodependencia, aunque sí una clara tendencia a un mayor número de mutaciones en los pacientes con

corticorresistencia. Este hallazgo, que probablemente hubiese sido significativo en caso de un mayor número de pacientes, podría corroborar la hipótesis establecida tras analizar los resultados de los antecedentes quirúrgicos de la enfermedad, es decir que las mutaciones se asocian a las formas más graves de la EC. A día de hoy ningún otro estudio ha intentado analizar la posible asociación de las mutaciones del gen NOD2 con los antecedentes de corticorresistencia o de corticorresistencia, por lo que debemos esperar a la aparición de trabajos futuros para valorar la importancia de nuestros hallazgos.

5.3. Frecuencia de mutaciones en los receptores toll-like y relación con la susceptibilidad para enfermedad de Crohn

El papel principal de los TLR es el de reconocer bacterias, virus, hongos o cualquier otro organismo patógeno que pueda ser deletéreo para el huésped. Recientemente se han publicado estudios fenotipo-genotipo de TLR que han demostrado que mutaciones en algún RTL o en CD14 (otra proteína de membrana afín a los RTL y que tiene como principal función reconocer el LPS) pueden contribuir a aumentar la susceptibilidad para ciertas infecciones o modificar el curso en determinadas enfermedades (117,227).

En los pocos estudios realizados hasta el momento sobre la influencia de las mutaciones del receptor toll-like tipo 4 (en concreto la mutación TLR4+299 A>G) en la susceptibilidad para la EC, los resultados han sido un poco contradictorios. Así en algunas poblaciones como la belga (228), con dos cohortes independientes de pacientes (en total 448 pacientes y 140 controles), se observó que tanto analizando la frecuencia alélica de las mutaciones (OR 2,35 95%IC 1,32-4,18, $p<0,01$) como el porcentaje de portadores de las mutaciones (pacientes 20,7, controles 9,4, $p=0,01$), las mutaciones estaban más presentes en pacientes que en controles confirmando susceptibilidad para la

EC. Se obtuvieron resultados muy similares en un estudio realizado en Ámsterdam (229) sobre 112 pacientes con EC y 170 controles en los que la frecuencia de portadores en los pacientes fue del 19% y en los controles del 10% (OR 2,07 95%IC 1,04-4,12, $p < 0,05$). El tercer estudio importante que demostró susceptibilidad para la EC en los pacientes portadores de la mutación fue el realizado en 204 pacientes y 199 controles en Munich (230) en el que tanto en la frecuencia de portadores (14,3% en pacientes vs 7,5% en controles, $p = 0,03$) como en la frecuencia alélica (7,4% en pacientes vs 3,9% en controles, $p = 0,04$) se observaron diferencias significativas. Posteriormente otros dos estudios han mostrado una mayor susceptibilidad para la enfermedad en pacientes portadores de mutaciones. Uno realizado en Grecia (231), en el que también se mostró una mayor frecuencia alélica en pacientes (7,92%) que en controles (3%) con un OR de 2,78 (95%IC 1,08-7,10) ($p = 0,02$) y otro en Australia (232), en el que la frecuencia alélica fue del 7% en los pacientes y del 5% en los controles (OR 1,53 95%IC 1,02-2,29, $p = 0,04$).

Sin embargo en la mayoría de los estudios realizados no se han corroborado estos resultados, incluso en poblaciones muy cercanas tanto geográfica como étnicamente a las previamente descritas. En otro estudio realizado en Groningen (Holanda) (233), sobre más de 700 pacientes no se observó influencia de las mutaciones en la susceptibilidad de la enfermedad. Tampoco se observaron diferencias entre pacientes y controles en un estudio húngaro con más de 500 pacientes (217), ni en otro italiano (234) en el que la frecuencia de portadores en pacientes fue de 7,5% y en controles de 7,8% (OR 0,96 IC95% 0,37-2,54, n.s). *Baumgart et al* (235) realizaron un estudio sobre la influencia de las mutaciones de TLR4 en dos poblaciones independientes de pacientes con EC y no observaron diferencias entre pacientes y controles en alemanes ($p = 0,78$) ni en húngaros ($p = 0,38$). La población alemana es sin

duda en la que más estudios se han realizado sobre la posible influencia de las mutaciones de TLR4 en la susceptibilidad para el Crohn; así además de los estudios ya descritos (230, 235) se realizó otro con menos pacientes (236) en el que a pesar de observarse una mayor frecuencia de alelos (7% vs 4%) y de portadores de mutaciones (15% vs 9%) en pacientes que en controles, las diferencias no alcanzaron significación estadística. Finalmente tampoco se encontró influencia de estas mutaciones ni en la población escocesa (162) ni en la de Nueva Zelanda (237): en ambas, tanto la frecuencia alélica como la de portadores, fue muy similar entre pacientes y controles.

En cuanto a los resultados que obtenidos en nuestro estudio no puede dejar de sorprender el resultado de que poseer mutaciones sea un factor protector de riesgo para la EC, por lo que debe ser analizado con cautela. Solamente en un estudio realizado en Hungría (217) se había descrito una mayor frecuencia de portadores (12%) en sujetos sanos que en pacientes con EC (9,9%), pero las diferencias no habían sido estadísticamente significativas. Hemos observado que la frecuencia de alelos mutados y de portadores descrita en nuestra población es la más baja de todas las publicadas hasta este momento, mientras que el porcentaje de alelos mutados y portadores en sujetos sanos es más alto que los hallados en la mayoría de las poblaciones caucásicas estudiadas (228,231,234) solamente asemejándose al de la población escocesa (162).

Parece difícil explicar desde el punto de vista epidemiológico estos resultados. Probablemente sean debidos al azar, por lo que creemos que se necesitan más estudios en otras poblaciones cercanas a la nuestra o con mayor número de pacientes para poder dar más fuerza y validez a los resultados obtenidos. De todas formas una conclusión obtenida con suficiente evidencia es que las mutaciones de los TLR4 en nuestra población no aumenta la susceptibilidad de padecer EC.

En nuestro estudio ninguna de las dos mutaciones del receptor toll-like tipo 9 estudiadas (TLR9⁻¹²³⁷ y TLR9⁺²⁸⁴⁸) está significativamente más presente en pacientes que en controles, por lo que tampoco la presencia de las mismas confería susceptibilidad para padecer la EC. Con respecto a estas mutaciones existe mucha menos evidencia científica publicada. En un estudio alemán (238) con 174 pacientes y 265 controles se observó que la frecuencia de portadores de mutaciones en TLR9⁻¹²³⁷ fue de 34,5% en los pacientes y de 22,6% en controles ($p < 0,01$); en otro estudio realizado sobre la misma mutación en Nueva Zelanda (237) se obtuvieron unos resultados muy similares a los nuestros sin observarse diferencias entre pacientes y controles. El único estudio publicado para evaluar la susceptibilidad que confiere la mutación TLR9⁺²⁸⁴⁸ para el desarrollo de la EC (238), análogo al nuestro, no mostró diferencias significativas entre pacientes y controles, por lo que parece que esta mutación no juega un papel muy claro en la etiopatogenia de la enfermedad.

