

ESTUDIO DE LOS GENES NOD2 Y HLA EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Memoria presentada por la licenciada en Medicina María Gómez García
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Programa de Doctorado: Medicina Interna.

DIRECTORES:

DR. JAVIER MARTÍN IBÁÑEZ

DR. MIGUEL ÁNGEL LÓPEZ-NEVOT

DR. JAVIER DE TERESA GALVÁN

GRANADA 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María Gómez García
D.L.: GR. 2591-2009
ISBN: 978-84-692-3858-5

Para que esta tesis salga adelante ha sido necesaria la colaboración de numerosas personas, a las que estoy muy agradecida.

En este tiempo de preparación del trabajo han ocurrido algunos sucesos inesperados y dolorosos que en algún momento me han hecho dudar si continuar o no, y ellos me han animado a seguir hacia delante, gracias amigos.

Gracias muy especialmente a Javier Martín y Miguel Ángel por toda la paciencia que habeis tenido a lo largo de este periplo; gracias a Javier de Teresa porque hace mucho tiempo me animó a inciar la tesis.

Hoy quiero recordar especialmente a Fernando, Antonio Ramón, Isabel, Miriam y Cristina, se que estarán muy contentos al ver el trabajo finalizado.

Y gracias infinitas a Benito por estar ahí cada día.

ÍNDICE

ABREVIATURAS-----	9
1. INTRODUCCIÓN-----	13
1.1. Enfermedad Inflamatoria Intestinal: definición y clasificación-----	15
1.1.1. Definición y clasificación de CU-----	15
1.1.2. Definición y clasificación de EC-----	18
1.1.3. Colitis indeterminada-----	20
1.2. Epidemiología-----	21
1.2.1. Incidencia y prevalencia-----	21
1.2.2. Edad-----	22
1.2.3. Sexo-----	23
1.2.4. Diferencias étnicas y raciales-----	23
1.3. Anatomía patológica-----	24
1.3.1. Colitis ulcerosa-----	24
1.3.2. Enfermedad de Crohn-----	24
1.4. Clínica-----	25
1.4.1. Manifestaciones digestivas-----	25
1.4.1.1. Diarrea-----	25
1.4.1.2. Dolor abdominal-----	26
1.4.1.3. Tenesmo rectal y urgencia defecatoria-----	27
1.4.1.4. Fiebre-----	27
1.4.1.5. Pérdida de peso-----	28
1.4.1.6. Enfermedad perianal-----	28
1.4.1.7. Fístulas-----	29

1.4.2. Manifestaciones extraintestinales-----	29
1.4.2.1. Manifestaciones osteoarticulares-----	30
1.4.2.2. Manifestaciones dermatológicas-----	32
1.4.2.3. Manifestaciones hepatobiliares-----	33
1.4.2.4. Manifestaciones oculares-----	34
1.4.2.5. Complicaciones tromboembólicas-----	34
1.5. Diagnóstico-----	35
1.5.1. Rx simple y baritada-----	35
1.5.2. Ecografía-----	36
1.5.3. Tomografía axial computerizada (TAC) -----	37
1.5.4. Resonancia magnética-----	38
1.5.5. Gammagrafía-----	38
1.5.6. Endoscopia-----	39
1.6. Tratamiento-----	40
1.6.1. Salicilatos-----	41
1.6.2. Corticoides-----	42
1.6.3. Inmunomoduladores-----	43
1.6.3.1. Azatioprina y 6-mercaptopurina-----	44
1.6.3.2. Metotrexato-----	45
1.6.3.3. Ciclosporina-----	46
1.6.3.4. Tacrólimus-----	47
1.6.3.5. Micofenolato mofetil-----	48
1.6.4. Agentes biológicos-----	48
1.6.5. Aféresis-----	51
1.7. Fisiopatología de la EII-----	52

1.7.1. Factores ambientales -----	53
1.7.1.1. Dieta-----	53
1.7.1.2. Factores microbianos-----	53
1.7.1.3 Tabaco-----	56
1.7.1.3.1. Tabaco y CU-----	56
1.7.1.3.2. Tabaco y EC-----	57
1.7.1.4. Apendicectomía-----	58
1.7.1.5. AINES-----	59
1.7.1.6. Anticonceptivos orales-----	60
1.7.2. Factores inmunológicos -----	61
1.7.2.1. Defectos en la barrera intestinal-----	62
1.7.2.2. Respuesta inmune innata-----	63
1.7.2.3. Respuesta inmune adaptativa-----	65
1.7.2.4. Mediadores del daño intestinal-----	69
1.7.3. Factores genéticos -----	70
1.7.3.1. Epidemiología genética de la EII-----	70
1.7.3.1.1. Estudios étnicos y raciales-----	70
1.7.3.1.2. Estudios familiares-----	71
1.7.3.1.3. Estudios con gemelos-----	71
1.7.3.1.4. Diferencias entre estudios esporádicos y familiares-----	72
1.7.3.2. Identificación de factores genéticos-----	72
1.7.3.2.1. Clonado posicional-----	73
1.7.3.2.2. Evaluación de genes candidatos: estudio de asociación-----	74
1.7.3.2.3. Identificación de genes candidatos mediante rastreos sistemáticos del Genoma (GWAS) -----	74

1.7.3.3. Loci de susceptibilidad a EII-----	76
1.7.3.4. Otros loci de susceptibilidad a EII y genes candidatos-----	80
1.7.3.5. Loci de susceptibilidad identificados mediante GWAS -----	81
1.8. Genes abordados en el presente estudio-----	84
1.8.1. CARD15/NOD2-----	84
1.8.1.1. Localización y estructura-----	84
1.8.1.2. Función de la proteína-----	86
1.8.1.3. Polimorfismos de CARD15-----	87
1.8.1.4. CARD15 en otras enfermedades-----	89
1.8.1.5. Mecanismo patogénico-----	89
1.8.2. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC/HLA) ----	92
1.8.2.1. HLA/MHC. Conceptos generales-----	92
1.8.2.2. Las moléculas HLA de clase I-----	94
1.8.2.2.1. Estructura-----	94
1.8.2.2.2. Organización genética-----	96
1.8.2.2.3. Polimorfismos de la cadena α -----	96
1.8.2.3. Las moléculas HLA de clase II-----	97
1.8.2.3.1. Estructura-----	97
1.8.2.3.2. Organización genética-----	98
1.8.2.3.3. Polimorfismos de las moléculas HLA de clase II-----	99
1.8.2.4. Función de las moléculas HLA clase I y II-----	100
1.8.2.5. Procesamiento del antígeno y ensamblaje a moléculas HLA de clase II-	102
1.8.2.6. Procesamiento del antígeno y ensamblaje a moléculas HLA de clase I-	103
1.8.2.7. Reconocimiento del antígeno por los linfocitos T-----	105
1.8.3. HLA/MHC y Enfermedad Inflamatoria Intestinal-----	110

2. OBJETIVOS -----	113
3. PACIENTES -----	117
4. MATERIALES Y METODOS -----	121
4.1.1. Extracción de DNA-----	123
4.1.2. Cuantificación de DNA-----	123
4.2. Polimorfismo de NOD2/CARD15-----	124
4.3. Tipaje genómico HLA de clase II-----	126
4.3.1. Fundamento-----	126
4.3.2. Amplificación de exón2 de DRB y DQB1-----	127
4.3.3. Hibridación y detección de bandas en las tiras que contienen las sondas-----	128
4.3.4. Procedimiento-----	130
4.3.5. Asignación del tipaje genómico HLA de clase II-----	131
ANALISIS ESTADISTICO-----	133
ANEXO -----	135
5. RESULTADOS -----	139
5.1 Características clínico-epidemiológicas -----	141
5.1.1. Edad al diagnóstico, sexo y tiempo de evolución de la enfermedad-----	143
5.1.2. Fumadores-----	144
5.1.3. Antecedentes familiares de EII-----	144
5.1.4. Necesidad de cirugía-----	145
5.1.5. Necesidad de inmunosupresores y tratamiento biológico-----	146
5.1.6. Manifestaciones extradigestivas-----	148
5.1.7. Enfermedad de Crohn: Clasificación de Montreal-----	149
5.1.8. Colitis ulcerosa: Clasificación de Montreal-----	151

5.2. Estudio de los polimorfismos del gen CARD15 -----	152
5.2.1. Análisis de susceptibilidad a padecer la enfermedad-----	152
5.2.1.1. Enfermedad de Crohn-----	152
5.2.1.1.1. Polimorfismo R702W-----	152
5.2.1.1.2. Polimorfismo G702R-----	154
5.2.1.1.3. Polimorfismo L1007fs-----	155
5.2.1.2. Colitis ulcerosa-----	156
5.2.2. Análisis de CARD15 y fenotipo-----	158
5.2.2.1. Enfermedad de Crohn-----	158
5.2.2.1.1. Edad al diagnóstico-----	158
5.2.2.1.2. Localización-----	159
5.2.2.1.3. Patrón evolutivo-----	160
5.2.2.1.4. Otras variables analizadas-----	161
5.3. HLA/MCH -----	163
5.3.1. HLA y Colitis ulcerosa-----	163
5.3.2. HLA y enfermedad de Crohn-----	166
6. DISCUSIÓN -----	169
6.1. Características clínico-epidemiológicas de la EII-----	171
6.2. CARD15 y Enfermedad de Crohn-----	172
6.3. CARD15 y Colitis ulcerosa-----	180
6.4. HLA y Colitis ulcerosa-----	181
7. CONCLUSIONES -----	185
PUBLICACIONES-----	190
BIBLIOGRAFIA-----	193

ABREVIATURAS

TERMINOS

ABREVIATURAS

- Anticonceptivos orales	ACO
- Ácido desoxirribonucleico	ADN
- Antiinflamatorios no esteroideos	AINEs
- Ac anticitoplasma de neutrófilos perinucleares	p-ANCA
- Ácido 5- aminosalicílico	5-ASA
- Ácido ribonucleico	ARN
- Anticuerpos anti-infliximab	ATI
- Autophagy-related 16-like 1	ATG16L1
- Azatioprina	AZA
- Receptor de células B	BCR
- Dominio de unión/activación de caspasas	CARD
- Colangitis esclerosante primaria	CEP
- Colitis indeterminada	CI
- Ciclooxygenasa	COX
- Células presentadoras de antígenos	CPA
- Colitis ulcerosa	CU
- Ciclosporina	CyA
- Enfermedad de Crohn	EC
- Enfermedad Inflamatoria Intestinal	EII
- Enfermedad perianal	EPA
- Fosa ilíaca derecha	FID
- Folículos linfoides	FL
- Forkhead box P3	FOXP3
- Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos	GM-CSF
- Genome wide scan studies	GWAS
- Anticuerpos anti-adalimumab	HAHA
- Interferón	IFN
- Inmunoglobulina	Ig
- Interleuquina	IL
- Inmunomoduladores	IMM
- Immunity-related guanosine triphosphatase	IRGM
- Muramil dipéptido	MDP
- Multidrug resistance	MDR
- Complejo Mayor de Histocompatibilidad	MHC
- Micofenolato Mofetil	MMF
- Metalomieloproteinasas de la matriz	MMPs
- Mercaptopurina	MP
- Metotrexato	MTX
- Factor nuclear kappa B	NF-κB
- Células natural killer	NK
- Dominio de oligomerización de nucleótidos	NODs
- Transportadores de cationes orgánicos	OCTN

- Patrones moleculares asociados a patógenos	PAMPs
- Receptor activado por proteinasa	PAR
- Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
- Prostaglandina	PG
- Placas de Peyer	PP
- Receptores de reconocimiento de patrones	PRRs
- Resonancia Magnética	RM
- Radiografía	Rx
- Polimorfismo de un solo nucleotido	SNP
- Tomografía axial computerizada	TAC
- Proteína transportadora de péptidos	TAP
- Receptor de células T	TCR
- Factor de crecimiento tisular β	TGF- β
- Tejido linfoide asociado a intestino	TLAI
- Receptores Toll-like	TLR
- Factor de necrosis tumoral α	TNF- α
- Células T reguladoras	Treg

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL:

DEFINICIONES Y CLASIFICACIÓN.

El término “Enfermedad Inflamatoria Intestinal crónica” (EII), incluye una amplia variedad de presentaciones y manifestaciones clínicas, cuya característica principal es la inflamación crónica del tubo digestivo en diferentes localizaciones. Actualmente, el concepto de EII engloba tres entidades: la enfermedad de Crohn (EC), la colitis ulcerosa (CU) y la colitis indeterminada (CI). La cronicidad en el curso clínico de la EII consiste en alternar periodos de inactividad o quiescencia que se identifican con las fases de remisión, con periodos de actividad clínica de diferente intensidad que se denominan brotes o recidivas. No se conoce la etiología de la EII; la teoría etiopatogénica más aceptada es que la disregulación de la respuesta inmune del huésped frente a la flora bacteriana residente y a otros antígenos intraluminales en sujetos susceptibles genéticamente, juega un papel clave en la patogenia del daño tisular en la EII (1).

1.1.1. DEFINICION Y CLASIFICACIONES DE COLITIS ULCEROSA.

La colitis ulcerosa se puede definir como un proceso inflamatorio ulcerativo agudo, subagudo o crónico de la mucosa recto-colónica que se extiende de manera proximal y continua desde recto hasta ciego, en diferente grado. La evolución clínica es variable y el pronóstico impredecible (2).

La CU puede presentar tres formas clínicas evolutivas distintas (3):

- **Forma crónica intermitente:** es la más frecuente, se caracteriza por cursar con brotes de actividad que alternan con periodos de remisión más o menos largos.
- **Forma crónica continua:** se caracteriza por mantener una actividad inflamatoria continua durante periodos de tiempo superiores a seis meses, a pesar del tratamiento médico.
- **Forma aguda fulminante:** es la menos frecuente; puede presentarse como forma de inicio de la enfermedad o en el transcurso de las otras formas evolutivas. Por lo general suele tratarse de una pancolitis y se presenta en forma de una rectorragia masiva o con complicaciones tales como el Megacolon Tóxico y la perforación colónica, obligando a una intervención quirúrgica precoz.

Clasificación de la colitis ulcerosa en función de la extensión anatómica (4):

- **Proctitis:** se reserva para aquellos pacientes con la enfermedad circunscrita al recto, se ha sugerido que el proceso inflamatorio no debe superar los 15 cm.; representa el 25-30% del global de la CU.
- **Proctosigmoiditis:** la inflamación mucosa afecta desde el recto hasta el sigma.
- **Colitis ulcerosa distal o colitis izquierda:** la afectación comprende recto, sigma y colon descendente hasta el ángulo esplénico; en ocasiones, las proctosigmoiditis se agrupan en esta denominación, pudiendo representar el 40-45% de las CU.
- **Colitis extensa:** la afectación rebasa el ángulo esplénico, extendiéndose desde el recto hasta el ángulo hepático, incluyendo el colon transversal.
- **Pancolitis:** afectación de todo el colon, este grupo representa el 10-15% del total.

Clasificación de Montreal de la colitis ulcerosa (5):

En el Congreso Mundial de Gastroenterología de 2005, se presentó la primera clasificación oficial para esta enfermedad, que tiene en cuenta dos parámetros, extensión y gravedad:

Extensión:

- **E1: Proctitis ulcerosa:** afección limitada al recto (el límite superior de la inflamación no supera la unión rectosigmoidea).
- **E2: Colitis izquierda** (o colitis distal): afección limitada al colon izquierdo (el límite superior de la inflamación no supera el ángulo esplénico).
- **E3: Colitis extensa** (pancolitis): afección que se extiende más allá del ángulo esplénico.

Gravedad:

- **S0: Colitis en remisión** (colitis silente): no hay síntomas de la enfermedad.
- **S1: Colitis leve:** presencia de cuatro o menos deposiciones al día con sangre, sin fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia ni aumento de la VSG.
- **S2: Colitis moderada:** criterios intermedios entre leve y grave, siempre con signos de afección sistémica leve.
- **S3: Colitis grave:** presencia de seis o más deposiciones diarias con sangre, fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia y aumento de la VSG, a menudo con signos de afección (toxicidad) sistémica grave.

1.1.2. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIONES DE LA ENFERMEDAD DE CROHN.

La enfermedad de Crohn se puede definir como un proceso inflamatorio crónico que puede afectar a cualquier región del tubo digestivo, desde la boca hasta el ano. La lesión inflamatoria es característicamente transmural, asimétrica y discontinua. La enfermedad se caracteriza por un curso clínico prolongado y variable, por la diversidad de las manifestaciones clínicas, por las complicaciones perianales y sistémicas y por una marcada tendencia a la recurrencia tras la resección quirúrgica (4).

En 1998, en el Congreso Mundial de Gastroenterología celebrado en Viena, se recomendó la utilización de esta clasificación, realizada con la intención de subdividir a los pacientes en grupos homogéneos, y que tiene en cuenta tres variables: edad al diagnóstico, localización y patrón evolutivo (6).

En función de la edad al diagnóstico (A) los pacientes se subdividen en:

- **A1:** menor de 40 años
- **A2:** igual o mayor de 40 años

Atendiendo a la máxima extensión de la enfermedad, previo a cualquier resección quirúrgica, se distribuyen en:

- **L1:** Ileal (30%) enfermedad limitada al ileon terminal, entendiendo como tal el tercio distal de intestino delgado, con o sin participación de ciego en continuidad.
- **L2:** Cólica (25%) afectación de cualquier localización entre recto y ciego sin participación del intestino delgado ni del tracto gastrointestinal superior.
- **L3:** Ileocólica (40%) afecta al ileon terminal, con o sin participación de ciego, y a cualquier localización del colon entre ascendente y recto.

- **L4:** Gastrointestinal alta (5%). Cualquier localización proximal al íleon distal independientemente de que exista o no afectación del íleon terminal o del colon

En función del patrón evolutivo (fenotipo), se proponen tres patrones evolutivos:

- **B1:** No estenosante no fistulizante, antes denominado inflamatorio.
- **B2:** Estenosante u obstructivo; se caracteriza por la disminución del calibre de la luz intestinal sin evidencia de fistulas y en ausencia de actividad inflamatoria.
- **B3:** Fistulizante; se asocia con el desarrollo de fistulas intraabdominales o perianales, masas inflamatorias y/o abscesos en el curso de la enfermedad.

En el Congreso Mundial de Gastroenterología celebrado en Montreal en 2005 se ha propuesto una nueva clasificación para la EC (5); los criterios principales que se han escogido son la edad de comienzo del cuadro, la localización, el patrón clínico (inflamatorio, estenosante o fistulizante) predominante y la presencia o no de enfermedad perianal.

Edad al diagnóstico (A):

- **A1:** 16 años o menos
- **A2:** 17-40 años
- **A3:** más de 40 años

Localización (L):

- **L1:** íleon terminal **L1+L4** (íleon terminal+tracto digestivo alto)
- **L2:** colon **L2+L4** (colon + tracto digestivo alto)
- **L3:** ileocólica **L3+L4** (ileocólica + tracto digestivo alto)
- **L4:** tracto digestivo alto

Patrón clínico (B):

- **B1:** no estenosante, no fistulizante o inflamatorio
- **B2:** estenosante
- **B3:** fistulizante

La forma perianal se ha considerado un modificador de cualquiera de los subtipos:

- **B1p:** inflamatorio con afectación perianal asociada
- **B2p:** estenosante con afectación perianal asociada
- **B3p:** fistulizante con afectación perianal asociada

Esta clasificación es una versión modificada de la clasificación de Viena, las diferencias sustanciales son: la inclusión del grupo A1, separando los pacientes con inicio antes de los 16 años, y del modificador del tracto digestivo superior (L4) a las demás localizaciones, y la no clasificación de la forma perianal en las penetrantes, sino que se ha considerado un modificador de cualquiera de los subtipos.

1.1.3. COLITIS INDETERMINADA.

La colitis indeterminada es una enfermedad intestinal crónica que afecta exclusivamente al colon tras excluir la colitis infecciosa y otras causas de colitis. Las lesiones endoscópicas observadas no permiten decidir si se trata de una EC o una CU y en el estudio histológico existe una desestructuración de la arquitectura de las criptas e inflamación aguda y crónica que no permite diferenciar entre EC y CU (5).

El tratamiento médico utilizado en la EC y CU es eficaz en la CI, pero su curso clínico es peor, fundamentalmente cuando se hace referencia al tratamiento quirúrgico.

1.2. **EPIDEMIOLOGÍA.**

1.2.1. INCIDENCIA Y PREVALENCIA.

La incidencia y prevalencia de la EII varían notablemente dependiendo de la localización geográfica, traduciendo probablemente la influencia de distintos factores ambientales y genéticos en su etiopatogenia (7).

Tradicionalmente se informaba de un gradiente norte-sur con la mayor incidencia en los países escandinavos (8), seguidos por Reino Unido (9) y Norteamérica (10). Sin embargo, el estudio europeo cooperativo (11), aunque confirma una mayor incidencia en los países del norte, muestra unas diferencias escasas, apuntando que las EII constituyen un problema muy frecuente en los países del sur de Europa.

Parece que la incidencia de la CU se mantiene estable durante las últimas décadas, en contraste con el aumento importante de la incidencia de la EC, con estabilización a partir de los años 80, aunque en estudios poblacionales epidemiológicos recientes, las tasas de incidencia continúan aumentando, sobre todo en la EC (12).

Las diferencias en los valores de incidencia descritas en la CU son debidas en parte a la diferencia en los criterios diagnósticos usados y fundamentalmente a la inclusión (13, 14) o no (15) de la proctitis ulcerosa; globalmente, las tasas de incidencia actual de la CU en los países occidentales se estiman entre 5-18 pacientes por 100.000 habitantes y año, habiéndose igualado prácticamente las diferencias existentes entre el norte y sur de Europa.

La incidencia en la enfermedad de Crohn en casi todos los estudios es menor que la descrita para la colitis ulcerosa, estimándose en los países occidentales 3.9-7 personas por 100.000 habitantes/año, mostrando un incremento en los países escandinavos a finales de los años 80 (8), para estabilizarse a partir de los 90. En España parece que con

cierto retraso, se está produciendo el mismo fenómeno, sugiriendo Brullet y colaboradores una correlación clara de la incidencia de la EC con el desarrollo económico de la zona geográfica (16).

En los últimos estudios prospectivos realizados en España, se muestra un aumento de la incidencia de CU de 7.2/100.000 habitantes y año y de 3.9/100.000 habitantes para la EC en Aragón (17) (años 1992-1995); en el estudio de Gijón de Saro Gismera (18) (estudio prospectivo y poblacional realizado en los años 1994-1997), la incidencia para la CU es de 9.63/100.000 habitantes/año y 6.08/100.000 habitantes/año para la EC.

Se estima que la prevalencia es aproximadamente 10-14 veces la incidencia de CU y 10-20 veces la incidencia de EC. Los datos aportados por varios estudios realizados en Europa, presentan unos rangos de prevalencia entre 8.3 a 214 casos por 100.000 habitantes para la EC y de 21.4 a 243 casos para la CU. Estos rangos de prevalencia son similares a los observados en Norteamérica (19).

El estudio de Saro Gismera (18) comunica una prevalencia para la CU de 121.8 casos por 100.000 habitantes (12 veces superior a la incidencia en esa región) y de 116.5 para la EC. En otro estudio epidemiológico descriptivo multicéntrico realizado en Asturias con un diseño mixto (retrospectivo-prospectivo), la prevalencia referida a 1997 para la EII es de 205.21, siendo de 109.96 para la CU, 87.45 para la EC y 7.79 para la colitis indeterminada (20).

1.2.2. EDAD.

Es típica la distribución bimodal de la edad al diagnóstico en la EII, con un pico de incidencia en la segunda (EC) o tercera década de la vida (CU) seguida de un segundo pico, habitualmente menor, en la sexta o séptima década. En los estudios más recientes y especialmente en la enfermedad de Crohn se observa una distribución unimodal con

un pico de incidencia en la segunda o tercera década seguido de una disminución gradual de la incidencia (19).

Aproximadamente un 10-15% de los casos se diagnostican antes de la mayoría de edad.

1.2.3. SEXO.

En el estudio europeo (11) y en el Brullet (16) se ha descrito una mayor incidencia en varones, aunque otros estudios no lo confirman; en general la EC parece un poco más frecuente en mujeres (17,18).

1.2.4. DIFERENCIAS ÉTNICAS Y RACIALES.

Existen importantes diferencias étnicas tanto en la incidencia y la prevalencia de la EII con el porcentaje más alto de incidencia en las personas de raza blanca y el menor en los asiáticos.

En un estudio reciente (21) sobre las diferencias entre las etnias de población americana, se observó un predominio de la EC en los afroamericanos y los americanos blancos, mientras que en los americanos mexicanos predominaba la CU.

Estudios realizados en poblaciones emigrantes sugieren que esas diferencias raciales están más relacionadas con el estilo de vida y las influencias ambientales que con verdaderas diferencias genéticas (22).

Diversos estudios han demostrado que existe un riesgo de EII 3-4 veces mayor en población judía inmigrante en relación con la población nativa (23). En Israel la prevalencia de EII entre judíos nacidos en Europa o América es superior a la que presentan los nacidos en Asia o África, pero inferior a la que presentan sus homólogos que aún residen en Europa o América (19).

1.3. ANATOMÍA PATOLÓGICA

1.3.1 COLITIS ULCEROSA.

En la CU los cambios histológicos están confinados predominantemente a la mucosa.

En la CU activa la mucosa muestra un infiltrado difuso de linfocitos y células plasmáticas junto con capilares congestivos. Los neutrófilos polimorfonucleares están también presentes en el epitelio y la luz de las criptas, dando lugar a la criptitis y abscesos crípticos. El estallido de las criptas produce rotura de la mucosa que posteriormente se ulcera. Las criptas que no se rompen muestran depleción de células caliciformes, distorsión y ramificación. La infiltración por eosinófilos puede ser marcada en algunos casos.

Cuando la enfermedad está inactiva la infiltración por las células inflamatorias disminuye, se resuelven los abscesos crípticos y se recupera la población de células caliciformes. Sin embargo, la arquitectura de las criptas permanece distorsionada (24, 25).

1.3.2. ENFERMEDAD DE CROHN.

El hallazgo más característico, pero no patognomónico de la EC es la presencia de granulomas, que están presentes entre un 50 y 70% de los casos. El segundo hallazgo microscópico en importancia en la EC es la presencia de fisuras, éstas son profundas grietas que se extienden desde una superficie ulcerada hasta la submucosa y a menudo hasta la muscular e incluso la serosa. El infiltrado inflamatorio en la EC es típicamente transmural. La submucosa está engrosada y fibrótica, observándose a este nivel agregados de linfocitos diseminados que también se extienden a la capa muscular y superficie serosa. Además de estos hallazgos característicos, existe un infiltrado

inflamatorio crónico inespecífico. Las criptas no están distorsionadas y aunque hay depleción de células caliciformes en su epitelio, ésta no es tan marcada como en la CU (24, 25).

1.4 CLÍNICA

1.4.1. MANIFESTACIONES DIGESTIVAS.

1.4.1.1. DIARREA.

Es la manifestación clínica más frecuente de la EII; es importante valorar la duración, volumen, existencia o no de síndrome rectal, productos patológicos con las heces, antecedentes epidemiológicos, prácticas sexuales y la presencia de dolor abdominal, fiebre y/o pérdida de peso.

Una duración de la diarrea superior a dos o tres semanas, o la existencia de brotes previos, son datos de gran ayuda ya que hacen improbables la mayoría de las causas de diarrea aguda. A veces en la EC la diarrea puede ser poco importante durante meses o años o incluso no ser reconocida como tal por el enfermo.

El volumen de las deposiciones puede ayudar a establecer la localización y extensión de la enfermedad. Una diarrea poco voluminosa puede indicar enfermedad colónica, el mecanismo fundamental es la exudación a través de una mucosa inflamada y suele acompañarse de moco, sangre o pus. Por el contrario, una diarrea voluminosa indica que la afectación se localiza en intestino delgado o colon proximal; los mecanismos a este nivel son múltiples, y al citado se añaden la hipersecreción intestinal, la alteración de la

reabsorción de agua y electrolitos, mala absorción de sales biliares, diarrea por sobrecrecimiento bacteriano y más raramente esteatorrea por afectación yeyuno-ileal extensa o por resección intestinal amplia (26).

La presencia de productos patológicos en las heces, especialmente sangre, es un dato valioso para diferenciar la colitis ulcerosa de la enfermedad de Crohn. La rectorragia aboga a favor de la colitis ulcerosa, e incluso, si la enfermedad está lo suficientemente activa, su ausencia permite poner en duda el diagnóstico. En la colitis de Crohn la hemorragia macroscópica se observa en menos de la mitad de los casos, pero en el 1-2% de los pacientes la hemorragia puede ser masiva, sobre todo en aquellos que tienen ulceraciones amplias y profundas (27).

1.4.1.2. DOLOR ABDOMINAL.

Es un síntoma frecuente y relativamente inespecífico; es mucho más frecuente en los pacientes con EC que en los de CU. La EC en su forma clásica de ileítis aguda cursa con un cuadro de dolor en FID indistinguible de la apendicitis aguda; lo habitual son episodios recurrentes de dolor cólico leve en FID o suprapúbico junto a diarrea. El dolor es un síntoma predominante en el denominado patrón obstructivo en el que adquiere un carácter suboclusivo ya sea por edema de la pared y el espasmo de la musculatura en los estadios iniciales o, de forma más típica, por la cicatrización progresiva y estrechamiento fibroestenótico que aparece con los años de evolución de la enfermedad.

En la colitis ulcerosa el dolor suele ser más sordo y se localiza generalmente en hipogastrio o fosas ilíacas. Cuando el segmento afectado es el colon izquierdo, las alteraciones de la motilidad originan el denominado “estreñimiento del colon derecho”,

que puede ser la causa de dolores abdominales cólicos. Un dato a tener en cuenta es la aparición de dolor en pacientes con colitis ulcerosa de larga evolución que puede indicar el desarrollo de una neoplasia estenosante de colon.

La aparición de dolor intenso en el curso de un brote agudo, moderado o grave (especialmente de pancolitis ulcerosa) sugiere la aparición de complicaciones como la figuración o perforación del colon; en los pacientes que toman corticoides a dosis altas, puede faltar el dolor aún en presencia de complicaciones.

1.4.1.3. TENESMO RECTAL Y URGENCIA DEFECATORIA.

El tenesmo lo describen los pacientes como una sensación de que el recto está ocupado y sienten presión que les produce un deseo de defecar pero que no se alivia tras el intento de defecar.

La urgencia defecatoria es el síntoma que más problemas suele producir, puesto que en muchas ocasiones la necesidad de defecar les lleva a presentar incontinencia rectal; estos dos síntomas se presentan sobre todo en la colitis ulcerosa (26).

1.4.1.4. FIEBRE.

Generalmente es una manifestación secundaria al proceso inflamatorio, y no suele ser muy alta. La presencia de picos febriles altos, precedidos de escalofríos, traduce en la mayoría de las ocasiones una complicación séptica o una perforación. Al igual que el dolor, puede faltar en pacientes que reciben dosis altas de corticoides.

1.4.1.5. PÉRDIDA DE PESO.

La pérdida de peso es más frecuente en la enfermedad de Crohn y por lo común es del 10 al 20% del peso, siendo secundaria a la anorexia y diarrea. Si la pérdida de peso es injustificable debe hacer pensar en una neoplasia.

1.4.1.6. ENFERMEDAD PERIANAL.

La enfermedad perianal (EPA) incluye las anomalías anorrectales (fisura, fistula o absceso, los repliegues cutáneos y la maceración perianal) presentes en los pacientes con enfermedad de Crohn de cualquier otra localización o cuando los hallazgos anorrectales son compatibles con dicha enfermedad pero sin evidencia objetiva de la misma a nivel intestinal.

Aproximadamente un 9% de pacientes debutan con patología anal o perianal e incluso ésta puede preceder al inicio de los síntomas intestinales en varios años. La mayoría de los pacientes con EC presentan alguna anomalía que suele ser asintomática hasta en el 70% de los casos (28).

La incidencia varía enormemente oscilando según las series publicadas entre el 20 y el 80% (29). La incidencia varía en función de la localización, cuando la EC afecta al intestino delgado, entre el 22 y el 71% presentan afectación perianal, mientras que estas cifras se incrementan cuando hay afectación colónica oscilando entre el 47 y el 92%

La EPA incluye tres tipos de lesiones: primarias, secundarias y concomitantes o casuales. Las lesiones primarias (fisuras anales, úlceras cavitadas, colgajos cutáneos edematosos) derivan del proceso patológico primario encontrado a nivel intestinal reflejando la actividad general de la propia EC. Las lesiones secundarias (fistulas simples o complejas, estenosis anal, absceso perianal, colgajos cutáneos) son

complicaciones mecánicas o infecciosas de las lesiones primarias más que una manifestación directa de la EC. Las lesiones concomitantes, no relacionadas directamente con la EC, hacen referencia a cualquiera de las lesiones anteriores u otras características de esa zona, que pueden preceder a la aparición de la enfermedad con independencia de la misma (28).

En la clasificación de Montreal, se considera a la EPA como una situación clínica con entidad propia, al presentar cursos evolutivos en ocasiones independientes del curso evolutivo que sigue la luminal.

1.4.1.7. FÍSTULAS.

La aparición de fístulas externas en un paciente en el que se sospecha una enfermedad inflamatoria intestinal es un dato casi patognomónico de enfermedad de Crohn.

En muchos pacientes con EC, la evolución de la enfermedad va a estar determinada por la presencia de trayectos fistulosos que se producen como consecuencia de la profundización de la inflamación transmural, por lo que las fístulas no se van a limitar sólo a la región perianal, sino que pueden aparecer en otras localizaciones formando trayectos enteroentéricos, enterovesicales y enterocutáneos. Las fístulas pueden complicarse con abscesos, o en una frecuencia muy baja, con perforación libre (30).

1.4.2. MANIFESTACIONES EXTRAINTESTINALES.

La EII cursa con manifestaciones extraintestinales en diversos órganos; en series amplias se ha observado que están presentes hasta en un 25-35% de los pacientes con EC y su frecuencia va aumentando a medida que lo hace el seguimiento; muchas de

ellas no pueden considerarse como manifestaciones extraintestinales de dicha enfermedad, sino más bien asociaciones casuales. En orden de frecuencia, las principales manifestaciones extraintestinales son las osteoarticulares, dermatológicas, hepatobiliares y oftálmicas.

1.4.2.1. MANIFESTACIONES OSTEOARTICULARES

La afectación articular es la manifestación extraintestinal más frecuente de la EII. Existen tres patrones de artritis en pacientes con EII: artritis periférica, espondilitis anquilosante y sacroileítis.

La artritis periférica aparece en un 15-20% de los pacientes. Se asocia a eritema nodoso y uveítis al menos en la mitad de los casos. Cursa con dolor a menudo súbito y presencia de derrame y otros signos inflamatorios. No se asocia a la presencia de HLA-B27. Se describen dos tipos de artritis periférica en la EII:

- Tipo 1: pauciarticular, asimétrica, de grandes articulaciones y que se relaciona claramente con la actividad de la enfermedad de base; comprende 2/3 de los casos de artritis y no es invalidante más que de manera aguda. El tratamiento es el mismo de la EII y responde de forma paralela.
- Tipo 2: poliarticular, asimétrica de pequeñas articulaciones y de curso independiente; afecta 1/3 de los pacientes con artritis y puede ser invalidante o de curso crónico, apareciendo destrucción articular. A veces es necesario asociar tratamiento específico con AINEs (31-33).

La espondilitis anquilosante es más frecuente en la EC con afectación colónica que en la CU, predomina ligeramente en los varones, suele asociarse a antígeno HLA-B27 y es de carácter deformante. Su tratamiento se basa en el control del dolor y rehabilitación para preservar la función articular.

La sacroileítis suele ser hallazgo radiológico o gammagráfico, presentando síntomas sólo un 3% de los pacientes. Ambas se caracterizan por los síntomas y la evolución es independiente de la actividad de la EII.

Enfermedad metabólica ósea: la **osteopenia** es un hecho común en la EII, con una prevalencia en algunas series del 30%; puede manifestarse, bien de forma aislada o en combinación, como osteoporosis u osteomalacia.

La **osteoporosis** es una enfermedad sistémica caracterizada por disminución de la masa ósea y deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, con el consiguiente incremento de la fragilidad ósea y mayor riesgo de fractura. Los corticoides constituyen un factor de riesgo independiente para el desarrollo de osteoporosis y se ha demostrado que en pacientes con EII que han recibido una dosis acumulativa mayor de 5 gramos a lo largo de su vida, tienen una densidad mineral ósea disminuida con un aumento del riesgo de fracturas.

El mejor tratamiento de la enfermedad metabólica ósea radica en su prevención, ya que no existe ningún método efectivo y seguro que restaure el hueso osteoporótico a su estado normal (31-33).

La **osteonecrosis** o necrosis aséptica es una complicación grave e irreversible de los corticoides y se diagnostica en un 4% de los pacientes con EII (34). Afecta

principalmente a las caderas, rodillas y hombros y se manifiesta por dolor e impotencia funcional, teniendo que recurrir a procedimientos quirúrgicos para su tratamiento.

1.4.2.2. MANIFESTACIONES DERMATOLÓGICAS

Las lesiones cutáneas más características son el eritema nodoso, el pioderma gangrenoso y las lesiones de la mucosa oral.

El eritema nodoso se presenta cerca de un 15% en los pacientes con EC y en menor proporción en la CU. Se presenta como nódulos subcutáneos rojos, calientes y dolorosos en la región pretibial de extremidades inferiores. Suele afectar a pacientes de corta evolución, aparece en los brotes y tiene una gran relación con la presencia de artropatía periférica. La lesión histológica predominante consiste en una vasculitis septal con infiltrado linfocitario. En la mayoría de los casos responde rápidamente al tratamiento de la EII, generalmente mejora con el reposo, los salicilatos u otros AINEs (31, 32).

El pioderma gangrenoso es una enfermedad ulcerativa crónica de la piel que representa una de las complicaciones cutáneas más graves de la EII. Se manifiesta como pústulas o nódulos dolorosos que aumentan de tamaño formando úlceras relativamente indoloras con necrosis importante de sus bordes, que son violáceos, siendo su base necrótica. Histológicamente se caracteriza por la lesión del endotelio, con necrosis fibroide de los vasos sanguíneos y marcada infiltración de neutrófilos o linfocitos.