Ni en el análisis de la frecuencia alélica ni en el porcentaje de portadores observamos diferencias en nuestra población con respecto a la mutación CD14⁻²⁶⁰, por lo que tampoco parece conferir susceptibilidad para la EC. El primer estudio que mostró la susceptibilidad para la EC de los portadores de esta mutación fue el de *Klein et al* (124) que en 219 pacientes y 410 controles habían descrito una mayor frecuencia alélica (51% vs 43%, $p = 0,04$) y de portadores de las mutaciones (72% vs 60%, $p = 0,03$) en pacientes con EC que en controles sanos. Posteriormente un estudio griego (231), con un menor número de pacientes, obtuvo resultados similares también con diferencias significativamente estadísticas de más mutaciones en los pacientes (OR 2,78 95%IC (1,08-7,10, $p = 0,02$)). Merece especial atención por lo novedoso de sus resultados el estudio realizado conjuntamente en dos cohortes de pacientes de países distintos (Alemania y Hungría) (235) en el que se observó que los portadores con mutaciones en

CD14 de Hungría tenían más riesgo para la EC ($p=0,02$), pero que los portadores alemanes no tenían más riesgo ($p=0,19$) para esta enfermedad, pero sí más riesgo para la CU. Esta mayor susceptibilidad para la CU en los portadores de mutaciones en CD14 no ha vuelto a ser reproducida por ningún otro estudio, si bien es cierto que la mayoría de ellos, al igual que el nuestro, solo incluyen pacientes con EC.

El resto de los estudios publicados en Alemania (236), Holanda (229), Hungría (239) y Nueva Zelanda (189) no mostraron relación de la mutación con mayor susceptibilidad siendo los porcentajes tanto de las frecuencias alélicas como de los portadores de la enfermedad muy similares a los hallados en nuestro estudio. Los resultados en cuanto a la frecuencia alélica (pacientes 49%, controles 50%, $p=n.s$) y el porcentaje de portadores de mutaciones (pacientes 74,9%, controles 79,5%, $p=n.s$) de CD14⁻²⁶⁰ observados en la población escocesa (162) fueron prácticamente idénticos a los de nuestra población (recordamos 51,5% en los pacientes y del 50.9% en los controles en frecuencia alélica y 77,6% pacientes y 78,5% en controles en portadores de mutaciones), sin observarse tampoco susceptibilidad. Una vez más estos resultados ayudan a reforzar la hipótesis previamente expuesta de las similitudes entre los pacientes gallegos y escoceses en cuanto a susceptibilidad genética para la EC. ¿Por las mismas raíces genéticas, por ejemplo “célticas”?

5.4. Influencia de las mutaciones en la respuesta al tratamiento con las terapias biológicas

Las terapias biológicas son unas terapias nuevas muy potentes que han demostrado su eficacia en los casos más graves de la EC, con el gran beneficio además de que son resolutivas aún en los casos que han fracasado las terapias convencionales como los corticoides. El problema es que mientras la mayoría de los pacientes tienen una buena respuesta a estos tratamientos, otros responden peor, se pierde antes su efecto o

simplemente no responden en absoluto a los mismos (125,240). En la actualidad existe muy poca evidencia sobre los posibles predictores clínicos de respuesta a estas terapias a pesar de haberse analizado multitud de ellos. Dentro de las dos terapias biológicas que nosotros analizamos, todos los estudios y revisiones previas se han realizado sobre los predictores de respuesta al infliximab, por ser este el primero y el que lleva más tiempo en el mercado.

Parece que los pacientes no fumadores, más jóvenes y sin estenosis responden mejor al infliximab (241). Un tema mucho más controvertido es si el uso de inmunosupresores concomitantes influye en la respuesta a estas terapias (242). En cuanto a los marcadores séricos, en principio ni los pANCA ni los ASCA parecen tener un factor predictivo en la respuesta al infliximab (243); solamente se ha observado una mejor respuesta en los pacientes con una proteína C reactiva alta (244,245). En cuanto a los factores genéticos apenas existen estudios ni evidencia científica (246).

En nuestro estudio pretendimos establecer una relación entre la presencia de las mutaciones genéticas, en principio de CARD15, pero también de TLR4 y CD14 y la respuesta a las terapias biológicas basándonos en una hipótesis según la cual estas nuevas terapias, tanto infliximab como adalimumab dependen de la supresión del sistema NF- κ -B disminuyendo la expresión del TNF en la mucosa, mientras que por otra parte NOD2/CARD15 activa NF- κ -B y potencialmente interactúa sobre la producción de TNF. De este modo las mutaciones en NOD2/CARD15 producirían una activación inapropiada de NF- κ -B, pudiendo así estar relacionadas con las diferentes respuestas a las terapias biológicas observadas en la práctica clínica (247).

En nuestra población no hemos observado ningún tipo de influencia de las mutaciones en NOD2 sobre la respuesta clínica a las terapias biológicas, ni en el análisis por separado de las tres mutaciones, ni en el de las dos que influyen en nuestra

población. Tampoco desglosando a nuestros pacientes según la indicación del tratamiento (inflamatorio puro o fistulizante) hemos visto influencia de las mutaciones.

Al realizar posteriormente el análisis individualizado de las dos grandes terapias biológicas empleadas, con respecto al infliximab observamos que las mutaciones en NOD2 no solo no influían en la respuesta al tratamiento, sino que tampoco tienen valor a la hora de predecir los pacientes que presentan una pérdida precoz de la respuesta o reacciones adversas al fármaco. En este caso nuestros resultados coinciden totalmente con los expuestos en dos estudios que también analizaron el potencial papel de estas mutaciones como marcadores de la respuesta al infliximab sin obtener ninguna asociación (248,249). También observamos en nuestra población que las mutaciones del gen NOD2 no influyen en la respuesta al adalimumab, así como tampoco en la pérdida de respuesta o en la presencia de reacciones adversas. En esta ocasión nuestros resultados también son coincidentes con el único estudio que había analizado la posible influencia de estas mutaciones en la respuesta a adalimumab (250), si bien en nuestro estudio el número de pacientes es superior (24 contra 16) por lo que aún tiene mayor validez.

En cuanto a las mutaciones en TLR4 no se observó ninguna influencia sobre la respuesta a las terapias biológicas. Observamos que los pacientes con mutaciones en CD14 y patrón inflamatorio presentaban mejor respuesta al tratamiento, mientras que los pacientes sin mutaciones en CD14 se asociaban a una mayor pérdida de respuesta. En principio parece que pueden estar ambos resultados interrelacionados pero se necesitan más estudios con más pacientes para poder obtener unas conclusiones sólidas.

A modo de resumen de conjunto podría afirmarse que a pesar de los datos expuestos sobre la influencia de las variantes de CARD15 en el curso clínico de la EC, a día de hoy, su utilidad en la práctica clínica resulta escasa y controvertida (251).

Claramente se necesitan más estudios prospectivos que confirmen la asociación de las variantes de CARD15 con un patrón más agresivo de la enfermedad y, fundamentalmente, que valoren la influencia de las mismas en la respuesta a los distintos tratamientos empleados. Al conocerse que las mutaciones del gen NOD2/CARD15 están asociadas con la EC, pero no con la CU, se planteó su utilidad a la hora de establecer el diagnóstico definitivo en las colitis indeterminadas (CI), que pueden representar el 5-10% de todas las EII. Sin embargo, se descartó esta posibilidad tras saberse que la mayoría de los polimorfismos se encuentran asociados a las formas ileales de la EC.

En múltiples ocasiones los pacientes y familiares con EC preguntan sobre la posibilidad de realizar un screening de la enfermedad a sus descendientes, aunque se encuentren asintomáticos (252). Se descartó la realización de screening en la población con síntomas sugestivos de EC debido a la baja sensibilidad, ya que la ausencia de mutaciones no excluiría que podría padecer la enfermedad, y la presencia de las mismas no necesariamente nos daría el diagnóstico definitivo. En los próximos años se valorará la posibilidad de realizar screening entre los familiares de alto riesgo para EC, aunque a día de hoy continúa siendo más eficaz simplemente la prohibición de fumar. Esta recomendación podría plantearse también para los controles sanos fumadores que hayan presentado alguna mutación (aproximadamente el 15%), ya que debido a la teoría etiopatogénica multifactorial de la EC, tendrían dos factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad (253).