Es más típico de la CU y se presenta en pacientes jóvenes, siendo necesario descartar la presencia de CU en los pacientes con pioderma. Actualmente se están utilizando terapias biológicas en el tratamiento (35, 36).

Las lesiones más frecuentes que afectan a la mucosa oral son la estomatitis aftosa, más característica de la enfermedad de Crohn, y la pioestomatitis vegetante que se asocia a la colitis ulcerosa; ambas en relación con la actividad de la EII.

1.4.2.3. MANIFESTACIONES HEPATOBILIARES

La colangitis esclerosante primaria (CEP) es la complicación más característica que se asocia a la EII. Aproximadamente el 75% de los pacientes con CEP tienen EII, alrededor del 85% tienen CU y un 13% tienen EC. Entre un 2.5 y 7.5% de los pacientes con CU desarrollan CEP. En la EC esta complicación solo ocurre cuando existe afectación de colon. El 70% de los pacientes con CEP tienen en suero anticuerpos anticitoplasma de los neutrófilos perinucleares (p-ANCA) (38). La CEP es una enfermedad con marcado carácter preneoplásico y la incidencia de colangiocarcinoma en estos pacientes es 30 veces superior a la población general (39).

La esteatosis hepática probablemente está relacionada con la malnutrición proteicocalórica y el tratamiento esteroideo; la esteatosis generalmente es de tipo macrovesicular. También se ha observado hepatitis crónica activa en las biopsias de pacientes con EII, sin que esta alteración guarde relación con infecciones por virus hepatótrofos o colangitis. La incidencia de cirrosis hepática está incrementada en pacientes con EII; la mayoría de los casos son secundarios a colangitis esclerosante y muestran las características de una cirrosis biliar secundaria (37).

1.4.2.4. MANIFESTACIONES OCULARES.

Aproximadamente en un 10% de los pacientes con EII encontramos lesiones oftalmológicas; son más frecuentes en las localizaciones ileocolónicas y se relacionan con la actividad de la enfermedad, coexistiendo en muchos casos con afectación articular y dermatológica (31).

La uveítis es una de las manifestaciones más frecuentes y potencialmente más grave; se caracteriza por la aparición de dolor ocular, hiperemia, visión borrosa y fotofobia; en caso de ser diagnosticada debe ser tratada, ya que puede evolucionar hacia glaucoma, cataratas, desprendimiento de retina y ceguera. El tratamiento consiste en la administración de colirios midriáticos, antiinflamatorios no esteroideos y corticoides tópicos en los casos leves y sistémicos e inmunosupresores en los graves (31).

La epiescleritis es un proceso frecuente (2-4%) y benigno caracterizado por edema escleral, hiperemia y en ocasiones dolor ocular; no existe alteración de la visión y cede espontáneamente o con corticoides tópicos sin secuelas.

1.4.2.5. COMPLICACIONES TROMBOEMBÓLICAS.

La EII presenta un estado de hipercoagulabilidad adquirido, que se agrava en situaciones en que la actividad inflamatoria es muy intensa. La base fisiopatológica es la alteración de múltiples parámetros de la hemostasia, entre los que destacan la trombocitosis y el aumento de algunos factores de la coagulación (I, V y VIII) y de la agregación plaquetaria y un descenso de la antitrombina III. Algunos de estos cambios son debidos a la presencia de un estado inflamatorio, y revierten con el tratamiento, mientras que otros persisten a pesar del control de la enfermedad de base.

Las complicaciones tromboembólicas son la tercera causa de muerte en la CU, por detrás de las complicaciones propias de la enfermedad y el adenocarcinoma de colon (32).

Otras manifestaciones extraintestinales asociadas con la EII son: colelitiasis, nefrolitiasis, amiloidosis, anemia hemolítica autoinmune, manifestaciones pulmonares, pancreáticas, cardíacas, neurológicas y tiroideas.

1.5. DIAGNÓSTICO

1.5.1. RADIOLOGÍA SIMPLE Y BARITADA

Los estudios baritados, tránsito intestinal y enema opaco, son exploraciones clásicas en el estudio de los pacientes con EII. Sin embargo, la Rx simple de abdomen es muy útil para orientar sobre la extensión de la afectación colónica fundamentalmente, y es la técnica de diagnóstico del megacolon tóxico, por tanto, debe preceder siempre a la realización de otros estudios baritados; también puede poner de manifiesto la existencia de dilataciones de intestino delgado secundarias a estenosis o signos de perforación intestinal (40, 41).

En los estudios baritados, los signos precoces de la CU son granularidad, espiculaciones en el borde colónico, seguidos de las úlceras en botón de camisa, desaparición de las haustras y signo del doble contorno. En estadios más avanzados las ulceraciones se van

haciendo más prominentes, dejando islotes de mucosa que alternan con tejido de granulación y que dan la imagen de pseudopólipos.

En la EC el signo más precoz son las úlceras aftoides, que posteriormente se transforman en úlceras longitudinales y transversales, que cuando confluyen entre sí dejan islotes de mucosa normal sobresaliente, dando lugar al patrón en empedrado.

Cuando la EII se encuentra en estadios avanzados es difícil establecer el diagnóstico diferencial entre CU y EC con localización exclusivamente colónica. Sin embargo, existen cuatro rasgos que son típicos de la EC y no de la CU: asimetría, discontinuidad, profundidad y localización. En la EC el proceso inflamatorio afecta más al borde mesentérico, produciendo retracción en esta zona y formación de pseudodivertículos en el borde antimesentérico. Es característico de la EC la afectación discontinua, alternando zonas indemnes con otras francamente patológicas, y la afectación más marcada del colon derecho, mientras que en la CU la afectación es continua desde el recto, que casi invariablemente está afectado. Cuando el intestino delgado se afecta en la EC, además de observar los signos descritos anteriormente, suele existir un componente de estenosis marcado, dando lugar al signo de la cuerda de Cantor. La afectación del mesenterio produce separación de las asas; también podemos observar úlceras profundas perpendiculares a la luz y la presencia de fistulas (40-41).

1.5.2. ECOGRAFÍA.

El patrón ecográfico del colon normal consiste en cinco capas de diferente ecogenicidad, cuya correspondencia con la estructura histológica de la pared cólica ha sido posteriormente demostrada.

En los pacientes afectos de una CU activa se produce un marcado engrosamiento global de la capa mucosa, siendo moderado el engrosamiento global de la pared intestinal y hallándose conservada la estructura en cinco capas de la misma.

En la EC activa se produce un mayor engrosamiento de la pared, a expensas de todas sus capas, disminuyendo o llegando a desaparecer la definición entre ellas (“borramiento de capas”). En estos pacientes se ha descrito como típico el “signo de la diana”, observado al estudiar el intestino en un corte transversal.

La ecografía doppler puede detectar hiperemia intestinal que es un signo de enfermedad activa en el intestino inflamado (42). No obstante, en los casos en los que existe una importante actividad inflamatoria, la distinción entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn mediante ecografía puede ser difícil.

En la EC la ecografía además de valorar la extensión y localización de la enfermedad, es útil para detectar complicaciones como los abscesos intraabdominales, áreas de estenosis con dilatación de las asas proximales así como trayectos fistulosos. En estos pacientes además la ecografía endoanal es junto con la RNM, la mejor técnica para la tipificación de la enfermedad perianal, y permite evaluar y clasificar los abscesos y trayectos fistulosos así como valorar la integridad del esfínter.

1.5.3. TOMOGRAFÍA AXIAL COMPUTERIZADA. (TAC)

Debido a la resolución espacial y de contraste, y al escaso tiempo de exploración, la TC se ha convertido en una herramienta diagnóstica imprescindible en la evaluación de los pacientes con EII, debiendo estudiarse cuidadosamente los siguientes puntos (43):

Afectación intestinal:

- Grosor y homogeneidad de la pared

- Mesenterio, retroperitoneo, atenuación y homogeneidad de la grasa del omento
- Tamaño de los ganglios linfáticos
- Abscesos, fistulas, colecciones extraluminales de contraste
- Masas mesentéricas y periviscerales

Afectación extraintestinal:

- Dimensiones del espacio presacro
- Anomalías hepáticas: colangitis esclerosante, esteatosis
- Hidronefrosis, litiasis renal o biliar
- Sacroileítis, osificación de los ligamentos paravertebrales

1.5.4. RESONANCIA MAGNETICA.

Es la técnica que delimita con mayor nitidez los planos grasos y musculares en la evaluación de las complicaciones sépticas de la enfermedad de Crohn perianal; presenta ventajas respecto a la TC: ausencia de radiación ionizante, el uso de contraste más seguro (gadolinio), realza mejor las estructuras y tiene posibilidad de obtener imágenes cortadas en el plano sagital (43).

1.5.5. GAMMAGRAFÍA

Aunque varios estudios han demostrado que la gammagrafía con leucocitos marcados con ^{99m}Tc -HMPAO puede ser útil para el diagnóstico inicial de la colitis ulcerosa y su diagnóstico diferencial con enfermedad de Crohn, en la práctica clínica su principal contribución a la valoración de los pacientes con EII es el estudio de manera no invasiva de la extensión y la actividad de la enfermedad (44,45).

En la enfermedad de Crohn es especialmente útil para distinguir estenosis fibróticas establecidas, donde no se objetiva captación, de las estenosis inflamatorias.

1.5.6. ENDOSCOPIA

La endoscopia es un método diagnóstico de una alta sensibilidad, por lo que es de gran utilidad diagnóstica en los pacientes con EII. Esta técnica no sólo permite visualizar directamente las lesiones sino que permite obtener material para estudio histopatológico.

La colonoscopia es la exploración más utilizada, ya que permite el estudio de la totalidad del colon, el recto, y en ocasiones el ileon terminal. La endoscopia oral también está indicada para el estudio de la afectación esofagogastroduodenal en los pacientes con EC. Además, la colangiopancreatografía endoscópica retrograda es la técnica de elección para el diagnóstico de colangitis esclerosante primaria (46).

En la última década se ha incorporado al arsenal endoscópico la ultrasonografía endoscópica o ecoendoscopia, que permite, mediante la incorporación de un transductor ecográfico en el extremo del endoscopio, obtener imágenes ecográficas de la pared del tubo gastrointestinal y de las estructuras anatómicas vecinas.

Las manifestaciones endoscópicas de la colitis ulcerosa son la granularidad de la mucosa, edema, friabilidad, sangrado y eritema mucoso, exudado mucopurulento, ulceraciones de distinta morfología y pseudopòlipos. En la EC la lesión más precozmente observada es la úlcera aftoide; en estadios más avanzados se aprecian úlceras profundas con bordes bien delimitados (úlceras en sacabocados), úlceras longitudinales y transversales, cuya presencia da lugar al aspecto “en empedrado” propio de la EC. En la CU el recto está afectado prácticamente en todos los casos,

aunque si se ha utilizado tratamiento tópico recientemente, puede mostrar un aspecto macroscópico normal. Las lesiones presentan una distribución difusa, continua y simétrica. En cambio, es característico en la EC la afectación segmentaria y asimétrica. Cuando la enfermedad está poco evolucionada es muy típico de la EC que las úlceras aparezcan rodeadas de áreas de mucosa microscópicamente normal, mientras que en la CU las erosiones y ulceraciones asientan sobre una mucosa difusamente inflamada (44-49).

Además de la incitación como técnica diagnóstica, la endoscopia ofrece la posibilidad de realizar dilatación de estenosis, tanto intestinales como de las vías biliares, y técnicas de hemostasia. También es la técnica de elección para el seguimiento de los pacientes con riesgo elevado de padecer carcinoma colorrectal.

1.6 TRATAMIENTO

La EII cursa con periodos de actividad de intensidad y gravedad variables y con periodos de inactividad o quiescencia, por este motivo el tratamiento viene determinado por la gravedad de las manifestaciones clínicas y su extensión anatómica.

Los principales objetivos del tratamiento médico son el obtener la mayor eficacia (inducción de la remisión, prevención de la recidiva, mejora de la calidad de vida y obtención de la curación mucosa) con el mínimo riesgo.

El tratamiento farmacológico actual de la EII comprende la utilización de tratamiento antiinflamatorio (aminosalicilatos y corticoides), e inmunomoduladores (convencionales y nuevas terapias biológicas).

1.6.1. SALICILATOS.

Los salicilatos son fármacos con efecto antiinflamatorio que, si bien pueden actuar inhibiendo la actividad ciclooxigenasa y lipooxigenasa, con lo que disminuyen la síntesis de prostaglandinas E y F, de tromboxano A₂ y de leucotrieno B₄, su principal efecto es inhibir la producción de radicales libres de oxígeno y participar en su depuración; también pueden tener un efecto inmunosupresor, ya que inhiben al factor nuclear kappa B (NF-κB) y la producción de interleucina 1 (IL-1) y de factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) (50, 51). Aunque su mecanismo de acción exacto se desconoce, parece ser que su eficacia terapéutica, tanto cuando se administra por vía oral como tópica, se debe a su efecto antiinflamatorio tópico sobre la mucosa intestinal más que a un efecto sistémico.

La *mesalazina* o *mesalamina* es un aminosalicilato análogo del ácido acetilsalicílico, que ha sido la base del tratamiento de la CU y de la EC. El 5-ASA es la molécula funcionalmente activa de la sulfasalazina mientras que la sulfapiridina es la molécula transportadora del 5-ASA hacia el tracto gastrointestinal distal y es responsable de sus efectos secundarios.

En general, la selección de los diferentes preparados de 5-ASA se debe de basar en la localización de la enfermedad; para pacientes con enfermedad de localización distal en colon, el tratamiento tópico es el de elección (*nivel de evidencia 1b, grado de recomendación A*). En las formas de colitis extensas se utilizan los preparados orales conjugados de 5-ASA (*nivel de evidencia 1a, grado de recomendación A*). El tratamiento combinado, oral y tópico, es el de elección para el manejo de los pacientes con colitis izquierda (*nivel de evidencia 1b, grado de recomendación A*).

Los preparados orales de 5-ASA de liberación sostenida o pH-dependiente permiten obtener concentraciones adecuadas en intestino delgado, especialmente en el íleon y colon derecho, estando indicados en los brotes leves de EC de esa localización a dosis elevadas (*nivel de evidencia Ia, grado de recomendación A*). La mesalazina puede ser eficaz en el mantenimiento de la remisión en los pacientes con CU (*nivel de evidencia Ib, grado de recomendación A*) pero es cuestionable en los pacientes con EC (*nivel de evidencia Ib, grado de recomendación D*) (52).

1.6.2. CORTICOIDES

Los corticoides son los fármacos más eficaces en el tratamiento de los brotes moderados o graves de EII, así como en los brotes leves o moderados que no han remitido con los salicilatos a dosis plenas. Su utilidad está condicionada por una serie de limitaciones:

- no son eficaces en todos los pacientes (53, 54)
- aunque pueden hacer desaparecer los síntomas, la persistencia de las lesiones intestinales condiciona la aparición de posteriores recidivas o complicaciones (54), y
- al ejercer su efecto en todo el organismo, ocasionan la aparición de numerosos efectos secundarios (55)

El mecanismo de acción de los glucocorticoides depende de la afinidad por su receptor específico presente en el interior de casi todas las células del organismo. Tienen un efecto antiinflamatorio, promovido por la inhibición de la liberación del ácido araquidónico de la membrana celular y la producción de eicosanoides, y un efecto inmunomodulador, secundario a la activación y migración del factor de transcripción NF- κ B hacia el núcleo, disminuyendo la síntesis de IL-1 y de IL-2 (55). Otra función

importante de los corticoides es la reducción de la función fagocítica y de quimiotaxis de los neutrófilos y, clínicamente, han demostrado mejorar la diarrea de estos pacientes a través de la absorción de sodio y agua.

El 20-30% de los pacientes con CU o EC activas son córticorresistentes; el mecanismo que explica esta situación clínica se ha relacionado recientemente con la presencia de un mayor número de receptores de corticoides, así como una mayor acumulación de isoformas β de estos receptores (56).

Las principales indicaciones de los corticoides sistémicos son la inducción de la remisión (brotes moderado y grave) en pacientes con enfermedad de Crohn (*nivel de evidencia 1b, grado de recomendación A*) (57) y colitis ulcerosa (*nivel de evidencia 2b, grado de recomendación B*) (58). Los corticoides orales están indicados en los brotes leves o moderados.

Ni los corticoides orales clásicos ni la budesonida han demostrado eficacia en el mantenimiento de la remisión ni en la CU ni en la EC (*nivel de evidencia 1b, grado de recomendación A*). Estos fármacos tienen numerosos efectos secundarios (hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia, síndrome de Cushing iatrógeno, estrías, hirsutismo, psicosis, glaucoma, leucocitosis, osteoporosis y necrosis de cadera, por lo que se desaconseja su utilización como terapia de mantenimiento. En los niños, el tratamiento continuado con corticoides provoca retraso del crecimiento y de la maduración sexual.

1.6.3. INMUNOMODULADORES

El 20-30% de los pacientes con EC son refractarios al tratamiento con esteroides, otro 20-30% desarrollan corticodependencia, y en conjunto, alrededor del 70% de los pacientes con EC recidivan durante el primer año (346); la incidencia de

corticoddependencia en los pacientes con CU se desconoce, pero se cree que puede ser similar al 20-30% de los pacientes con EC, por esto, en estos pacientes la primera opción terapéutica es la utilización de fármacos inmunomoduladores (IMM) (59).

1.6.3.1. AZATIOPRINA Y 6-MERCAPTOPURINA

Actualmente, los fármacos IMM más utilizados son la azatioprina (AZA) y la 6-mercaptopurina (6-MP), que son análogos de las purinas e inhiben la biosíntesis de nucleótidos y por lo tanto inhiben la producción de proteínas, ARN y ADN; esto se traduce en una disminución de la proliferación de los linfocitos B y T y la respuesta inmune primaria, así como en la función de los linfocitos y células “natural killer”. Recientemente se ha descrito que el efecto real en la EII dependería de la inhibición de la coestimulación de los linfocitos, a través de un efecto sobre la proteína intracelular RAC1 (60); este efecto puede ser el responsable del retraso en el inicio del efecto de estos agentes en la práctica clínica.

Las indicaciones principales de la AZA y 6-MP son la inducción de la remisión y prevención de la recidiva en los pacientes con EII, tanto CU como EC, córticoddependiente y corticorefractaria (*nivel de evidencia 1b, grado de recomendación A; nivel de evidencia 2b, grado de recomendación B*) (61). Otras indicaciones aceptadas son la prevención de la recurrencia postcirugía en los pacientes con EC, en pacientes con EC fistulizante, especialmente en las fistulas de localización perianal, en la prevención del retraso de crecimiento en los niños con enfermedad activa y en la reservoritis crónica refractaria al tratamiento antibiótico y/o esteroideo (*nivel de evidencia 2b, grado de recomendación B*) (62, 63).

La eficacia clínica de los inmunomoduladores tiopurínicos está limitada por la aparición de efectos adversos hasta en un 15-30% de los pacientes, que pueden dividirse en idiosincráticos o alérgicos y dependientes de la dosis; entre los alérgicos se ha descrito la aparición de náuseas y vómitos, rash, pancreatitis (2-5% que obliga a la retirada del fármaco), artralgias o fiebre, y son independientes de la dosis administrada (64). El efecto secundario dependiente de dosis más importante es la mielosupresión, aunque la hepatotoxicidad se ha descrito tanto como un efecto secundario alérgico o como dependiente de la dosis.

Aunque la incidencia de linfomas es mayor en los pacientes trasplantados renales que en los pacientes con artritis reumatoide y EII tratados con AZA, estudios recientes no han podido demostrar un aumento significativo del riesgo relativo de desarrollar linfomas en los pacientes con EII tratados con derivados tiopurínicos respecto a la población normal (65). Por otra parte, en la actualidad está bien establecida la seguridad de uso de la AZA durante la gestación sin que se produzca un aumento significativo de malformaciones fetales, abortos, partos prematuros, etc., estando incluidas dentro del grado C de recomendaciones de la FDA.

1.6.3.2. METOTREXATO

El MTX inhibe la síntesis de DNA a través de su acción antagonista sobre el ácido fólico, reduce la producción de IL-1 e IL-6 e induce la apoptosis en subpoblaciones seleccionadas de células T (66).

Está indicado en la inducción de la remisión y prevención de la recidiva en los pacientes con EC activa, especialmente en los no respondedores a tiopurínicos o que presentan

intoleranciai a los mismos (*nivel de evidencia 1a, grado de recomendación A; nivel de evidencia 1b, grado de recomendación A*) (67).

El principal efecto secundario es la toxicidad hepática con desarrollo de fibrosis y cirrosis hepática, descrito en los pacientes con artritis reumatoide y psoriasis y relacionado con la dosis acumulativa total superior a 1.5 gramos, actuando como factores facilitadores el alcoholismo, la obesidad, la diabetes y la edad avanzada. Está contraindicado en el embarazo y en los pacientes con hepatopatía subyacente.

1.6.3.3. CICLOSPORINA (CyA)

La CyA es un polipéptido cíclico de 11 aminoácidos producido a partir del hongo *Beauveria nlyea*. Es un agente lipofílico con fuertes propiedades hidrofóbicas cuya absorción es variable. La CyA actúa inhibiendo las citoquinas proinflamatorias, especialmente la IL-2 y el IFN- γ . En el interior de las células forma un complejo con la ciclofilina, un receptor proteico situado en los linfocitos T y este complejo, CyA-ciclofilina, se une a la calcineurina; las actividades enzimáticas de la calcineurina son inhibidas tras esta interacción física bloqueándose los factores de transcripción proinflamatorios; por lo tanto, por esta vía la CyA inhibe a una amplia variedad de citoquinas proinflamatorias (IL-2, IFN- γ , TNF- α , factor estimulador de la colonia de macrófagos y la IL-4) (68).

La CyA es eficaz en la inducción de la remisión en los pacientes con CU corticorrefractaria (*nivel de evidencia 1a, grado de recomendación A*) (69), sin embargo carece de eficacia en la prevención de la recidiva en estos pacientes, pudiendo ser utilizada como puente a la azatioprina en los inicialmente respondedores a la CyA.

Carece de eficacia en la inducción de la remisión en pacientes con EC refractaria a esteroides (*nivel de evidencia 1a, grado de recomendación D*).

Los efectos secundarios más frecuentes son nefrotoxicidad, HTA, hipertricosis, hiperplasia gingival, náuseas; menos frecuentes son las convulsiones (favorecidas por la hipomagnesemia e hipocolesterolemia), alteraciones hematológicas, anafilaxia e infecciones oportunistas (70).

1.6.3.4. TACRÓLIMUS

Es un antibiótico macrólido producido por el *Streptomyces tsukubaensis* con potentes propiedades inmunomoduladoras, utilizado para la prevención del rechazo del trasplante renal, hepático y de otros órganos sólidos. Posee una actividad similar a la ciclosporina, ya que inhibe la IL-2, y tal vez tiene menos efectos secundarios. Se administra via oral y tiene una absorción más uniforme que la ciclosporina.

No hay ensayos clínicos controlados con tacrólimus en el tratamiento de la CU; los ensayos abiertos sugieren que el tacrólimus puede ser eficaz en el tratamiento de pacientes con CU córticodependientes o córticorresistentes (*nivel de evidencia 3, grado de recomendación C*) (71). De la misma forma, en cuanto a la eficacia para el tratamiento de la EC luminal, puede ser una opción terapéutica en la EC activa córticodependiente o córticorresistente, facilitando la respuesta clínica, pero no la remisión (*nivel de evidencia 3, grado de recomendación C*) (72).

El tacrólimus es eficaz en inducir la remisión en pacientes con EC perianal, pero no para el mantenimiento.

Los efectos secundarios más frecuentes son la nefrotoxicidad, la hipertensión arterial, la neurotoxicidad, hiperpotasemia, molestias gastrointestinales, mielosupresión, hiperglucemia transitoria y la diabetes.

1.6.3.5. MICOFENOLATO MOFETIL

El MMF es un profármaco que inhibe de forma selectiva la proliferación y función de los linfocitos B y T, incluyendo la formación de anticuerpos, la adhesión y migración celular mediante la inhibición de las moléculas de adhesión y la liberación de citocinas proinflamatorias (IFN γ y TNF α), mientras que regula la liberación de IL-10 (73).

En un estudio abierto que incluye 4 pacientes con EC con fístulas, el MMF indujo la remisión en los 4 (*nivel de evidencia 3, grado de recomendación C*), por tanto, en los pacientes con EC parece adecuado reservar el MMF para los no respondedores, o que no toleran AZA/6-MP y/o metotrexato (74).

En los pacientes con CU activa, parece eficaz en inducir la remisión, asociado a prednisolona (*nivel de evidencia 2b, grado de recomendación B*), sin embargo, es más discutible para el mantenimiento de la remisión (75).

Los efectos secundarios más frecuentes son dosis dependientes e incluyen diarrea y vómitos, que puede ser un problema para los pacientes con EII.

1.6.4. AGENTES BIOLÓGICOS

Las terapias biológicas incluyen una serie de sustancias biológicas naturales, tales como productos derivados de la sangre o microorganismos muertos, atenuados o vivos (probióticos), péptidos recombinantes o proteínas (hormonas del crecimiento,

eritropoyetina), anticuerpos monoclonales contra sustancias inflamatorias (TNF, α 4 integrinas...) y ácidos nucleicos (oligonucleótidos antisentido).

Actualmente disponemos de varios agentes biológicos que antagonizan directamente el TNF- α y se han utilizado ampliamente para el tratamiento de diferentes afecciones reumatológicas, como la artritis reumatoide, la psoriasis y artritis psoriásica y la espondilitis anquilosante: Infliximab, adalimumab, certolizumab pegol y etanercept, aunque sólo el infliximab y el adalimumab son eficaces en la EII.

El Infliximab es un anticuerpo monoclonal antiTNF α de clase IgG1 quimérico, el 25% de la molécula es murino y el 75% restante es una molécula humana IgG1 (76). El Adalimumab es un anticuerpo monoclonal antiTNF α IgG1 estructuralmente idéntico a los anticuerpos humanos, lo que reduce la posibilidad de desarrollar respuesta inmune (77).

Los anticuerpos anti-TNF- α actúan uniéndose tanto a la forma soluble como transmembrana del TNF- α , inhibiendo su efecto proinflamatorio inmediato y la producción de otros mediadores proinflamatorios. Como consecuencia del bloqueo del TNF- α se produce una disminución de otras citocinas proinflamatorias, fundamentalmente IL-6, así como la migración de los leucocitos dentro del intestino (78). Junto con la reducción de citocinas proinflamatorias se produce una “up-regulation” de las moléculas de adhesión endoteliales que reducen la migración de células inflamatorias a las áreas de inflamación y disminuye la producción del factor estimulador de las colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) en las células T de la mucosa intestinal, que puede inducir la apoptosis de las mismas (78).

El infliximab es eficaz en la inducción de la remisión en la EC luminal activa de patrón inflamatorio en pacientes con enfermedad grave corticorrefractaria y en la EC corticodependiente ante fracaso o contraindicación de tratamiento inmunosupresor (*nivel*

de evidencia 1b, grado de recomendación A) (79). También es eficaz en el mantenimiento de la remisión a largo plazo en los pacientes con EC luminal activa que responden a la pauta de inducción, administrado cada 8 semanas (nivel de evidencia 1b, grado de recomendación A) (79). Induce la remisión y previene la recidiva en pacientes con EC fistulizante, con fístulas perianales o enterocutáneas (nivel de evidencia 1b, grado de recomendación A) (80).

El infliximab induce la remisión en pacientes con CU activa, corticodependientes o corticorresistentes, facilita la curación mucosa y previene la recidiva (*nivel de evidencia 1b, grado de recomendación A) (81).*

El adalimumab es eficaz en la inducción de la remisión en pacientes con EC luminal activa (*nivel de evidencia 1b, grado de recomendación A) (82), así como en pacientes con EC que han perdido la respuesta al Infliximab o han sido intolerantes a éste (nivel de evidencia 1b, grado de recomendación A; nivel de evidencia 2b, grado de recomendación B) (83).*

Los efectos secundarios del infliximab están en relación con reacciones alérgicas durante la infusión (cefalea, náuseas, rash cutáneo y urticaria), también disnea y dolor torácico; se ha sugerido que estas reacciones podrían estar en relación con la formación de anticuerpos anti-infliximab (ATI); las complicaciones infecciosas son relativamente frecuentes, pero la mayoría son banales; alrededor del 7% tiene infecciones graves (84).

También se han descrito anticuerpos anti-adalimumab (HAHA), así como complicaciones infecciosas, pero el riesgo más importante para tener una complicación infecciosa grave es el uso concomitante con corticoides (85).

1.6.5. AFERESIS

Existen todavía datos insuficientes en cuanto a su eficacia real en el tratamiento de la CU; su principal virtud reside en un perfil de seguridad difícilmente mejorable, con una incidencia de muy escasos efectos adversos atribuible a la técnica, lo que la convierte en una alternativa terapéutica muy atractiva para pacientes pediátricos o pacientes intolerantes a múltiples fármacos. Un consenso español estableció la corticodependencia y el fracaso o intolerancia al tratamiento convencional (especialmente relacionado a esteroides e inmunosupresores), como sus principales indicaciones en la CU (86).

1.7. FISIOPATOLOGÍA DE LA EII

La EII es una patología de etiología desconocida. El modelo más aceptado postula que factores ambientales inciden sobre individuos con predisposición genética para poner en marcha una respuesta inmune descontrolada que origina el desarrollo de la enfermedad.

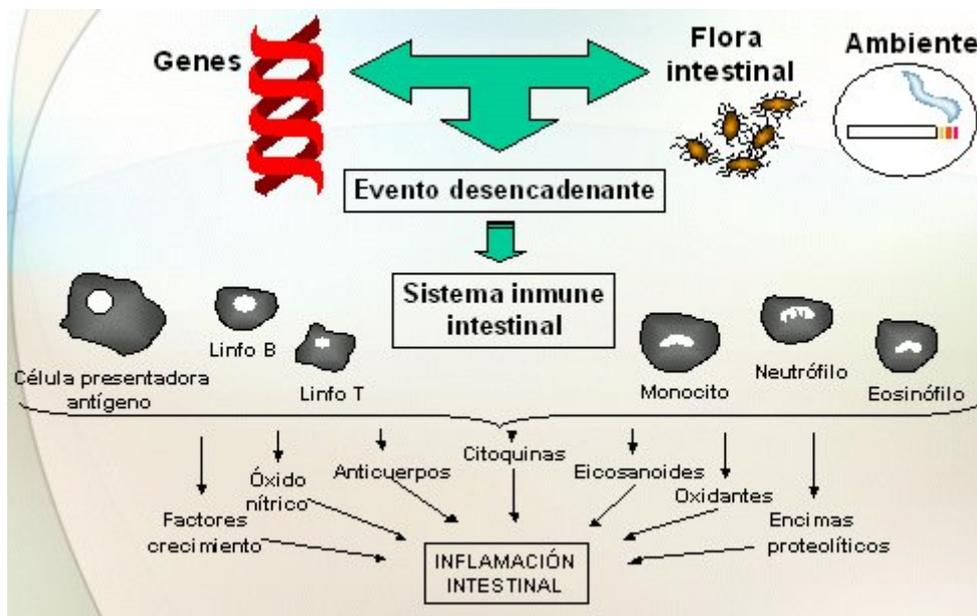


Fig. 1. Fisiopatología de la EII

1.7.1. FACTORES AMBIENTALES.

1.7.1.1. DIETA

Se ha intentado implicar diversos tipos de alimentación en la patogenia de la enfermedad. Varios estudios describen una menor incidencia de lactancia materna (87, 88) y un menor consumo de fibra, frutas, verduras y zumos de frutas en pacientes con EII (89, 90). También se ha descrito especialmente en la enfermedad de Crohn un mayor consumo de azúcares y de productos con altas cantidades de carbohidratos refinados, así como de grasas hidrogenadas como la margarina (89, 91-95).

A pesar de que muchos alimentos y componentes alimenticios han sido barajados como factores etiológicos, todavía no hay datos definitivos que apoyen a la dieta como causa de estas enfermedades. Sin embargo están surgiendo evidencias de que la terapia nutricional es efectiva en el tratamiento especialmente de la enfermedad de Crohn (96).

1.7.1.2. FACTORES MICROBIANOS

En el transcurso de los años, una larga lista de agentes microbianos ha sido implicada en la patogenia tanto de la EC como de la CU. En ella se incluyen bacterias, mycobacterias, hongos, virus y la flora intestinal normal. La existencia de un aumento de la reactividad antibacteriana en pacientes con EII se sabe desde hace décadas, pero solo recientemente se ha interpretado como un reflejo de la exposición crónica del sistema inmune del enfermo a los antígenos bacterianos, como consecuencia de la inflamación intestinal.

La teoría de un antígeno específico como causante de la enfermedad no ha sido demostrada nunca aunque se ha tratado de implicar a distintos microorganismos. Durante cierto tiempo, se consideró la posibilidad de que *M. paratuberculosis* fuera el agente etiológico específico de la EC, pero los estudios inmunológicos y el fracaso de ensayos clínicos con agentes antituberculosos sitúa esta posibilidad como bastante remota. Diversos virus, como el virus del sarampión, han sido también propuestos como posibles candidatos a causar EC, pero todavía carecemos de una evidencia sólida de su implicación patogénica (97, 98).

En un estudio reciente, utilizando cultivos convencionales y nuevas técnicas de biología molecular, se ha investigado la flora asociada a la mucosa en biopsias de 305 pacientes con EII y en 40 controles sin que se encontraran diferencias en las diferentes especies aisladas (99).

Actualmente, el posible papel de los agentes microbianos en la patogenia de la EII se centra en la flora intestinal normal. En condiciones normales, existe una interacción fisiológica recíproca entre la flora entérica normal y el sistema inmune de la mucosa. Durante una de las infecciones intestinales habituales, como la salmonelosis, se produce una interacción patológica entre una flora intestinal anormal y un sistema inmune de la mucosa normal que responde de manera adecuada mediante un proceso inflamatorio autolimitado. En la EII sin embargo, nos encontraríamos con una situación en la que una flora intestinal normal produce una respuesta inmune mucosa anormal en el huésped, lo cual conduciría a un proceso patológico que se expresa como una inflamación crónica del tracto gastrointestinal.

Además, no todos los componentes de la flora intestinal son necesariamente patógenos en la EII. Una clase de microorganismos denominados de forma colectiva como probióticos mejoran en vez de inducir inflamación (100).

Diversas líneas de evidencia apuntan a ese papel central de la flora intestinal normal en la patogenia de la EII, en especial de la EC. Estas son:

- Las lesiones tienen lugar predominantemente en áreas del intestino con la mayor cantidad de bacterias (101)
- El efecto beneficioso de la derivación del flujo fecal sobre la inflamación mucosa (102)
- El desarrollo de una inflamación dependiente de bacterias en la reservoritis y la EC (103)
- El beneficio terapéutico de los antibióticos y probióticos en la reservoritis y la EC (104, 105)
- La pérdida de tolerancia a la flora bacteriana intestinal autóloga en los pacientes con EII
- En modelos animales manipulados genéticamente es necesaria la existencia de una flora bacteriana entérica normal para el desarrollo de enfermedad (106).

Enfermedad de Crohn	Colitis ulcerosa
Mycobacterium paratuberculosis	Escherichia coli
Mycobacterium kansasii	Diplostreptococcus
Paramyxovirus	Fusobacterium necrophorum
Listeria monocytogenes	Shigella
Chlamydia	Helicobacter hepaticus
RNA reovirus	RNA virus
Pseudomonas maltophilia	

TABLA 1. Patógenos implicados en la etiología de la EII (107)

1.7.1.3. TABACO

El factor de riesgo ambiental mejor caracterizado en la enfermedad inflamatoria intestinal es el consumo de tabaco y en particular cigarrillos; su efecto parece relacionado con la nicotina. Uno de los datos que más llama la atención es que su influencia es diferente en la EC, donde es factor de riesgo, y en la CU, en la que tiene un papel protector; este aspecto es una evidencia más de que se trata de dos enfermedades diferentes con diferencias anatomofisiológicas significativas (108).

Hasta el momento no se han podido descubrir los mecanismos precisos causantes del efecto del tabaco sobre la EII, aunque se sabe que los fumadores tienen alteraciones tanto de la inmunidad celular como en la humoral y producen mayor cantidad de radicales libres (109). El efecto protector en la CU se relaciona con un efecto restaurador de los valores de glucoproteínas del moco del colon que facilita los procesos de reparación y ayuda a mantener la integridad de la mucosa; sin embargo, en la EC el tabaco actuaría potenciando procesos isquémicos focales (110).

1.7.1.3.1. Tabaco y colitis ulcerosa.

Prácticamente existe unanimidad entre los estudios realizados en considerar que el tabaco tiene efecto protector frente al desarrollo de CU y además se asocia a un curso más benigno de la enfermedad, tanto desde el punto de vista subjetivo de los pacientes como desde la valoración objetiva de las complicaciones de la CU, la menor necesidad de tratamientos agresivos (esteroides, inmunosupresores), de ingresos hospitalarios y de cirugía (111, 112); el dejar de fumar puede desencadenar un primer brote de CU mientras que el consumo de tabaco protege frente a la CU activa y ayuda a mantener la

remisión. Lindberg encontró un riesgo relativo a tener CU de 1 en los no fumadores, de 0.6 en los fumadores y de 2.5 en los ex-fumadores, alcanzando un riesgo relativo de 4.4 en los pacientes ex-fumadores de más de 11 cigarrillos/día (113)

Un aspecto interesante es la relación entre el momento en que el paciente deja de fumar y el desarrollo de colitis; Motley et al. En un estudio con 138 pacientes, encontraron que 107 (69.5%) desarrollaron colitis después de haber dejado de fumar, con un pico máximo en el primer año y un 52% en los primeros tres años tras dejar de fumar (114). En los niños expuestos al humo del tabaco (fumadores pasivos), parece haber un efecto de protección frente a la CU (115), sin embargo, los estudios terapéuticos con nicotina oral o en parches, no han aportado los resultados beneficiosos esperados.