6. CONCLUSIONES

- La presencia de mutaciones en el gen NOD2/CARD15 confiere susceptibilidad para la enfermedad de Crohn en la población gallega analizada.
- La frecuencia de las mutaciones del gen NOD2/CARD15 es más baja que la descrita en otras poblaciones caucásicas estudiadas.
- Solamente las mutaciones G908R y 1007fs confieren susceptibilidad para la enfermedad, mientras que la presencia de la mutación R702W no se correlaciona con esta susceptibilidad.
- La presencia de mutaciones en el gen NOD2/CARD15 se asocia con un mayor riesgo de resecciones quirúrgicas en los pacientes con enfermedad de Crohn.
- La presencia de mutaciones en los receptores “toll-like” tipo 4, tipo 9 y CD14 no confiere susceptibilidad para la enfermedad de Crohn en nuestra población.
- La presencia de mutaciones tanto en el gen NOD2/CARD15 como en los receptores “toll-like” no tiene valor predictivo para la respuesta al tratamiento con terapias biológicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sands B. Enfermedad de Crohn. Sleisenger & Fordtran. Enfermedades gastrointestinales y hepáticas (7ª edición).
2. Riera J. Definiciones conceptuales de la enfermedad inflamatoria intestinal. Concepto de cronicidad. Enfermedad inflamatoria intestinal. II edición. Madrid: ERGON S.A. 2002
3. Nikolaus S, Schreiber S. Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2007;133:1670-89.
4. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1989;24(Suppl 170):2-6.
5. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, et al. Development of a Crohn's disease activity index. *Gastroenterology* 1976;70:439-444.
6. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's disease activity. *Lancet* 1980;1:514.
7. Van Hess PAM, Van Alteren PH, Van Lier, et al. An index of inflammatory activity in patients with Crohn's disease. *Gut* 1980;21:279-286.
8. Irvine EJ. Usual therapy improves perianal Crohn's disease as measured by a new disease activity index. McMaster IBD Study Group. *J Clin Gastroenterol* 1995;20:27-32.
9. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, et al. A simple classification of Crohn's disease: report of Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6: 8-15.
10. Estiarte R. Farmacoepidemiología de la enfermedad de Crohn en España. Aportación personal.

11. Aufses AH. The history of Crohn's disease. *Surg Clin North Am* 2001;81:1-12
12. Janowitz HD, Burrill B. Crohn (1884-1983) life and work. Freiburg, Germany. FALK FOUNDATION e. V. 2003.
13. Stowe SP, Redmond SR, Stormont JM et al. An epidemiologic study of inflammatory bowel disease in Rochester, New York. Hospital Incidence. *Gastroenterology* 1990;98:104-110.
14. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P et al. Epidemiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in a central Canadian province: a population-based study. *Am J Epidemiol* 1999;149:914-924.
15. Bjornsson S, Johannsson JH. Inflammatory Bowel Disease in Iceland, 1990-1994: a prospective, nationwide, epidemiological study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:31-38.
16. Moum B, Vatn MH, Ekbohm A et al. Incidence of ulcerative colitis and indeterminate colitis in four counties of southeastern Norway, 1990-93. A prospective population-based study. The Inflammatory Bowel South-Eastern Norway (IBSEN) Study Group of Gastroenterologists. *Scand J Gastroenterol*. 1996;31:362-6.
17. Rubin GP, Hungin APS, Nelly PJ et al. Inflammatory bowel disease: epidemiology and management in an English general practice population. *Aliment Pharmacol Ther*. 2000;14:1553-9.
18. Russel MG, Dorant E, Volovics A et al. High incidence of inflammatory bowel disease in The Netherlands: results of a prospective study. The South Limburg IBD Study Group. *Dis Colon Rectum*. 1998 Jan;41(1):33-40.
19. Gower-Rousseau C, Salomez JL, Duppas JL et al. Incidence of inflammatory bowel disease in northern France (1988-1990). *Gut*. 1994;35:1433-8.

20. Maté-Jimenez J, Munoz J, Vicent D et al. Incidence and prevalence of ulcerative colitis and Crohn's disease in urban and rural areas of Spain from 1981 to 1988. *J Clin Gastroenterol.* 1994;18:27-31.
21. Vucelic B, Korac B, Sentic M et al. Epidemiology of Crohn's disease in Zagreb, Yugoslavia: a ten-year prospective study. *Int J Epidemiol.* 1991;20:216-20.
22. Tragnone A, Corrao G, Miglio F et al. Incidence of inflammatory bowel disease in Italy: a nationwide population-based study. Gruppo Italiano per lo Studio del Colon e del Retto (GISC). *Int J Epidemiol.* 1996;25:1044-52.
23. Odes HS, Locker C, Neumann L et al. Epidemiology of Crohn's disease in southern Israel. *Am J Gastroenterol.* 1994;89:1859-62.
24. Morita N, Toki S, Hirohashi T et al. Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Japan: nationwide epidemiological survey during the year 1991. *J Gastroenterol.* 1995;30 Suppl 8:1-4.
25. Linares de la Cal JA, Canton C, Pajares JM et al. Inflammatory bowel disease in Argentina and Panama (1987-1993) *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1997;9:1129.
26. Ruiz Ochoa V. Epidemiologic study of Crohn's disease in Galicia from 1976 to 1983. *Rev Esp Enferm Apar Dig.* 1984;66:273-9.
27. Brullet E, Bonfill X, Urrutia G et al. Epidemiological study on the incidence of inflammatory bowel disease in 4 Spanish areas. Spanish Group on the Epidemiological Study of Inflammatory Bowel Disease. *Med Clin (Barc).* 1998;110:651-6.
28. Pinchbeck BR, Kirdeikis J, Thomson AB. Inflammatory bowel disease in northern Alberta. An epidemiologic study. *J Clin Gastroenterol.* 1988;10:505-15.

29. Palli D, Trallori G, Saieva C et al. General and cancer specific mortality of a population based cohort of patients with inflammatory bowel disease: the Florence Study. *Gut*. 1998;42:175-9.
30. Jess T, Winther KV, Munkholm P et al. Mortality and causes of death in Crohn's disease: follow-up of a population-based cohort in Copenhagen County, Denmark. *Gastroenterology*. 2002;122:1808-14.
31. Bernstein CN, Kraut A, Blanchard JF et al. The relationship between inflammatory bowel disease and socioeconomic variables. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:2117-25.
32. Hiatt RA, Kaufman L. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a defined northern California population. *West J Med*. 1988;149:541-6.
33. Fellows IVV, Freeman JG, Colmes GK. Crohn's disease in the city of Derby, 1951-85. *Gut*. 1990;31:1262-5.
34. Mayberry JF, Judd D, Smart H et al. Crohn's disease in Jewish people--an epidemiological study in south-east Wales. *Digestion*. 1986;35:237-40.
35. Loftus EV Jr, Schoenfield P, Sandborn WJ. The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America: a systematic review. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002;16:51-60.
36. Ekbom A, Helmick C, Zack M et al. The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology*. 1991;100:350-8.
37. Jarnerot G, Jarnmark I, Nilsson K. Consumption of refined sugar by patients with Crohn's disease, ulcerative colitis, or irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol*. 1983;18:999-1002.

38. Godet PG, May GR, Sutherland LR. Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. *Gut*. 1995;37:668-73.
39. Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1989;34:1841-54.
40. Fiocchi C. Visión integrada de la fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Enfermedad inflamatoria intestinal*. II edición. Madrid: ERGON S.A. 2002
41. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115:182-205.
42. Naser SA, Ghobrial G, Romero C et al. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* 2004;364:1039-44.
43. Romero C, Hamdi A, Valentine JF et al. Evaluation of surgical tissue from patients with Crohn's disease for the presence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis DNA by in situ hybridization and nested polymerase chain reaction. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:116-25.
44. Freeman H, Noble M. Lack of evidence for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:782-3.
45. Lozano-León A, Barreiro-Acosta M, Dominguez-Muñoz JE. Absence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Crohn's disease in Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:1190-2.
46. Sartor RB. Enteric microflora in IBD: pathogens or comensals? *Inflammatory Bowel Dis* 1997;3:230-35.
47. Cobrin GM, Abreu MT. Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease. *Immunol Rev* 2005;206:277-95.

48. Wild GE. The role of antibiotics in the management of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2004;10:321-3.
49. Prantera C, Zannoni F, Scribano ML et al. An antibiotic regimen for the treatment of active Crohn's disease: a randomized, controlled clinical trial of metronidazole plus ciprofloxacin. *Am J Gastroenterol.* 1996;91:328-32.
50. Greenberg GR. Antibiotics should be used as first-line therapy for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2004 May;10:318-20.
51. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 2004;126:1620-33.
52. Israeli E, Grotto I, Gilburd B et al. Anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic antibodies as predictors of inflammatory bowel disease. *Gut* 2005; 54:1232-6.
53. Abreu MT. The pathogenesis of inflammatory bowel disease: translational implications for clinicians. *Curr Gastroenterol Rep.* 2002;4:481-9.
54. Sans M, Salas A, Soriano A. Differential role of selectins in experimental colitis. *Gastroenterology.* 2000;120:1162-72.
55. Present DH, Rutgeerts P, Targan S et al. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med.* 1999;340(18):1398-405.
56. Neurath MF, Fuss I, Pasparakis M et al. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur J Immunol.* 1997;27:1743-50.
57. Saiki T, Mitsuyama K, Toyonaga A et al. Detection of pro- and anti-inflammatory cytokines in stools of patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 1998;33:616-22.

58. 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.
59. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in *NOD2* associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411:603-6.
60. Kurata JH, Kantor-Fish S, Frankl H, et al. Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization. *Gastroenterology* 1992;102:1940-8.
61. Ogunbi SO, Ramsom JA, Sullivan K, et al. Inflammatory bowel disease in African-American children living in Georgia. *J Pediatr.* 1998;133:103-7.
62. Montgomery SM, Morris DL, Pounder RE, et al. Asian ethnic origin and the risk of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1999;11:543-6.
63. Ahmad T, Satsangi J, McGovern D, et al. Review article: the genetics of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001;15:731-48.
64. Roth MP, Petersen GM, McElree C, et al. Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1989;97:900-4.
65. Yang H, McElree C, Roth MP, et al. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut* 1993;34: 517-24.
66. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003; 124: 521-36.
67. Russell RK, Satsangi J. IBD: a family affair. *Best Pract & Res Clin Gastroenterol.* 2004;18:525-39.
68. Farmer RG, Michener WM, Mortimer EA. Studies of family history among patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol.* 1980;9:271-7.
69. Bayless TM, Tokayer AZ, Polito JM, et al. Crohn's disease: concordance for site and clinical type in affected family members--potential hereditary influences. *Gastroenterology.* 1996;111:573-9.

70. Monsen U, Bernell O, Johansson C, et al. Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol.* 1991;26:302-6.
71. Freeman HG. Familial Crohn's disease in single or multiple first-degree relatives. *J Clin Gastroenterol.* 2002;35:9-13.
72. Carbonnel F, Macaigne G, Beaugerie L, et al. Crohn's disease severity in familial and sporadic cases. *Gut.* 1999;44:91-5.
73. Peeters M, Nevens H, Baert F, et al. Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology.* 1996;111:597-603.
74. Probert CS, Jayanthi V, Hughes AO, et al. Prevalence and family risk of ulcerative colitis and Crohn's disease: an epidemiological study among Europeans and south Asians in Leicestershire. *Gut.* 1993;34:1547-51.
75. Weterman IT, Peña AS. Familial incidence of Crohn's disease in The Netherlands and a review of the literature. *Gastroenterology.* 1984;86:449-52.
76. Halme L, Turunen U, Helio T, et al. Familial and sporadic inflammatory bowel disease: comparison of clinical features and serological markers in a genetically homogeneous population. *Scand J Gastroenterol.* 2002;37:692-8.
77. Satsangi J, Grootsholen C, Holt H, et al. Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease. *Gut.* 1996;38:738-41.
78. Colombel JF, Grandbastien B, Gower-Rosseau C, et al. Clinical characteristics of Crohn's disease in 72 families. *Gastroenterology.* 1996; 111:604-7.
79. Orholm M, Fonager K and Sorensen HT. Risk of ulcerative colitis and Crohn's disease among offspring of patients with chronic inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 1999;94:3236-8.

80. Laharie D, Debeugny S, Peeters M, et al. Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring. *Gastroenterology*. 2001;120:816-9.
81. Roth MP, Petersen GM, McElree C, et al. Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1989;97:900-4.
82. Meucci G, Vecchi M, Torgano G, et al. Familial aggregation of inflammatory bowel disease in northern Italy: a multicenter study. The Gruppo di Studio per le Malattie Infiammatorie Intestinali (IBD Study Group). *Gastroenterology*. 1992;103:514-9.
83. Annese V, Andreoli A, Astegiano M, et al. Clinical features in familial cases of Crohn's disease and ulcerative colitis in Italy: a GISC study. Italian Study Group for the Disease of Colon and Rectum. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:2939-45.
84. Barreiro-Acosta M, Domínguez-Muñoz JE, Pardo de Vera C, et al. Relationship between clinical features of Crohn's disease and the risk of developing extraintestinal manifestations. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007;19:73-8.
85. Polito JM, Rees RC, Childs B, et al. Preliminary evidence for genetic anticipation in Crohn's disease. *Lancet*. 1996;347:798-800.
86. Grandbastien B, Peeters M, Franchimont D, et al. Anticipation in familial Crohn's disease. *Gut*. 1998;42:170-4.
87. Heresbach D, Gulwani-Akolkar B, Messer M, et al. Anticipation in Crohn's disease may be influenced by gender and ethnicity of the transmitting parent. *Am J Gastroenterol*. 1998;93:2368-72.
88. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, et al. Genetic versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* 1996; 312: 95-6.

89. Orholm M, Binder V, Sorensen TI, et al. Concordance of inflammatory bowel disease among danish twin. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1075-81.
90. Hlafvarson J, Bodin L, Tysk C, et al. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* 2003; 124: 1767-73.
91. Hayward PA, Satsangi J, Jewell D. Inflammatory bowel disease and the X chromosome. *QJM*. 1996;89:713-8.
92. Schinella RA, Greco MA, Cobert BL, et al. Hermansky-Pudlak syndrome with granulomatous colitis. *Ann Intern Med*. 1980;92:20-3.
93. Lloyd-Still J. Crohn's disease and cystic fibrosis. *Dig Dis Sci*. 1994 ;39:880-5.
94. Vermeire S, Satsangi J, Peeters M, et al. Evidence for inflammatory bowel disease of a susceptibility locus on the X chromosome. *Gastroenterology*. 2001;120:834-40.
95. Purrmann J, Zeidler H, Bertrams J, et al. HLA antigens in ankylosing spondylitis associated with Crohn's disease. Increased frequency of the HLA phenotype B27,B44. *J Rheumatol*. 1988;15:1658-61.
96. Minuk GY, Lewkonja RM. Possible familial association of multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 1986;314:586.
97. Cottone M, Cappello M, Puleo A, et al. Familial association of Crohn's and coeliac diseases. *Lancet*. 1989;2:338.
98. Schreiber S. Genomics and inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Gastroenterology* 2000; 16: 297-305.
99. Gomollón F. Genética en las enfermedades inflamatorias intestinales. *Gastroenterología Práctica* 2005; 14(2): 21-6.