1.7.1.3.2. Tabaco y enfermedad de Crohn.

El consumo de tabaco en la EC es un factor de riesgo para padecer la enfermedad y además influye en su curso clínico determinando un peor pronóstico, ya que encuentra un mayor riesgo en la recurrencia clínica (precisan dosis mayores de esteroides e inmunosupresores, más fístulas y más abscesos) (116), endoscópica y quirúrgica de los enfermos fumadores, especialmente las mujeres.

El primer meta-análisis que demostró la asociación entre el tabaco y la EC fue realizado por Calkins et al. En 1989, dejando patente que fumar incrementaba por 2 el riesgo de padecer EC, siendo algo menor en los ex-fumadores, y además, en este colectivo disminuía a medida que el periodo de abstinencia del tabaco aumentaba (117). En 1995 Reif et al. realizaron un estudio multicéntrico de casos-contróles en 261 pacientes israelíes con EC (Azhkenazi y Sefardí) y no obtuvieron la esperada relación entre el consumo de tabaco y EC; esto nos hace reflexionar sobre la heterogeneidad de la EC y

que la predisposición genética (más clara en la comunidad judía) a padecer EC está por encima de factores ambientales (118).

Otro aspecto importante es que el tabaco podría determinar el tipo de EII (fumadores-EC, no fumadores-CU) incluso dentro de la misma familia. Lee et al. estudian a 67 familias, cada una con tres o más familiares de primer grado con EII, y observaron un importante grado de concordancia en el tipo de EII (EC o CU), pero no mayor que la esperada para la edad de diagnóstico, localización, tipo de enfermedad o afectación transmural de la EC, pero sí se observó una asociación significativa entre fumar y EC y no fumar y CU que se mantenía incluso en las familias con las dos enfermedades (119).

1.7.1.4. APENDICECTOMÍA.

La fuerte asociación inversa entre la apendicectomía y colitis ulcerosa ha sido demostrada por varios estudios y su meta-análisis; los datos preliminares de estudios realizados en modelos animales muestran una reducción en el desarrollo de colitis experimental después de realizar apendicectomía a edad temprana. Las alteraciones en la respuesta inmune de la mucosa que conducen al desarrollo de apendicitis o bien resultantes de la apendicectomía podrían afectar de manera negativa el mecanismo patogénico de la colitis ulcerosa (120).

En la enfermedad de Crohn se ha encontrado una asociación positiva con la apendicectomía (121-123). Algunos autores piensan que las apendicectomías previas en esta enfermedad, probablemente se debían a un falso diagnóstico de una apendicitis en un EC no diagnosticada (124); sin embargo, estudios recientes encuentran un incremento en el riesgo a desarrollar enfermedad de Crohn en pacientes sometidos a

apendicectomía. Esta asociación se mantiene de manera constante hasta veinte años después de la apendicectomía, lo que sugiere mecanismos biológicos subyacentes (125).

1.7.1.5. AINES.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) actúan bloqueando la vía de la ciclooxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico, por lo que interfieren en la formación de prostaglandinas y tromboxanos.

Se desconoce cuál es el mecanismo de acción por el que los AINE interfieren en la evolución de la EII, aunque se les ha atribuido diversos efectos como inflamación de la mucosa intestinal, provocar cuadros de obstrucción intestinal, perforación y hemorragia.

La lesión de la mucosa intestinal puede ser secundaria a la reducción de prostaglandinas endógenas provocadas por la inhibición de la ciclooxigenasa por el consumo de AINE.

Otro posible mecanismo lesivo de los AINE consiste en la disminución de moléculas transportadoras de alta energía, como el ATP, y en el aumento de la permeabilidad intestinal, con lo que facilitan la captación de macromoléculas lesivas que desencadenan una respuesta inmunológica y reacciones inflamatorias locales en la mucosa del intestino (126).

Con los datos de que disponemos hasta el momento podemos decir que los AINE suponen un factor de empeoramiento de la EII, pudiendo desencadenar brotes en los pacientes en fase de remisión y aumentar la gravedad de los enfermos con actividad clínica. Por otra parte, los AINE son capaces de provocar entre sus efectos secundarios un cuadro intestinal que imita a la EII, fundamentalmente a la EC tanto en sus manifestaciones clínicas como histológicas (127).

1.7.1.6. ANTICONCEPTIVOS ORALES.

El uso de los anticonceptivos orales (ACO) es más controvertido. En el estudio de Timmer y col (128) se demuestra que el uso de anticonceptivos orales se asocia con un incremento del riesgo de recidiva en los pacientes con EC, sin embargo, el estudio de Cosnes (129) concluye que no tienen efecto en el grado de actividad de la EC, y en el meta-análisis de Godet (130), que analiza 15 estudios, concluye que el uso de anticonceptivos se asocia con un muy discreto riesgo de desarrollar tanto EC como CU. Las conclusiones de este meta-análisis fueron confirmadas en un estudio de casos-controles realizado en Italia (88), donde observan un mayor riesgo de padecer EC en las mujeres que habían consumido anticonceptivos orales durante al menos un mes.

En un estudio realizado en Aragón (131) se ha observado que fumar, la historia familiar previa y el uso de anticonceptivos orales parecían ser factores de riesgo para desarrollar EC. En el estudio caso-control aleatorizado de Boyko et al. (132) que empareja a los casos por edades, evalúan los efectos del uso de ACO en CU y el riesgo en la EC. Las mujeres que utilizan ACO los meses antes del brote de la enfermedad presentan un riesgo aumentado para ambas enfermedades; las que lo habían tomado durante más de seis años tenían el riesgo más alto de padecer EC, sin que el tiempo de duración se asocie con un aumento de riesgo para CU. El riesgo para CU tiende a ser más alto entre las consumidoras de estrógenos a dosis altas, mientras que el riesgo para la EC fue independiente de la dosis de estrógenos.

Podemos decir por tanto, que la asociación entre la toma de ACO y la EII es débil y en caso de existir sería con la EC y no con la CU; además, se pone en duda que los ACO influyan en la evolución de la enfermedad y en el número de recaídas (133).

1.7.2. FACTORES INMUNOLÓGICOS

La mucosa del intestino representa el área más amplia de contacto con antígenos externos del organismo, derivados de la flora microbiana intestinal e introducidos con la dieta. Esta estimulación antigénica masiva da lugar a una infiltración extensa de la mucosa intestinal por células mononucleadas que desarrollan un estado de inflamación fisiológica. Esta infiltración inmunológica controlada está dirigida de forma precisa y es capaz de discriminar entre los antígenos inofensivos y los dañinos. Para cumplir esta tarea la mucosa del intestino ha desarrollado un sistema inmune de la mucosa altamente organizado, que constituye el tejido linfoide asociado al intestino (TLAI). El TLAI se compone por un elevado número de células mieloides y linfoides dispersas a lo largo de la mucosa intestinal o agrupadas en forma de los folículos linfoides (FL) en el colon y las placas de Peyer (PP) en el intestino delgado.

En condiciones fisiológicas, los antígenos de la luz intestinal son constantemente valorados por células presentadoras de antígenos (CPA) especializadas, representadas por las células dendríticas. Estas células reciben los antígenos procedentes de las células M (células epiteliales especializadas), a través de un proceso de transcitosis y los presentan asociados al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) a las células T que, en condiciones normales, generan una respuesta de tolerancia hacia estos antígenos. Este sistema de presentación de antígenos es altamente eficaz para discriminar entre antígenos nocivos o inofensivos. La tolerancia inmunológica puede dar lugar, en caso de una infección por patógenos, a una respuesta inmune confeccionada adecuadamente para proteger al huésped de potenciales daños letales.

En la EII, la compleja cascada de eventos que dan lugar a la tolerancia está dañada y acaba generando una respuesta inmune anormal hacia antígenos normalmente tolerados.

La integridad de la barrera epitelial representa un factor importante que puede contribuir de forma potencial al inicio o mantenimiento de un proceso inflamatorio (134).

El sistema inmune se puede dividir en dos ramas: inmunidad innata e inmunidad adquirida. La inmunidad innata representa una forma de inmunidad antigua conservada por la evolución, que actúa reconociendo patrones moleculares conservados asociados a patógenos (PAMP) y a través de ellos, las células especializadas (células dendríticas, macrófagos, células epiteliales) proporcionan una primera línea de defensa contra los patógenos invasores. La inmunidad adaptativa proporciona una respuesta inmune más específica e intensa contra los patógenos invasores (134).

1.7.2.1. DEFECTOS EN LA BARRERA INTESTINAL.

En condiciones normales la luz intestinal contiene una cantidad extraordinaria de especies bacterianas, la mayoría implicadas en procesos necesarios para la absorción de nutrientes por el huésped. Sin embargo, los antígenos potencialmente capaces de provocar una respuesta inmune, bien introducidos con la dieta o procedentes de alguna especie de patógenos que normalmente existen en el intestino sin causar enfermedad clínicamente evidente, se mantienen aislados del sistema inmune de la mucosa a través de una barrera eficaz que impide que dichos antígenos entren en contacto con las células inmunológicas reactivas (135).

Entre los elementos que constituyen esta barrera altamente dinámica tenemos la capa epitelial intestinal continua, el moco superficial producido por células especializadas (células Goblet) intercaladas entre las células epiteliales, el flujo fecal mantenido por un peristaltismo activo y la secreción de factores protectores del huésped; una alteración en cualquiera de estos elementos puede participar en la patogenia de la EII. (134).

1.7.2.2. RESPUESTA INMUNE INNATA.

Hasta hace pocos años el foco de interés principal había sido la respuesta inmune adaptativa y los mediadores del daño tisular. Sin embargo, estudios más recientes apoyan la idea de que si bien el papel de la inmunidad adaptativa es fundamental en la amplificación y cronificación del fenómeno inflamatorio, lo que pone en marcha todo el mecanismo podría tener más que ver con una disfunción de la respuesta inmune innata (136).

Charles Janeway Jr. fue el primero en formular la idea de que la respuesta inmune innata depende de la existencia de *receptores de reconocimiento de patrones* (PRRs) capaces de detectar motivos microbianos denominados *patrones moleculares asociados a patógenos* (PAMPs) (137).

Miembros de dos familias de PRRs, los receptores Toll-like (TLR) (138), como TLR2 y TLR4, y las proteínas con dominio de unión a nucleótidos-oligomerización (NODs) (139, 140), sobre todo NOD2, han demostrado ser especialmente importantes en la homeostasis de la mucosa y la flora comensal intestinal (141, 142). Estas proteínas se expresan de forma constitutiva o inducida a lo largo del tracto gastrointestinal por múltiples tipos celulares (células epiteliales; macrófagos y dendríticas de la lámina propia; y miofibroblastos, células endoteliales y adipocitos de la submucosa) y parecen existir interacciones recíprocas en sus vías de señalización (143, 144), si bien existen datos contradictorios (145, 146). Estas moléculas actúan mediante la inducción de la secreción de determinadas citoquinas y quemoquinas y vías efectoras antimicrobianas (revisado por Cario (142) y Mueller y Podolsky (141)). Así, cuando inciden factores desencadenantes ambientales y/o genéticos, se produciría una disfunción de estos receptores y el desarrollo de la enfermedad.

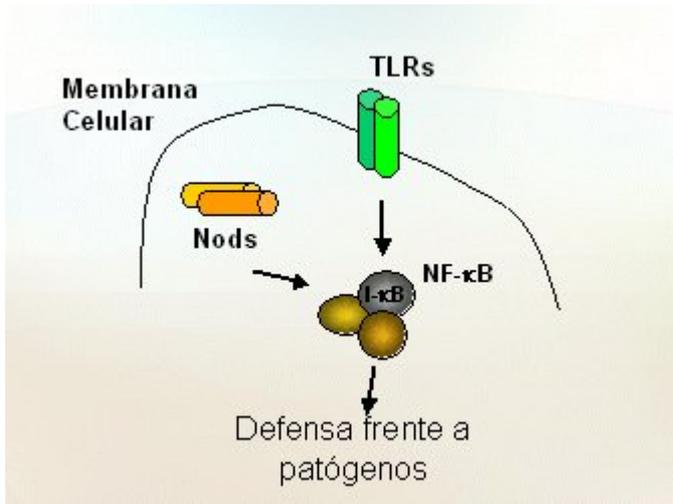


Fig. 2. Mecanismo de respuesta a microorganismos: las células utilizan dos sistemas para responder a microorganismos, los receptores intracelulares NOD2 y los TLR que están en la superficie celular y que sirven para reconocer productos bacterianos; ambos transmiten señales que activan el factor de transcripción NFκB, iniciándose diversos mecanismos que protegen al organismo de los patógenos que se han detectado.

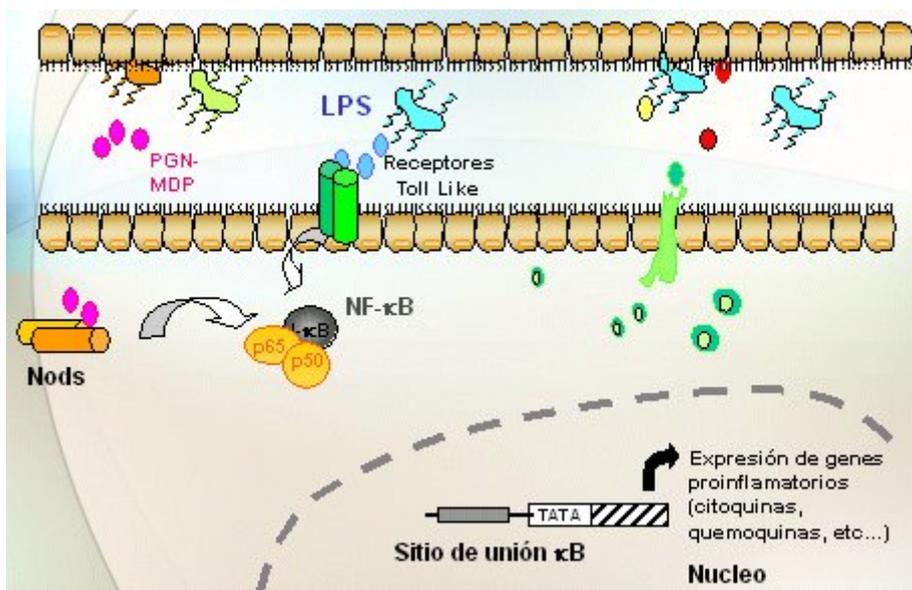


Fig. 3. Respuesta inmune intestinal normal

Por otro lado, la señalización mediante TLR y NOD, particularmente en células dendríticas, parece controlar el tipo de respuesta inmune adaptativa subsiguiente (146, 147), por lo que podrían intervenir en el desbalance Th1/Th2 que se ha observado en la EII.

Un dato clave a favor de la importancia de la respuesta innata en la patogénesis de la EII viene dado por la identificación de una importante asociación de mutaciones en *CARD15* (gen que codifica NOD2), con la susceptibilidad y forma de presentación de la EC (ver más adelante). Se ha observado una producción disminuida de *defensinas*, una familia de proteínas bactericidas producidas fundamentalmente por la célula de Paneth del epitelio, en pacientes de Crohn portadores de estas mutaciones así como en ratones deficientes para *CARD15* (146). Estos hallazgos estarían en línea con una hipótesis anteriormente planteada de que la EC podría tratarse de una inmunodeficiencia (148).

Asimismo se han comunicado asociaciones de polimorfismos en TLR asociados a EII, si bien estas no son tan consistentes como la anteriormente mencionada.

1.7.2.3. RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA.

Numerosas evidencias sostienen la idea de que la respuesta inmune adaptativa y más concretamente, las células T juegan un papel importante en el desarrollo de la EII. En modelos experimentales se ha demostrado que el proceso inflamatorio puede estar condicionado por un exceso de función T efectora o por una deficiente función T reguladora (100).

Existe un consenso razonable en cuanto a que la mucosa de pacientes con EC establecida está dominada por linfocitos CD4+ con fenotipo Th1, caracterizados por la

producción de IFN- γ e IL-2 (112). La IL-12 y la IL-18 parecen las citoquinas principalmente responsables de la polarización a Th1, si bien la IL-21 puede ser también importante (revisado por Gordon et al. (150)). Por el contrario, en la CU, la mucosa estaría dominada por linfocitos CD4⁺ con fenotipo Th2, si bien algo atípico, caracterizado por la producción de TGF- β e IL-5, pero no IL-4 (149). Investigaciones más recientes apuntan a la IL-13 secretadas por células NK T no clásicas como posible responsable del daño epitelial en la CU (151).

Recientemente se ha descrito una tercera población de linfocitos T cooperadores (Helper) denominada TH17 (porque produce entre otras citoquinas IL-17 (en sus isoformas IL-17A e IL17F) que interviene tanto en la homeostasis intestinal y en el control de infecciones bacterianas y fúngicas como en la inmunopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal (152) promoviendo a través de la IL17 : a) La migración , expansión y función de los polimorfos nucleares neutrófilos b) La maduración de las células dendríticas, la estimulación de las células T durante su primer contacto antigénico c) La producción de mediadores inflamatorios como la IL-1, IL-6, IL-8, TNF, GM-CSF, NOS2, prostanglandina E2, metaloproteasas y quimiocinas por parte de diferentes tipos celulares como los fibroblastos, las células endoteliales, los macrófagos y las propias células epiteliales de la mucosa intestinal (153). Los linfocitos TH17 a su vez son capaces de producir otras citoquinas como la IL-16, IL-21, IL-26 y la quimiocinas CCL20 que son también proinflamatorias. En determinadas circunstancias los linfocitos TH17 pueden producir citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 y la IL-22. La diferenciación a linfocitos TH17 esta condicionada por la IL-23 en presencia de IL-6 y TGF- β (154).

En cuanto a un posible déficit de mecanismos reguladores, se ha apuntado que la inflamación mucosa puede ser resultado de una pérdida de la tolerancia de células T a la

microflora, o de la disfunción de alguno de los compartimentos de células T reguladoras (CD4+CD25+, Tr1, CD8 supresoras) que se han visto podrían participar en la homeostasis de la mucosa (100, 155-158).

Por otro lado, la apoptosis de las células T de la lámina propia parece ser crítica en la modulación de la respuesta inmune mucosa y en la eliminación de los clones reactivos, por lo que defectos de apoptosis pueden ser claves para la acumulación inapropiada de células T y la perpetuación de la inflamación crónica de la mucosa en la EII (159, 160). De hecho, el mecanismo por el cual el infliximab, la sulfasalazina y la azatioprina ejercen su acción beneficiosa consiste, en gran parte, en la inducción de muerte de células T activadas de la lámina propia (159). Sin embargo, dos estudios recientes ponen de manifiesto que existen diferencias importantes en la deficiente regulación de la apoptosis en la CU y la EC y que es el factor patogénico más importante en ésta (161, 162).

Se ha propuesto un esquema inmunopatogénico donde juega un papel central la IL-23. En condiciones basales existe un equilibrio entre las células Treg y las poblaciones TH1 y TH17. Las células Treg FOXP3+ a través de la producción de TGF- β e IL10 mantienen bajo control a las subpoblaciones TH1 y TH17. Los linfocitos TH17 bajo la acción de dosis moderadas de IL-23 producen niveles homeostáticos de IL-17 e IL-22 que promueven la regeneración epitelial y estabilizan a las células epiteliales intestinales que producen mucinas y péptidos antimicrobianos (163). (Fig 4). Cuando por causa desconocida se produce un daño tisular en la barrera intestinal y aumenta su permeabilidad para gérmenes de la flora saprofita, se estimula la producción de IL-23 por las células dendríticas próximas al epitelio. El aumento en la concentración de IL-23 en la lámina propia intestinal condiciona el bloqueo de las células Treg que condiciona la expansión de la subpoblación linfocitaria TH1 con producción de INF- γ y de la

subpoblación TH17. La subpoblación TH17 también es expandida directamente por la acción de la IL-23 e inducida a producir mayor porcentaje de citoquinas proinflamatorias que alteran de forma considerable la reparación de las células epiteliales intestinales con lo que se perpetúa el proceso (164) (Fig 5). En este contexto es de gran interés el dato reciente de que determinados polimorfismos del receptor para la IL-23 (IL-23R) se asocian a la enfermedad de EC y a la CU.

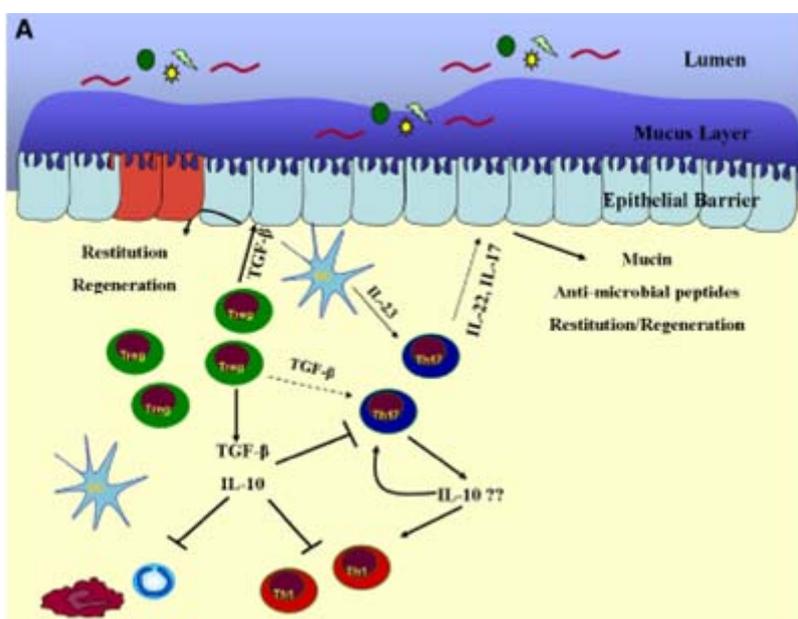
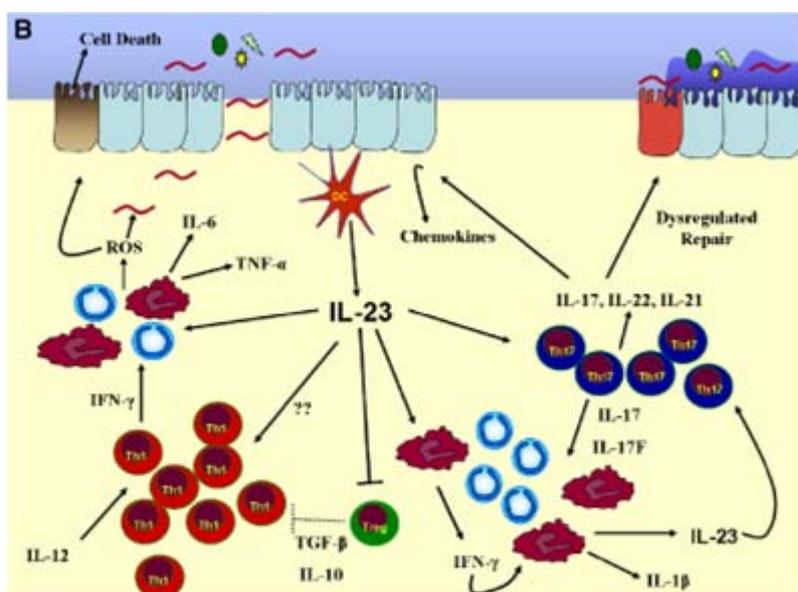


Fig 4 y 5. Acción de la interleuquina 23



1.7.2.4. MEDIADORES DEL DAÑO INTESTINAL.

La activación de las células centrales del sistema inmune se acompaña de la producción de una amplia variedad de mediadores no-específicos del daño y cicatrización de la mucosa. Estos incluyen una amplia diversidad de citoquinas y factores de crecimiento, así como leucotrienos y prostaglandinas y óxido nítrico (97).

Otros factores posteriormente identificados con un importante papel en el daño tisular y la cicatrización en el intestino son las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), endopeptidasas neutras, las cuales pueden degradar todos los componentes de la matriz extracelular. Varios componentes de esta familia (MMP-1, -13, -2, -9, -3, -10, -7 y -12) se han visto sobreexpresadas en tejidos de EII por diversas técnicas (150, 165).

Investigaciones más recientes en estas vías finales de daño o lesión tisular, están identificando otros mediadores y vías de señalización que podrían resultar valiosas dianas terapéuticas en EII (150). De ellas destaca, PAR-1 (receptor activado por proteínasa-1) que aumenta la permeabilidad intestinal e induce citoquinas Th1, expresión de COX-2 y síntesis de PGE2 y se encuentra sobreexpresado en colon de pacientes de EII; de acuerdo con estos datos, antagonistas de PAR-1 disminuyen la inflamación en diversos modelos experimentales de colitis (166).

1.7.3. FACTORES GENÉTICOS.

1.7.3.1 EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICA DE LA EII

Los datos epidemiológicos sugieren varias líneas de evidencia a favor de la contribución de factores genéticos a la fisiopatología de la EII. Estos datos incluyen las diferencias étnicas y raciales en la prevalencia de la enfermedad, la agregación familiar y los estudios con gemelos y por asociación con otros síndromes genéticos reconocidos (síndrome de Hermansky-Pudlak, glucogenosis tipo 1b, síndrome de Turner, Wiskott-Aldrich) (167).

1.7.3.1.1. Estudios étnicos y raciales.

Los estudios epidemiológicos muestran que la incidencia y la prevalencia de estas enfermedades varían dependiendo de la localización geográfica y en función de factores étnicos y raciales, con un incremento en la incidencia de la enfermedad de Crohn en las últimas tres décadas al menos en los países occidentales.

Entre los grupos étnicos, los judíos de los Estados Unidos tienen el mayor riesgo de desarrollar EII comparado con los no judíos caucásicos, con una incidencia 2-4 veces superior y una prevalencia 2-9 veces mayor. El incremento del riesgo de EII en los judíos askenazis se ha comprobado en diferentes periodos de tiempo, así como en diferentes áreas geográficas, lo que podría sugerir que los factores genéticos desempeñan un papel más importante en el riesgo a desarrollar EII en la población judía.

1.7.3.1.2. Estudios familiares.

En estudios poblacionales aproximadamente un 5-10% de los pacientes con EII presentan una historia familiar positiva, indicando que el mayor factor de riesgo para desarrollar EII es el hecho de tener un familiar afecto con la enfermedad (168); el riesgo es alrededor del 10% para familiares de primer grado (169). Es interesante que si uno de los padres padece la EC, hay un riesgo mayor de tener una hija con EII (12.6%) en comparación con el 7.9% de tener un hijo con EII (170); ello apunta a que un factor de predisposición puede encontrarse en el cromosoma X, como se ha comunicado en estudios con técnicas de rastreo del genoma humano (171)

El riesgo relativo estimado mediante estudios de cohorte y casos-control es de 10 para los parientes de un paciente con colitis ulcerosa y de 14 para los parientes de un paciente con enfermedad de Crohn.

Se ha descrito que hasta el 75% de las familias con afectación múltiple son concordantes para el tipo de enfermedad mientras que el 25% son mixtas (un miembro con EC y otro con CU) (167).

1.7.3.1.3. Estudios con gemelos.

La tasa de concordancia para enfermedad de Crohn es del 42 al 58% en gemelos monocigotos, mientras que entre gemelos dicigotos no difieren significativamente a las observadas entre otros hermanos. En la colitis ulcerosa las tasas de concordancia se han establecido entre 6-17% para gemelos monocigotos y un 0-5% para los gemelos dicigotos. La concordancia es significativamente inferior al 100% entre gemelos

monocigotos lo que indica una penetrancia reducida para el genotipo de EII, además de factores no genéticos como por ejemplo factores ambientales (167).

1.7.3.1.4. Diferencias entre estudios esporádicos y familiares.

Probablemente la observación más consistente en varios estudios es la menor edad al debut de la enfermedad en los casos familiares comparado con los esporádicos.

Para la EC la edad media al diagnóstico de los casos familiares es de aproximadamente 22 años, comparado con 27 años en los casos esporádicos. De forma similar en pacientes con colitis ulcerosa la edad al diagnóstico en los casos familiares y esporádicos fue de 23.3 y 28.6 años respectivamente (167, 172).

Otro hallazgo interesante cuando se comparan los casos esporádicos y familiares es la relativa preponderancia del sexo femenino entre los casos familiares. La relación femenino/masculino fue de entre 1.23 y 1.68/1 en los casos familiares de EC y de 1.3 a 1.1.5/1 en la CU (119, 167, 173).

1.7.3.2. IDENTIFICACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS.

La identificación de regiones cromosómicas y genes de susceptibilidad asociados a EII ha supuesto la confirmación definitiva de la existencia de un importante componente genético en estos procesos. Sin embargo, se ha hecho evidente que la EII no sigue patrones de herencia mendelianos, sino que se ajusta a un modelo genético complejo según el cual interaccionan muchos factores de riesgo genético, cada uno con una contribución individual modesta (174). No existe una variante genética necesaria ni

suficiente para que se desarrolle la enfermedad. Además, ocurre que factores de susceptibilidad en diferentes genes pueden dar lugar a una misma enfermedad en diferentes individuos, lo que se conoce como heterogeneidad genética (167).

Con la intención de reducir esta heterogeneidad, se intenta estudiar poblaciones homogéneas (judíos askenazis, finlandeses...) o se investigan subgrupos con características étnicas o geográficas comunes.

Dos sistemáticas de trabajo complementarias se han empleado en la búsqueda de genes implicados en la susceptibilidad a EII: **el clonado posicional**, basado en estudios de ligamiento, y **la evaluación de genes candidatos**, basado en estudios de asociación (estudios de casos y controles) (175). Sin embargo, en los últimos años la estrategia que está resultando más exitosa en la identificación de genes de riesgo en la EII son los estudios de **rastreo sistemáticos del genoma** (genome wide scan studies –GWAS).

1.7.3.2.1. Clonado posicional.

En este tipo de estudios se trabaja sin hipótesis previa de los genes que podrían intervenir y se rastrea la totalidad del genoma. Se basa en análisis estadísticos, tales como el análisis de ligamiento en familias con más de un miembro afecto. En una primera fase se evalúa el parecido entre miembros afectados, para un gran número de marcadores altamente polimórficos (microsatélites) diseminados de forma uniforme a lo largo del genoma (*genome wide scan*). Si se detecta un “exceso de parecido”, la región donde se localiza el o los marcadores es estudiada con mayor profundidad. Para aceptar que una región se encuentra asociada a enfermedad, el nivel de significación ha de ser muy alto o el hallazgo ha de reproducirse en posteriores estudios de replicación dirigidos a explorar marcadores de esa región en otros grupos de familias. Al no

sustentarse en una hipótesis previa, este método es capaz de detectar genes de susceptibilidad a priori no sospechados e incluso encontrar genes desconocidos. Ha sido muy útil para identificar genes en enfermedades con patrones de herencia mendelianos. Su principal inconveniente es la falta de potencia a causa del gran número de marcadores genéticos que se evalúan.

1.7.3.2.2. Evaluación de genes candidatos: estudios de asociación.

Por genes candidatos se entiende aquellos que intervienen en alguna de las vías fisiopatológicas de la enfermedad o de enfermedades relacionadas o que se han demostrado importantes en modelos experimentales. Son genes candidatos de especial interés aquellos que, además, mapean dentro o próximos a regiones que contienen loci de susceptibilidad identificados por los estudios de ligamiento. Su posible implicación en la enfermedad se analiza mediante estudios de asociación, generalmente del tipo casos-control, donde se comparan las frecuencias alélicas en pacientes afectados de la enfermedad con las obtenidas en un conjunto de controles. Muchos autores consideran que los estudios de asociación constituyen el mejor método para identificar variantes genéticas en relación a enfermedades complejas (176), ya que su potencia para detectar factores con una contribución modesta al desarrollo de la enfermedad es superior a los estudios de ligamiento (177).

1.7.3.2.3. Identificación de genes candidatos mediante rastreos sistemáticos del genoma (GWAS).

Además de la estrategia basada en estudios de asociación, una de las aproximaciones comúnmente utilizadas en el estudio de las bases genéticas de enfermedades complejas

es la realización de rastreos sistemáticos del genoma (genome-wide association studies, GWAS). En este tipo de estrategia se analizan un denso número de variantes genéticas (desde 500.000 hasta 1 millón) consistentes en el cambio de un nucleótido (SNPs) distribuidos a lo largo de todo el genoma humano con el objeto de observar si existen diferencias entre pacientes con una enfermedad determinada y controles sanos (178, 179). La aparición de diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles indica que la región del genoma donde se encuentra el SNP contiene un marcador genético asociado con la enfermedad en cuestión. El desarrollo de esta tecnología ha sido posible gracias a la gran evolución que han experimentado las técnicas de genotipado que ha permitido la aparición de lo que hoy conocemos como “técnicas de genotipado a gran escala” (180, 181). Por otra parte también ha sido fundamental el avance en la caracterización de la variabilidad genética humana (se han localizado e identificado alrededor de 15 millones SNPs en el genoma humano <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) y en el conocimiento de la organización del genoma humano en bloques de desequilibrio de ligamiento (LD) (grupos de SNPs que se heredan juntos con una probabilidad mucho mayor de la que lo haría por azar, www.hapmap.org) (182, 183). Además de analizar al mismo tiempo un elevadísimo número de genes, otra de las ventajas de los GWAS es la de partir de una “hipótesis libre”, es decir, se analizan un elevado número de genes sin considerar a priori su función o localización lo cual evita el sesgo de selección del gen y permite identificar nuevas vías implicadas en la patogénesis de la enfermedad que con otro tipo de estrategias pasarían desapercibidas (179). Así, los GWAS se han convertido en una herramienta muy poderosa para la identificación de regiones de susceptibilidad asociadas con enfermedades complejas. Un evidente reflejo de ello es el amplio número de trabajos de este tipo que se han publicado recientemente y que han dado como fruto

la caracterización de numerosas regiones cromosómicas asociadas con la enfermedad inflamatoria intestinal, y otras enfermedades autoinmunes, aportando datos muy novedosos al conocimiento del componente genético de estas patologías (184, 185).

1.7.3.3. LOCI DE SUSCEPTIBILIDAD A EII.

Desde el estudio de Hugot et al, publicado en 1996 (186), datos de ligamiento de unos 10 rastreos genómicos realizados por grupos independientes junto con muchos otros estudios de replicación (referenciados en Newman y Siminovitch (187) han delineado al menos nueve loci de susceptibilidad a EII (IBD1-IBD9) (Tabla 3).

<i>Locus de Susceptibilidad</i>	Posición en el Cromosoma	Gen	Enfermedad a la Que se asocia
<i>IBD1</i>	16q12	CARD15	EC
<i>IBD2</i>	12q14	Desconocido	CU
<i>IBD3</i>	6p	Desconocido	EII
<i>IBD4</i>	14q11-q12	Desconocido	EC
<i>IBD5</i>	5q31-33	SLC22A4/A5	EC
<i>IBD6</i>	19p13	Desconocido	EII
<i>IBD7</i>	1p36	Desconocido	EII
<i>IBD8</i>	16p12	Desconocido	EC
<i>IBD9</i>	3p26	Desconocido	EII

TABLA 3. Localización de los distintos loci de susceptibilidad para la enfermedad inflamatoria intestinal.

Algunos de ellos se relacionan con EII, mientras que otros son específicos del fenotipo EC o CU. Siete de estos loci, los localizados en los cromosomas 1 (IBD7), 5 (IBD5), 6 (IBD3), 12 (IBD2), 14 (IBD4), 16 (IBD1) y 19 (IBD6) se consideran importantes por su alta significación estadística o su replicación en varios estudios. Cada una de estas regiones cromosómicas son extensas y contienen potencialmente varios centenares de genes candidatos (167):

IBD1: localizado en la región pericentromérica del cromosoma 16 (16q12), fue identificado por primera vez por Hugot en 1996 como un locus de susceptibilidad para enfermedad de Crohn y este hallazgo ha sido posteriormente replicado en numerosos estudios (186,188-191). La evidencia definitiva de ligamiento de IBD1 se estableció en un amplio estudio internacional que incluyó 613 familias (192), y la evidencia de ligamiento se encuentra sustancialmente justificada por la asociación de variantes del gen CARD15/NOD2 con la EC. Sin embargo, conviene reseñar que al menos dos grupos independientes, uno italiano (193, 194) y otro británico (195), han encontrado ligamiento de este locus también con colitis ulcerosa. Además, un estudio de polimorfismo de microsatélites de esta región ha reportado la asociación de determinados haplotipos con EC y también con CU (196).

IBD2: se localiza en el cromosoma 12 (12q14). La evidencia de ligamiento es mayor en colitis ulcerosa. Varios genes posibles candidatos cerca del locus IBD2 han sido investigados con resultados negativos o poco concluyentes, incluyendo la familia de las integrinas B*7 (197), la proteína de resistencia natural asociada a macrófagos (198) y el gen STAT6 (199-201).

IBD3: localizado en el cromosoma 6p comprende el complejo mayor de histocompatibilidad y otras muchas moléculas inmunológicamente importantes. Ha sido implicado de manera consistente en varios estudios de ligamiento tanto con enfermedad de Crohn como con colitis ulcerosa (191, 201, 203). La contribución relativa estimada mediante estudios epidemiológicos y de ligamiento de la región HLA al riesgo genético total es del 64% al 100% en colitis ulcerosa y del 10% al 33% en enfermedad de Crohn (204-206). Mientras que los datos con respecto a la asociación de IBD con alelos HLA específicos son complejos y a menudo discordantes entre diferentes estudios, existe un consenso de que los alelos relevantes parecen diferir entre grupos étnicos e influencia más significativamente la expresión fenotípica que la susceptibilidad (207).

Polimorfismos en otros genes del MHC, tales como TNF e IKBL han sido implicados en IBD (208, 209) pero su papel en la enfermedad es incierto.

IBD5: Varios estudios de rastreo identificaron un locus ligado a enfermedad de Crohn en el cromosoma 5, región 5q31 (203, 210), se trata de un segmento de 250 kb definido por un haplotipo basado en 11 polimorfismos dispersos a lo largo del mismo (211). La asociación de EC con este haplotipo de riesgo 5q31 se ha replicado en otras poblaciones caucásicas pero no en población japonesa (195, 212-215). Esta región contiene un número importante de citoquinas inmunorreguladoras que pueden ser importantes genes candidatos en la fisiopatología de la EC: interleuquinas 3, 4, 5 y 14, así como otros genes potencialmente candidatos como el CSF-2 y el IRF-1.