100. Vermeire S, Pierik M, Henckaerts L. La genética de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Enfermedad inflamatoria intestinal. II edición. Madrid: ERGON S.A. 2002 (UPDATE 2004).
101. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; 379:821-3.
102. Ogura Y, Inohara N, Benito A, et al. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem*. 2001;276:4812-8.
103. Álvarez M, Panés J. CARD15/NOD2 y enfermedad de Crohn. ¿Qué explicaría su asociación? *Enfermedad Inflamatoria Intestinal al Día* 2004;3: 8-14.
104. Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, et al. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem*. 2002;277:41701-5.
105. Lala S, Ogura Y, Osborne C, et al. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology*. 2003;125:47-57.
106. Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K, et al. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2003;124:1001-9.
107. Inohara N, Nunez G. The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene*. 2001;20:6473-81.
108. Philpott D, Viala J. Towards an understanding of the role of NOD2/CARD15 in the pathogenesis of Crohn's disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004;18:555-68.
109. Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, et al. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2003;124:993-1000.

110. Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, et al. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology*. 2003;124:140-6.
111. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem*. 2003;278:5509-12.
112. Girardin SE, Sansonetti PJ, Philpott DJ. Intracellular vs extracellular recognition of pathogens--common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol*. 2002;10:193-9.
113. Kobayashi K, Inohara N, Hernandez LD, et al. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature*. 2002;416:194-9.
114. Akira S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*. 2003;15:5-11.
115. Grimm MC, Pavli P. NOD2 mutations and Crohn's disease: are Paneth cells and their antimicrobial peptides the link? *Gut*. 2004;53:1558-60.
116. Boirivant M, Marini M, Di Felice G, et al. Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology*. 1999;116:557-65.
117. Peñate M, Peña AS. Relevance of the innate immune system. *Rev Esp Enferm Dig*. 2001;93:721-39.
118. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*. 1997;9:4-9.
119. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, et al. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:588-93.

120. Lien E, Means TK, Heine H, et al. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest*. 2000;105:497-504.
121. Carrillo-Esper R. Innate immunity, Toll receptor and sepsis *Cir Cir*. 2003;71:252-8.
122. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000;406:782-7.
123. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun*. 2000;68:7010-7.
124. Klein W, Tromm A, Griga T, et al. A polymorphism in the CD14 gene is associated with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol*. 2002;37:189-91.
125. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* 1997; 337:1029–1035.
126. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 2002; 359:1541–1549.
127. Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, et al. Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004; 350:876–885.
128. Lichtenstein GR, Bala M, Han C, et al. Infliximab improves quality of life in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8:237–243.
129. Lichtenstein GR, Yan S, Bala M, et al. Infliximab maintenance treatment reduces hospitalizations, surgeries, and procedures in fistulizing Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2005;128: 862-9.

130. Rutgeerts P, Diamond RH, Bala M, et al. Scheduled maintenance treatment with infliximab is superior to episodic treatment for the healing of mucosal ulceration associated with Crohn's disease. *Gastrointest Endosc.* 2006;63:433-4.
131. Ljung T, Karlen P, Schmidt D, et al. Infliximab in inflammatory bowel disease: clinical outcome in a population based cohort from Stockholm County. *Gut* 2004; 53:849–853.
132. Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P, et al. Human antitumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology* 2006; 130:323–333.
133. Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P, et al. Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial. *Gastroenterology* 2007; 132:52–65.
134. Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, et al. Adalimumab induction therapy for Crohn disease previously treated with infliximab: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007; 146:829–838.
135. Loftus EV, Feagan BG, Colombel JF, et al. Effects of adalimumab maintenance therapy on health-related quality of life of patients with Crohn's disease: patient-reported outcomes of the CHARM trial. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:3132-41.
136. Feagan BG, Panaccione R, Sandborn WJ, et al. Effects of adalimumab therapy on incidence of hospitalization and surgery in Crohn's disease: results from the CHARM study. *Gastroenterology.* 2008;135:1493-9.
137. Sobrado H. *Historia de Galicia.* Ediciones Trea.
138. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70:845-57.

139. Orchard TR, Wordsworth BP, Jewell DP. Peripheral arthropaties in inflammatory bowel disease: their articular distribution and natural history. *Gut* 1998; 42: 387-91.
140. Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, et al. Frequency of glucocorticoid resistance and dependency in Crohn's disease. *Gut* 1994; 35:360-2.
141. Crane AM, Bradbury L, Van Heel DA, et al. Role of NOD2 variants in spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:1629-33.
142. Heesen M, Bloemeke B, Bachmann-Mennenga B, Kunz D. The CD14-260 C --> T promoter polymorphism co-segregates with the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-308 G --> A polymorphism and is associated with the interleukin-1 beta (IL-1 beta) synthesis capacity of human leukocytes. *Eur Cytokine Netw.* 2002;13 :230-3.
143. Pålsson-McDermott EM, O'Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology.* 2004;113:153-62.
144. Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics.* 2003;81:85-91.
145. Lewontin RC. The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. *Genetics.* 1964;49:49-67.
146. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:867-74.

147. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet*. 2001;357:1925-8.
148. Vermeire S. NOD2/CARD15: relevance in clinical practice. *Best Pract & Res Clin Gastroenterol*. 2004; 18(3) 569-75.
149. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol*. 2004; 99:393-404.
150. Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, et al. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002; 123:86-91.
151. Croucher PJ, Mascheretti S, Hampe J, et al. Haplotype structure and association to Crohn's disease of CARD15 mutations in two ethnically divergent populations. *Eur J Hum Genet*. 2003; 11:6-16.
152. Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003; 17:1465-70.
153. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, et al. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;122:854-66.
154. Esters N, Pierik M, van Steen K, et al. Transmission of CARD15 (NOD2) variants within families of patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:299-305.
155. Annese V, Lombardi G, Perri F, et al. Variants of CARD15 are associated with an aggressive clinical course of Crohn's disease--an IG-IBD study. *Am J Gastroenterol*. 2005;100:84-92.

156. Heresbach D, Gicquel-Douabin V, Birebent B, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms in Crohn's disease: a genotype- phenotype analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2004;16:55-62.
157. Büning C, Genschel J, Bühner S, et al. Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;19:1073-8.
158. Hradsky O, Lenicek M, Dusatkova P, et al. Variants of CARD15, TNFA and PTPN22 and susceptibility to Crohn's disease in the Czech population: high frequency of the CARD15 1007fs. *Tissue Antigens.* 2008;71:538-47.
159. Gazouli M, Zacharatos P, Mantzaris GJ, et al. Association of NOD2/CARD15 variants with Crohn's disease in a Greek population. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2004;16:1177-82.
160. Mendoza JL, Murillo LS, Fernández L, et al. Prevalence of mutations of the NOD2/CARD15 gene and relation to phenotype in Spanish patients with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol.* 2003;38:1235-40.
161. Bairead E, Harmon DL, Curtis AM, et al. Association of NOD2 with Crohn's disease in a homogenous Irish population. *Eur J Hum Genet.* 2003;11:237-44.
162. Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, et al. NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun.* 2004;5:417-25.
163. Heliö T, Halme L, Lappalainen M, et al. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut.* 2003;52:558-62.

164. Törkvist L, Noble CL, Lördal M, et al. Contribution of CARD15 variants in determining susceptibility to Crohn's disease in Sweden. *Scand J Gastroenterol.* 2006;41:700-5.
165. Ernst A, Jacobsen B, Østergaard M, et al. Mutations in CARD15 and smoking confer susceptibility to Crohn's disease in the Danish population. *Scand J Gastroenterol.* 2007;42:1445-51.
166. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, et al. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2002;123:679-88.
167. Kugathasan S, Collins N, Maresso K, et al. CARD15 gene mutations and risk for early surgery in pediatric-onset Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004;2:1003-9.
168. Newman B, Silverberg MS, Gu X, et al. CARD15 and HLA DRB1 alleles influence susceptibility and disease localization in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 2004;99:306-15.
169. Vermeire S, Wild G, Kocher K, et al. CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure. *Am J Hum Genet.* 2002;71:74-83.
170. Cavanaugh JA, Adams KE, Quak EJ, et al. CARD15/NOD2 risk alleles in the development of Crohn's disease in the Australian population. *Ann Hum Genet.* 2003;67:35-41.
171. Li M, Gao X, Guo CC, Wu KC, Zhang X, Hu PJ. OCTN and CARD15 gene polymorphism in Chinese patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008;14:4923-7.

172. Pugazhendhi S, Amte A, Balamurugan R, Subramanian V, Ramakrishna BS. Common NOD2 mutations are absent in patients with Crohn's disease in India. *Indian J Gastroenterol.* 2008;27:201-3.
173. Derakhshan F, Naderi N, Farnood A, et al. Frequency of three common mutations of CARD15/NOD2 gene in Iranian IBD patients. *Indian J Gastroenterol.* 2008;27:8-11.
174. Uyar FA, Over-Hamzaoglu H, Türe F, Gül A, Tözün N, Saruhan-Direskeneli G. Distribution of common CARD15 variants in patients with sporadic Crohn's disease: cases from Turkey. *Dig Dis Sci.* 2006;51:706-10.
175. Zouiten-Mekki L, Zaouali H, Boubaker J, et al. CARD15/NOD2 in a Tunisian population with Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* 2005;50:130-5.
176. Zaahl MG, Winter T, Warnich L, Kotze MJ. Analysis of the three common mutations in the CARD15 gene (R702W, G908R and 1007fs) in South African colored patients with inflammatory bowel disease. *Mol Cell Probes.* 2005;19:278-81.
177. Figueroa C, Peralta A, Herrera L, et al. NOD2/CARD15 and Toll-like 4 receptor gene polymorphism in Chilean patients with inflammatory bowel disease. *Eur Cytokine Netw.* 2006;17:125-30.
178. Baptista ML, Amarante H, Picheth G, et al. CARD15 and IL23R influences Crohn's disease susceptibility but not disease phenotype in a Brazilian population. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:674-9.
179. Fidler HH, Olschwang S, Avidan B, et al. Association between mutations in the CARD15 (NOD2) gene and Crohn's disease in Israeli Jewish patients. *Am J Med Genet A.* 2003;121:240-4.

180. Karban A, Atia O, Leitersdorf E, et al. The relation between NOD2/CARD15 mutations and the prevalence and phenotypic heterogeneity of Crohn's disease: lessons from the Israeli Arab Crohn's disease cohort. *Dig Dis Sci.* 2005;50:1692-7.
181. Kugathasan S, Loizides A, Babusukumar U, et al. Comparative phenotypic and CARD15 mutational analysis among African American, Hispanic, and White children with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2005;11:631-8.
182. Geary RB, Lea RA, Roberts RL, Chambers GK, Barclay ML, Kennedy MA. CARD15 allele frequency differences in New Zealand Maori: ancestry specific susceptibility to Crohn's disease in New Zealand? *Gut.* 2006;55:580.
183. Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M, et al. Crohn's disease patients carrying Nod2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence. *Ann Surg.* 2005;242:693-700.
184. Cantó E, Ricart E, Busquets D, et al. Influence of a nucleotide oligomerization domain 1 (NOD1) polymorphism and NOD2 mutant alleles on Crohn's disease phenotype. *World J Gastroenterol.* 2007;13:5446-53.
185. De Diego C, Alcántara M, Valle J, et al. Frequency of CARD15 polymorphisms in patients with Crohn's disease from Toledo, Spain: genotype-phenotype correlation. *Genet Test.* 2006;10:178-85.
186. Rodrigo L, Martínez-Borra J, Garrote JA, et al. CARD15 mutations are poorly related to Crohn's disease phenotypes in Asturias. *Rev Esp Enferm Dig.* 2007;99:570-757.
187. Ferreira AC, Almeida S, Tavares M, et al. NOD2/CARD15 and TNFA, but not IL1B and IL1RN, are associated with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2005;11:331-9.

188. Vind I, Vieira A, Hougs L, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms in Crohn's disease: a genotype-phenotype analysis in Danish and Portuguese patients and controls. *Digestion*. 2005;72:156-63.
189. Leung E, Hong J, Fraser AG, et al. Polymorphisms of CARD15/NOD2 and CD14 genes in New Zealand Crohn's disease patients. *Immunol Cell Biol*. 2005;83:498-503.
190. Capelli C, Redhead N, Abernethy JK, et al. A Y chromosome census of the British Isles. *Curr Biol*. 2003;13:979-84.
191. Carracedo A, Beckmann A, Bengs A, et al. Results of a collaborative study of the EDNAP group regarding the reproducibility and robustness of the Y-chromosome STRs DYS19, DYS389 I and II, DYS390 and DYS393 in a PCR pentaplex format. *Forensic Sci Int*. 2001;119:28-41.
192. Soto L, Vega A, Goyanes V, Valverde D. Hemochromatosis in Galicia (nw Spain): a Celtic influence? *Clin Genet*. 2000;57:454-5.
193. Castillo S, Tejedor D, Mozas P, et al. The apolipoprotein B R3500Q gene mutation in Spanish subjects with a clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2002;165:127-35.
194. Murillo L, Crusius JB, van Bodegraven AA, Alizadeh BZ, Peña AS. CARD15 gene and the classification of Crohn's disease. *Immunogenetics*. 2002;54:59-61.
195. Tomer G, Ceballos C, Concepcion E, Benkov KJ. NOD2/CARD15 variants are associated with lower weight at diagnosis in children with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2003;98:2479-84.
196. Cukovic-Cavka S, Vermeire S, Hrstic I, et al. NOD2/CARD15 mutations in Croatian patients with Crohn's disease: prevalence and genotype-phenotype relationship. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006;18:895-9.

197. Protic MB, Pavlovic ST, Bojic DZ, et al. CARD15 gene polymorphisms in Serbian patients with Crohn's disease: genotype-phenotype analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008;20:978-84.
198. Seiderer J, Schnitzler F, Brand S, et al. Homozygosity for the CARD15 frameshift mutation 1007fs is predictive of early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis. *Scand J Gastroenterol*. 2006;41:1421-32.
199. Louis E, Michel V, Hugot JP, et al. Early development of stricturing or penetrating pattern in Crohn's disease is influenced by disease location, number of flares, and smoking but not by NOD2/CARD15 genotype. *Gut*. 2003;52:552-7.
200. Ogura Y, Lala S, Xin W, et al. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut*. 2003;52:1591-7.
201. Colombel JF. The CARD15 (also known as NOD2) gene in Crohn's disease: are there implications for current clinical practice? *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2003;1:5-9.
202. Brant SR, Picco MF, Achkar JP, et al. Defining complex contributions of NOD2/CARD15 gene mutations, age at onset, and tobacco use on Crohn's disease phenotypes. *Inflamm Bowel Dis*. 2003;9:281-9.
203. Vavassori P, Borgiani P, Biancone L, et al. CARD15 mutation analysis in an Italian population: Leu1007fsinsC but neither Arg702Trp nor Gly908Arg mutations are associated with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2004;10:116-21.
204. Mardini HE, Gregory KJ, Nasser M, et al. Gastroduodenal Crohn's disease is associated with NOD2/CARD15 gene polymorphisms, particularly L1007P homozygosity. *Dig Dis Sci*. 2005;50:2316-22.