Muy recientemente se han identificado dos variantes dentro de los genes SLC22A4 y SLC22A5 que componen un haplotipo bialélico altamente asociado con EC (216). Estos genes mapean en el centro de la región 5q31 y codifican los transportadores de

membrana OCTN1 y OCTN2, respectivamente, que medían el transporte bidireccional de carnitina y cationes orgánicos. El haplotipo formado por estos polimorfismos, aunque acontece con mayor frecuencia en el haplotipo de riesgo 5q31 antes mencionado, parece ser independiente del mismo y se postulan como variantes causantes de enfermedad (216). Por otro lado, los polimorfismos de SLC22A4/A5 interaccionan con variantes de CARD15 produciendo un incremento del riesgo de padecer EC (217).

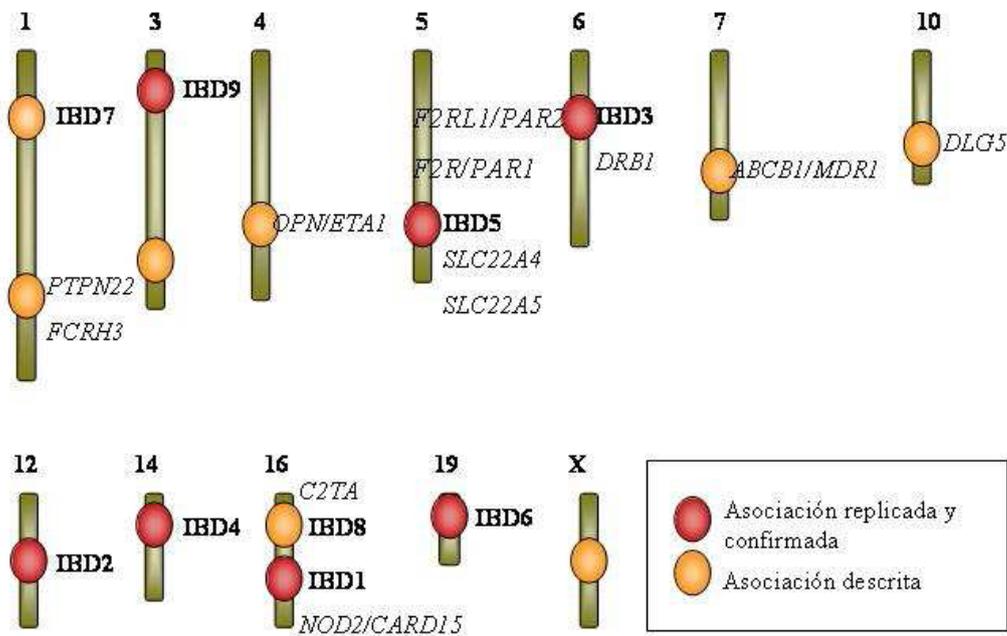


Fig. 6. Áreas de ligamiento a enfermedad inflamatoria intestinal (218)

1.7.3.4. OTROS LOCI DE SUSCEPTIBILIDAD A EII Y GENES CANDIDATOS.

Mediante técnicas de clonado posicional, Stoll et al han demostrado recientemente una asociación a EII con variantes del gen DLG5 (*Drosophila Discs Large Homolog 5*) (219) que asienta en la región 10q22-23 y codifica una proteína estructural que interviene en el mantenimiento de la integridad epitelial. Este hallazgo se ha replicado en otro estudio posterior (220) y está en consonancia con los datos que muestran que la permeabilidad intestinal está alterada en la EII (221) y que dicha alteración está determinada por factores genéticos (222, 223).

Otro gen de interés es el MDR-1 (*multidrug resistance 1*) que codifica la P-glicoproteína 1, una proteína transmembrana involucrada en el transporte de drogas a través de las membranas plasmáticas y en resistencia a agentes quimioterápicos. Se ha identificado por conocerse que ratones deficientes en MDR-1 desarrollan colitis (224) y asentar en una zona de susceptibilidad (7q22) identificada recientemente mediante un meta-análisis de 10 rastreos genómicos independientes (225). Dos polimorfismos se han encontrado asociados a CU en al menos dos estudios independientes (226, 227), y uno de ellos también se ha visto asociado a EC y EII (228); sin embargo, también se han comunicado análisis contradictorios (229-231).

El locus IBD6 (19p) también contiene genes implicados actualmente en EII. Así por ejemplo, el gen que codifica ICAM-1, una integrina con participación importante en la adhesión y tráfico de células del sistema inmunitario contiene varios polimorfismos asociados con CU y EC (232). Otros genes candidatos en esta región son el factor 3 del complemento, el receptor tromboxano A2 y la hidroxilasa del leucotrieno B4 (167).

Se ha observado una región de ligamiento en el cromosoma 1p (IBD7) con EII (188, 233). Las familias que mostraron ligamiento a esta región también mostraron un mayor ligamiento a IBD1, lo que sugiere posibles interacciones gen-gen entre estos dos loci. Aún no se han identificado genes asociados en esta región, si bien algunos autores proponen al gen de la caspasa 9 y genes de la familia del receptor de TNF que mapean en esta región (188).

Otros genes candidatos de especial interés en EII son los TLR. Se ha comunicado una asociación de un polimorfismo del promotor de TLR9 con EC (234) y otros estudios muestran un incremento de la susceptibilidad a EC, CU y EII asociado con variantes en el gen que codifica TLR4 (235-239).

También se ha descrito que el gen NFKB1, que mapea dentro de un intervalo de ligamiento a EII en 4q, posee un polimorfismo de delección en región promotora que merma la activación transcripcional y se ha asociado con CU (240); sin embargo, dicha asociación no ha podido ser replicada en un estudio muy reciente en población española (241).

1.7.3.5. LOCI DE SUSCEPTIBILIDAD IDENTIFICADOS MEDIANTE GWAS.

Los estudios de rastreo sistemático del genoma (GWAS) han supuesto un dramático avance en el conocimiento de las bases genéticas de la enfermedad inflamatoria intestinal. Hasta 30 nuevos genes implicados en la susceptibilidad a la EII se han identificado de forma consistente en los últimos tres años, abriendo de esta forma una nueva era en la investigación de la enfermedad (242).

Debido a que la contribución genética a la enfermedad de Crohn es mas importante que en la colitis ulcerosa, los primeros GWAS se realizaron en la EC, lo cual permitió la

identificación de 10 nuevos factores genéticos de riesgo, al mismo tiempo que confirmó asociaciones previamente descritas mediante otras estrategias como la del gen *NOD2*.

Uno de los primeros genes que se identificó fue el gen del receptor de la interleuquina 23 (*IL23R*) (243). Diferentes variantes genéticas del gen *IL23R* se observaron asociadas a la EC de forma significativa en este primer GWAS en la enfermedad de Chron. Estos hallazgos han sido confirmados en diferentes poblaciones, incluida la española (244), lo cual refuerza el papel del gen del *IL23R* como uno de los factores genéticos de riesgo más sólidos en la EC. Otro gen asociado a la EC en los GWAS ha sido el gen de la interleuquina 12B (*IL12B*), señalando la importancia de la respuesta innata en la EC, ya que tanto la IL12 como la IL23 son moléculas de gran relevancia en el proceso inflamatorio e inmune que subyace en las enfermedades autoinmunes como la EC (242, 246).

Junto con el gen del *IL23R*, otros dos genes que se ha comprobado juegan un papel capital en la genética de la EC son los genes *ATG16L1* y *IRGM*. La asociación del gen *ATG16L1* (autophagy-related 16-like 1) con la EC fue inicialmente identificada por Hampe et al (247) y confirmada en diferentes estudios posteriores (248). En la población española se ha confirmado recientemente la asociación del gen *ATG16L1* con la EC y reportado que se encuentra asociado también con la colitis ulcerosa en un meta-análisis (Palomino-Morales R, *Genes and Immunity* 2009 –in press-). La proteína ATG16L1 se expresa abundantemente en células epiteliales intestinales, así como en linfocitos y macrófagos y juega un papel relevante en un proceso biológico denominado autofagia, que es un mecanismo por el cual las células encapsulan microorganismos y restos celulares citosólicos para posteriormente ser fusionados por los lisosomas que degradan el contenido de estas vacuolas. La autofagia es reconocida como un proceso de gran importancia en la respuesta inmune innata. Se sugiere que el gen *ATG16L1*

influencia la susceptibilidad a la enfermedad de Crohn mediante una alteración de la autofagia para eliminar en las células del sistema inmune innato intestinal.

La relevancia de la autofagia en la patogénesis de la EC se ha visto reforzada con la identificación de la asociación de otro gen implicado en la autofagia como es el gen *IRGM* (immunity-related guanosine triphosphatase) en la susceptibilidad a la enfermedad de Crohn (249). Al igual que en el caso del gen *ATG16L1* esta asociación ha sido observado en diferentes estudios independientes y en diversas poblaciones incluida la española (242, 248, Palomino-Morales R, *Genes and Immunity* 2009 –in press-).

La asociación entre la enfermedad de Crohn y NOD2, junto con la de los genes implicados en autofagia, *ATG16L1* y *IRGM*, refuerza la hipótesis del importante papel que juegan los defectos en la respuesta inmune innata en el desarrollo de la EC.

Señalar que aunque los estudios genéticos en la colitis ulcerosa se encuentran menos avanzados, se ha observado que los genes *IL23R* e *IL12B* también se encuentran asociados a la CU (242), así como aunque en menor medida los genes *ATG16L1* y *IRGM* e incluso algunos autores proponen que también NOD2, algo no formalmente demostrado aún. Recientemente se han publicado GWAS específicos en CU, observando la asociación con el gen de la interleukina 10 (*IL10*) y el gen *ARPC2* (actin-related protein2/3 complex subunit 2) (250).

Otros diferentes genes se han asociado tanto a la EC como a la UC que necesitan ser validados y confirmados en estudios posteriores. Indicar que las asociaciones de estos genes señalados con la enfermedad son modestas y que se hace necesario estudiar no solo la interacción de estos genes entre sí, sino quizá más importante identificar las variantes causales dentro de estos genes que sean las responsables últimas del riesgo genético a la enfermedad, para lo cual se hacen necesario realizar tanto estudios de

mapeo fino, re-secuenciación como análisis funcionales de las variantes genéticas implicadas en la asociación a la enfermedad.

1.8. GENES ABORDADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO.

1.8.1. CARD15/NOD2.

En 2001 dos estudios independientes comunicaron la identificación del gen CARD15/NOD2 como el responsable del ligamiento con el locus IBD1. Hugot et al mediante un estudio de clonado posicional en población europea y Ogura en población norteamericana y mediante el estudio de un gen candidato en la zona IBD1, comunicaron que tres variantes del gen CARD15/NOD2 confieren susceptibilidad a padecer enfermedad de Crohn pero no a colitis ulcerosa (251, 252).

1.8.1.1. LOCALIZACIÓN Y ESTRUCTURA.

El gen CARD15/NOD2 se encuentra ubicado en la región pericentromérica del cromosoma 16 (16q12) y contiene 12 exones codificantes. Por su alta homología respecto a un gen ya descrito, denominado NOD1, se denominó en un principio NOD2, pero posteriormente el gen fue re-denominado CARD15 por el comité de nomenclatura HUGO, reservándole el término NOD2 para la proteína correspondiente. Comparte similitudes con el gen R de las plantas, que media la resistencia frente a patógenos bacterianos (253,254).

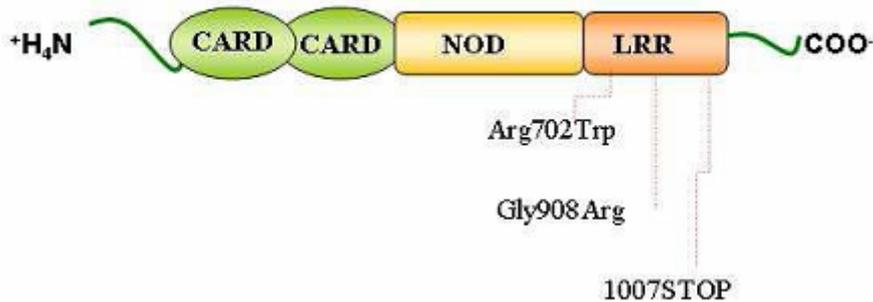


Fig. 7. Estructura del NOD2

Este gen codifica para una proteína citoplasmática de 1040 aminoácidos que se expresa fundamentalmente en fagocitos incluyendo monocitos, macrófagos, células dendríticas y polimorfonucleares (253). Posteriormente se comprobó su expresión a un bajo nivel basal en células epiteliales que se incrementa cuando la célula es sometida a estímulos inflamatorios (255-257). También se ha comprobado su expresión en las células de Paneth (258, 259). Éstas son células especializadas que forman parte del sistema defensivo y se localizan en la base de las criptas de Lieberkuhn en el intestino delgado, fundamentalmente a nivel de ileon; segregan defensinas y otros péptidos antimicrobianos en respuesta a la existencia de bacterias (260-262). Se ha sugerido que las células de Paneth desempeñan un papel en el desarrollo de EC, aunque todavía no se dispone de claras evidencias de su implicación en la fisiopatología de la enfermedad.

NOD2 pertenece a la superfamilia NOD1/CED4/APAF1 reguladores de la apoptosis celular, y la estructura básica se divide en tres regiones:

- La región aminoterminal tiene dos dominios de reclutamiento y activación de caspasas (CARD); constituyen los dominios efectores, median interacciones proteína-proteína y están involucrados en la apoptosis celular y la activación de NF-KB.

- La región central tiene una estructura de unión de nucleótidos (NBD), encargada de la auto-oligomerización de la proteína.
- La región carboxiterminal tiene diez secuencias repetidas ricas en leucina (LRR), similares a los receptores Toll-like, que podría funcionar como un sensor intracelular de determinados microorganismos y productos bacterianos

1.8.1.2. FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA.

La proteína NOD2 puede inducir apoptosis (254, 263) y activar NF-KB (264). Ambos procesos se inician respectivamente, mediante una interacción CARD-CARD con la caspasa-9 (involucrada en apoptosis) y señales intracelulares mediadas por la serina/ tionina kinasa Rip2 (también denominada RICK o CARDIAK) (254, 265, 266).

Estas señales de transducción están precedidas por la interacción del dominio LRR de NOD2 con determinados componentes bacterianos. Inicialmente se consideró que eran los lipopolisacáridos (253), pero estudios posteriores han demostrado que son los peptidoglicanos bacterianos los componentes con los cuales interactúa de forma selectiva el dominio LRR (267). La activación de NF-KB estimula genes de citoquinas y genes que codifican para moléculas de adhesión celular y moléculas procoagulantes.

En la actualidad NOD2 se considera como un receptor intracelular del sistema inmune innato. De esta manera NOD2 constituiría una réplica intracitoplasmática de los Toll-Like Receptors (TLRs) que se localizan al otro lado de la membrana celular (268).

1.8.1.3. POLIMORFISMOS DE CARD15.

Se ha demostrado que CARD15 es un gen altamente polimórfico. Así, Lesage et al identificaron hasta 67 variaciones de secuencia, 9 de las cuales presentan una frecuencia alélica mayor al 5% en pacientes con enfermedad de Crohn. Tres de ellos son considerados factores independientes asociados a la enfermedad de Crohn (269).

R702W

Este polimorfismo de un nucleótido simple (SNP) consiste en un cambio de citosina por timina en el nucleótido 14272 que da lugar a un cambio de arginina por triptófano en el aminoácido 702 (exón 4). También se puede encontrar en la literatura con la anotación C14772T y SNP8.

G908R

Este SNP consiste en un cambio de guanina por citosina en la posición 25368, la cual da lugar a un cambio de glicina por arginina en el aminoácido 908 (exón 8). Otras denominaciones que recibe esta variante son G25386C y SNP12.

L1007fsinsC

A diferencia de las anteriores esta mutación es del tipo frameshift (cambio en el marco de lectura) y consiste en la inserción de un nucleótido de citosina en la posición 32629 (exón 11) dando lugar a un codón de terminación (codón stop) tras la leucina codificada en la posición 1007. Como consecuencia la proteína sintetizada carece de los 33

aminoácidos terminales. También se puede encontrar frecuentemente en la literatura con la denominación de SNP13 o, más raramente como 32629insC.

Estos tres polimorfismos son independientes unos de otros, de tal forma que no aparecen juntos en un mismo haplotipo (cromosoma). Sin embargo, todos ellos están asociados con el alelo serina de un SNP prolina/serina en el aminoácido 268 (P268S, SNP5), el cual está ampliamente representado en la población general. Esto sugiere la existencia de un haplotipo ancestral definido por el alelo 268S, sobre el cual habrían acontecido las mutaciones causantes de enfermedad, produciendo la diversificación del mismo (270).

Las frecuencias alélicas de las distintas mutaciones varían en función de la población estudiada. Todos los estudios a excepción de los realizados en la población asiática (japoneses (271), coreana (272) y china (273)), encuentran una fuerte asociación de 1007fs con EC (270). Sin embargo, no ocurre lo mismo con las otras variaciones que en algunos estudios no alcanzan significación estadística como factores independientes de susceptibilidad. Asimismo, existen estudios discordantes en cuanto al posible papel de las mutaciones de CARD15 en la forma de presentación de la EC en diferentes poblaciones (274).

1.8.1.4. CARD15 EN OTRAS ENFERMEDADES

Se ha analizado en relación a otros procesos de base autoinmune. En un estudio inicial se asoció a artritis psoriásica (275) y se proclamó como gen autoinmune pleiotrópico, pero este hallazgo no se ha reproducido en otros estudios (276-280).

Recientemente se ha relacionado con atopia y con el síndrome azul (Blau síndrome) (281-283).

Se han estudiado otros procesos: granulomatosis de Wegener (284), artritis reumatoide (285), enfermedad de Behcet (286) y susceptibilidad a tuberculosis pulmonar (287), no encontrando relación con CARD15.

1.8.1.5. MECANISMO PATOGENICO

Como ya se ha comentado, CARD15 se expresa habitualmente en monocitos de sangre periférica y en las células de Paneth, actuando como un sensor intracelular de motivos bacterianos. Su ligando es el muramil dipéptido (MDP), estructura contenida en los peptidoglicanos y generada tras su digestión en los lisosomas.

Usando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de individuos homocigotos para la mutación L1007fs Núñez y col demostraron que los individuos homocigotos tienen una activación de NFkB y una expresión de IL-1 β disminuidas en respuesta a MDP pero no a LPS. Por el contrario PBMC de sujetos heterocigotos actúan de una manera muy similar a los que no presenta mutación en lo que respecta a activación de NFkB y expresión de IL-1 β (288).

Chamaillard et al. (290) han demostrado que las variantes de CARD15 pueden ser clasificadas en función de su capacidad de activar NFkB de forma basal y en respuesta a los peptidoglicanos.

Dos estudios recientes nos han ayudado a esclarecer el papel de NOD2 y su función anormal en situaciones de enfermedad:

- Kobayashi et al. (146) han desarrollado ratones deficientes en el gen CARD15 (NOD2 -/-). Los macrófagos obtenidos de la médula ósea de estos ratones no

responden a MDP pero responden con normalidad a otros ligandos de los receptores Toll-like (TLR). MDP y los ligandos de TLR dan lugar a una producción sinérgica de IL-6 e IL-12 en macrófagos wild-type, pero no en los NOD2 ^{-/-}. Los ratones deficientes en NOD2 presentan un incremento en la diseminación de *Listeria monocytogenes* cuando se administra vía oral, pero no ocurre lo mismo cuando es administrada vía sistémica, lo que sugiere que la principal función inmune innata de NOD2 reside en el intestino, y no en la periferia. Esto podría explicarse por el hecho de que las células de Paneth Nod2 ^{-/-} tienen una expresión muy reducida de criptidinas (alpha-defensinas).

- Maeda et al. (145) han desarrollado ratones knock-in portadores de una mutación análoga a L1007fs en humanos. En contra de la ausencia de respuesta que se aprecia en ratones CARD15 ^{-/-}, los animales homocigotos para la mutación de CARD15 desarrollan una activación incrementada de NFκB en respuesta a MDP y una expresión también incrementada de múltiples genes regulados por NFκB incluyendo IL-6, IL-1β y Cox-2.

Estos datos plantean la posibilidad de que las mutaciones de CARD15 constituyan una ganancia de función.

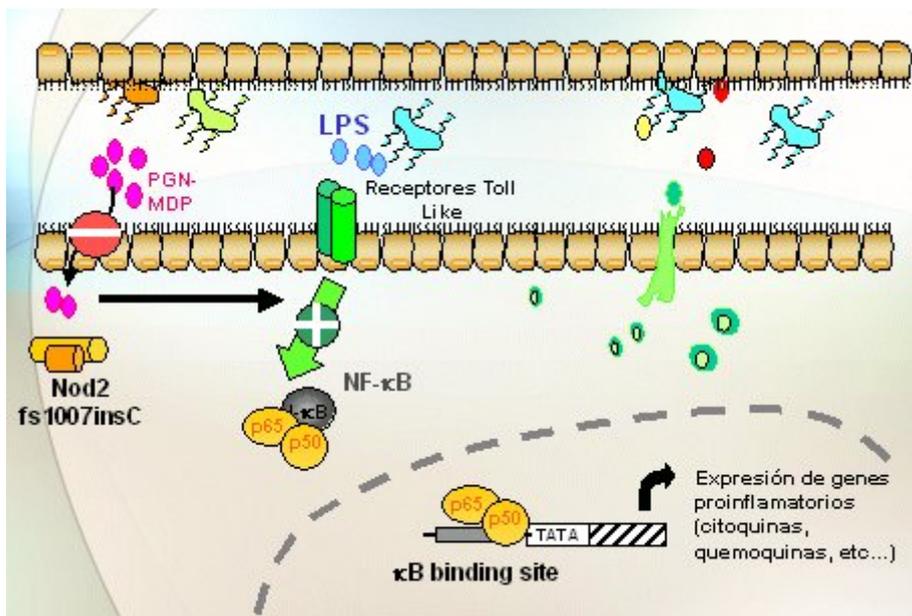


Fig.8. Las variantes NOD2 significan ¿pérdida de respuesta? (144) Watanabe et al. *Nature Immunology* 2004)

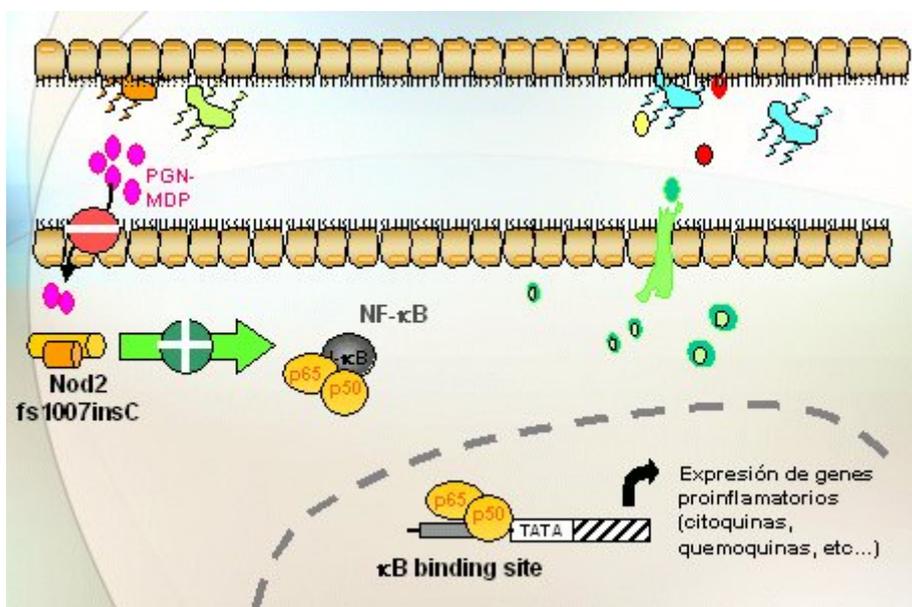


Fig. 9. Las variantes NOD2 ¿significan aumento de la respuesta? (145) Maeda S et al. *Science* 2005)

Se podría plantear un modelo en el cual la expresión de CARD15 por las células de Paneth, células dendríticas de la mucosa, y macrófagos de la lámina propia ayudaría en el reconocimiento de patógenos intracelulares, desencadenando una respuesta antimicrobiana consistente en secreción de criptidina y citoquinas como IL-6, IL-1 β e IL-12. Las células dendríticas en el ileon normalmente reconocen a las bacterias luminales que son transportadas hasta la lámina propia, resultando en una expresión constitutiva de IL-23. En los pacientes con EC portadores de la mutación, el reconocimiento erróneo de las bacterias podría resultar en una pérdida de la capacidad de erradicarlas de forma adecuada y una sobreexpresión de IL-23 y otras citoquinas Th1 que podría conducir a una inflamación crónica.

1.8.2. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (HLA/MHC)

1.8.2.1. HLA/MHC-Conceptos generales

Las moléculas HLA constituyen un elemento clave en el desarrollo de la respuesta inmune específica. Las siglas derivan de “human leukocyte antigen” y son glicoproteínas presentes en la superficie de la membrana de las células, codificadas por un complejo de genes diferentes localizados en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3) (290) extendiéndose en una región amplia que recibe el nombre de “Complejo Mayor de Histocompatibilidad” (MHC).

En el MHC humano se diferencian tres regiones denominadas *clase I*, *clase II* y *clase III*. La región de clase I es la más telomérica, con un tamaño de 1900 kb y codifica para los antígenos clásicos HLA-A, HLA-B y HLA-C, y para los no clásicos HLA-E, HLA-F y HLA-G y otros. La región de clase II se localiza en la parte más centromérica del complejo, cuenta con un tamaño de 900 kb y codifica para las moléculas HLA-D (DR, DP y DQ) además de para las proteínas transportadoras de péptidos TAP1 y TAP2, y de los proteosomas LMP (LMP1 y LMP2) (291, 292). La región de clase III se encuentra entre las dos anteriores, tiene unas dimensiones de 1000 kb y en ella se han identificado 36 genes diferentes que codifican, entre otros, para distintos elementos del complemento, C2 y C4 (C4A y C4B) y el factor Bf del complemento (293, 294); los genes A y B del factor de necrosis tumoral (TNF) y genes de las proteínas de choque térmico (hsp70) (295).

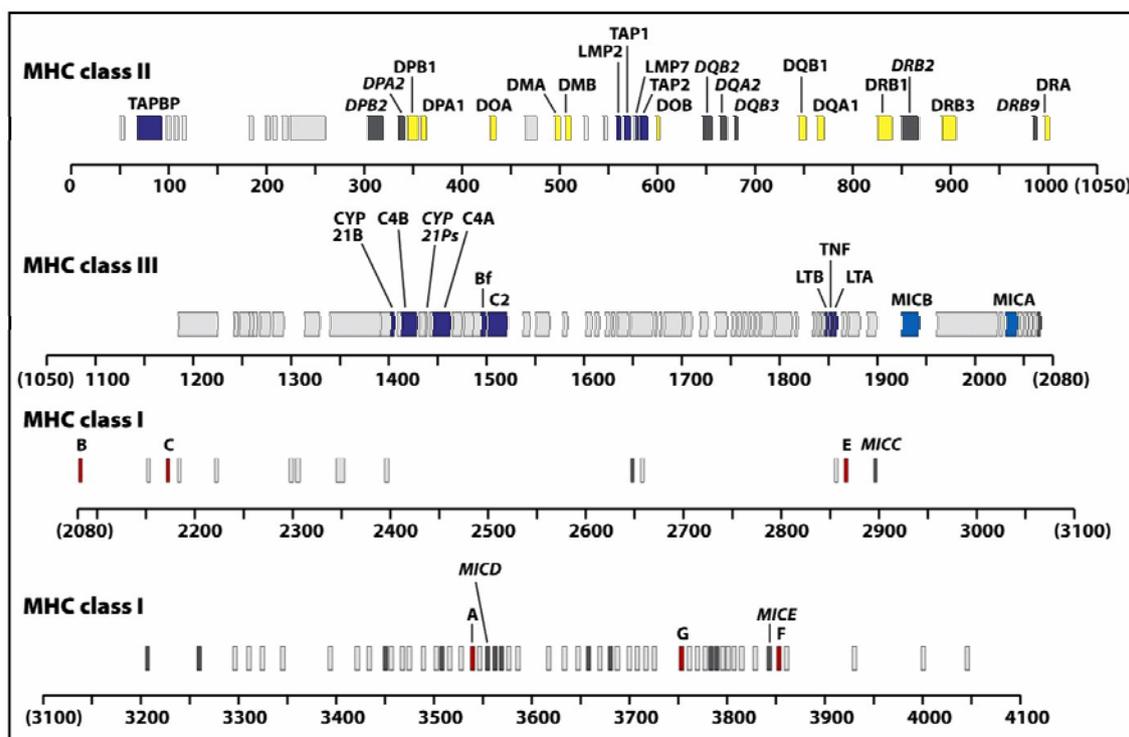


Fig 10 Estructura del Sistema Mayor de Histocompatibilidad Humano (HLA)

El conjunto de genes HLA clase I y clase II se caracterizan por tres propiedades importantes:

- El polimorfismo, es decir, la existencia de un gran número de alelos para cada uno de estos genes.
- La codominancia o expresión de dos alelos de un mismo gen.
- La unión de los genes en el brazo corto del cromosoma 6.

1.8.2.2. Las moléculas de HLA clase I

1.8.2.2.1 Estructura

Las moléculas de clase I son heterodímeros glucoproteicos de la membrana plasmática de las células nucleadas del organismo (296). Están constituidas por dos cadenas, una pesada o α (44 Kd), asociada de forma no covalente a una cadena ligera o β (12 Kd) codificada fuera del MHC, en concreto en el cromosoma 15 (15q21) (297, 298).

La cadena pesada α presenta una porción extracelular, otra transmembrana y una última intracitoplasmática. La porción extracelular tiene tres dominios ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$), constituidos por 90 aminoácidos cada uno, siendo los dos primeros los de mayor polimorfismo. La región transmembrana posee 25 aminoácidos apolares y la intracitoplasmática otros 30 aminoácidos.

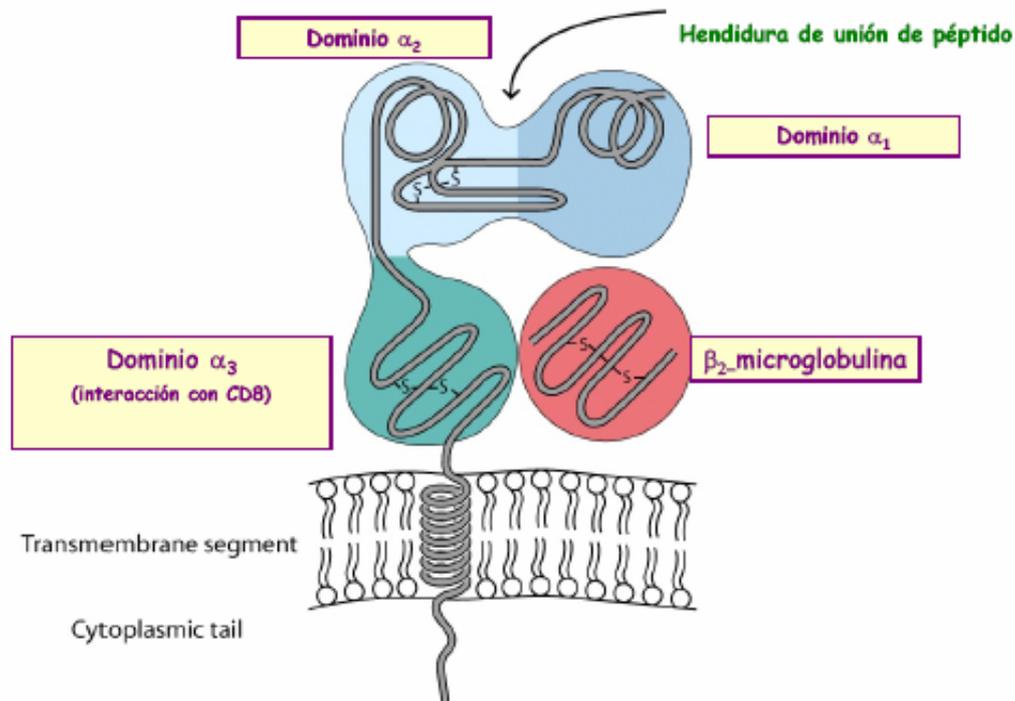


Fig. 11 Estructura molecular HLA-clase I

La cadena ligera β llamada también β_2 -microglobulina, está constituida por 99 aminoácidos y un solo dominio. No presenta polimorfismo alguno dentro de la misma especie. Su localización es extracelular, íntimamente asociada a la cadena pesada (299, 300).

Las moléculas de clase I presentan una conformación caracterizada por la existencia de un surco o hendidura en su extremo aminoterminal, formado por la interacción espacial entre los dominios α_1 y α_2 . Esta hendidura es de vital importancia, ya que va a albergar a los fragmentos de los antígenos proteicos procesados (301), y es de esta manera como el sistema inmune reconoce a los antígenos.

1.8.2.2.2. Organización genética

La región de clase I contiene los tres loci clásicos, HLA-A, -B y -C, cada uno de los cuales codifica para una cadena α diferente de las moléculas de clase I. Todos los genes presentan una organización similar. Comprenden 8 exones separados por sus correspondientes intrones. El primer exón codifica para el péptido líder y el segundo, tercero y cuarto para los dominios α_1 , α_2 y α_3 de la cadena pesada. La región transmembrana es codificada por el quinto exón y la región intracitoplasmática por los exones 6, 7 y 8 (302, 303). El gen de la β_2 -microglobulina contiene cuatro exones, el primero codifica para el péptido líder y los tres siguientes para la molécula completa (304).

1.8.2.2.3. Polimorfismo de la cadena α

Todas las moléculas clásicas HLA de clase I (HLA-A, -B y -C) presentan un grado de polimorfismo en cada uno de los tres loci, entendiendo por polimorfismo las distintas variaciones en secuencia que pueden presentar un gen dentro de la población. Este polimorfismo obedece a cambios de la secuencia en los exones 2 y 3, lo que se va a traducir en variaciones en la secuencia de aminoácidos en los dominios α_1 y α_2 de la cadena pesada (305-307).

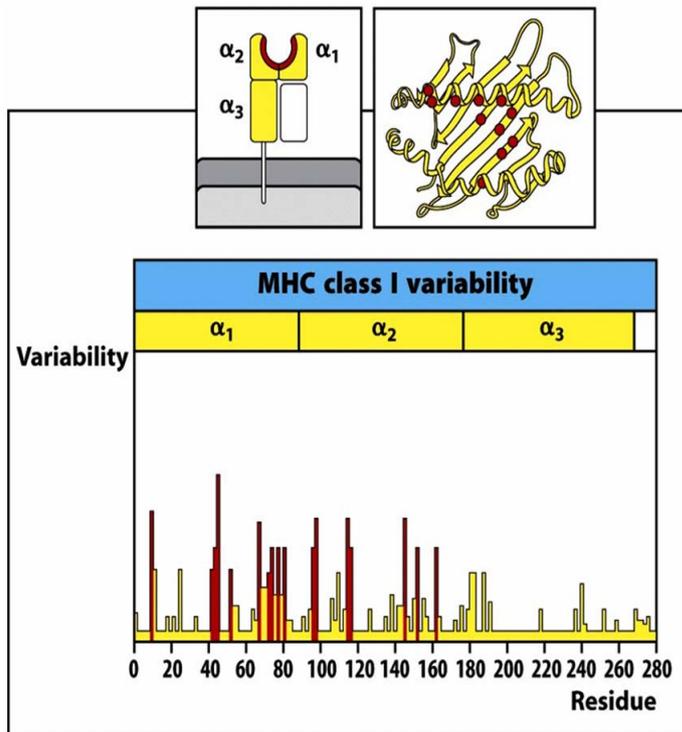


Fig 12. El mayor porcentaje de variabilidad de las moléculas HLA de clase I se localiza en los dominios α_1 y α_2

1.8.2.3. Las moléculas HLA de clase II

1.8.2.3.1. Estructura

Básicamente su estructura recuerda a la de las moléculas de clase I. Son también glicoproteínas de membrana heterodiméricas, que resultan de la asociación no covalente de dos cadenas llamadas α y β , codificadas las dos dentro de la región HLA-D (ver figura). Ambas cadenas presentan la porción extracelular, transmembrana e intracitoplasmática. En ambos casos la porción extracelular está constituida por dos dominios denominados α_1 - α_2 y β_1 - β_2 . En la parte transmembrana existen unos 40 aminoácidos apolares y la región intracitoplasmática posee aminoácidos apolares (308).

Desde el punto de vista cristalográfico y tridimensional, la asociación de las dos cadenas forma también un surco en el extremo aminoterminal de la molécula de clase II, de configuración más abierta que la anterior, pero con la misma función, que es albergar pequeños péptidos antigénicos. El surco se forma entre los dominios α_1 y β_1 (301, 309, 310).

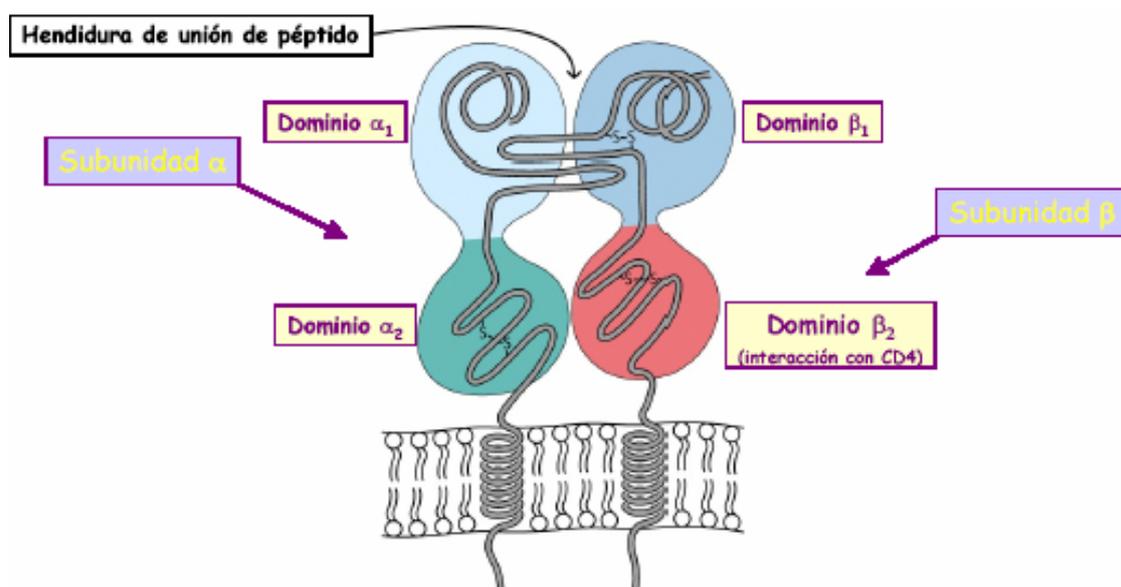


Fig. 13 Estructura molecular HLA-clase II

1.8.2.3.2. Organización genética

Es mucho más compleja que la de clase I, ya que cada uno de los tres loci (DR, DP y DQ) contiene dos genes, A y B, que codifican para las cadenas α y β respectivamente. Además, la subregión DR puede contener genes adicionales responsables de la subdivisión de los genes DR en cuatro grupos DR1, DR8, DR52 y DR53 (311, 312).

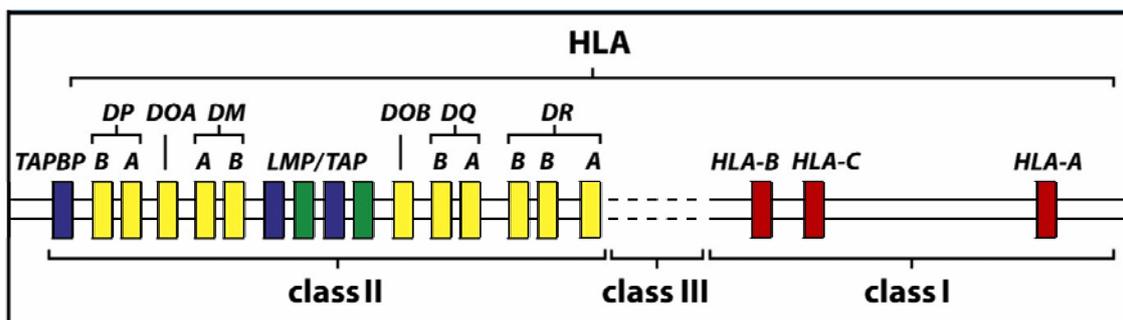


Fig 14. Estructura y distribución génica de la región de HLA

Los genes A y B de los tres loci presentan una estructura similar. Los genes A poseen cinco exones que codifican para el péptido líder, dominio $\alpha 1$, dominio $\alpha 2$, región transmembrana y porción intracitoplasmática. Los genes B poseen seis exones, a excepción de DQB que contiene cinco (308).

1.8.2.3.3. Polimorfismo de las moléculas HLA clase II

A diferencia de las moléculas de clase I, las de clase II presentan polimorfismo en sus cadenas, la α y la β . De las dos cadenas, la más polimórfica para los tres loci es la β , y dentro de ésta, la región $\beta 1$ de la molécula, codificada por el exón II.

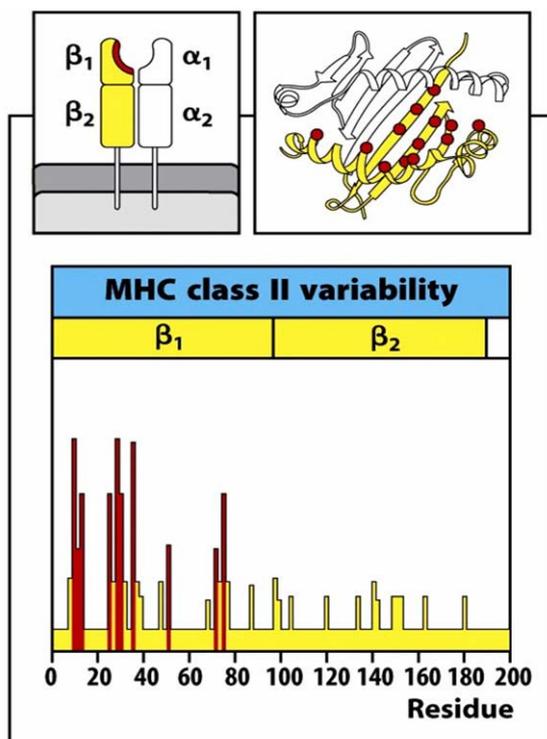


Fig 15. Las variaciones en la secuencia de las moléculas HLA-DR residen en el dominio β_1

1.8.2.4. Función de las moléculas HLA clase I y II

El descubrimiento de los antígenos HLA se debió a los estudios realizados en rechazos de trasplantes de órganos, sin embargo, ha sido más recientemente cuando se han logrado dilucidar su papel en la fisiología normal del sistema inmune.

Las principales células del sistema inmune específico son los linfocitos T CD4+, T CD8+ y linfocitos B. Estas células se caracterizan porque contienen en sus membranas celulares receptores específicos para el antígeno, llamados receptor de células T (TCR) y receptor de células B (BCR). La formación de estos receptores se realiza mediante un

proceso de recombinación somática multigénica al azar, durante la ontogenia de los elementos del sistema inmune específico, en sus correspondientes órganos linfoides primarios y antes de entrar en contacto con el antígeno (313, 314).

Los linfocitos T no van a identificar al antígeno a través de su receptor específico en su forma nativa, sino procesado en pequeños fragmentos peptídicos de un tamaño de 8 a 24 aminoácidos y asociados a las moléculas del MHC de clase I y de clase II (301, 315). Las células T CD8⁺ reconocen al antígeno en el contexto de las moléculas de clase I (316), mientras que las T CD4⁺ lo hacen asociadas a las moléculas de clase II (317). A este proceso se le reconoce con el nombre de **restricción por MHC**.

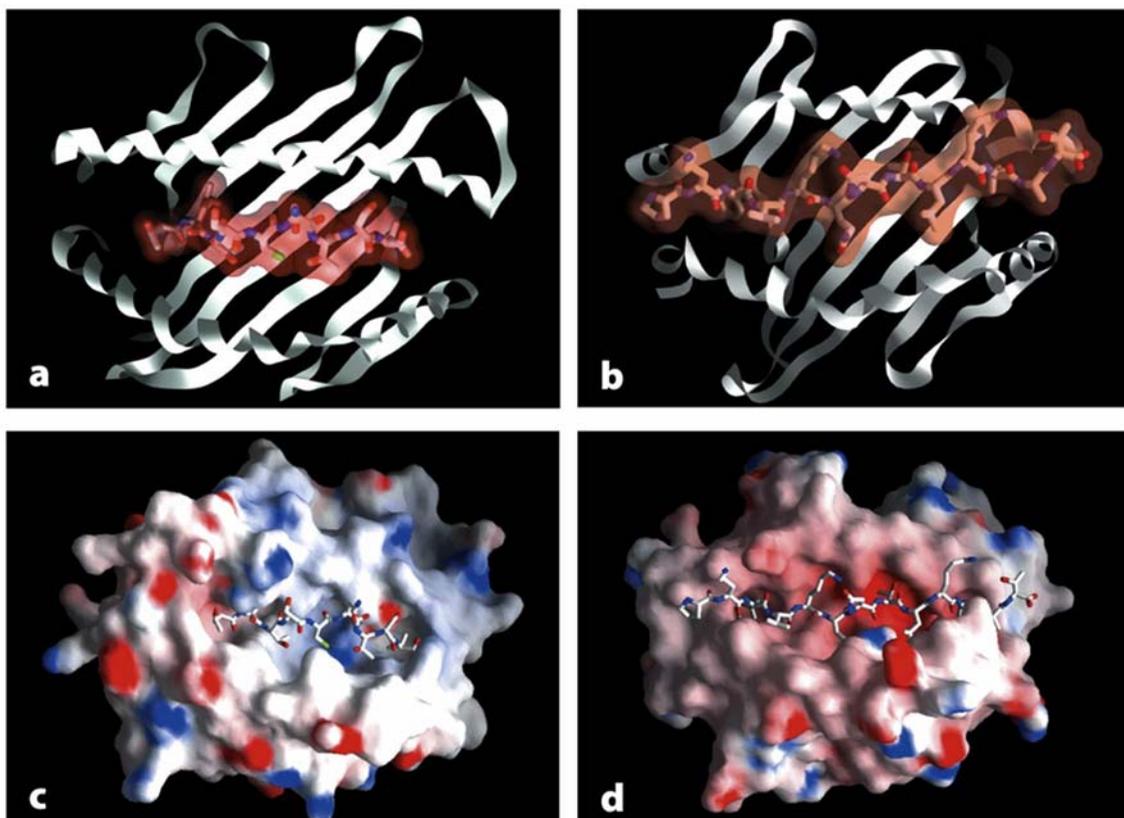


Fig 16. Unión de los péptidos a las moléculas HLA de clase I (a y c) y de clase II (b y c)

Las moléculas del MHC son glicoproteínas de membrana, por lo que su síntesis tiene lugar en los ribosomas adosados a las membranas del retículo endoplásmico rugoso (RER) y siguen la ruta exocítica de la célula, esto es, son transportadas al aparato de Golgi, donde experimentan glicosilaciones y de allí se desprenden en vacuolas que serán exocitadas al medio formando parte de la membrana plasmática. Es simultáneamente a este tránsito cuando tiene lugar el procesamiento y carga del antígeno en el surco o hendidura que forma la estructura de las moléculas de clase I y clase II.

1.8.2.5. Procesamiento del antígeno y ensamblaje a las moléculas HLA de clase II

Tras la síntesis y asociación de las cadenas α y β en el retículo endoplásmico rugoso (RER), el heterodímero se asocia rápidamente con un tercer polipéptido llamado cadena invariante (Ii o CD74) (318). La cadena Ii tiene la función de evitar una carga prematura del antígeno en la molécula de clase II (319).

Durante el transporte de las moléculas de clase II a la membrana plasmática se produce un empaquetamiento en vesículas secretoras dentro del aparato de Golgi. Estas vesículas, en el tránsito a la membrana, se van a fusionar con vacuolas digestivas (fusión de endosoma y lisosomas) formadas tras los procesos de fagocitosis o pinocitosis, y que son los contenedores de antígenos exógenos (320). La bajada del pH del endosoma provoca la liberación de la cadena invariante y hace posible que las moléculas de clase II puedan captar los péptidos derivados de la digestión intracelular de los antígenos exógenos. En este proceso de carga juegan un papel importante las moléculas HLA-DM. Finalmente se produce la expresión de las moléculas del MHC de clase II con el antígeno, en la superficie celular por fusión de las vacuolas con la

membrana plasmática donde serán reconocidas por los linfocitos T CD4+ (321). Como podemos deducir, las moléculas de clase II son portadoras de antígenos exógenos, captados del medio por células presentadoras de antígeno (321).

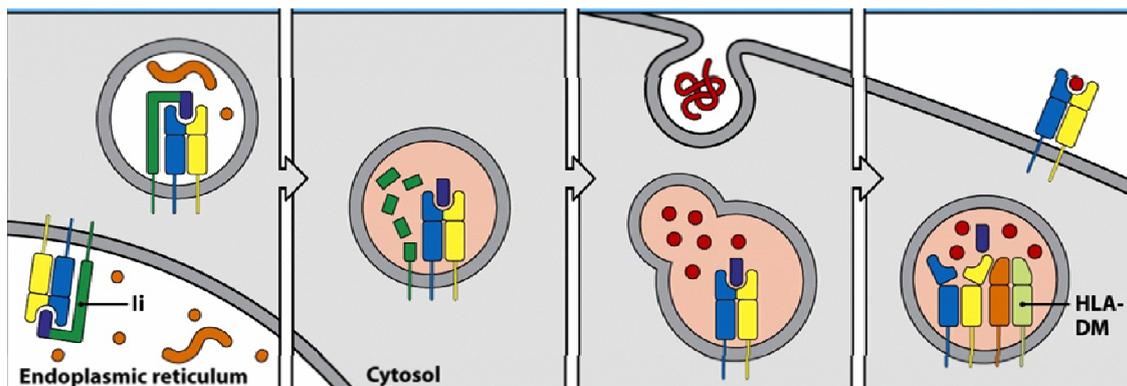


Fig 17. Procesamiento exógeno de los péptidos antigénicos y su unión a las moléculas HLA de clase II

1.8.2.6. Procesamiento del antígeno y ensamblaje a las moléculas HLA de clase I

La síntesis de la cadena pesada α y de la β 2-microglobulina, así como su ensamblaje para formar una molécula de clase I, tienen lugar en el RER; además, en este compartimento es donde se une al péptido antigénico (320)

En este caso los antígenos no son degradados en endosomas, sino en una estructura proteica citoplasmática denominada **proteosoma** (323). El proteosoma consiste en un complejo multimérico de 16 a 20 proteínas de bajo peso molecular con actividad proteolítica amplia. La estructura del complejo es cilíndrica, formada por la asociación de 4 anillos proteicos (324), cada uno de los cuales posee seis o siete subunidades. Algunas de las subunidades son codificadas por genes de clase II, en concreto LMP2 y LMP7 (325, 326); estos genes son inducidos por IFN- γ .

Degradados los antígenos sus fragmentos deben pasar desde el citoplasma al RER para ser cargados en las moléculas HLA clase I. En este proceso intervienen dos nuevos elementos “la proteína de choque térmico” (heat shock protein-hsp), localizada en el cromosoma 6 (327), y las proteínas transportadoras de péptidos antigénicos (TAP), cuyos genes se localizan en la región de clase II del MHC. Las hsp tienen como función conducir a los péptidos citosólicos hasta las proximidades del RER, donde serán captados por las proteínas TAP que son las encargadas directas del transporte de los péptidos del citoplasma al interior del RE (328). Los TAP son intermediarios pertenecientes a la superfamilia ABC de transportadores (292), están codificados por genes localizados en la región de clase II del MHC, llamados TAP1 y TAP2 (329, 330).

Una vez en el RE se une al péptido antigénico al surco o hendidura formado por los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la cadena pesada. Esta unión se estabiliza con la asociación no covalente de la molécula de $\beta 2$ -microglobulina. El complejo así formado pasa a la membrana plasmática celular donde es reconocido por los linfocitos T CD8+.

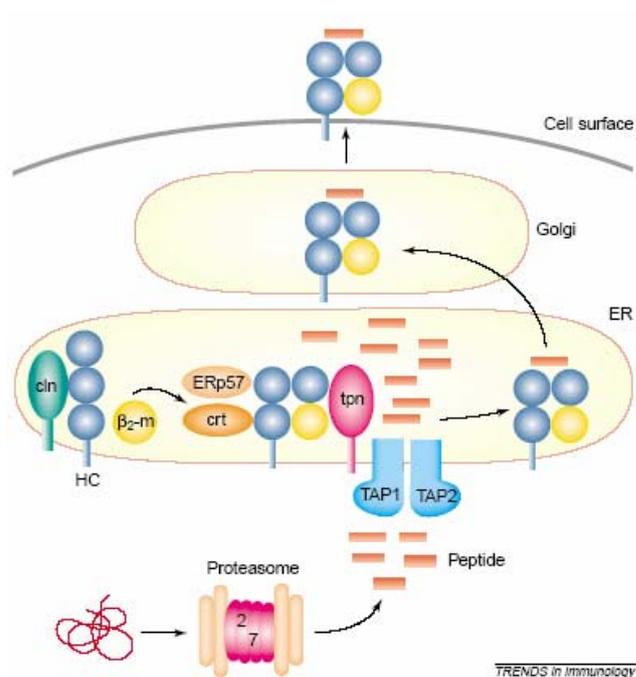


Fig 18. Procesamiento endógeno de los péptidos antigénicos y su unión a las moléculas HLA de clase I

1.8.2.7. Reconocimiento del antígeno por los linfocitos T

Una vez cargado el péptido antigénico en las moléculas HLA de la célula portadora del antígeno o célula presentadora de antígeno (CPA), es reconocido por los linfocitos T a través del complejo del TCR. El complejo TCR está constituido por dos elementos, el TCR y CD3, que van a reconocer el péptido antigénico asociado a las moléculas del MCH, y el transductor de la señal respectivamente.

El TCR es un heterodímero de membrana formado por la asociación de dos cadenas, α y β , unidas de forma covalente por puentes disulfuro (331); las dos cadenas presentan una región variable aminoterminal, una región constante, transmembrana e

intracitoplasmática. Existe una subpoblación de linfocitos T que presentan un heterodímero diferente formado por la asociación de dos cadenas llamadas γ y δ (332).

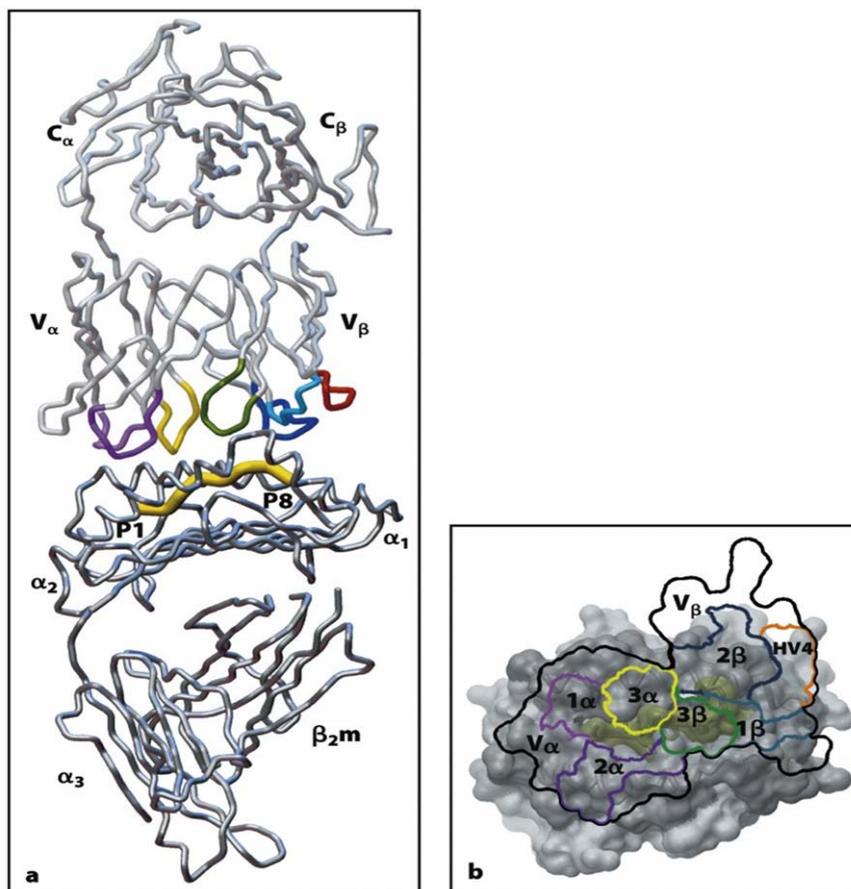


Fig 19. Unión del TCR con el complejo HLA de clase II más péptido (P1-P8)

En cualquier caso, ambos heterodímeros, α/β o γ/δ , se encuentran asociados en la membrana celular con otro complejo multimolecular denominado CD3, que consiste en tres cadenas polipeptídicas diferentes denominadas γ , δ y ϵ . Además, el TCR se asocia a dos cadenas polipeptídicas llamadas ζ (zeta) que forman un homodímero, que se caracterizan por tener una región extracelular constante pequeña intracelular bastante desarrollada portadora de los llamados ITAM's (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Estas secuencias son sustratos y lugar de anclaje de numerosas

tirosina-kinasas, las cuales son rápidamente activadas tras la unión del ligando al TCR y son, por tanto, las encargadas de iniciar la cascada intracelular de señales que conducen a la proliferación y diferenciación de las células T del sistema inmune específico en células efectoras (333).

Además, los linfocitos T $\alpha\beta$ poseen una molécula de clase CD4 o CD8, que son los marcadores fenotípicos de los linfocitos T cooperadores (T CD4+) y T citotóxicos (T CD8+) respectivamente. Estas moléculas son adhesinas (334) que facilitan la interacción entre célula presentadora de antígeno-linfocito y dotan a los linfocitos portadores de una u otra, de la capacidad de reconocer bien a las moléculas de clase I, bien a las moléculas de clase II. El reconocimiento de una u otra clase es debido a que el marcador CD4 interacciona solamente con el dominio $\beta 2$ de las moléculas de clase II (335) y no con las de clase I, mientras que el CD8 lo hace con el dominio $\alpha 3$ de la cadena pesada de la molécula de clase I (336). Por tanto, CD4 y CD8 van a reconocer la porción no polimórfica de las moléculas de clase I y II respectivamente.

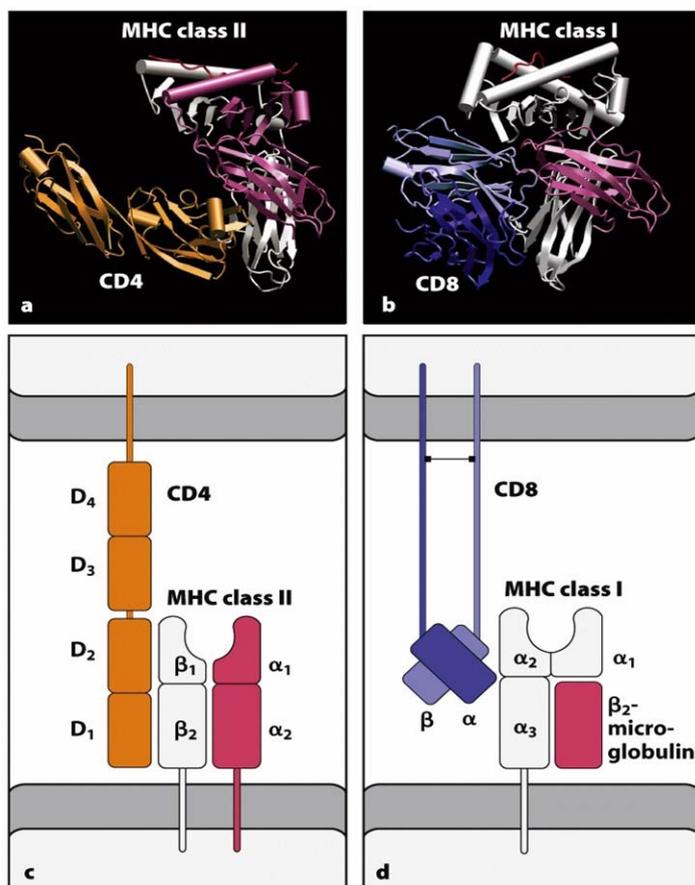


Fig 20. Unión del CD4 a las moléculas HLA de clase II (a y c) y del CD8 a las moléculas HLA de clase I (b y d)

La expresión de CD4 o CD8 en la superficie de los linfocitos T maduros es mutuamente excluyente, lo que permite identificar a las dos subpoblaciones de linfocitos T, desde el punto de vista fenotípico.

La clase de moléculas HLA (I o II), va a conferir una función concreta a las células portadoras. Las moléculas de clase II que alberguen péptidos antigénicos en su gruta, confieren a las células que las portan un papel activador y regulador de los procesos inmunológicos conducentes a la eliminación del antígeno. Las moléculas de clase I que

alberguen péptidos antigénicos, constituyen los marcadores celulares que indican a los elementos efectores del sistema inmune, las dianas sobre las que tienen que actuar.

Esta diferencia funcional se va a traducir en una distribución tisular diferente; las moléculas HLA de clase II van a estar presentes, principalmente, en las llamadas **células presentadoras de antígeno profesionales** (macrófagos, células B, células de Langherans, células dendríticas), cuya función es capturar al antígeno exógeno, procesarlo y ofrecérselo a las células Th del sistema inmune, que lo reconocerán a través de sus receptores específicos (337).

Las moléculas HLA de clase I estarán presentes en la mayoría de las células del organismo, por lo que cualquier célula infectada por un patógeno intracelular (virus, bacteria, protozoo) o cualquier alteración molecular en las células que origine nuevos productos celulares (tumor) será detectada y eliminada por los linfocitos T citotóxicos, al ser estos productos empaquetados en moléculas de clase I y expuestos en la superficie celular. La presencia de moléculas HLA de clase I en las células es señal de inhibición para las células NK.

1.8.3. HLA/MHC y Enfermedad Inflamatoria Intestinal

Los alelos del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (DR y DQ principalmente) confieren diferente susceptibilidad a CD y CU (338, 339).

La principal problemática del estudio de HLA en los pacientes con EII se podría resumir en las tres características intrínsecas de las regiones HLA:

- el fuerte desequilibrio de ligamiento existente
- la alta densidad de polimorfismos, más abundantes que en otras zonas del genoma humano
- la alta concentración de genes en estas regiones

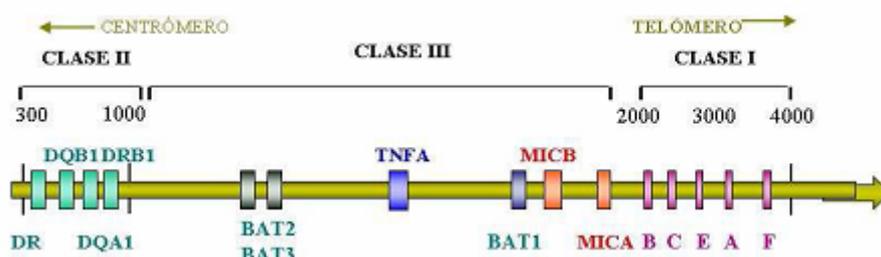


Fig. 21. Localización de genes dentro de la región IBD3 en el cromosoma 6

Dentro de la región del HLA clase I se encuentran los genes MICA y en la de tipo III los que codifican para BAT, MICB y TNF α , todos ellos involucrados en diversa medida en la etiopatogenia de la EII.

Existen diversos marcadores dentro de la región DR y DQ de clase II que determinan diferencias en la susceptibilidad y/o evolución de la enfermedad. Asimismo puede haber efectos HLA privativos de ciertas poblaciones. La región del genoma que codifica para el HLA de clase II se ha llamado también IBD3 por su relación con esta enfermedad,

puesto que sería responsable de entre un 10% y un 33% del riesgo en CD y de un 64%-100% en CU (225).

- **DR1 subtipo 0103 (DRB1*0103):** es el que produce un mayor incremento del riesgo, se relaciona con CU (205, 340-343) así como con la localización colónica en Crohn (344). En el caso de los enfermos de CU portadores de este alelo, generalmente padecen enfermedad de tipo extenso o de mayor gravedad, y frecuentemente presentan manifestaciones articulares (342, 343, 345), de hecho, es un determinante compartido con espondiloartropatías (345, 346). En los pacientes con EC de localización colónica que presentan este alelo, el desarrollo de la enfermedad es más grave, siendo necesario el uso de Infliximab o la colectomía; este alelo está presente en el 32% de los pacientes con EC de colon; se ha asociado con enfermedad perianal y fenotipo fistulizante (347, 348).
- **DR2 (DRB1*01502/DRB1*1501):** el alelo DRB1*01502 se relaciona con una mayor susceptibilidad a padecer CU (338, 341, 3342, 349-353). El subtipo DRB1*1501 aparece asociado negativamente a la enfermedad de Crohn, por lo que parece que confiere protección en todos los grupos étnicos (347,352, 354).
- **DR3:** se asocia negativamente con el riesgo de padecer Crohn (347,355), mientras que los alelos del haplotipo **HLA-DR3*DQ2** determinan protección específica ante la CU distal (205).
- **DR4 (DRB1*0401):** se encuentra dentro de un haplotipo más extenso, el DRB1*0401 DQB1*0301 (339, 353, 355). Determina protección a CU y susceptibilidad a CD, se ha postulado la existencia de un posible efecto epistático con NOD2.
- **DR7 (DRB1*0701):** la presencia de este alelo se asocia a enfermos de Crohn ileales e ileocolónicos sin mutaciones en la región NOD2 (347, 348,355).

- **DR13 (DRB1*1302-DRB3*0301-Cw0802):** se encuentra asociado positivamente con un mayor riesgo de padecer CD (356).

Los alelos de HLA de clase II pueden proporcionar información acerca de la evolución de la enfermedad una vez que se ha realizado el diagnóstico (357).

2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es la caracterización clínica, epidemiológica y genética de nuestra cohorte de pacientes de enfermedad inflamatoria intestinal.

Los objetivos específicos planteados en el trabajo de investigación son los siguientes:

- 1.- Descripción de las características clínico-epidemiológicas de los pacientes de enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.
- 2.- Estudiar la influencia de las variantes del gen *NOD2* a la susceptibilidad a la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.
- 3.- Investigar el papel de los genes HLA de clase II en el riesgo genético a enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.
- 4.- Analizar la relación de las variantes del gen *NOD2* con las características clínicas de la enfermedad de Crohn.

3. PACIENTES

Entre enero de 2004 y febrero de 2005 se incluyeron 534 pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, 272 con enfermedad de Crohn y 262 con colitis ulcerosa.

Para la inclusión en el estudio, el diagnóstico de enfermedad de Crohn o de colitis ulcerosa debía estar confirmado según los datos clínicos, radiológicos y/o endoscópicos, siguiendo los criterios de Lennard-Jones (358). Además, los pacientes tenían que tener un estudio de extensión completo.

Tras informar a los pacientes del objetivo del estudio y previa obtención de un consentimiento informado, se obtuvieron 20 ml. de sangre para extracción de ADN.

Se realizó una revisión sistemática de las historias clínicas, a través de las cuales se recogieron los datos clínicos, radiológicos y endoscópicos según protocolo (ANEXO página 135).

En función de la extensión, los pacientes con colitis ulcerosa se clasificaron en los siguientes grupos: proctitis, colitis izquierda y pancolitis. El patrón evolutivo se determinó siguiendo la clasificación de Hendriksen (3): forma crónica intermitente, forma crónica continua y fulminante.

Los pacientes con enfermedad de Crohn fueron distribuidos según la clasificación de Montreal (5), en función de la edad al diagnóstico (A1: menor o igual a 16 años; A2: entre 16 y 40 años, A3: mayor de 40 años), localización (L1 *ileal o ileocecal*; L2 *colónica*; L3 *ileocolónica*; a estas tres localizaciones se puede sumar una modificación -L4 *gastrointestinal alta*- que indica la afección, añadida a cualquiera de las tres anteriores, de cualquier tramo proximal al ileon terminal) y patrón evolutivo (B1 inflamatoria; B2 estenosante y B3 penetrante; a esta categoría puede sumarse una modificación (p) que indica que al patrón predominante se le añade la existencia de *enfermedad perianal*).

Como controles se emplearon a 450 individuos anónimos del centro de transfusiones sanguíneas, que fueron seleccionados bajo los criterios de edad y sexo para que resultasen lo más parecidos posibles a la población de enfermos.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1.1. EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción del DNA se llevó a cabo con el kit comercial (QIAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Inc. USA).

1.1) Material

- PBS - Proteinase K - Buffer AL (buffer de lisis) - Etanol 70%- Buffer de lavado (AW1, AW2)- Buffer de elución (AE)

1.2) Método

Se mezcla en tubo “ependorf” 20µl de proteinasa K (lisis), 200µl de sangre tratada con EDTA y 200µl de buffer AL (buffer de lisis). Esta mezcla se incuba a 56° durante 10 min. Tras la incubación, se añaden 200µl de etanol y se homogeniza. Posteriormente se centrifuga a 8000rpm durante 1 min. El sobrenadante se vierte a una columna de silica-gel y se centrifuga a 8000rpm durante 1min. Se desecha el tubo y se añade a la columna 500 µl de buffer AW1. Se centrifuga de nuevo a 8000rpm durante 1 min. Se desecha de nuevo el tubo y se pasa la columna a un nuevo tubo al que se añade 500µl de buffer AW2. Se centrifuga a 13000rpm durante 3 min. Los dos buffers de lavado utilizados, AW1 y AW2, aumentan la pureza del DNA extraído. Las condiciones de lavado también aseguran la completa eliminación de cualquier contaminante residual sin afectar a la unión del DNA. La columna se pasa a un ependorf y se añade 200 µl de tampón de elución. Se centrifuga a 8000rpm durante 1 min y el DNA obtenido se almacena a 4°C.

4.1.2. CUANTIFICACIÓN DE DNA.

Para la cuantificación se utiliza un espectrofotómetro ultravioleta a una longitud de onda de 260nm. Se realiza una dilución 1/20 y medimos la absorbancia o densidad

óptica (D.O) de la muestra. Conocemos que 1 D.O corresponde a 50 µg/ml. La absorbancia a 260nm corresponde a DNA, mientras que la absorbancia a 280nm corresponde a la concentración de proteínas. La relación de la D.O. a 260nm/ D.O. a 280nm es el índice de pureza de la muestra, aconsejándose que sea superior a 1.5; mientras que la lectura inversa, 280/260 debe ser de 0.5. Se obtiene la concentración de DNA directamente en µg/µl, y lo hace multiplicando la lectura obtenida a 260nm por 50 (ya que una unidad de absorbancia a 260nm se corresponde con una solución de DNA de 50µg/ml) y por la dilución.

4.2. POLIMORFISMOS DEL GEN CAR15

En la detección de las variantes polimórficas del gen CAR15 se utilizaron dos técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dependiendo de la variante a analizar:

a. Variante 1007 finsC se analizó mediante PCR más digestión con enzimas de restricción (RFLP). Los cebadores utilizados fueron los descritos por **Van Hell (Am J Med Gent 2002; 111:253-259)**, forward 5'-GGCAGAGCCTCCTGCAGGGC- 3' y reverso 5'-CCTCAAAATT CTGCCATTCC-3'. El producto amplificado de 152 pares de bases se digirió con la enzima de restricción Apa I que daba lugar a dos fragmentos de 128 bp y 24 bp en el caso de individuos homocigotos para la delección y de tres fragmentos: 152 bp, 128 bp y 24 bp en el caso de individuos heterocigotos. En los individuos en los que no estaba presente la mutación no se producía corte de la enzima y aparecía un fragmento de 158 bp.

b. Las variantes R702W (rs2066844) y G908R (rs2066845) se analizaron mediante PCR a tiempo real con sondas Taqman. En esta técnica, la mezcla de PCR contiene varias sondas –dos por lo general complementarias del fragmento objeto de amplificación, cada una de ellas correspondiente uno de los alelos del polimorfismo a estudiar. Estas sondas están marcadas en su extremo 5' con un fluoróforo (FAM/VIC/HEX...) que emiten en diferentes longitudes de onda: es la llamada emisión o fluorescencia primaria. En el extremo 3' llevan una molécula (*quencher*) que enmascara la emisión fluorescente, al capturar la energía del fluoróforo gracias a un fenómeno de resonancia, emitiendo una radiación secundaria, de longitud de onda menor que el fluoróforo marcador, que se puede discriminar fácilmente de la emisión primaria del marcador fluorescente libre en el medio. La adición final de un grupo fosfato en 3' tras el *quencher* impide que las sondas puedan funcionar como cebadores. El *quencher* más utilizado inicialmente fue TAMRA, pero en la actualidad la mayoría emplean moléculas no fluorescentes. La mezcla de reacción contiene una tercera molécula fluorescente (habitualmente ROX) que permite cuantificar el efecto de las variaciones de temperatura sobre la emisión fluorescente, facilitando la interpretación al sustraer estas modificaciones de fondo en la lectura. Durante la amplificación, la Taq Polimerasa (Ampli Taq Gold), en su elongación, llega a la zona donde está hibridando la sonda. La actividad exonucleasica 5'-3' de la enzima digiere la sonda liberando sus nucleótidos con la consiguiente liberación del fluorocromo en 5' separándolo del *quencher* en 3', lo que permite detectar la emisión primaria. Si una determinada muestra no contiene el alelo correspondiente, la sonda mantendrá su integridad, y no se detectará la fluorescencia primaria de la sonda en cuestión.

Las características del programa de PCR fueron las siguientes:

- 1) desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min
- 2) 40 ciclos de amplificación:
 - 15 s a 93°C (desnaturalización)
 - 60 s a 65°C (hibridación)

Para determinar los umbrales de detección para cada alelo de los marcadores estudiados, se lleva a cabo un análisis de discriminación alélica con los datos obtenidos de la lectura a punto final de las intensidades de fluorescencia obtenidas para cada población. Posteriormente se interpretaron las curvas cuantitativas de las lecturas correspondientes a la PCR en tiempo real para asignar a cada individuo su genotipo. Estas lecturas se llevaron a cabo en un sistema termociclador-detector *Applied Biosystems 7500 o 7900 HT Fast Real Time PCR system*.

4.3. TIPAJE GENÓMICO HLA DE CLASE II

4.3.1. Fundamento.

Para genotipar una muestra en HLA de clase II se realiza una amplificación del exón 2 de DRB y DQB1 y después se hibrida con sondas de oligonucleótidos específicas de alelo (SSO) para las distintas variantes de DRB y DQB1. Para detectar donde se ha producido la hibridación se procede al revelado.

El amplificado, se desnaturaliza para separar la doble cadena de DNA, y se añade a una bandeja donde se han colocado, inmersas en una solución astringente, las tiras reactivas (Dynal RELI®SSO Typing Trays) que contienen fijados por una membrana de nylon las distintas secuencias específicas de oligonucleótidos y que al añadir el producto de PCR, van a capturar las secuencias complementarias. Los primeros incluidos en los

amplificados están marcados con biotina. Se añade estreptavidina que esta unida a un complejo anticuerpo antiperoxidasa-peroxidasa que se fijará a la biotina. Y finalmente se añade el sustrato TMB (tetrametilbencidina) y peróxido de hidrógeno.

Por la acción de la peroxidasa el sustrato cambia de color y precipita donde se ha producido la hibridación y de esta forma aparecen una serie de bandas azules con un patrón específico de cada combinación de alelos. En los distintos pasos seguidos en el proceso de detección seguimos el protocolo y los reactivos incluidos en el kit de detección (DynaL RELI® SSO Strip Detection Reagent Kit para 250 muestras referencia 802.250). El proceso de hibridación, lavados y revelado de las bandas se lleva a cabo de forma automática con el instrumento Dynal AutoRELI 48 referencia 899.05). En la tira reactiva se observa un patrón de bandas que se interpreta con un programa informático (DynaL RELI® SSO Pattern Matching Program 5.1) que nos da el tipaje genómico de la muestra.

4.3.2. Amplificación del exón2 de DRB y DQB1

4.3.2.1.- Se utilizan para cada reacción de PCR:

15µl de la solución de ClMg_2

30µl de la mezcla que contiene la Taq polimerasa, los DNTPs, los cebadores marcados con biotina para DRB o DQB1 y el tampón específico.

15 µl de DNA (13-14ng/ µl. 200ng por reacción)

4.3.2.2.- Los tubos de PCR con las mezclas se amplifican según el siguiente Programa del Ciclador Térmico (Perkin Elmer 9600):

a) 96°C 60 segundos para desnaturalizar el DNA.

b) 35 ciclos de: 96°C 15 sec; 58°C 45sec y 72°C 15sec.

c) 72°C 5 minutos

d) Mantenimiento a 15°C

4.3.2.3.- Finalizado el programa de amplificación en el ciclador térmico. A cada tubo se añaden 60 µl de la solución desnaturalizante (3% EDTA, 1.6% hidróxido sódico y azul de timol) y se deja incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se pueden dejar fuera del frigorífico durante 1 o 2 horas si en ese tiempo se va a realizar la hibridación. Si esto no es así se pueden conservar a 2-8°C durante una semana y a -20°C durante 3 meses.

4.3.3. Hibridación y detección de las bandas en las tiras que contienen las sondas.

4.3.3.1.) Reactivos:

a) Concentrado de SSPE: Solución de fosfato sódico con ClNa, EDTA y 1.0% de ProClin 150 como conservante.

b) Concentrado de SDS. Sulfato dodecil sódico y 1.0% de ProClin 150 como conservante.

c) Conjugado de Esteptavidina-HRP: Conjugado de peróxidasa de rábano unida a la esteptavidina en una solución ACES con ClNa y 1.0% de ProClin 150 como conservante.

d) Substrato A: Una solución de citrato que contiene 0.01% H₂O₂ y 0.1% de Proclin 150 como conservante

e) Substrato B: Solución 0.1% de 3, 3', 5, 5'-Tetrametilbenzidina (TMB) en 40% de dimetilformamida (DMF).

Todos estos reactivos se pueden conservar a 2-8°C hasta la fecha de caducidad

4.3.3.2.) Soluciones para la hibridación, los lavados y el revelado de las bandas en las tiras que contienen las sondas (SSO (oliginucleótidos específicos de secuencia))

a) Tampón de hibridación: Mezclar en el orden siguiente: Agua desionizada, Concentrado de SSPE y Concentrado de SDS. Mezclar bien y calentar a 50°C para asegurarse que todos los componentes se han disuelto. Se puede mantener tres meses a temperatura ambiente. Ver tabla adjunta para calcular los volúmenes de cada componente.

b) Tampón de lavado se procede igual que con el de hibridación salvo que las proporciones de los componentes son diferentes.

c) Tampón de citrato. Llevar a 1X con agua desionizada, la solución de citrato concentrada a 20X

Nº Muestras	50	100	150	200	250
T. Hibridacion	355ml	710ml	1065ml	1420ml	1775ml
Agua desioniza	275ml	550ml	825ml	1100ml	1375ml
SSPE Concent	71ml	142ml	213ml	284ml	355ml
SDS Concent	9ml	18ml	27ml	36ml	45ml
T. Lavado	1354ml	2708ml	4062ml	5416ml	6770ml
Agua desioniza	1279ml	2559ml	3838.5ml	5118ml	6397.5ml
SSPE Concent	66.7ml	135.4ml	203,1ml	270.8ml	338.5ml
SDS Concent	6.8ml	13,6ml	20.4ml	27.2ml	34ml
T Citrato	540ml	1080ml	1620ml	2160ml	2700ml
Agua desioniza	513ml	1026ml	1539ml	2052ml	2565ml
Citrato Concent	27ml	54ml	81ml	108ml	135ml

Tabla 4.

4.3.4. Procedimiento.

Para la hibridación, lavados y reacción de revelado se utiliza un equipo automático que es el AUTORELI 48 con capacidad para 48 muestras.

Este equipo contiene reservorios para los distintos reactivos . Los volúmenes para 48 muestras son los siguientes: 1) T Hibridación (300ml); 2) T Lavado (960ml); 3) Conjugado (T Lavado 275.6ml + 832µl de Estreptavidina-HRP); 4) Substrato de trabajo (228.8ml substrato A y 57.2ml de substrato B) ; 5) Tampón de citrato (450ml) y 6) 470 ml de agua desionizada. Una vez que se han preparado y colocado en sus recipientes los reactivos, se numeran y colocan las tiras que contienen las sondas en celdas individuales de una bandeja con capacidad para 48, como máximo, de muestras. A continuación se coloca en un pocillo de la celdilla el amplificado correspondiente a cada tira y al terminar se lleva la bandeja a una plataforma del AUTORELI se ajusta y fija y después de cerrar la tapa se inicia el programa.

El programa consta en primer lugar de un proceso de hibridación a 50°C de 30 minutos; por ello se debe colocar el tampón de hibridación precalentado a esa temperatura. Después de los lavados se incuba a temperatura ambiente con la solución del conjugado y tras una nueva serie de lavados se procede a la incubación con el substrato, con un paso previo en citrato y finalmente las tiras se lavan en agua y se dejan en citrato. Todo este proceso es automático, inyectándose y aspirándose los reactivos sucesivamente de dos en dos. El equipo tiene un tanque para los desechos que se cambia cada 10-12 ciclos de hibridación. Finalizado el programa se saca la bandeja y las tiras se extraen de las celdillas y se secan con papel de filtro.

4.3.5. Asignación del Tipaje genómico HLA de clase II

Las bandas después de pasar por el AUTORELI presentan un determinado patrón de bandas de color azul cuya interpretación va a permitir realizar la asignación del tipaje HLA genómico. La interpretación del patrón de bandas de las tiras se realiza con un programa de ordenador que es el PMP v5.3 después de importar la imagen de las tiras por medio de un scanner

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de las diversas pruebas fueron exportados para la creación de una base de datos y posterior análisis de la misma con el software SPSS 13.0 (Statistical package for Social Sciences). Se utilizaron así mismo los programas informáticos Stadistics v.5.0 y EpiInfo.

Para la descripción de variables cuantitativas se utilizó la media y la desviación estándar de la media.

Las frecuencias genóticas y alélicas para los estudios caso-control se analizaron mediante tablas de contingencia utilizando el estadístico Chi-cuadrado o en su caso -con valores esperados menores de 5- empleando el test exacto de Fischer. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos. En caso contrario, se fijó una potencia β mayor o igual que 0,8 para aceptar la hipótesis nula de igualdad de proporciones.

Los intervalos de confianza al 95% de las odds ratio (ORs) se estimaron por el método de Cornfield calculado por el paquete informático Epi Info v6.02 (CDC, Estados Unidos/ WHO, Suiza).

ANEXO**HOJA DE RECOGIDA DE DATOS**

NOMBRE:

FECHA DE NACIMIENTO:

N. AFILIACIÓN:

N. HISTORIA:

TFNO:

DIRECCIÓN:

SEXO: V / M

ESTADO CIVIL: soltero / casado /separado/ viudo

PESO:.....Kg.

TALLA.....m.

FUMADOR:

SI

NO

Ex-fumador ¿Fumaba al
diagnostico? SI / NO

ANTICONCEPTIVOS: SI / NO

ANTECEDENTE FAMILIARES:

EEII: NO / SI: E. CROHN / C.ULCEROSA

FAMILIAR:.....

ENFERMEDADES AUTOINMUNES:

Familiar:

- | | | |
|--------------------------|---------------------------|-------|
| <input type="checkbox"/> | Diabetes Mellitus tipo 1. | |
| <input type="checkbox"/> | Patología Tiroidea | |
| <input type="checkbox"/> | Enf Celiaca. | |
| <input type="checkbox"/> | CEP | |
| <input type="checkbox"/> | Esclerosis múltiple | |
| <input type="checkbox"/> | Psoriasis | |

EEII:

ENF. DE CROHN	
COLITIS ULCEROSA	

FECHA DIAGNÓSTICO:

DIAGNÒSTICO:

TRANSITO INTESTINAL	SI / NO	
ENEMA OPACO	SI / NO	
COLONOSCOPIA	SI / NO	
CONFIRMACIÓN HISTOLÒGICA	SI / NO	

COLITIS ULCEROSA		
LOCALIZACIÒN:	PROCTITIS	
	COLITIS IZQUIERDA	
	PANCOLITIS	
PATRÒN EVOLUTIVO:	CRÒNICA INTERMITENTE	
	CRÒNICA CONTINUA >6meses	
	AGUDA FULMINANTE	

ENF DE CROHN: (Clasificación de MONTREAL)			
A. EDAD al diagnóstico		A1. < 16 años.	
		A2. 16 - 40 años.	
		A3. > 40 años	
L. LOCALIZACIÒN		L1. ILEON TERMINAL	Con o sin extensión a ciego
		L2. COLON.	Incluye recto. Excluye ileon terminal
		L3. ILEO-COLON.	Ileon distal + colon
		L4. GI ALTO.	
B. CONDUCTA CLINICA		B1. NO ESTENOSANTE NO PENETRANTE	= Inflamatoria
		B2. ESTENOSANTE.	Estenosis + dilatación preestenótica ò síntomas obstructivos SIN Enf. Penetrante
		B3. PENETRANTE.	Incluye masa y absceso.
		p	Afectación perianal

ENFERMEDADES ASOCIADAS:

COMPLICACIONES ASOCIADAS:**MANIFESTACIONES EXTRADIGESTIVAS:**

OSTEOMUSCULARES	ARTRITIS PERIFERICA	
	SACROILEITIS	
	ESPONDILITIS ANQUILOSANTE	
PIEL	ERITEMA NUDOSO	
	PIODERMA GANGRENOSO	
	LESIONES ORALES	
HEPATOBILIAR	CEP	
	GRANULOMATOSIS	
	COLELITIASIS	
	ESTEATOSIS	
OJO	IRITIS / UVEITIS	
	EPIESCLERITIS	
ENF. TROMBOEMBOLICA		
AMILOIDOSIS		

NUMERO DE INGRESOS DEBIDOS A EEII:

CIRUGÍA: NO / SI : INTERVENCIÓN REALIZADA:
FECHA:

TRATAMIENTO:

FÁRMACO	PRE VIO	INDICACION	EFFECTOS 2º	ACTUAL / DOSIS	DURACION	RESP UESTA
CORTICOIDES	SI / NO					SI / NO
SALICILATOS	SI / NO					SI / NO
AZT	SI / NO					SI / NO
CICLOSPORINA	SI / NO					SI / NO
INFLIXIMAB	SI / NO					SI / NO

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS.

Se han incluido en el estudio un total de 534 pacientes, 272 con enfermedad de Crohn y 262 con colitis ulcerosa.

Enfermedad de Crohn:

La edad media al comienzo de la enfermedad de los pacientes fue de 29.2 años distribuyéndose (A1<16, A2 entre 16 y 40 y A3>40 años) de la siguiente manera: A1 9.57%, A2 69.11% y A3 21.32, con una duración media de la enfermedad de 7.9 años, existiendo un ligero predominio del sexo femenino sobre el masculino (52% en mujeres y 48% hombres).

En cuanto al hábito tabáquico, el 49% no ha fumado nunca y el 51% restante son ex-fumadores o fumadores actuales.

La localización de la enfermedad se distribuye de la siguiente forma: 41.91% ileal (L1), 21.70% colónica (L2), y 33.46% ileocolónica (L3); L1+L4 0.36%, L2+L4 1.10% y L3+L4 1.47%.

Según el patrón evolutivo (fenotipo), los pacientes se dividen en: B1 (no penetrante no estenosante) el 45.58%, B2 (estenosante) el 19.48% y B3 (fistulizante o penetrante) el 20.58%. En cuanto a la enfermedad perianal, B1p el 5.14%, B2p el 0.73% y B3p el 8.45%.

TABLA 5. Clasificación de Montreal para la Enfermedad de Crohn.**EDAD AL DIAGNÓSTICO (A)****A1** 16 años o menos**A2** 17-40 años**A3** mayor de 40 años**LOCALIZACIÓN (L)****L1** Íleon terminal L1+L4 (íleon terminal + tracto digestivo alto)**L2** Colon L2+L4 (Colon + tracto digestivo alto)**L3** Ileocolónica L3+L4 (ileocolónica + tracto digestivo alto)**L4** Tracto digestivo alto**PATRON CLÍNICO (B)****B1** No-estenosante, no fistulizante. Inflamatorio**B1p** (inflamatorio con afectación perianal asociada)**B2** Estenosante**B2p** (estenosante con afectación perianal asociada)**B3** Fistulizante**B3p** (fistulizante con afectación perianal asociada)

De los 272 pacientes con E. de Crohn, el 43.3% presentaron manifestaciones extradigestivas, el 32% requirieron intervención quirúrgica, el 46.4% necesitaron tratamiento inmunosupresor (fundamentalmente AZA/6-MP) y en un 16.7% fue necesario el uso de biológicos.

Colitis ulcerosa:

De los 262 pacientes con colitis ulcerosa, la edad media al diagnóstico es de 32.3 años, con una duración media de la enfermedad de 8.1 años; el 51% pertenecen al sexo masculino y el 49% al femenino; el 52% de los pacientes no son fumadores y el 48% restante son ex fumadores o fuman actualmente.

Según la localización de la enfermedad, el 17.18% tiene una proctitis (E1), el 41.22% colitis izquierda (E2) y el 41.60% pancolitis (E3).

TABLA 6. Clasificación de Montreal para la Colitis Ulcerosa**Extensión (E)**

E1) Proctitis ulcerosa: afección limitada al recto (el límite superior de la inflamación no supera la unión rectosigmoidea)

E2) Colitis izquierda (o colitis distal): afección limitada al colon izquierdo (el límite superior de la inflamación no supera el ángulo esplénico)

E3) Colitis extensa (pancolitis): afección que se extiende más allá del ángulo esplénico.

Gravedad (S)

S0) Colitis en remisión (Colitis silente): no hay síntomas de la enfermedad.

S1) Colitis leve: cuatro o menos deposiciones al día con sangre, sin fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia ni aumento de la VSG

S2) Colitis moderada: criterios intermedios entre leve y grave, siempre con signos de afección sistémica leves

S3) Colitis grave: seis o más deposiciones diarias con sangre, fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia y aumento de la VSG, a menudo con signos de afección (“toxicidad”) sistémica grave.

Entre los pacientes con colitis ulcerosa, el 42% presentan manifestaciones extraintestinales, siendo las más frecuentes las articulares (36%), seguidas por las manifestaciones cutáneas (14%) y en menor número las oculares (4%).

El 23.28% ha precisado el uso de tratamiento inmunosupresor y el 5.34% cirugía.

5.1.1 EDAD AL DIAGNÓSTICO, SEXO Y TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.

La edad media al diagnóstico de la enfermedad ha sido de 29.2 años para la enfermedad de Crohn, y algo superior para los pacientes con colitis ulcerosa, 32.3 años.

Existe un predominio del sexo femenino en la EC con un 52%, pero en la CU predomina ligeramente el sexo masculino (51%).

El tiempo medio de seguimiento ha sido de 7.9 años para los pacientes con Crohn y 8.1 para la colitis.

5.1.2 FUMADORES.

El hábito de fumar fue algo superior en los pacientes con EC (50.8%), teniendo en cuenta a los fumadores actuales y exfumadores, frente a un 48.1% de fumadores y exfumadores en la colitis ulcerosa.

5.1.3 ANTECEDENTES FAMILIARES DE EII.

El porcentaje de afectación familiar es de un 10.6% en los pacientes con EC y de un 11.45% en los pacientes con CU; el 89.4% y el 88.55% de los pacientes incluidos en el estudio son casos esporádicos sin antecedentes familiares de EC y ni de CU.

Familiares afectados EC	N	%
si	29	10.66
no	243	89.34
Total	272	100

Tabla 7 y 8. Familiares afectos en EC y CU

Familiares afectados CU	N	%
si	30	11.45
no	232	88.55
Total	262	100

5.1.4 NECESIDAD DE CIRUGÍA

La necesidad de cirugía ha sido muy superior en los pacientes con EC, en el 32% ha sido necesario realizar algún acto quirúrgico, fundamentalmente resecciones intestinales (ileal, ileocólica o colónica) considerando en un grupo aparte las intervenciones relacionadas con enfermedad perianal (fistulectomías, colocación de setones).

Cirugía en EC	N	%
Si	87	32.0
No	185	68.0
	272	100.0

Tabla 9. Cirugía en EC

En la colitis ulcerosa se han intervenido solamente 15 pacientes (5.72%), realizándose una colectomía total con reservorio ileoanal en J, debido a colitis grave y refractariedad al tratamiento médico, pero en 3 pacientes la intervención se ha realizado al diagnosticarse cáncer de colon.

Cirugía en CU	N	%
Colectomía	15	5.72
No	247	94.28
Total	262	100

Tabla 10. Cirugía en CU

5.1.5 NECESIDAD DE INMUNOSUPRESORES Y TRATAMIENTO BIOLÓGICO

En el 46.32% de los pacientes con EC ha sido necesario el tratamiento inmunosupresor, generalmente AZA/6-MP (43.75%) como tratamiento de elección, por córticodependencia o córticorefractariedad o presencia de fístulas; en caso de alergia o intolerancia a este fármaco utilizamos en segundo lugar el metotrexato (2.57%).

En la colitis ulcerosa la necesidad de tratamiento inmunosupresor ha sido menor, 24.05% frente al 75.95% en que no ha sido necesario.

EC	N	%
Azatioprina	119	43.75
Metotrexato	7	2.57
No	146	53.68
Total	272	100

Tabla 11 y 12. Inmunosupresores en EC y CU

CU	N	%
Azatioprina	62	23.67
Metotrexaro	1	0.38
No	199	75.95
Total	262	100

El 16.55% de los pacientes con EC han sido candidatos al tratamiento biológico con Infliximab o Adalimumab y el 5.73% de los pacientes con CU, generalmente debido a refractariedad a la AZA y por presencia de fístulas.

T. biológico en EC	N	%
Si	45	16.55
No	227	83.45
Total	272	100.0

T. biológico en CU	N	%
Si	15	5.73
No	247	94.27
Total	262	100.0

Tabla 13 y 14. T. biológico en EC y CU

5.1.6 MANIFESTACIONES EXTRADIGESTIVAS

El 42% de pacientes con CU presentan manifestaciones extradigestivas, siendo las más frecuentes las articulares (artritis, artralgias, sacroileítis y espondilitis anquilosante) presentes en el 32%, seguidas a continuación por las manifestaciones cutáneas (14.12%) y oculares (3.81%).

MANIFESTACIONES EXTRA EN CU	CU=262	%
ARTICULARES	84	32
CUTANEAS	37	14.12
OCULARES	10	3.81

Tabla 15. Manifestaciones extradigestivas en CU

En los pacientes con EC se han presentado manifestaciones extraintestinales en el 43.3% de los casos, siendo las más frecuentes las osteomusculares (24.30%), seguidas por las hepatobiliares (CEP, esteatosis) presentes en el 10.29%, cutáneas (4.77), tromboembólicas (3.30%) y oculares (1.83%).

MANIFESTACIONES EXTRA EN EC	EC=272	%
OSTEOMUSCULARES	66	24.30
PIEL	13	4.77
HEPATOBILIARES	28	10.29
OFTALMOLOGICAS	5	1.83
E. TROMBOEMBOLICA	9	3.30

Tabla 16. Manifestaciones extradigestivas en EC

5.1.7 ENFERMEDAD DE CROHN: CLASIFICACIÓN DE MONTREAL

Los 272 pacientes fueron divididos en función de la clasificación de Montreal en diversos grupos, teniendo en cuenta la edad al diagnóstico (A1, menor o igual a 16 años, A2, entre los 16 y los 40 años y A3, por encima de los 40 años de edad), localización (L1, ileal, que afecta al ileon terminal, con participación o no del ciego en continuidad; L2, cólica, afecta a cualquier tramo del colon, sin participación del intestino delgado; L3, ileocólica, afectación del ileon terminal, con o sin participación cecal, junto a cualquier segmento del colon entre ascendente y recto, y L4, gastrointestinal alta, que indica la afección (añadida a cualquiera de las tres anteriores) de cualquier tramo intestinal proximal al ileon terminal).

Respecto al patrón evolutivo, esta clasificación distingue tres patrones (B1 no obstructivo no fistulizante, también llamado inflamatorio, B2 obstructivo o estenosante y B3 fistulizante; a esta categoría se suma una modificación (p) que indica que al patrón predominante se le añade la existencia de enfermedad perianal).

Edad: en el grupo A1 están el 9.57% de los pacientes (26), el grupo A2 es el más numeroso con el 69.11% (188) y en el grupo A3 están el 21.32% (58 pacientes).

EDAD	N	%
A1	26	9.57
A2	188	69.11
A3	58	21.32
total	272	100.0

Tabla 17. Edad al diagnóstico en EC

Localización: en nuestra serie la localización L1 es la más frecuente, estando representada por el 41.91% de los pacientes (114), seguida muy de cerca por L3, con el 33.46% (91 pacientes) y L2 con el 21.70% (59 pacientes). L1 + L4 representa solamente el 0.36% (1 paciente), L2 + L4 el 1.10% (3 pacientes) y L3 + L4 representa el 1.47% (4 pacientes).

LOCALIZACIÓN	N	%
L1	114	41.91
L2	59	21.70
L3	91	33.46
L1+L4	1	0.36
L2+L4	3	1.10
L3+L4	4	1.47
	272	100.0

Tabla 18. Localización

Patrón evolutivo: El grupo B1 (inflamatorio) es el más numeroso, con el 45.58% (124 pacientes), seguido por el B3 (penetrante), con un 20.58% (56 pacientes), y en tercer lugar el B2 con un 19.48% (53 pacientes). En el grupo B1p hay 14 pacientes (5.14%), en el B2p 2 pacientes (0.73%) y en el B3p 23 pacientes (8.45%). Del total de pacientes, el 14.32% tienen afectación perianal.

PATRON EVOLUTIVO	N	%
B1	124	45.58
B2	53	19.48
B3	56	20.58
B1p	14	5.14
B2p	2	0.73
B3p	23	8.45
	272	100.0

Tabla 19. Patrón evolutivo

5.1.8 COLITIS ULCEROSA: CLASIFICACION DE MONTREAL.

EXTENSION Y EVOLUCION

Los pacientes con colitis ulcerosa se clasificaron en función de la extensión en E1 (proctitis), con el 17.18% (45 pacientes), E2 (colitis izquierda) con el 41.22% (108 pacientes) y E3 (pancolitis) con el 41.60% (109 pacientes).

E1	45	17.18
E2	108	41.22
E3	109	41.60
Total	262	100.00

Tabla 20. Extensión CU

Según la evolución de la enfermedad se distinguió un patrón recidivante, forma continua y una forma fulminante.

5.2. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN CARD15.

5.2.1 ANALISIS DE SUSCEPTIBILIDAD A PADECER LA ENFERMEDAD

En el presente estudio se han analizado tres SNPs de zona codificante del gen CARD15, que en estudios previos se han relacionado con la enfermedad de Crohn; estos polimorfismos son R702W, G908R y L1007fs.

Del total de nuestros 236 pacientes, 81 de ellos presentan algún polimorfismo, es decir, el 34.32%, así como 65 de los 356 controles (18.25%).

	NOD2 +	%	NOD2 -	%
EC	81	34.32	155	65.68
controles	65	18.25	291	81.75

Tabla 21. NOD2+ (al menos una variante)

5.2.1.1 ENFERMEDAD DE CROHN

5.2.1.1.1 Polimorfismo R702W.

En el análisis de frecuencias alélicas se observa un incremento estadísticamente significativo del alelo 702W en el grupo de pacientes (tabla 1).

En cuanto a la distribución de los diferentes genotipos, es de destacar la baja frecuencia de individuos con doble copia del alelo 702W (2.5% en pacientes y 0.6% en controles) y la existencia de una mayor prevalencia del genotipo heterocigoto RW en el grupo de pacientes (17.8% vs 11%). De esta forma, el ser portador de al menos una copia del alelo 702W confiere un aumento de casi 2 veces el riesgo de padecer EC.

Tabla 22: Frecuencias alélicas y genotípicas de R702W

R702W	EC n (%) N= 236	Controles n (%) N=356	P	OR (IC 95%)
RR	188 (79.6)	315 (88.4)	0.002	0.5 (0.3-0.7)
RW	42 (17.8)	39 (11)	0.014	1.78 (1.1-2.8)
WW	6 (2.5)	2 (0.6)	0.039	3.63 (0.8-15.7)
R	418 (88.5)	669 (94)	0.0007	0.49 (0.3-0.7)
W	54 (11.5)	43 (6)	0.0007	2.00 (1.3-3.07)

5.2.1.1.2 Polimorfismo G908R.

La frecuencia del alelo 908R está aumentado prácticamente el doble en el grupo de pacientes (tabla 2).

Dicho incremento es reflejo de un mayor número de individuos heterocigotos GR en el grupo de pacientes ((7.6% vs 4.2%), ya que no encontramos individuos con doble copia de la mutación. Por tanto, el ser portador del alelo 908R parece incrementar casi 2 veces el riesgo de padecer EC.

Tabla 23: Frecuencias alélicas y genotípicas de G908R

G908R	EC n (%) n=236	CONTROLES n (%) N=356	P	OR (IC 95%)
GG	218 (92.4)	341 (95.8.4)	0.006	0.53 (0.8-1.07)
RG	18 (7.6)	15 (4.2)	0.06	1.88 (0.9-3.7)
RR	0(0)	0 (0)	-	1.53 (0.03-77.1)
R	18 (3.8)	15 (2.1)	0.007	0.54 (0.2-1.07)
G	454 (96.2)	640 (97.9)	0.007	1.85 (0.9-3.6)

5.2.1.1.3 Polimorfismo L1007fs.

La variante L1007fs solo está presente en el 1.2% de los controles analizados, mientras que la frecuencia en el grupo de pacientes asciende al 5.2% (tabla 3), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.000028$).

En la tabla 3 se muestra la distribución de los diferentes genotipos. El 9.4% de los pacientes es portador de una copia de L1007fs, mientras que dicha variante aparece en el 2.5% de los individuos sanos. Esta diferencia se traduce en un aumento de algo más de 4 veces el riesgo de padecer enfermedad de Crohn entre individuos portadores de este polimorfismo.

Estos resultados indican que L1007fs es la variante de CARD15 más claramente asociada a susceptibilidad a la enfermedad en nuestra población y que dicha asociación es independiente del resto de SNPs de CARD15.

Tabla 24: Frecuencias alélicas y genotípicas de L1007fs

L1007fs	EC n (%) n=236	CONTROLES n (%) N=356	P	OR (IC 95%)
GENOTIPOS				
-/-	1 (0.4)	0 (0)	0.19	3.3 (2.0-9.13)
-/+	22 (9.4)	9 (2.5)	0.00009	4.07 (1.8-8.8)
+/+	213 (90.2)	374 (97.5)	0.00004	0.23 (0.10-0.5)
ALELOS				
-	24 (5.1)	9 (1.2)	0.000028	4.28 (2.0-9.1)
+	442 (94.9)	757 (98.8)	0.000028	0.23 (0.1-0.49)

5.2.1.2 COLITIS ULCEROSA

Como se puede observar en las tablas A, B y C la distribución de frecuencias alélicas de los diferentes SNPs de CARD15, es muy similar en pacientes con colitis ulcerosa y controles. Lo que apunta que estos polimorfismos no juegan un papel relevante en la susceptibilidad a la CU.

La distribución de las frecuencias genotípicas de los diferentes SNPs se recogen en las tablas A, B y C donde se observa que existe una frecuencia incluso mayor del genotipo heterocigoto RW y GR en el grupo control, pero no se traduce en diferencias significativas con respecto al grupo de pacientes (11% vs 9.9% y 1.4% vs 4.3%); en el caso de L1007fs, no existen diferencias entre pacientes y controles (2.4% vs 2.5%).

Tabla 25. R702W (rs2066844)

		COLITIS	CONTROLS		
GENOTIPOS		N=192 (%)	N=327 (%)	P-	OR
	RR	170 (88.5)	289 (88.4)	0.955	1.00
	RW	19 (9.9)	36 (11.0)	0.690	0.91
	WW	3 (1.6)	2 (0.6)	0.284	2.29
ALELOS					
	R	359 (93.5)	614 (93.9)	0.8	0.92
	W	25 (6.5)	40 (6.1)	0.8	1.08

Tabla 26. G908R (rs2066845)

		COLITIS	CONTRO			
GENOTIPOS		N=214 (%)	N=327 (%)	P-	OR	IC 95%
	RR	0 (0.00)	0 (0.00)		1.53	(0.124-1.297)
	RG	3 (1.4)	14 (4.3)	0.06	0.39	(0.121-1.285)
	GG	211 (98.6)	313 (95.7)	0.06	2.53	(0.777-8.241)
ALELOS						
	R	3 (0.7)	14 (2.1)	0.062	0.40	(0.124-1.297)
	G	425 (99.3)	640 (97.9)	0.062	2.49	(0.770-8.059)

Tabla 27. L1007fs

		COLITIS	CONTROL			
GENOTIPOS		N=214 (%)	N=327 (%)	P-	OR	IC 95%
	-/-	162 (97.6)	347 (97.5)	0.93	0.94	(0.3022-2.8912)
	-/+	4 (2.4)	9 (2.5)	0.9	1.07	(0.3424-3.3278)
	+/+	0 (0.00)	0 (0.0)			
ALELOS						
	-	328 (98.8)	703 (98.7)	0.93	0.93	(0.3022-2.8912)
	+	4 (1.2)	9 (1.3)	0.93	1.07	(0.3459-3.3096)

5.2.2 ANÁLISIS DE CARD15 Y FENOTIPO

5.2.2.1 ENFERMEDAD DE CROHN

Con la intención de estudiar la posible influencia de CARD15 sobre el fenotipo de la EC analizamos la relación entre las variables de dicho gen y las características clínicas fundamentales de la enfermedad, como son la localización, patrón evolutivo y edad al diagnóstico. También hemos estudiado su posible relación con otras variables clínicas como los antecedentes familiares de EII, la necesidad de tratamiento inmunosupresor e infliximab y la cirugía.

De los 272 pacientes con EC de los que disponemos de datos clínicos, solo hemos tipado el CARD15 en 236 pacientes.

5.2.2.1.1 Edad al diagnóstico.

En la tabla se muestra como se distribuyen los pacientes portadores de mutaciones analizadas de CARD15 en los grupos A1, A2 y A3, según la clasificación de Montreal.

	NOD2+	%	NOD2-	%	P	OR	IC 95%
A1	9	11.1	15	9.7	0.7	1.21	0.5-2.8
A2	60	74.1	102	65.8	0.1	1.45	0.8-2.6
A3	12	14.8	38	24.5	0.5	0.56	0.2-1.1
Total	81	100.0	155	100.0			

Tabla 28. NOD2 y edad al diagnóstico en EC

En total, de los 236 pacientes tipados, 81 pacientes presentan alguno de los polimorfismos, es decir, el 34.32%.

Estudiando los grupos de edad por separado, en el grupo A1 (24 pacientes), hay 9 pacientes que presentan algún polimorfismo, es decir el 37.5% del total de ese grupo.

En el grupo A2 (162 pacientes), 60 presentan alguna mutación del CARD15 (37.03%), y en el grupo A3 (50 pacientes), 12 de ellos tienen alguna mutación (24%).

Observamos que de los 81 pacientes que presentan algún polimorfismo, 69 de ellos (85.18%) presentaban una edad al diagnóstico inferior a 40 años, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

Estos resultados indican que en nuestra población, el ser portador de mutaciones en CARD15 se asocia con un debut más temprano de la enfermedad.

5.2.2.1.2 Localización

Se ha analizado la posible correlación entre ser portador de mutaciones de CARD15 y la localización de la enfermedad.

localización	n	NOD2+	%	NOD2-	%	P	OR	IC95%
L1	94	35	43.2	59	38.1	0.4	1.2	0.7-2.1
L2	53	15	18.5	38	24.5	0.3	0.7	0.3-0.1
L3	81	28	34.6	53	34.2	0.9	1.02	0.5-1.7
L4	8	3	3.7	5	3.2	0.8	1.2	0.3-5
Total	236	81	100	155	100			

Tabla 29. NOD2 y localización en EC

En la localización L1 hay 94 pacientes, de los cuales, 35 son NOD2 +, que representa el 37.23%, frente al 62.76% que no tienen mutación (59 pacientes), dentro de este grupo, pero en relación al total de pacientes NOD2 +, representa el 43.2%.

En la localización L2 hay 53 pacientes, de ellos, 15 pacientes presentan algún polimorfismo (28.30% vs. 71.70%); estos 15 pacientes, en relación al total de NOD2 + representan el 18.5%.

En la localización L3 hay 81 pacientes, de los cuales 28 tienen algún polimorfismo (34.56% vs. 65.43% del grupo), representando asimismo el 34.56% del total de NOD2+.

En estos grupos, la diferencia mayor entre portadores y no portadores de polimorfismos se encuentra en L2 (28.30% que son NOD2 + frente a un 71.70%), representando solamente el 18.5% del total de pacientes que presentan polimorfismos.

En nuestros pacientes, el grupo que presenta mayor % de mutación es el L1 (ileal), con un 43.2% del total, seguido de la localización L3 (ileocolónica) que representa el 34.6%, por lo que parece que la mutación de CARD15 favorece la afectación ileal e ileocolónica, y protegería de la afectación exclusivamente colónica.

5.2.2.1.3 Patrón evolutivo

Tabla 30. NOD2 y patrón evolutivo en EC

Patrón evolutivo	NOD2+	NOD2-	P	OR	IC 95%
B1	35 (42.9%)	88 (57%)	0.04	0.58	0.3-0.9
B2	21 (25.4%)	34 (21.9%)	0.4	1.25	0.6-2.3
B3	25 (30.8%)	33 (21.1%)	0.06	1.74	0.9-3.1
No p	68 (83.9%)	130 (86%)	0.6	1.2	0.5-2.5
P	13 (16.1%)	21 (14%)	0.6	0.8	0.3-1.7

Analizando los distintos grupos se aprecia un mayor porcentaje de individuos con mutación dentro del grupo B1 (42.9%, 35 pacientes), pero dentro de este grupo, con 123 pacientes, el 28.45% tienen mutación frente al 71.54% que no la tienen.

En el grupo B2, 55 pacientes, el 38.19% tienen alguna mutación (21 pacientes) frente al 61.81% que no la tienen, representando el 25.4% del total de pacientes NOD2+.

En el grupo B3, con 58 pacientes, el 43.1% de ellos (25) presentan una mutación frente al 56.9% que son NOD2 -, representando el 30.8% del total de pacientes con mutación.

Con estos datos, se aprecia un mayor porcentaje de individuos con mutación dentro del grupo de pacientes con patrón B1, seguido por el grupo B3, y en tercer lugar el B2.

5.2.2.1.4 Otras variables analizadas

Se ha encontrado asociación negativa entre la necesidad de tratamiento biológico y CARD15, de forma que del total de 42 pacientes que precisaron tratamiento biológico, solo 8 presenta una mutación CARD15, es decir 19% vs.81% que no presentaron ninguna mutación.

Tratamiento biológico	NOD2+	NOD2-	p	OR	IC 95%
SI	8 (9.8%)	34 (21.9%)	0.02	0.4	0.1-0.9
NO	73 (90.2%)	121 (78.1%)	0.02	2.3	1.04-5.2
Total	81	155			

Tabla 31. NOD2 y t. biológico

No se ha encontrado asociación con la necesidad de inmunosupresores ni de cirugía, ni con la existencia de casos familiares.

Cirugía	NOD2+	NOD2-	p	OR	IC 95%
SI	26 (32%)	50 (32%)	0.9	1.0	0.5-1.7
NO	55 (68%)	105 (68%)	0.9	0.99	0.5-1.7
Total	81	155			

Tabla 32. NOD2 y cirugía

Inmunosupresores	NOD2+	NOD-	P	OR	IC 95%
Azatioprina	34 (42%)	74 (47.4%)	0.4	0.81	0.5-1.14
Metotrexato	1 (1.2%)	4 (2.6%)	0.4	0.76	0.1-4.8
No	46 (56.8)	77 (50%)	0.3	1.31	0.7-2.2
Total	81	155			

Tabla 33. NOD2 e inmunosupresores

Familiares afectados EC	NOD2+	NOD2-	P	OR	IC 95%
Si	8 (10%)	14 (9%)	0.8	1.1	0.4-2.8
No	73 (90%)	141 (91%)	0.8	0.8	0.3-2.1
Total	81	155			

Tabla 34. NOD2 y familiares afectados

5.3. HLA/MHC

5.3.1. HLA y Colitis ulcerosa

De los 262 pacientes con colitis ulcerosa, se han

El HLA-DQB1* se ha determinado los alelos HLA-DRB1* en 206 pacientes y HLA-DQB1* en 122 pacientes, teniendo como controles a 269 individuos sanos no relacionados.

No se han encontrado diferencias en las frecuencias de los alelos HLA-DRB1*01, DRB1*04, DRB1*07, DRB1*08, DRB1*09, DRB1*10, DRB1*11, DRB1*12, DRB1*13, DRB1*14 y DRB1*16 entre los pacientes de CU y los controles. Sí ha habido diferencias estadísticamente significativas con HLA-DRB1*03, con 22 (5.3%) en pacientes y 64 (11.9%) en controles, con $p=0.0004$ pc 0.0052 OR 0.4 (IC 0.26-0.7) y en menor proporción con HLA-DRB1*15, detectándose 66 (16%) en pacientes y 59 (11%) en controles (p 0.02 que al corregirse por el número de alelos pierde la significación estadística pc 0.26) Tabla 35.

El HLA-DQB1* se ha analizado en 122 pacientes, encontrando las mayores diferencias en HLA-DQB1*02, 47 en pacientes (19.3%) y 135 (25.1%) en controles, con una p de 0.073 (no significativa), no observando en el resto de alelos estudiados diferencias significativas (HLA-DQB1*03, DQB1*04, DQB1*05 y DQB1*06). Tabla 36.

Tabla 35 y 36 .Frecuencias alélicas de HLA-DRB1 Y HLA-DQB1 en COLITIS ULCEROSA

HLA-DRB1*	CU 2n=412	%	CONT 2n=538	%	p	Pc (13)	OR	IC (95%- 95%+)
01	60	14.5	75	13.9	ns			
03	22	5.3	64	11.9	0.0004	0.0052	0.4	0.26-0.7
04	47	11.4	73	13.6	ns			
07	66	16	80	14.9	ns			
08	10	2.4	21	3.9	ns			
09	1	0.2	0	0	ns			
10	3	0.7	10	1.9	ns			
11	60	14.5	65	12.1	ns			
12	5	1.2	5	0.9	ns			
13	44	10.7	62	11.5	ns			
14	20	4.8	17	3.2	ns			
15	66	16	59	11	0.02	0.26		
16	8	1.9	7	1.3	ns			

HLA-DQB1*	CU 2n=244	%	CONT	%	p
02	47	19.3	135	25.1	ns
03	77	31.6	161	29.9	ns
04	7	2.9	24	4.5	ns
05	55	22.5	113	21.0	ns
06	58	23.8	105	19.5	ns

Para confirmar el efecto protector del alelo HLA-DRB1*03 se amplió el estudio uniendo la serie de los pacientes de Colitis Ulcerosa del Hospital Virgen de las Nieves (206) con los del Hospital de San Carlos de Madrid (370) de forma que la serie completa consta de 576 pacientes(N) y de 1.152 alelos (2N).La serie de controles se aumentó de 269 a 861 (N) con un total de alelos de 1.722 (2N).

Después de realizar el tipaje HLA y el análisis estadístico se confirmó el efecto protector del alelo HLA-DRB1*03 porque de forma estadísticamente significativa su frecuencia estaba disminuida en la serie de los pacientes de Colitis Ulcerosa (78 casos HLA-DRB1*03 (6.77%)) cuando se compara con los controles (226 casos HLA-DRB13 (19.61%)) $P_c 6.42 \times 10^{-6}$ OR 0.51 [0.37–0.69] Tabla 37

HLA-DRB1*	CU 2N=1152	CONTROLES 1722	OR	P	P _c
01	173	211	1.27	0.033	0.42
15/16	178	227	1.22	0.087	
03	78	226	0.48	5.72×10^{-7}	6.42×10^{-6}
04	111	200	0.81	0.094	
11/12	182	208	1.36	0.004	0.062
13/14	192	282	1.02	0.837	
07	178	276	0.95	0.677	
OTROS	60	92	0.97	0.875	

Tabla 37. Frecuencias alélicas de DRB1* en nuestra serie y en la del Hospital San Carlos en COLITIS ULCEROSA

5.3.2. HLA y Enfermedad de Crohn

5 casos de HLA-DRB1*08 en Se ha determinado el tipaje para HLA-DRB1* en 220 pacientes con enfermedad de Crohn, no obteniendo diferencias significativas en HLA-DRB*01, DRB1*03, DRB1*04, DRB1*09, DRB1*11, DRB1*12, DRB1*13, DRB1*14, DRB1*15 y DRB1*16. En nuestro grupo de pacientes se han encontrado

- 87 casos de HLA-DRB1*07 en pacientes de EC (19.8%) vs. 79 (14.7%) en controles, con una p de 0.03 y OR 1.4 (IC 1.02-1.99) al corregir la p por el número de alelos (13) se pierde la significación estadística $p=0.39$
- 5 casos de HLA-DQB1* en pacientes de EC (1.1%) vs. 21 (3.9%) en controles, con una p de 0.007 y OR 0.3 (IC 0.1-0.8) $p=0.091$ (no significativa)
- 2 casos de HLA-DRB1*10 en pacientes de EC (0.5%) vs. 10 (1.9%) en controles, con una p de 0.047 y OR 0.3 (IC 0.08-1.3) $p=0.61$ (no significativa)

Tabla 38.

El tipaje para HLA-DQB1* se ha determinado en 126 pacientes, no existiendo diferencias estadísticamente significativas en HLA-DQB1*2, DQB1*03, DQB1*05 y DQB1*06. En este grupo de pacientes hay 4 casos con HLA-DQB1*04 (1.6%) vs. 24 (4.5%) en controles, con una p de 0.041 y OR 0.41 (IC 0.1497-1.1432) $p=0.53$ (no significativa) Tabla 39.

Tabla 38 y 39 Frecuencias alélicas de HLA-DRB1 y HLA-DQB1 en ENFERMEDAD DE CROHN

HLA-DRB1*	EC 2n=440	%	CONT 2n=538	%	p	pc (13)	OR	IC (95%- 95%+)
01	48	10.9	75	13.9	ns			
03	41	9.3	64	11.9	ns			
04	65	14.8	73	13.6	ns			
07	87	19.8	80	14.9	0.03	0.39		
08	5	1.1	21	3.9	0.007	0.091		
09	4	0.9	0	0	ns	ns		
10	2	0.7	10	1.9	0.047	0.52		
11	54	12.3	65	12.1	ns			
12	3	0.7	5	0.9	ns			
13	64	14.5	62	11.5	ns			
14	24	5.5	17	3.2	ns			
15	37	8.4	59	11	0.02	0.26		
16	6	1.4	7	1.3	ns			

HLA-DQB1*	EC 2n=252	%	CONT	%	p
02	69	27.4	135	25.1	ns
03	82	32.5	161	29.9	ns
04	4	1.6	24	4.5	0.041 (pc= 0.20)
05	45	17.9	113	21.0	ns
06	52	20.6	105	19.5	ns

6. DISCUSSION

6.1 CARACTERÍSTICAS CLINICO-EPIDEMIOLÓGICAS DE LA EII

Al revisar las características clínicas y epidemiológicas de nuestros pacientes, observamos que no existen diferencias significativas en la distribución de la enfermedad en relación al **sexo**, en consonancia con lo publicado en la bibliografía, sin embargo, en zonas de alta incidencia, la CU es más frecuente en varones y la EC más frecuente en mujeres, relación que es inversa en los países de baja incidencia.

La edad media al diagnóstico de la enfermedad es de 29.2 años en la EC y 32.3 años en la CU, ambas algo inferiores a los datos publicados por Saro Gismera (359), que son de 33.9 años para EC y 43.3 para CU, así como a la serie publicada por Garrido et al. (360), que es de 33.3 años para la EC y de 44.7 para la CU; en todas las series publicadas, la EC se diagnostica a una edad más precoz que la CU.

En **la localización** de la EC predomina la localización ileal (41.9%), seguida de la ileocolónica (33.5%) y en tercer lugar la colónica (21.6%), datos superponibles a los publicados por Garrido (ileal 43.3%, colon 20%, e ileocolon 36.7%), a diferencia de la serie de Saro, donde la localización más frecuente es la ileocolónica (37.13%). En el trabajo publicado por el Grupo de Estudio Epidemiológico y Económico Español sobre la Enfermedad de Crohn (361) dicha localización ileocolónica es la más frecuente (47%); en nuestra serie el 14.32% tienen afectación perianal, datos similares a los publicados por el Grupo de Estudio Español anteriormente citado, con un 12%.

En la CU (proctitis 17.18%, colitis izquierda 41.22% y colitis extensa 41.60%) no encontramos diferencias con los datos publicados por otros autores.

La asociación familiar en nuestra serie es del 10.66% para los pacientes con EC y del 11.45% para los pacientes de CU, datos similares a los publicados por Saro y col en

cuanto a EC (10.3%), al Grupo Español (9% en pacientes con EC), y a la serie de Garrido (10%), y superiores en la CU (Saro, CU 7.9%, Grupo Español 6% y Garrido 5%). En estudios poblacionales, aproximadamente un 5-10% de los pacientes con EII presentan una historia familiar positiva, indicando que el mayor factor de riesgo para desarrollar EII es el hecho de tener un familiar afecto con la enfermedad (168).

En nuestra serie, el 46.32% de los pacientes con EC están en **tratamiento con inmunosupresores**, fundamentalmente AZA, para inducción de la remisión y prevención de las recidivas por córticodependencia, córticorretractariedad o presencia de fistulas; actualmente se tiende a introducir más precozmente la AZA para evitar el retraso en el crecimiento en los niños con enfermedad activa. En la CU la necesidad de inmunosupresores ha sido menor, 24.05%, similar a otras series publicadas (362) El uso de **tratamiento biológico** (Infliximab/adalimumab) es del 16.55% en la EC y del 5.73% en la CU. La cirugía ha sido necesaria en el 32% de los pacientes con EC (resecciones intestinales), dejando aparte las intervenciones relacionadas con la enfermedad perianal; en la CU se ha realizado colectomía en el 5.72% de los pacientes. En nuestra serie, y en consonancia con los estudios publicados, observamos una mayor morbilidad de la EC frente a la CU, que se pone de manifiesto por la mayor necesidad de inmunomoduladores, uso de biológicos y cirugía.

6.2 CARD15 Y ENFERMEDAD DE CROHN

En este trabajo hemos valorado la posible influencia de los alelos 702W, 908R y L1007fs del gen CARD15 en la susceptibilidad y fenotipo de la EII en nuestra población. Dichas mutaciones fueron establecidas inicialmente como factores independientes de riesgo para el desarrollo de la EC, y no así de la CU (251).

Numerosos estudios posteriores se han dirigido a replicar los hallazgos iniciales y a valorar su influencia en la forma de presentación de la enfermedad en diferentes poblaciones (revisados en (274)). Un metaanálisis de los mismos revela una significativa variabilidad en la prevalencia de los alelos de alto riesgo, que es ostensible tanto en las poblaciones control como en los grupos de pacientes (274). En las tablas 7.1, 7.2 y 7.3 se recogen las frecuencias alélicas obtenidas en diferentes estudios.

Las diferencias fundamentales se establecen con la población asiática, donde ninguno de los alelos de susceptibilidad está presente ni en pacientes con EC ni en la población general (272, 273, 290). Tampoco se han encontrado otras variantes de CARD15 relacionadas con la enfermedad, por lo que no parece que este gen contribuya a la susceptibilidad a EC en estas poblaciones (272).

Tabla 40. Frecuencias alélicas en pacientes con EC y población control en España.

	R702W	G908R	L1007fs	Población
EC	11.6	3.9	5.2	Española. Granada
Controles	6	2.1	1.2	
EC	11	4	6	Española. Cádiz
Controles	6	1	1	
EC	13.7	8.3	14.2	Española. Madrid. 2003 (363)
Controles	4.3	2.1	4.3	
EC	6.7	4.5	4.5	Española. Galicia. 2004 (364)
Controles	5.8	1	1	
EC	8.8	3	6	Española. Asturias. 2007 (366)
Controles	11.6	2.3	3.5	
EC	7.6	3	4.6	Española. Toledo. 2006 (365)
Controles	3.4	1.1	2	

Tabla 41. Frecuencias alélicas en pacientes con EC y población control en Europa.

En cursiva y subrayado, no alcanzan significación estadística como factor de susceptibilidad al nivel de 0.05

	R702W	G908R	L1007fs	Población
EC	9.1	3.4	6.6	Europea Cuthbert 2002 (354)
Controles	3.5	0.6	2.1	
EC	10.8	6.1	10.5	Europea. Lesage 2002 (269)
Controles	4.4	1.0	1.9	
EC	11	6	12	Europea. Hugot 2001 (251)
Controles	4	1	2	
EC	12.5	3.3	9.4	Británica. Ahmad 2002 (347)
Controles	5.2	1.4	1.6	
EC	-	-	16	Británica/Alemana. Hampe 2001 (367)
Controles	-	-	4.4	
EC	1.2	5.2	11.2	Italiana. Vavassori 2004 (368)
Controles	0.8	2	1.2	
EC	8.7	7.2	9.3	Italiana. Annese 2005 (369)
Controles	4.1	2.7	0.7	
EC	11.5	<u>3.7</u>	<u>9.0</u>	Francesa. Heresbach 2004 (370)
Controles	4.7	1.6	4.2	
EC	-	4.3	8.5	Holandesa. Murillo 2002 (371)
Controles	-	3	5.9	
EC	5.5	2.4	4.1	Escocesa. Arnott 2004 (372)
Controles	4.2	0	1.8	
EC	<u>3.3</u>	<u>0.6</u>	4.8	Finlandesa. Helio 2003 (373)
Controles	1.8	0	1.7	
EC	12	<u>2.7</u>	6.8	Portuguesa. Ferrerira 2005 (374)
Controles	3.9	1.2	1.5	
EC	8.8	6.1	11	Alemana. Van der Linde 2007 (375)
Controles	5.9	0.7	1.9	
EC	7.1	3	10.8	Húngara. Buning 2005 (376)
Controles	2.6	1.2	2.2	
EC	13.3	-	22	Checa y Eslovaca. Hoseck 2008 (377)
Controles	10.2	-	6	

Tabla 42. Frecuencias alélicas en pacientes con EC y población control en el resto.

En cursiva y subrayado, no alcanzan significación estadística como factor de susceptibilidad al nivel de 0.05

	R702W	G908R	L1007fs	Población
EC	10.8	4.3	8.4	EEUU. Caucásica. Bonen 2003 (378)
Controles	4	1.7	4	
EC	16.4	11.4	11.4	EEUU. Abreu 2002 (379)
Controles	-	-	-	
EC	12.9	5.2	10	Canadiense. Quebec. Vermeire 2002 (380)
Controles	4.2	0.7	0.7	
EC	11	2	7	Australiana. Cavanaugh 2003 (381)
Controles	5	1	1	
EC	<u>1.9</u>	<u>5.3</u>	<u>1.1</u>	Tunecina. Zouiten-Mechi 2005 (382)
Controles	2.7	0.5	0	
EC	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	China. Leong. 2003 (273)
Controles	0	0	0	
EC	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	Japonesa. Inoue. 2002 (383)
Controles	0	0	0	
EC	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	Coreana. Croucher. 2003 (272)
Controles	0	0	0	

La prevalencia de mutaciones del gen CARD15 en nuestros pacientes (34.32%) es similar a los resultados publicados en estudios previos realizados en diferentes regiones de España, siendo del 32.8% en Madrid (363), del 27.9% en Galicia (364) y del 35% en Cádiz (datos no publicados). Lessage et al. (269) comunican que el 50% de los pacientes con EC tienen al menos una mutación, incluyendo aquí al 17% que tienen dos mutaciones; Hoseck et al. (377) tienen una prevalencia del 53.3% de pacientes con EC con una o dos mutaciones y del 24.4% con doble mutación.

Sin embargo, la prevalencia que hemos encontrado es superior a los resultados publicados de Toledo (365) del 15.2% y de Asturias (366), que son del 17.3%.

En nuestra población, el ser portador de una copia confiere un riesgo 3.2 veces mayor de padecer EC

La asociación entre las mutaciones de CARD15 y la aparición o desarrollo de EC se ha confirmado en diferentes áreas geográficas y grupos étnicos (252, 365). En las poblaciones caucásicas europeas y norteamericanas, menos del 50% de los pacientes con EC presentan la mutación CARD15 y entre el 10 y el 20% de los individuos sanos son portadores de estas mutaciones. Por lo tanto, la presencia de las mutaciones en el mencionado gen no se consideran ni necesarias ni suficientes, como factores condicionantes para el desarrollo y aparición de una EC, explicando sólo el 20% de la susceptibilidad genética a la EC.

En Europa existe un gradiente de la contribución de las mutaciones de CARD15 a esta susceptibilidad. En los países del Norte de Europa su prevalencia es menor (347, 367, 373, 384) que en el resto de los países europeos (207, 269, 354, 386, 387). Sin embargo en Asia, África Subsahariana y Sudamérica, estas mutaciones son raras o están ausentes

(272, 273, 382, 383, 388), y en estas áreas la enfermedad es menos prevalente que en Europa o Estados Unidos.

En general, las diferencias encontradas en distintos estudios pueden deberse a variaciones étnicas entre poblaciones, cambios en las definiciones fenotípicas y a un reducido número de casos por grupo estudiado (389).

La idea más extendida es que CARD15 se asocia con un debut temprano de la enfermedad, localización ileal y un patrón fundamentalmente estenosante. En muchos estudios estas asociaciones son más apreciables en portadores de dos copias mutadas (390).

En nuestro estudio, del total de 81 pacientes que presentan algún polimorfismo de CARD15, el 85.18%, presentan una **edad** al diagnóstico inferior a 40 años, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

Incluso antes de la identificación de CARD15, Brant et al (391) comunicaron que la asociación de la EC con la región 16q era mayor en pacientes con una edad al debut de la enfermedad inferior a los 22 años. Otros estudios posteriores han confirmado esta asociación (269, 370, 392). Sin embargo, esta relación entre CARD15 y la edad al diagnóstico no es universal y son varios los estudios, incluyendo el de Madrid, donde no se ha evidenciado esta asociación (362, 370, 379, 380).

La localización de la enfermedad es una variable que suele permanecer estable en el curso de la misma (393). En estudios previos parece tener una clara asociación con CARD15, apreciándose una asociación positiva entre ser portador de una o más

variables con la afectación ileal. En el metaanálisis de Economou et al. (282) se encuentra un incremento de riesgo de 2.53 (IC 95%: 1.61-2.34); además se ha observado que los pacientes portadores de doble copia son poco frecuentes dentro del grupo con afectación exclusivamente colónica (167).

En nuestros pacientes, la localización que presenta mayor % de mutación es la L1 (ileal), que representa un 43.2% del total de pacientes, en consonancia con los resultados de Mendoza y otros autores (269, 347, 362, 368). La localización ileocólica (L3) representa el 34.6% de pacientes, y la localización colónica (L2) representa solamente el 18.5% del total de pacientes que presentan mutaciones, coincidiendo nuestros resultados con diversos autores. Parece por tanto que la mutación CARD15 favorecería la afectación ileal e ileocolónica y “protegería” de la afectación exclusivamente colónica, pudiendo indicar que en este subgrupo de pacientes pueden existir otros genes que pueden estar comprometidos en la susceptibilidad a la EC (347). Sin embargo, otros autores no encuentran asociación de NOD2 con la localización de la enfermedad (364, 371, 394).

La mayoría de estudios que encuentran relación entre CARD15 y el **patrón evolutivo** de la enfermedad aprecian asociación positiva con el patrón estenosante, con un incremento del riesgo de 1.94 (IC: 1.62-2.34) según el metaanálisis de Economou (274). En general, esta relación está peor establecida y en muchos estudios no se encuentra esta asociación. Parte de esta dificultad radica en el uso de definiciones diferentes en los estudios, ya que algunas clasificaciones incluyen las fistulas perianales en el patrón fistulizante, como es el caso de la clasificación de Viena (6), y otras consideran la enfermedad fistulizante perianal etiopatológicamente distinta a las fistulas

primariamente intraabdominales, como es el caso de la clasificación de Montreal (5). Por otro lado, la distinción entre fistulas y estenosis es a veces difícil de realizar, particularmente en los análisis retrospectivos. Más problemático aún es el hecho de que el patrón evolutivo cambia a lo largo del tiempo, con un incremento en las complicaciones penetrantes y fistulizantes a medida que aumenta el tiempo de seguimiento. En este sentido, Louis et al (393) estudiaron 163 pacientes con EC que al diagnóstico presentaban un patrón no penetrante no estenosante; cinco años tras el diagnóstico, el 67.5% de los pacientes aún tenían un patrón inflamatorio, sin embargo el 11% había desarrollado estenosis y el 21% fistulas, sin que el genotipo de CARD15 influyera en la evolución.

En nuestra serie no hemos encontrado diferencias significativas en la asociación de NOD2 con los distintos grupos, aunque si hemos encontrado un porcentaje algo aumentado de pacientes portadores de una mutación en los pacientes con patrón inflamatorio; esto podría deberse a un sesgo por diferencias en el tiempo de seguimiento.

En nuestra serie, se ha encontrado una asociación negativa entre la necesidad de tratamiento biológico y CARD15, de forma que del total de 42 pacientes que precisaron tratamiento biológico, solo 8 presentan una mutación CARD15, es decir 19% vs. 81% que no presentan ninguna mutación, en consonancia con los resultados de otros autores (364).

Por otro lado, es interesante destacar que todos los pacientes tratados con Infliximab/Adalimumab, han recibido previamente tratamiento inmunosupresor, sin embargo, el porcentaje de pacientes portadores de mutación en el grupo tratado con

inmunosupresores es del 43.2% frente al 9.8% de NOD2 + que están tratados con biológicos.

Es posible que CARD15 seleccione a un subgrupo de pacientes con una mejor respuesta al tratamiento inmunosupresor, motivo por el cual necesiten con menos frecuencia recurrir a terapias biológicas.

Nosotros tampoco hemos encontrado una asociación positiva entre la necesidad de cirugía y mutación de CARD15, aunque otros autores si la han encontrado, especialmente mutación de 1007fins y resecciones ileales (394), resecciones ileocecales y alto riesgo de recidiva postoperatoria y reoperación (395). Estos hallazgos también se confirmaron en un estudio prospectivo de Barcelona (397); entre 70 pacientes catalanes que precisaron cirugía, la recurrencia postoperatoria fue también más frecuente en los pacientes con variantes de CARD15 en los análisis univariado y multivariado, necesiéndose antes la reintervención quirúrgica.

Tampoco hemos encontrado asociación con la existencia de casos familiares.

6.3 CARD15 Y COLITIS ULCEROSA

Los estudios que abordan el análisis de la influencia de las variantes de CARD15 y CU son escasos; ello se debe a que en los primeros estudios estos polimorfismos se descartaron como factor de susceptibilidad a CU. En algunos estudios posteriores de asociación con EC se han incluido cohortes de pacientes con CU pero casi siempre utilizándola como una población control que presenta un fenómeno inflamatorio intestinal, con el fin de contrastar la especificidad de la asociación de CARD15 con EC.

En ningún caso se han analizado posibles relaciones con las formas de presentación de la enfermedad. No obstante, existen datos que apoyan la idea de que IBD1 constituye también un locus de susceptibilidad a CU (193, 196, 398).

En nuestra serie de pacientes no hemos encontrado diferencias en la distribución de alelos entre los pacientes con CU y los controles sanos; en una reciente publicación de china, tampoco han hallado diferencias entre las mutaciones de pacientes con CU y controles sanos (399).

6.4 HLA Y COLITIS ULCEROSA

El descenso en la frecuencia de HLA-DR3 de nuestra muestra de pacientes de Colitis Ulcerosa en relación con los controles sanos, lo que se interpreta como un efecto protector de este alelo, se confirmó con otra serie de pacientes de Colitis Ulcerosa del Hospital Clínico de San Carlos de Madrid. Además se comprobó que las frecuencias de los dos haplotipos extendidos de HLA que incluyen el alelo HLA-DR3: AH8.1 (HLA-B8, TNF-308^a[TNFa2b3], HLA-DR3) y AH18.2 (HLA-B18, TNF-376A[TNFa1b5]; HLA-DR3) descendían por igual en los pacientes con Colitis Ulcerosa lo que indica que la protección mediada por HLA-DR3 no se debe a otro gen con el que está ligado como el TNF o HLA-B. (400).

El efecto protector del HLA-DR3 había sido descrito anteriormente en una población francesa (401). Los autores sugieren que el efecto protector podría deberse también a otro gen ligado en el haplotipo extendido AH18.2 que es muy frecuente en el área mediterránea de donde proceden sus pacientes. Nuestros datos descritos anteriormente

descartan esta posibilidad y apuntan hacia la zona centromérica de la región HLA donde se sitúa el locus HLA-DRB1 como responsable del efecto protector.

Datos muy recientes corroboran esta hipótesis. En un estudio donde se analizan todas las variantes conocidas hasta ahora de SNP en el genoma humano (Genome-wide association study GWAS) en 1.052 pacientes de CU americanos con ascendencia europea frente a 2,571 controles se encuentran solo cuatro marcadores asociados con CU. Uno de ellos el rs2395185 se localiza en la región HLA en 6p21, concretamente en la región de HLA de clase II en un fragmento de 300kb, entre el gen BTNL-2 (butirofilina-like 2) y HLA-DRB1. Su asociación indica también un efecto protector $OR=0.66$ $P=1.0 \times 10^{-16}$. (402)

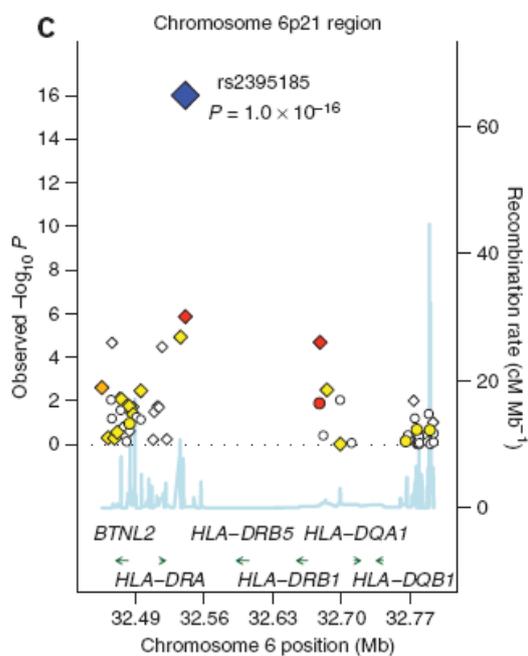


Fig 21.

Sería de gran interés estudiar si existe un ligamiento entre la variante de rs2395185 y el alelo HLA-DRB1*0301

Satsangi J et al (205) en 1996 describieron un descenso en la frecuencia de HLA-DR3 en pacientes de Colitis Ulcerosa con afectación distal. En nuestro estudio no se encontraron diferencias fenotípicas con el efecto protector del HLA-DR3 que actúa en nuestra serie de pacientes como un alelo de protección general y no como un factor de modificación de la enfermedad.

El efecto protector de HLA-DR3 se describe por vez primera en una enfermedad autoinmune como la Colitis Ulcerosa. En otras enfermedades autoinmunes como el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) (403), Enfermedad de Graves (Hipertiroidismo autoinmune) (404) y en la Diabetes Tipo I Insulin-dependiente (405) HLA-DR3 se ha definido como un alelo de susceptibilidad aunque dentro del haplotipo extendido AH8.1 (HLA-B8, TNF-308^a[TNFa2b3], HLA-DR3) donde no es posible diferenciar la contribución independiente de cada uno de los alelos que lo constituyen (356).

HLA-DR3 se ha relacionado con una mayor capacidad de inducir una respuesta del sistema inmune mediada por linfocitos TH1 que producen TNF alfa, IL-12, IL-23 e INF-gamma. El Interferón gamma de los linfocitos TH1 inhibe la diferenciación hacia linfocitos TH2 productores de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-10. En la Colitis Ulcerosa predominan los linfocitos TH2 lo que explicaría el efecto protector de HLA-DR3 al bloquear su diferenciación. También cabría la posibilidad que en el contexto de la etiopatogenia de la Colitis Ulcerosa, el alelo HLA-DR3 tuviera la posibilidad de inducir con mayor intensidad que otros alelos HLA de clase II, el desarrollo y diferenciación de linfocitos TH reguladores CD25⁺ y FOXP-3⁺ que son capaces de inhibir la proliferación de los linfocitos TH17 que juegan un papel esencial en la enfermedad inflamatoria intestinal.

Otros trabajos de asociación de HLA con la Colitis Ulcerosa han encontrado como alelos de susceptibilidad a HLA-DRB1*0103 y HLA-DRB1*1502 que tienen en común:

- a) su baja frecuencia en la población general europea,
- b) la presencia en la posición 86 del bolsillo 1 del aminoácido glicina (el alelo HLA-DRB1* 1501 que no está asociado con la CU tiene en esa posición el aminoácido valina),
- c) que se relacionan con una mayor severidad, extensión y resistencia al tratamiento de los pacientes y
- d) que su asociación positiva con la Colitis Ulcerosa se ha replicado en varias poblaciones (Norteamericana (341), Británica (353), Mejicana (342) en el caso de HLA-DRB1*0103 y Europea (353), Norteamericana (341) , Japonesa (406) y Coreana (407) para el alelo HLA-DRB1*1502).

El hecho de que no hayamos encontrado en nuestra serie de pacientes de Colitis Ulcerosa asociación con estos alelos se puede deber a que la frecuencia de los mismos es más elevada en nuestra población control, a la propia heterogeneidad de la enfermedad, a la necesidad de la interacción con otros genes o a los distintos factores ambientales incluyendo las características de la flora intestinal y dietéticos que pueden contribuir al desencadenamiento de la enfermedad y a poner de manifiesto una determinada susceptibilidad condicionada por un alelo HLA.

7. CONCLUSIONES

1. Observamos en nuestra serie una tendencia a diagnosticar la EII a edad más temprana
2. La asociación familiar es algo superior en la Colitis ulcerosa en relación a los datos publicado, en la EC es similar
3. La prevalencia de mutación del gen CARD15 en nuestros pacientes (34.32%) es superponible a los datos publicados en otras regiones españolas (Madrid, Galicia y Cádiz) y superior a los datos de Asturias y Toledo
4. La mutación CARD15 favorece la afectación ileal e ileocolónica y “protege” de la afectación exclusivamente colónica
5. Existe asociación negativa entre la necesidad de tratamiento biológico y CARD15
6. Observamos un efecto protector de HLA-DR3 en nuestra serie de pacientes con CU

El presente trabajo ha dado lugar a la elaboración de diversos artículos científicos:

1. Rueda B, Zhernakova A, López-Nevot MA, **Gómez-García M**, Ortega E, Piñero A, Correro F, Brieva JA, Nieto A, Koeleman BP, Martín J. CTLA4/CT60 polymorphism is not relevant in susceptibility to autoimmune inflammatory intestinal disorders. *Hum Immunol* 2005; 66(3): 321-5.
2. Oliver J, **Gómez-García M**, Paco L, López-Nevot MA, Piñero A, Correro F, Martín L, Brieva JA, Nieto A, Martín J. A functional polymorphism of the NFKB1 promoter is not associated with ulcerative colitis in a Spanish population. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11(6): 576-9.
3. Martín MC, Oliver J, Urcelay E, Orozco G, **Gómez-García M**, López-Nevot MA, Piñero A, Brieva JA, de la Concha EG, Nieto A, Martín J. The functional genetic variation in the PTPN22 gene has a negligible effect on the susceptibility to develop inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens* 2005; 66(4): 314-7.
4. Sánchez E, Rueda B, Orozco G, Oliver J, Vílchez JR, Paco L, López-Nevot MA, Callejas JL, Sabio JM, **Gómez-García M**, Nieto A, Delgado M, Martín J. Analysis of a GT microsatellite in the promoter of the foxp3/scurfin gene in autoimmune diseases. *Hum Immunol* 2005; 66(8): 869-73.
5. Oliver J, **Gómez-García M**, Vílchez JR, López-Nevot MA, Piñero A, Correro F, Nieto A, Martín J. Inducible and endothelial nitric oxide synthase genes polymorphism in inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens* 2006; 67(4): 326-30.
6. Oliver J, Márquez A, **Gómez-García M**, Martínez A, Mendoza JL, Vílchez JR, López-Nevot MA, Piñero A, de la Concha EG, Nieto A, Urcelay E, Martín J. Association of the macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms with inflammatory bowel disease. *Gut* 2007; 56(1): 150-1.

7. Oliver J, Rueda B, López-Nevot MA, **Gómez-García M**, Martín J. Replication of an association between IL23R gene polymorphism with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5(8): 977-81.
8. Núñez C, Oliver J, Mendoza JL, **Gómez-García M**, Piñero A, Taxonera C, Díaz-Rubio M, López-Nevot MA, de la Concha EG, Nieto A, Urcelay E, Martínez A, Martín J. MYO9B polymorphisms in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2007; 56(9): 1321-2.
9. **Gómez-García M**, Oliver J, Márquez A, Mendoza JL, López-Nevot MA, Fernández-Arquero M, González-Escribano MF, Díaz-Rubio M, de la Concha EG, Urcelay E, Martín J, Martínez A. Strong protective effect of DR3 against ulcerative colitis in the Spanish population. *Am J Gastroenterol* 2007; 102(12): 2762-6.
10. Núñez C, Oliver J, Mendoza JL, **Gómez-García M**, Taxonera C, Gómez LM, López-Nevot MA, de la Concha EG, Urcelay E, Martínez A, Martín J. CD209 in inflammatory bowel disease: a case-control study in the Spanish population. *BMC Med Genet* 2007; 8:75.
11. Márquez A, Varadé J, Robledo G, Martínez A, Mendoza JL, Taxonera C, Fernández-Aequero M, Díaz-Rubio M, **Gómez-García M**, López-Nevot MA, de la Concha EG, Martín J, Urcelay E. Specific association od a CLEC16A/KIAA0350 polymorphism with NOD2/CARD15(-) Crohn's disease patients. *Eur J Hum Genet* 2009 (pendiente de publicación impreso).

BIBLIOGRAFIA:

1. Morahan G, Morel L. Genetics of autoimmune diseases in humans and animal models. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 803-11.
2. Hinojosa J, Moles JR, Primo J. Definition of chronic inflammatory bowel disease. Conceptual evolution. *Gastroenterol Hepatol* 1995; 18(10):496-501.
3. Hendriksen C, Kreiner S, Binder V. Long term prognosis in ulcerative colitis based on results from a regional patient group from the country of Copenhagen. *Gut* 1985;26(2):158-63.
4. Riera J. Definiciones conceptuales de la enfermedad inflamatoria intestinal. Concepto de cronicidad. En: Gassull MA, Gomollón F, Obrador A, Hinojosa J. Enfermedad Inflamatoria Intestinal. II edición. Madrid: ERGON S.A. 2002.
5. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*. 2005; 19 Suppl A: 5-36.
6. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, et al. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congress of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6(1):8-15.
7. Sonnenberg A, Wasserman IH. Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease within the United States. *Gastroenterology* 1991; 101:122-30.
8. Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Kreiner S, Binder V. Incidence and prevalence of Crohn's disease in the country of Copenhagen 1962-1987: A six-fold increase in incidence. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27:609-14.
9. Lee FI, Costello FT. Crohn's disease in Blackpool-incidence and prevalence 1968-80. *Gut* 1985; 26:274-8.
10. Stowe SP, Redmond SR, Stormont JM, Shah AN, Chessin LN, Segal HL, et al. An epidemiologic study of inflammatory bowel disease in Rochester, New York. Hospital incidence. *Gastroenterology* 1990; 98: 104-10.
11. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, et al. and the EC-IBD Study Group. 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.
12. Bernstein CN, Wajda A, Svenson LW, Mackenzie A, Koehoorn M, Jackson M, et al. The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: A population-based study. *Am J Gastroenterol* 2006; 101 (7): 1559-68.
13. Devlin HB, Datta D, Dellipiana AW. The incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in North Tees Health District. *World J Gurg* 1980; 4: 183-93.
14. Haug K, Schrupf E, Barstad S, Fluge G, Halvorsen JF. Epidemiology of ulcerative colitis in western Norway. *Scand J Gastroenterol* 1988; 23: 517-22.
15. Binder V, Both H, Hansen PK, Hendriksen C, Kreiner S, Torp-Pedersen K. Incidence and prevalence of ulcerative colitis and Crohn's disease in the Country of Copenhagen, 1962-1978. *Gastroenterology* 1982; 83:563-658.
16. Brullet E, Bonfill , Urrutia G, Ruiz Ochoa V, Cueto M, Clofent J, Martinez Salmerón JF, et al. Estudio epidemiológico sobre la incidencia de Enfermedad Inflamatoria Intestinal en cuatro áreas españolas. *Med Clin* 1998; 110: 651-6.
17. López Miguel C, Sicilia B, Sierra E, Lopez Zaborras J, Arribas F, Gomollón F.. Incidencia de la Enfermedad Inflamatoria en Aragón: resultados de un estudio prospectivo y poblacional. *Gastroenterol Hepatol* 1999; 22: 323-8.
18. Saro Gismera C, Lacort Fernández M, Arguelles Fernández G, Antón Magarzo J, Garcia Lopez R, Navascues CA, et al. Incidencia y prevalencia de la enfermedad inflamatoria intestinal en Gijón, Asturias. *Gastroenterol Hepatol* 2000; 23: 322-32.
19. Loftus EV Jr, Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2002; 31(1):1-20.
20. Saro Gismera C, Riestra Menéndez S, Milla Crespo A, Sanchez Fernandez R, Lacort Fernandez M, Arguelles Fernandez G, et al. Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease. Asturian study in 5 areas (EIICEA). Spain. *Ann Med Interna* 2003; 20: (1): 3-9.
21. Basu D, López I, Kulkarni A, Sellin JH. Impact of race and ethnicity on inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100 (10): 2254-61.
22. Montgomery SM, Morris DL, Pounder RE, Wakefield AJ. Asian ethnic origin and the risk of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 543-6.

23. Saro Gismera C VRO. Epidemiología y factores de riesgo de la enfermedad inflamatorias intestinal. En: MA Gassull, A Obrador, J Hinojosa, editor. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. 2 ed. Madrid: Ediciones Ergon SA; 2002. p. 7-20.
24. Geller. Pathology of inflammatory bowel disease: a critical appraisal in diagnosis and management. In: Targan S SF, edit. *Inflammatory bowel disease: from bench to bedside*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994. p. 336-351.
25. Price. The pathology. In: Järnerot G LJJ, Truelove S, editor. *Inflammatory bowel disease*. Malmö: Corona and Astra; 1992. p. 269-293.
26. Mendoza Hernández JL, Lana Soto R, Díaz-Rubio M. Definiciones y manifestaciones clínicas generales. En: MA Gassull, F Gomollón, J Hinojosa, A Obrador, editor. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal* 3 ed. Madrid. Ediciones Aran SL; 2007. p.21-28.
27. Robert JR, Sachar DB, Greenstein AJ. Severe gastrointestinal hemorrhage in Crohn's disease. *Ann Surg* 1991; 213(3): 207-11.
28. Alós Company R, Hinojosa del Val J. Enfermedad perianal: tratamiento médico-quirúrgico. En: MA Gassull, F Gomollón, J Hinojosa, A Obrador, editor. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. 3 ed. Madrid. Ediciones Arán SL; 2007. p. 386-403.
29. McKee RF, Keenan RA. Perianal Crohn's disease –is it all bad news? *Dis Colon Rectum* 1996; 39 (2): 136-42.
30. Greenstein AJ, Sachar DB, Mann D, Lachman P, Heimann T, Aufses AH Jr.. Spontaneous free perforation and perforated abscess in 30 patients with Crohn's disease. *Ann Surg* 1987; 205 (1): 72-6.
31. Mora F, Mínguez M, Peña A. Manifestaciones extraintestinales: manejo terapéutico. En: J Hinojosa del Val, F Díaz de Rojas, editor. *Controversias en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. Schering-Ploug, S.A. 1998. p.267-85.
32. Román ALS. Manifestaciones extraintestinales de la enfermedad inflamatoria intestinal. En: MA Gassull, A Obrador, J Hinojosa, editor. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. 2 ed. Madrid: Ediciones ERGON, S.A. ; 2002. p.125-133.
33. Forcada J, Olive A. Osteoarticular manifestations of chronic intestinal inflammatory disease. *Gastroenterol Hepatol* 1996; 19 (1): 21-3.
34. Brom B, Bank S, Mark N. Periostitis, aseptic necrosis and arthritis occurring in a patient with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1971, 60: 1106-8.
35. Reguiaï Z, Grange F. The role of anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in Pyoderma gangrenosum associated with inflammatory bowel disease. *Am J Clin Dermatol* 2007; 8 (2): 67-77.
36. Hewitt D, Tait C. Use of Infliximab in pioderma gangrenosum. *Australas J Dermatol* 2007 May; 48 (2):95-8.
37. Bertran X, Planas R. Hepatobiliary complications in chronic intestinal inflammatory disease. *Gastroenterol Hepatol* 1996; 19(1): 10-5.
38. Van den Berg A, Jansen PL. Pathogenesis and medical therapy of primary sclerosing cholangitis. Any news? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11 (2): 121-4.
39. Lee YM, Kaplan MM. Primary sclerosing cholangitis. *N Engl J Med* 1995; 332 (14): 924-33.
40. Ramos L, Gonzalez C, Marcos J. Hallazgos radiológicos en las exploraciones con bario en la enfermedad inflamatoria intestinal. En: Abreu L CC, editor. *Enfermedad inflamatoria intestinal*. Barcelona: JR Proas S.A.; 1990. p. 129-152.
41. Feliú E, Fontanilla T, Vega MC, Méndez JC. Rx simple de abdomen, exploraciones baritadas en CU y Crohn. En: *Diagnóstico radiológico de la enfermedad inflamatoria intestinal*. Madrid. Ed: Esquema de comunicación S.A. 2000. p. 51-170.
42. Schreyer AG. Nuevas técnicas de imagen en la enfermedad inflamatoria intestinal: ecografía, tomografía computerizada y resonancia nuclear magnética. En: MA Gassull, F Gomollón, J Hinojosa, A Obrador editor. *Enfermedad Inflamatoria intestinal*, 3 ed. Madrid. Ediciones Arán SL. 2007, p. 185-97.
43. Feliú E, Ramos L. Valoración crítica de las técnicas de diagnóstico por imagen en la enfermedad inflamatoria intestinal. En: J Hinojosa del Val, F Díaz de Rojas, editor. *Controversias en la enfermedad inflamatoria intestinal*. Schering-Ploug, S.A. 1998. p.33-46.
44. Sans Cuffi M. Criterios diagnósticos y clínica de la colitis ulcerosa. En: MA Gassull, A Obrador, J Hinojosa, editor. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. II ed. Madrid: Ediciones Ergon, SA.; 2002. p. 99-109.
45. Nos Mateu P, Criterios diagnósticos y clínicos de de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. En: MA Gassull, A Obrador, J Hinojosa, editor. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. II ed. Madrid: Ediciones Ergon SA.; 2002. p. 209-17.

46. Abreu L, Barrios C, Garridos A, Chantar C. La endoscopia en la enfermedad inflamatoria intestinal. En: Abreu L, editor. *Enfermedad inflamatoria intestinal*. Barcelona: JR Proas SA; 1990. p. 215-22.
47. Modigliani. Endoscopy. In: Jarnerot G, Truelove S, editor. *Inflammatory bowel disease*. Malmö: Corona and Astra; 1992. p. 245-67.
48. Salena B. Diagnosis: an endoscopist's perspectiva. In: Targan S, editor. *Inflammatory bowel disease: from bench to bedside*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994. p. 352-65.
49. Gassull M, Obrador A, Chantar C. Endoscopia y ecoendoscopia en la enfermedad inflamatoria intestinal. En: JR Prous SA, editor. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. Barcelona; 1994. p. 39-50.
50. Greenfield SM, PUNCHARD NA, Teare JP, et al. The mode of action of the aminosalicylates in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1993; 7: 369-83.
51. Bantel H, Berg C, Vieth M, et al. Mesalazine inhibits activation of transcription factor NFκB in inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 3452-7.
52. Gisbert JP, Gomollón F, Maté J, Pajares JM. Role of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) in treatment of inflammatory bowel disease: A systematic review. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 471-88.
53. Faubion WA, Loftus EV Jr, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The natural story of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* 2001; 121: 255-60.
54. Munkholm P, Langholtz E, Davidsen M, Binder V. Frequency of glucocorticoid resistance and dependency in Crohn's disease. *Gut* 1994; 35: 360-2.
55. Buchman AL. Efectos secundarios de los corticosteroides. En: Gassull MA, Gomollón F, Obrador A, Hinojosa J, editores. *Enfermedad inflamatoria intestinal*. 2ª ed. Madrid: Ergon; 2002. P. 393-401.
56. Webster JC, Oakley RH, Jewell CM, Cidowski JA. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 6865-70.
57. Malchow H, Ewe K, Brandes JW, Goebell H, Ehms H, Sommer H, et al. European Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1984; 86: 249-66.
58. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis. Final report on a therapeutic trial. *Br J Med* 1955; 2: 1041-8.
59. McGovern DPB, Travis SPL. Thiopurine therapy: When to start and when to stop. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 219-24.
60. Cara CJ, Pena AS, Sans M, Rodrigo L, Guerrero-Esto M, Hinojosa J, et al. Reviewing the mechanism of action of thiopurine drugs: Toward a new paradigm in clinical practice. *Med Sci Monit* 2004; 10: 247-54.
61. Lemann M, Mary JY, Colombel JF, Duclos B, Soule JC, Lerebours E, et al. A randomized, double-blind, controlled withdrawal trial in Crohn's disease patients in long-term remission on azathioprine. *Gastroenterology* 2005; 128: 1812-8.
62. Carter MJ, Lobo AJ, Travis SP, IBD Section, British Society of Gastroenterology. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2004; 53 (Supl. 5): 1-16
63. Bebb JR, Scott BB. Systematic review: How effective are the usual treatments for Crohn's? *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 151-9.
64. Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: A 30 years review. *Gut* 2002; 50: 485-9.
65. Kandiel A, Fraser AG, Korelitz BI, Bresinger C, Lewis JD. Increased risk of lymphoma among inflammatory bowel disease patients treated with azathioprine and 6-mercaptopurine. *Gut* 2005; 54: 1121-5.
66. Egan LJ, Sandborn WJ, Mays DC, Tremaine WJ, Fauq AH, Lipski JJ. Systemic and intestinal pharmacokinetics of methotrexate in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 65: 29-39.
67. Alfidhli AA, McDonald JW, Feagan BG. Methotrexate for induction of remission in refractory Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2005: CD003459.
68. Gerber D, Bonham C, Thompson A. Immunosuppressive agents: Recent developments in molecular action and clinical application. *Transplant Proc* 1998; 30: 1573-9.
69. Hawthorne AB. Cyclosporin and refractory colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 239-44.
70. Haslam N, Hearing SD, Probert CS. Audit of cyclosporine use in inflammatory bowel disease: Limited benefits, numerous side-effects. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 657-60.

- 71 Baumgart DC, Wiedenmann B, Dignass AU. Rescue therapy with tacrolimus is effective in patients with severe and refractory inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 1273-81.
- 72 Ierardi E, Principi M, Francavilla R, Pisani A, Rendina M, Ingrosso M, et al. Oral tacrolimus long-term therapy in patients with Crohn's disease and steroid resistance. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 371-7.
- 73 Durez P, Appelboom T, Pira C, Stordeur P, Vray B, Goldman M. Antiinflammatory properties of mycophenolate mofetil in murine endotoxemia: Inhibition of TNFalpha and upregulation of IL-10 release. *Int J Immunopharmacol* 1999; 21: 581-7.
- 74 Skelly MM, Logan RF, Jenkins D, Mahida YR, Hawkey CJ. Toxicity of mycophenolate mofetil in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8: 93-7.
- 75 Orth T, Peters M, Schlaak JF, Krummenauer F, Wanitschke R, Mayer WJ, et al. Mycophenolate mofetil versus azathioprine in patients with chronic active ulcerative colitis: a 12-month pilot study. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1201-7.
- 76 Sandborn WJ, Hanauer S. Antitumor necrosis factor therapy of inflammatory bowel disease: A review of agents, pharmacology, clinical results and safety. *Inflamm Bowel Dis* 1999; 5: 119-33.
- 77 Breedveld FC. Therapeutic monoclonal antibodies. *Lancet* 2000; 355: 735-40.
- 78 Baert FJ, D'Haens GR, Peeters M, Hiele MI, Schaible TF, Shealy D, et al. Tumor necrosis factor alpha antibody (Infliximab) therapy profoundly down-regulates the inflammation in Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology* 1999; 116: 22-6.
- 79 Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, et al. Maintenance Infliximab for Crohn's disease: The ACCENT I randomized trial. *Lancet* 2002; 359: 1541-9.
- 80 Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezaand RA, et al. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1999; 117: 761-9.
- 81 Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinich W, Olson A, Johanns J, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005; 353 (23): 2462-76.
- 82 Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, Macintosh D, et al. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: The CLASSIC-I trial. *Gastroenterology* 2006; 130: 323-33.
- 83 Hinojosa J, Gomollon F, Garcia S, Bastida G, Cabriada JL, Saro C, et al. On behalf of GETECCU Grupo Español de Trabajo para el estudio de Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa (Spanish Scientific Group on Crohn's Disease and Ulcerative Colitis). Efficacy and safety of short-term adalimumab treatment in patients with active Crohn's disease who lost response or showed intolerance to Infliximab: A prospective, open-label, multicentre trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 409-18.
- 84 Winthrop KL. Risk and prevention of tuberculosis and other serious opportunistic infections associated with the inhibition of tumor necrosis factor. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2: 602-10.
- 85 Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: Systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *Jama* 2006; 295: 2275-85.
- 86 Cabriada JL, Doménech E, Gomollón F, González-Carro P, González-Lara V, Hinojosa J, et al. Documento de consenso en el uso de la granulocitoaféresis en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29: 85-92.
- 87 Bergstrand O, Hellers G. Breast-feeding during infancy in patients who later develop Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1983; 18 (7): 903-6.
- 88 Corrao G, Tragnone A, Caprilli R, Trallori G, Papi C, Andreoli A, et al. Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case-control study. Cooperative Investigators of the Italian Group for the Study of the Colon and the Rectum (GISC). *Int J Epidemiol* 1998; 27(3): 397-404.
- 89 Reif S, Klein I, Lubin F, Farsbtein M, Hallak A, Gilat T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40 (6): 754-60.
- 90 Rawcliffe PM, Truelove SC. Breakfast and Crohn's disease I. *Br Med J* 1978; 2 (6136): 539-40.
- 91 Martini GA, Brandes JW. Increased consumption of refined carbohydrates in patients with Crohn's disease. *Klin Wochenschr* 1976; 54 (8): 367-71.

- 92 Jarnerot G, Jarnmark I, Nilsson K. Consumption in patients with Crohn's disease, ulcerative colitis, or irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* 1983; 18(8): 999-1002.
- 93 Kasper H, Sommer H. Dietary fiber and nutrient intake in Crohn's disease. *Am J Clin Nutr* 1979; 32 (9): 1898-901.
- 94 Persson PG, Ahlbom A, Hellers G. Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. *Epidemiology* 1992; 3(1): 47-52.
- 95 Porro GB, Panza E. Smoking, sugar, and inflammatory bowel disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985; 291 (6500): 971-2.
- 96 Cashman KD, Shanahan F. Is nutrition an aetiological factor for inflammatory bowel disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15(6): 607-13.
- 97 Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115 (1): 182-205.
- 98 Fiocchi C. Visión integrada de la fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal. En: MA Gassull, A Obrador, J Hinojosa, editor. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. II ed. Madrid: Ediciones Ergon SA; 2002. p. 59-66.
- 99 Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122 (1): 44-54.
- 100 Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunol.* 2003; 3: 521-533.
- 101 Sartor RB. Review article: Role of the enteric microflora in the pathogenesis of intestinal inflammation and arthritis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11 Suppl 3: 17-22; discussion 22-3.
- 102 Rutgeerts P, Geboes K, Peeters M, Hiele M, Pennickx F, Aerts R, et al. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet* 1991; 338 (8770): 771-4.
- 103 Sandborn WJ, Landers CJ, Tremaine WJ, Targan SR. Antineutrophil cytoplasmic antibody correlates with chronic pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis. *Am J Gastroenterol* 1995; 90 (5): 740-7.
- 104 Sands BE. Therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000; 118 (2 Suppl 1): S68-82.
- 105 Shanahan F. Probiotic and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale? *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6 (2): 107-15.
- 106 Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 109(4): 1344-67.
- 107 Farrell RJ, LaMont JT. Microbial factors in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2002; 31 (1): 41-62.
- 108 Krishnan A, Korzenik JR. Inflammatory bowel disease and environmental influences. *Gastroenterol Clin North Am* 2002; 31 (1): 21-39.
- 109 Thomas GA, Rhodes J, Green JT. Inflammatory bowel disease and smoking – a review. *Am J Gastroenterol* 1998; 93 (2): 144-9.
- 110 Rhodes J, Thomas GA. Smoking: good or bad for inflammatory bowel disease?. *Gastroenterology* 1994; 106 (3): 807-10.
- 111 Russel MG, Volovics A, Schoon EJ, van Wijlick EH, Logan FR, Shivananda S, et al. Inflammatory bowel disease: is there any relation between smoking status and disease presentation? European Collaborative IBD Study Group. *Inflamm Bowel Dis* 1998; 43(3): 182-6.
- 112 Fraga XF, Vergara M, Medina C, Casellas F, Bermejo G, Malagelada JR. Effects of smoking on the presentation and clinical course of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997; 9(7): 683-7.
- 113 Lindberg E, Tysk C, Anderson K, Jarnerot G. Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut* 1988; 29(3): 352-7.
- 114 Motley RJ, Rhodes J, Ford GA, Wilkinson SP, Chesner IM, Asquith P, et al. Time relationships between cessation of smoking and onset of ulcerative colitis. *Digestion* 1987; 37 (2): 125-7.
- 115 Sandler R, Sandler D, McDonnell C, Wurzelmann JI. Childhood exposure to environmental tobacco smoke and the risk of ulcerative colitis. *Am J Epidemiol* 1992; 135: 603-8.
- 116 Picco MF, Bayless TM. Tobacco consumption and disease duration are associated with fistulizing and stricturing behaviours in the first 8 years of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2003; 98(2): 363-8.
- 117 Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1989; 34 (12): 1841-54.

- 118 Reif S, Klein I, Arber N, Gilat T. Lack of association between smoking and inflammatory bowel disease in Jewish patients in Israel. *Gastroenterology* 1995; 108(6): 1683-7.
- 119 Lee JC, Lennard-Jones JE. Inflammatory bowel disease in 67 families each with three or more affected first-degree relatives. *Gastroenterology* 1996; 111(3): 587-96.
- 120 Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG, Kouroumalis EA. Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8(4): 277-86.
- 121 Gilat T, Hacoheh D, Lilos P, Langman MJ. Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. An international cooperative study. *Scand J Gastroenterol* 1987; 22 88 9: 1009-24.
- 122 Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* 1994; 343(8900): 766-7.
- 123 Wurzelmann JI, Lyles CM, Sandler RS. Childhood infections and the risk of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1994; 39(3): 555-60.
- 124 Russel MG, Dorant E, Brummer RJ, van de Kruijs MA, Muris JW, Bergers JM, et al. Appendectomy and the risk of developing ulcerative colitis or Crohn's disease: results of a large case-control study. South Limburg Inflammatory Bowel Disease Group. *Gastroenterology* 1997; 113(2): 377-82.
- 125 Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003; 124(1): 40-6.
- 126 Aabakken L, Osnes M. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced disease in the distal ileum and large bowel. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24:48-55.
- 127 Lana R, Mendoza JL, Cruz-Santamaría DM, García-Paredes J. Antiinflamatorios no esteroideos. En: Etiopatogenia de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal: factores ambientales. Actualizaciones temáticas Madaus en Gastroenterología. Barcelona, ed Glosa 2004. p. 55-8.
- 128 Timmer A, Sutherland L, Martin F. Oral contraceptive use and smoking are risk factors for relapse in Crohn's disease. The Canadian Mesalamine for Remission Crohn's Disease Study group. *Gastroenterology* 1998; 114(6): 1143-50.
- 129 Cosnes J, Carbonnel F, Carrat F, Beaugerie L, Gendre JP. Oral contraceptive use and the clinical course of Crohn's disease: a prospective cohort study. *Gut* 1999; 45(2): 218-22.
- 130 Godet PG, May GR, Sutherland LR. Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. *Gut* 1995; 37(5): 668-73.
- 131 Sicilia B, López Miguel C, Arribas F, Lopez Zaborras J, Sierra E, Gomollon F. Environmental risk factors and Crohn's disease: a population-based, case-control study in Spain. *Dig Liver Dis* 2001; 33(9): 762-7.
- 132 Boyko EJ, Theis MK, Vaughan TL, Nicol-Blades BI. Increased risk of inflammatory bowel disease associated with oral contraceptive use. *Am J Epidemiol* 1994; 140(3): 268-78.
- 133 Mendoza JL, Cruz-Santamaría DM, Lana R, García-Paredes J. Anticonceptivos. En: Etiopatogenia de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal: factores ambientales. Actualizaciones temáticas Madaus en Gastroenterología. Barcelona, ed Glosa 2004. p. 37-40.
- 134 Fantini MC, Fina D, Pallone F. Inmunología de las enfermedades inflamatorias intestinales. En: MA Gassull, F Gomollón, J Hinojosa, A Obrador. Enfermedad Inflamatoria Intestinal. III edición. Madrid, Ediciones Arán SA. 2007. p. 81-102.
- 135 Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation and allergy in the gut. *Science* 2005; 307: 1920-5.
- 136 Sartor RB. Innate immunity in the pathogenesis and therapy of IBD. *J Gastroenterol* 2003; 38 Suppl 15: 43-7.
- 137 Medzhitov R, Janeway C Jr. An ancient system of host defense. *Curr Opin Immunol* 1998; 10(1): 12-5.
- 138 Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17(1): 1-14.
- 139 Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(5): 371-82.
- 140 Ting JP, Davis BK. CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 387-414.
- 141 Mueller T, Podolsky DK. Nucleotide-binding-oligomerization domain proteins and toll-like receptors: sensors of the inflammatory bowel diseases microbial environment. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21(4): 419-25.
- 142 Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-Like receptors and NOD2. *Gut* 2005; 54(8): 1182-93.

- 143 Netea MG, Kullberg BJ, de Jong DJ, Franke B, Sprong T, Naber TH, et al. NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. *Eur J Immunol* 2004; 34(7): 2052-9.
- 144 Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type I responses. *Nat Immunol* 2004; 5(8): 800-8.
- 145 Maeda S, Hsu LC, Liu H, Bankston LA, Limura M, Kagnoff MF, et al. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* 2005; 307(5710): 734-8.
- 146 Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005; 307(5710): 731-4.
- 147 Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* 2005; 560: 11-8.
- 148 Korzenik JR, Dieckgraefe BK. Is Crohn's disease an immunodeficiency? A hypothesis suggesting possible early events in the pathogenesis of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000; 45(6): 1121-9.
- 149 Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347(6): 417-29.
- 150 Gordon JN, Sabatino AD, Macdonald TT. The pathophysiologic rationales for biological therapies in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21(4): 431-7
- 151 Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113(10): 1490-7.
- 152 Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 2007; 19(6): 652-7.
- 153 Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008; 28: 454-67.
- 154 Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupé P, Barillot E, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol* 2008; 9(6): 650-7.
- 155 Coombes JL, Robinson NJ, Maloy KJ, Uhlig HH, Powrie F. Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol Rev* 2005; 204: 184-94.
- 156 Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, et al. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25 (high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005; 128(7): 1868-78.
- 157 Makita S, Kanai T, Oshima S, Uraushihara K, Totsuka T, Sawada T, et al. CD4+CD25bright T Cells in Human Intestinal Lamina Propria as Regulatory Cells. *J Immunol* 2004; 173(5): 3119-30.
- 158 Allez M, Mayer L. Regulatory T cells: peace keepers in the gut. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10(5): 666-76.
- 159 Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. T cell apoptosis and inflammatory bowel disease. *Gut* 2004; 53(11): 1556-8.
- 160 Neurath MF, Finotto S, Fuss I, Boirivant M, Galle PR, Strober W. Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends Immunol* 2001; 22(1): 21-6.
- 161 Sturm A, Leite AZ, Danese S, Krivacic KA, West GA, Mohr S, et al. Divergent cell cycle kinetics underlie the distinct functional capacity of mucosal T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 2004; 53(!!): 1624-31.
- 162 Doering J, Begue B, Lentze MJ, Rieux-Laucat F, Goulet O, Schmitz J, et al. Induction of T lymphocyte apoptosis by sulphasalazine in patients with Crohn's disease. *Gut* 2004; 53(11): 1632-8.
- 163 Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med*. 2006;203: 2271-9.
- 164 Ahern PP, Izcue A, Maloy KJ, Powrie F. The interleukin-23 axis in intestinal inflammation. *Immunol Rev* 2008; 226: 147-59.
- 165 Kirkegaard T, Hansen A, Bruun E, Brynskov J. Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease. *Gut* 2004; 53(5): 701-9.

- 166 Vergnolle N, Cellars L, Mencarelli A, Rizzo G, Swaminathan S, Beck P, et al. A role for proteinase-activated receptor-1 in inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2004; 114(10): 1444-56.
- 167 Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003; 124(2): 521-36.
- 168 Hugot JP. Genetic origin of IDB. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10 suppl 1: S11-S15.
- 169 Russell RK, Satsangi J. IBD: a family affair. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 525-39.
- 170 Peeters M, Nevens H, Baert F, Hiele M, de Meyer AM, Vlietinck R, et al. Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology* 1996; 111: 597-603.
- 171 Vermeire S, Satsangi J, Peeters M, Parkes M, Jewell DP, Vlietinck R, Rutgeerts P. Evidence for inflammatory bowel disease of a susceptibility locus on the X chromosome. *Gastroenterology* 2001; 120: 834-40.
- 172 Yang H, McElree C, Roth MP, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut* 1993; 34(4): 517-24.
- 173 Peeters M, Cortot A, Vermeire S, Colombel JF. Familial and sporadic inflammatory bowel disease: different entities? *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6(4): 314-20.
- 174 Wandstrat A, Wakeland E. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat Immunol* 2001; 2(9): 802-9.
- 175 Mayeux R. Mapping the new frontier: complex genetic disorders. *J Clin Invest* 2005; 115(6): 1404-7.
- 176 Neale BM, Sham PC. The future of association studies: gene-based analysis and replication. *Am J Hum Genet* 2004; 75(3): 353-62.
- 177 Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996; 273(5281): 1516-7.
- 178 Kruglyak L. The road to genome-wide association studies. *Nat Rev Genet.* 2008; 9:314-8.
- 179 Jorgenson E, Witte JS. A gene-centric approach to genome-wide association studies. *Nat Rev Genet.* 2006; 7:885-91.
- 180 Dunbar SA. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clin Chim Acta* 2006; 363:71-82.
- 181 Tost J, Gut IG. Genotyping single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry in clinical applications. *Clin Biochem.* 2005; 38:335-50.
- 182 Pennisi E. Breakthrough of the year. Human genetic variation. *Science* 2007; 318:1842-3.
- 183 Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science.* 2002; 296:2225-9.
- 184 Wellcome Trust Case Control Consortium; Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC), Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, et al. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet* 2007; 39:1329-37.
- 185 Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; 447:661-78.
- 186 Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; 379(6568): 821-3.
- 187 Newman B, Siminovitch KA. Recent advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21(4): 401-7.
- 188 Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, Fields CT, LaBuda MC, Rohal PM, et al. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Nat Acad Sci U S A* 1998; 95(13): 7502-7.
- 189 Curran ME, Lau KF, Hampe J, Schreiber S, Bridger S, Macpherson AJ, et al. Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16. *Gastroenterology* 1998; 115(5): 1066-71.
- 190 Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, Lau KF, Bridger S, Macpherson AJ, et al. A genome-wide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. *Am J Hum Genet* 1999; 64(3): 808-16.

- 191 Williams CN, Kocher K, Lander ES, Daly MJ, Rioux JD. Using a genome-wide scan and meta-analysis to identify a novel IBD locus and confirm previously identified IBD loci. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8(6): 375-81.
- 192 Cavanaugh J. International collaboration provides convincing linkage replication in complex disease through analysis of a large pooled data set: Crohn disease and chromosome 16. *Am J Hum Genet* 2001; 68(5): 1165-71.
- 193 Annese V, Latiano A, Bovio P, Forabosco P, Piepoli A, Lombardi G, et al. Genetic analysis in Italian families with inflammatory bowel disease supports linkage to the IBD1 locus- a GISC study. *Eur J Hum Genet* 1999; 7(5): 567-73.
- 194 Annese V, Latiano A, Palmieri O, Li HH, Forabosco P, Ferraris A, et al. Linkage of ulcerative colitis to the pericentromeric region of chromosome 16 in Italian inflammatory bowel disease families is independent of the presence of common CARD15 mutations. *J Med Genet* 2003; 40(11): 837-41.
- 195 Mirza MM, Fisher SA, King K, Cuthbert AP, Hampe J, Sanderson J, et al. Genetic evidence for interaction of the 5q31 cytokine locus and the CARD15 gene in Crohn disease. *Am J Hum Genet* 2003; 72(4): 1018-22.
- 196 Farmer M, Hunt L, Eichenberger MR, Petras RE, Janosky JE, Galandiuk S. Association of susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 with both ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2001; 46(3): 632-6.
- 197 Van Heel DA, Carey AH, Jewell DP. Identification of novel polymorphisms in the beta7 integrin gene: family-based association studies in inflammatory bowel disease. *Genes Immun* 2001; 2(8): 455-60.
- 198 Stokkers PC, Huibregtse K Jr., Leegwater AC, Reitsma PH, Tytgart GN, van Deventer SJ. Analysis of a positional candidate gene for inflammatory bowel disease: NRAMP2. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6(2): 92-8.
- 199 Klein W, Tromm A, Folwaczny C, Hagedorn M, Duerig N, Epplen J, et al. The G2964A polymorphism of the STAT6 gene in inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 2005; 37(3): 159-61.
- 200 De Jong DJ, Franke B, Naber AH, Willemsen JJ, Heister AJ, Brunner HG, et al. No evidence for involvement of IL-4R and CD11B from the IBD1 region and STAT6 in the IBD2 region in Crohn's disease. *Eur J Human Genet* 2003; 11(11): 884-7.
- 201 Xia B, Crusius JB, Wu J, Zwiers A, van Bodegraven AA, Pena AS. Signal transducer and activator of transcription 6 gene G2964A polymorphism and inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2003; 131(3): 446-50.
- 202 Hampe J, Shaw SH, Saiz R, Leysens N, Lantermann A, Mascheretti S, et al. Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p. *Am J Hum Genet* 1999; 65(6): 1647-55.
- 203 Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, McLeod RS, Griffiths AM, et al. Genome-wide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2000; 66(6): 1863-70.
- 204 Risch N. Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease. *Am J Hum Genet* 1987; 40(1): 1-14.
- 205 Satsangi J, Welsh KI, Bunce M, Julier C. Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1996; 347(9010): 1212-7.
- 206 Yang H, Plevy SE, Taylor K, Tyan D, Fischel-Ghodsian N, McElree C, et al. Linkage of Crohn's disease to the major histocompatibility complex region is detected by multiple non-parametric analyses. *Gut* 1999; 44(4): 519-26.
- 207 Yap LM, Ahmad T, Jewell DP. The contribution of HLA genes to IBD susceptibility and phenotype. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18(3): 577-96.
- 208 De la Concha EG, Fernandez-Arquero M, Lopez-Nava G, Martin E, Allcock RJ, Conejero L, et al. Susceptibility to severe ulcerative colitis is associated with polymorphism in the central MHC gene IKBL. *Gastroenterology* 2000; 119(6): 1491-5.
- 209 van Heel DA, Udalova IA, de Silva AP, McGovern DP, Kinouchi Y, Hull J, et al. Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism that affects an interaction between the OCT1 and NF(-kappa)B transcription factors. *Hum Mol Genet* 2002; 11(11): 1281-9.
- 210 Ma Y, Ohmen JD, Li Z, Bentley LG, McElree C, Pressman S, et al. A genome-wide search identifies potential new susceptibility loci for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 1999; 5(4): 271-8

- 211 Rioux JD, Daly MJ, Silverberg MS, Lindblad K, Steinhart H, Cohen Z, et al. Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet* 2001; 29(2): 223-8.
- 212 Armuzzi A, Ahmad T, Ling KL, de Silva A, Cullen S, van Heel D, et al. Genotype-phenotype analysis of the Crohn's disease susceptibility haplotype on chromosome 5q31. *Gut* 2003; 52(8): 1133-9.
- 213 Giallourakis C, Stoll M, Miller K, Hampe J, Lander ES, Daly MJ, et al. IBD5 is a general risk factor for inflammatory bowel disease: replication of association with Crohn disease and identification of a novel association with ulcerative colitis. *Am J Hum Genet* 2003; 73(1): 205-11.
- 214 Negoro K, McGovern DP, Kinouchi Y, Takahashi S, Lench NJ, Shimosegawa T, et al. Analysis of the IBD5 locus and potential gene-gene interactions in Crohn's disease. *Gut* 2003; 52(4): 541-6.
- 215 Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Ichimori T, Saito S, Lida A, et al. Association analysis of SLC22A5, SLC22A5 and DLG5 in Japanese patients with Crohn disease. *J Hum Genet* 2004; 49(12): 664-8.
- 216 Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, et al. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 2004; 36(5): 471-5.
- 217 Newman B, Gu X, Wintle R, Cescon D, Yazdanpanah M, Liu X, et al. A risk haplotype in the Solute Carrier Family 22A4/22A5 gene cluster influences phenotypic expression of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005; 128(2): 260-9.
- 218 Ahmad T, Tamboli CP, Jewell D, Colombel JF. Clinical relevance of advances in genetics and pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology* 2004; 126(6): 1533-49.
- 219 Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, et al. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2004; 36(5): 476-80.
- 220 Daly MJ, Pearce AV, Farwell L, Fisher SA, Latiano A, Prescott NJ, et al. Association of DLG5 R30Q variant with inflammatory bowel disease. *Eur J Hum Genet* 2005; 13(7): 835-9.
- 221 Olaison G, Sjodahl R, Tagesson C. Abnormal intestinal permeability in Crohn's disease. A possible pathogenic factor. *Scand J Gastroenterol* 1990; 25(4): 321-8.
- 222 May GR, Sutherland LR, Meddings JB. Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn's disease? *Gastroenterology* 1993; 104(6): 1627-32.
- 223 Peeters M, Geypens B, Claus D, Nevens H, Ghoos Y, Verbeke G, et al. Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997; 113(3): 802-7.
- 224 Panwala CM, Jones JC, Viney JL. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J Immunol* 1998; 161(10): 5733-44.
- 225 Van Heel DA, Fisher SA, Kirby A, Daly MJ, Rioux JD, Lewis CM. Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Hum Mol Genet* 2004; 13(7): 763-70.
- 226 Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fromm MF, Kaskas B, Metzler J, et al. Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003; 124(1): 26-33.
- 227 Ho GT, Nimmo ER, Tenesa A, Fennell J, Drummond H, Mowat C, et al. Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2005; 128(2): 288-96.
- 228 Brant SR, Panhuysen CI, Nicolae D, Reddy DM, Bonen DK, Karaliukas R, et al. MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2003; 73(6): 1282-92.
- 229 Croucher PJ, Mascheretti S, Foelsch UR, Hampe J, Schreiber S. Lack of association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and inflammatory bowel disease in two independent North European populations. *Gastroenterology* 2003; 125(6): 1919-20; author reply 1920-1.
- 230 Glas J, Torok HP, Schiemann U, Folwaczny C. MDR1 gene polymorphism in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2004; 126(1): 367-9.
- 231 Gazouli M, Zacharatos P, Gorgoulis V, Mantzaris G, Papalambros E, Ikonomopoulos J. The C3435T MDR1 gene polymorphism is not associated with susceptibility for ulcerative colitis in Greek population. *Gastroenterology* 2004; 126(1): 367-9.

- 232 Low JH, Williams FA, Yang X, Cullen S, Colley J, Ling KL, et al. Inflammatory bowel disease is linked to 10p13 and associated with ICAM-1. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10(3): 173-81.
- 233 Cho JH, Nicolae DL, Ramos R, Fields CT, Rabenau K, Corradino S, et al. Linkage and linkage disequilibrium in chromosome band 1p36 in American Chaldeans with inflammatory bowel disease. *Hum Mol Genet* 2000; 9(9): 1425-32.
- 234 Torok 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(1): 365-6.
- 235 Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, 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(7): 987-92.
- 236 Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Mussack T, Folwaczny C. Polymorphism of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative. *Clin Immunol* 2004; 112(1): 85-91.
- 237 Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, et al. Association between polymorphism in the toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol* 2005; 11(5): 681-5.
- 238 Ouburg S, Mallant-Hent R, Crusius JB, van Bodegraven AA, Mulder CJ, Linskens R, 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(3): 439-40.
- 239 Lakatos PL, Lakatos L, Szalay F, Willheim-Polli C, Osterreicher C, Tulassay Z, et al. Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutation in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World J Gastroenterol* 2005; 11(10): 1489-95.
- 240 Karban AS, Okazaki T, Panhuysen CI, Gallegos T, Potter JJ, Bailey-Wilson JE, et al. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* 2004; 13(1): 35-45.
- 241 Oliver J, Gomez-Garcia M, Paco L, Lopez-Nevot MA, Pinero A, Correro F, et al. A functional polymorphism of the NFKB1 promoter is not associated with ulcerative colitis in a Spanish population. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11(6): 576-9.
- 242 Budarf ML, Labbé C, David G, Rioux JD. GWA studies: rewriting the story of IBD. *Trend Genet* 2009; 25: 137-46.
- 243 Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006; 314: 1461-3.
- 244 Oliver J, Rueda B, López-Nevot MA, Gómez-García M, Martin J. Replication of an association between IL23 gene polymorphism with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 977-81.
- 245 Xavier RJ, Rioux JD. Genome-wide association studies: a new window into immune-mediated diseases. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 631-43.
- 246 Mathew CG. New links to the pathogenesis of Crohn disease provided by genome-wide association scans. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 9-14.
- 247 Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007; 39: 207-11.
- 248 Zhang H, Massey D, Tremelling M, Parkes M. Genetics of inflammatory bowel disease: clues to pathogenesis. *Br Med Bull* 2008; 87: 17-30.
- 249 Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* 2007; 39: 830-2.
- 250 Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, Nikolans S, Mayr G, et al. Sequence variants in IL 10.ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Gen* 2008; 40: 1319-23.
- 251 Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411(6837): 599-603.
- 252 Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411(6837): 603-6.

- 253 Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nunez G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 2001; 276(4): 2551-4.
- 254 Inohara N, Nunez G. The NOD: a signalling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene* 2001; 20(44): 6473-81.
- 255 Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F, et al. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 2002; 277(44): 41701-5.
- 256 Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamaillard M, Chareyre F, De Lagausie P, et al. Card 15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* 2003; 52(6): 840-6.
- 257 Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K, Kuhbacher T, Waetzig GH, Seegert D, et al. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003; 124(4): 1001-9.
- 258 Ogura Y, Lala S, Xin W, Smith E, Dowds TA, Chen FF, et al. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 2003; 52(11): 1591-7.
- 259 Lala S, Ogura Y, Psborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, et al. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 2003; 125(1): 45-57.
- 260 Ouellette AJ, Bevins CL. Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7(1): 43-50.
- 261 Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP, Ayabe T, Lopez-Boado YS, Stratman JL, et al. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* 1999; 286(5437): 113-7.
- 262 Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* 2000; 1(2): 113-8.
- 263 Beutler B. Autoimmunity and apoptosis: the Crohn's connection. *Immunity* 2001; 15(1): 5-14.
- 264 Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappa B. *J Biol Chem* 2001; 276(7): 4812-8.
- 265 Inohara N, Ogura Y, Nunez G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2002; 5(1): 76-80.
- 266 Kobayashi K, Inohara N, Hernandez LD, Galan JE, Nunez G, Janeway CA, et al. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* 2002; 416(6877): 194-9.
- 267 Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003; 278(8): 5509-12.
- 268 Hugot JP, Zouali H, Lesage S. Lessons to be learned from the NOD2 gene in Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15(6): 593-7.
- 269 Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70(4): 845-57.
- 270 Zheng CQ, Hu GZ, Zeng ZS, Lin LJ, Gu GG. Progress in searching for susceptibility gene for inflammatory bowel disease by positional cloning. *World J Gastroenterol* 2003; 9(8): 1646-56