205. Louis E, Collard A, Oger AF, Degroote E, Aboul Nasr El Yafi FA, Belaiche J. Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut*. 2001;49:777-82.
206. Cosnes J, Cattan S, Blain A, et al. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2002;8:244-50.
207. Onnie CM, Fisher SA, Prescott NJ, et al. Diverse effects of the CARD15 and IBD5 loci on clinical phenotype in 630 patients with Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008;20:37-45.
208. Radlmayr M, Torok HP, Martin K, Folwazny C. The c-insertion mutation of the NOD2 gene is associated with fistulizing and fibrostenotic phenotypes in Crohn's disease (letter). *Gastroenterology* 2002; 122:2091-2.
209. Loftus EV Jr, Silverstein MD, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR. Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gastroenterology*. 1998;114:1161-8.
210. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut*. 1996;39:690-7.
211. Lopez Miguel C, Sicilia B, Sierra E, Lopez Zaborras J, Arribas F, Gomollon F. Incidence of inflammatory bowel disease in Aragon: outcome of a prospective population-based study. *Gastroenterol Hepatol*. 1999;22:323-8.
212. Blanchard JF, Bernstein CN, Wajda A, Rawsthorne P. Small-area variations and sociodemographic correlates for the incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Epidemiol*. 2001;154:328-35.

213. Ruiz Ochoa V, Potel J. Crohn's disease in Galicia. En McComell R.B. The genetics epidemiology of IBD. Karger. Basel. 1985.
214. Mahmud N, Weir DG. The urban diet and Crohn's disease: is there a relationship? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2001;13:93-5.
215. Amre DK, Lambrette P, Law L, et al. Investigating the hygiene hypothesis as a risk factor in pediatric onset Crohn's disease: a case-control study. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:1005-11.
216. Cosnes J, Carbonnel F, Carrat F, Beaugerie L, Cattan S, Gendre J. Effects of current and former cigarette smoking on the clinical course of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 1999;13:1403-11.
217. Lakatos PL, Lakatos L, Szalay F, et al. Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World J Gastroenterol.* 2005;11:1489-95.
218. Laghi L, Costa S, Saibeni S, et al. Carriage of CARD15 variants and smoking as risk factors for resective surgery in patients with Crohn's ileal disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22:557-64.
219. Zhou Z, Lin XY, Akolkar PN, et al. Variation at NOD2/CARD15 in familial and sporadic cases of Crohn's disease in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Gastroenterol.* 2002;97:3095-101.
220. Crawford NP, Colliver DW, Eichenberger MR, et al. CARD15 genotype-phenotype relationships in a small inflammatory bowel disease population with severe disease affection status. *Dig Dis Sci.* 2007;52:2716-24.
221. Peeters H, Vander Cruyssen B, Laukens D, et al. Radiological sacroiliitis, a hallmark of spondylitis, is linked with CARD15 gene polymorphisms in patients with Crohn's disease. *Ann Rheum Dis.* 2004;63: 1131-4.

222. Peeters H, Vander Cruyssen B, Mielants H, et al. Clinical and genetic factors associated with sacroiliitis in Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23:132-7.
223. Renda MC, Orlando A, Civitavecchia G, et al. The role of CARD15 mutations and smoking in the course of Crohn's disease in a Mediterranean area. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:649-55.
224. Bianchi V, Maconi G, Ardizzone S, et al. Association of NOD2/CARD15 mutations on Crohn's disease phenotype in an Italian population. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2007;19:217-23.
225. López Ramos D, Gabriel R, Cantero Perona J et al. Association of MAL Tectomy (appendectomy and tonsillectomy) and inflammatory bowel disease: a familial case-control study. *Rev Esp Enferm Dig* 2001;93:303-14.
226. Radford-Smith GL, Edwards JE, Purdie DM et al. Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut.* 2002;51:808-13.
227. Abreu MT, Arditi M. Innate immunity and toll-like receptors: clinical implications of basic science research. *J Pediatr.* 2004;144:421-9.
228. Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, et al. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut.* 2004;53:987-92.
229. Ouburg 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;54:439-40.

230. Brand S, Staudinger T, Schnitzler F, et al. The role of Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and CARD15/NOD2 mutations in the susceptibility and phenotype of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2005;11:645-52.
231. Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, et al. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol.* 2005;11:681-5.
232. Hume GE, Fowler EV, Doecke J, et al. Novel NOD2 haplotype strengthens the association between TLR4 Asp299gly and Crohn's disease in an Australian population. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:585-90.
233. Oostenbrug LE, Drenth JP, de Jong DJ, et al. Association between Toll-like receptor 4 and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2005;11:567-75.
234. Rigoli L, Romano C, Caruso RA, et al. Clinical significance of NOD2/CARD15 and Toll-like receptor 4 gene single nucleotide polymorphisms in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008;14:4454-61.
235. Baumgart DC, Buning C, Geerds L, et al. The c.1-260C>T promoter variant of CD14 but not the c.896A>G (p.D299G) variant of toll-like receptor 4 (TLR4) genes is associated with inflammatory bowel disease. *Digestion.* 2007;76:196-202.
236. Török HP, Glas J, Tonenchi L, Mussack T, Folwaczny C. Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin Immunol.* 2004;112:85-91.
237. Hong J, Leung E, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Krissansen GW. TLR2, TLR4 and TLR9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22:1760-6.

238. Török HP, Glas J, Tonenchi L, Bruennler G, Folwaczny M, Folwaczny C. Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism. *Gastroenterology*. 2004;127:365-6.
239. Klausz G, Molnár T, Nagy F, et al. Polymorphism of the heat-shock protein gene Hsp70-2, but not polymorphisms of the IL-10 and CD14 genes, is associated with the outcome of Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*. 2005;40:1197-204.
240. Nikolaus S, Raedler A, Kühbacker T, Sfikas N, Fölsch UR, Schreiber S. Mechanisms in failure of infliximab for Crohn's disease. *Lancet*. 2000;356:1475-9.
241. Parsi MA, Achkar JP, Richardson S, et al. Predictors of response to infliximab in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;123:707-13.
242. Van Assche G, Magdelaine-Beuzelin C, D'Haens G, et al. Withdrawal of immunosuppression in Crohn's disease treated with scheduled infliximab maintenance: a randomized trial. *Gastroenterology*. 2008;134:1861-8.
243. Esters N, Vermeire S, Joossens S, et al. Serological markers for prediction of response to anti-tumor necrosis factor treatment in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2002;97:1458-62.
244. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut*. 2006;55:426-31.
245. Barreiro de Acosta M, Macías García F. Proteína C reactiva: Valor en la EII. *GH continuada* 2007;6: 188-191.
246. Mascheretti S, Schreiber S. The role of pharmacogenomics in the prediction of efficacy of anti-TNF therapy in patients with Crohn's disease. *Pharmacogenomics*. 2004;5:479-86.

247. Baert FJ, D'Haens GR, Peeters M, et al. Tumor necrosis factor alpha antibody (infliximab) therapy profoundly down-regulates the inflammation in Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology*. 1999;116:22-8.
248. Vermeire S, Louis E, Rutgeerts P, et al. NOD2/CARD15 does not influence response to infliximab in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;123:106-11.
249. Mascheretti S, Hampe J, Croucher PJ, et al. Response to infliximab treatment in Crohn's disease is not associated with mutations in the CARD15 (NOD2) gene: an analysis in 534 patients from two multicenter, prospective GCP-level trials. *Pharmacogenetics*. 2002;12:509-15.
250. Seiderer J, Brand S, Dambacher J, et al. Adalimumab in patients with Crohn's disease--safety and efficacy in an open-label single centre study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;25:787-96.
251. Barreiro-de Acosta M, Peña AS. Clinical applications of NOD2/CARD15 mutations in Crohn's disease. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2007;37:49-54.
252. Rubin D. To test or "NOD2" test: What are the questions? *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:510-512.
253. Silverberg M. The time has come for NOD2/CARD15 testing for families with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:504-506

ANEXO 1

INFORMACIÓN Ó PACIENTE

ESTUDIO sobre os polimorfismos dos Xenes que influen na severidade e tratamento da Enfermidade de Crohn

Numerosos estudos suxiren que os factores xenéticos están implicados na predisposición a sufrir-la Enfermidade de Crohn. Xa se teñen identificado vinculacións nalgúns cromosomas (3, 7 e 12), aínda que non se chegou a ningún consenso.

O Servicio de Aparato Dixestivo do Hospital Clínico Universitario de Santiago en colaboración co Departamento de Xenética da Facultade de Bioloxía de Santiago e o Laboratorio de Inmunoxenética do VU Medisch Centrum de Amsterdam, vai realizar un estudio de inmunoxenética sobre os polimorfismos dos xenes que poden conferir susceptibilidade a enfermidade e o seu papel na severidade dos pacientes con Enfermidade de Crohn.

A súa participación no estudio conleva a extracción dunha mostra sanguínea; completaráse unha historia clínica. Nalgúns pacientes asimesmo se solicitará, de forma voluntaria, a obtención dunha mostra sanguínea de familiares directos (pais, irmáns ou fillos).

Descrición do procedemento

Extraeráselle unha mostra sanguínea da que se extraerá o ADN que se empregará para realiza-lo estudio.

Medicamentos

Non inflúe a toma de ningún medicamento para realiza-lo estudio.

Molestias e riscos

Se realizará unha simple extracción sanguínea, asimesmo realizaráselle unha serie de preguntas sobre a súa enfermidade, para encuadralo dentro da Clasificación de Viena.

Beneficios que obtén de participar neste estudio

Aínda que a súa participación neste estudio non lle vai proporcionar un beneficio inmediato, nun futuro, os resultados obtidos permitirán coñecer-la súa especificidade ós novos tratamentos para a Enfermidade de Crohn, así como a susceptibilidade xenética da súa familia.

Tamén ten que saber que:

- Ten completa liberdade para negarse a participar no estudo, e a súa negativa non terá repercusións na asistencia médica que recibe.
- Participar neste estudo non supón ningún gasto extra para vostede.
- O Hospital, o Servicio de Aparato Dixestivo, centros colaboradores e o persoal sanitario comprométense a gardar e respeta-la confidencialidade da súa historia clínica, cualquera que sexa o uso que se faga dos resultados deste estudo.
- Manténrase o seu carácter confidencial e a súa identidade non será revelada.
- E posible que se publiquen datos do estudo, pero manténrase sempre o seu anonimato.

Se durante a participación no estudo cre necesario recibir máis información, pode contactar co Dr. no número de teléfono

FOLLA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Eu, (nome e apelidos)

Lin a folla de información que se me entregóu

Puiden facer preguntas sobre o estudio

Recibín suficiente información.

Falei con (nome investigador)

Comprendo que poido retirarme do estudio:

1. Cando queira
2. Sin ter que dar explicación
3. Sin que isto repercuta na miña atención médica.

Presto libremente a miña conformidade para participar no estudio.

Sinatura Paciente

Sinatura Investigador

INFORMACIÓN AL PACIENTE

ESTUDIO sobre los polimorfismos de los genes en la severidad y tratamiento de la Enfermedad de Crohn

Numerosos hallazgos sugieren que los factores genéticos están implicados en la predisposición a sufrir la Enfermedad de Crohn. Ya se han identificado vinculaciones en algunos cromosomas (3, 7 y 12), aunque no se ha llegado a consenso.

El Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico Universitario de Santiago en colaboración con el Departamento de Genética de la Facultad de Biología de Santiago y el Laboratorio de Inmunogenética del VU Medisch Centrum de Amsterdam, va a realizar un estudio de inmunogenética sobre los polimorfismos de los genes que intervienen en la susceptibilidad a la enfermedad y su papel en la severidad de los pacientes con Enfermedad de Crohn.

Su participación en el estudio conlleva la extracción de una muestra sanguínea; se le completará una historia clínica. En algunos pacientes asimismo se solicitará, de forma voluntaria, la obtención de una muestra sanguínea de familiares directos (padres, hermanos o hijos).

Descripción del procedimiento

Se le extraerá una muestra sanguínea de la cual se extraerá el ADN que se empleará para realizar el estudio.

Medicamentos

No influye la toma de ningún medicamento para realizar el estudio.

Molestias y riesgos

Se realizará una simple extracción sanguínea, asimismo se le realizarán una serie de preguntas sobre su enfermedad, para encuadrarlo dentro de la Clasificación de Viena.

Beneficios que obtiene de participar en este estudio

Aunque su participación en este estudio no le va a proporcionar un beneficio inmediato, en un futuro, los resultados obtenidos permitirán conocer su especificidad a los nuevos tratamientos para la Enfermedad de Crohn, así como la susceptibilidad genética de su familia.

También tiene que saber que:

- Tiene completa libertad para negarse a participar en el estudio, y su negativa no tendrá repercusiones en la asistencia médica que recibe.
- Participar en este estudio no supone ningún gasto extra para usted.
- El Hospital, el Servicio de Aparato Digestivo, centros colaboradores y el personal sanitario se comprometen a guardar y respetar la confidencialidad de su historia clínica, cualquiera que sea el uso que se haga de los hallazgos de este estudio.
- Se mantendrá su carácter confidencial y su identidad no será revelada.
- Es posible que se publiquen datos del estudio, pero se mantendrá siempre su anonimato.

Si durante la participación en el estudio cree necesario recibir más información, puede contactar con el Dr. en el número de teléfono

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, (nombre y apellidos)

He leído la hoja de información que se me ha entregado

He podido hacer preguntas sobre el estudio

He recibido suficiente información.

He hablado con (nombre investigador)

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicación
3. Sin que esto repercuta en mi atención médica.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firma Paciente

Firma Investigador

ANEXO 2

ESTUDIO DE FACTORES GENÉTICOS IMPLICADOS EN LA SEVERIDAD Y TRATAMIENTO A LA ENFERMEDAD DE CROHN

Nombre:

Número:

Sexo: H M

Nº hijos:

Edad:

Procedencia: Rural Urbano Procedencia de los padres: Rural Urbano

Fumador previo a enfermedad: SÍ NO Fumador actual: SÍ NO

Años de enfermedad:

Confirmación de la enfermedad: Endoscopia

Radiología

Histología

CLASIFICACIÓN DE VIENA

Extensión Anatómica diagnóstica

Patrón evolutivo

Edad

Ileon terminal (L1)

No estenosante ni penetrante (B1)

<40 años (A1)

Colon (L2)

Estenosante (B2)

>40 años (A2)

Ileocolon (L3)

Penetrante (B3)

Tracto gastrointestinal alto (L4)

Cirugía previa: SÍ NO

Tipo de intervención:

Tratamientos recibidos: Azatioprina SÍ NO Probióticos SÍ NO

Corticoides orales SÍ NO Ciprofloxacino SÍ NO

Corticoides tópicos SÍ NO Metronidazol SÍ NO

Budesonida SÍ NO Metotrexate SÍ NO

5-ASA oral SÍ NO 5-ASA tópico SÍ NO

Infliximab SÍ NO N° Respuesta:

Corticorresistencia: SÍ NO

Corticodependencia: SÍ NO

Familiar afecto: SÍ NO

Grado:

Afectación extraintestinal: SÍ NO

Tipo:

Consentimiento: SÍ NO

Fecha muestra:

**ESTUDIO DE FACTORES GENÉTICOS IMPLICADOS EN LA SEVERIDAD Y
TRATAMIENTO A LA ENFERMEDAD DE CROHN**

Nombre:

Número:

Sexo: H M

Nº hijos:

Edad:

Procedencia: Rural Urbano

Procedencia de los padres: Rural Urbano

Fumador: SÍ NO

Consentimiento: SÍ NO

Fecha muestra: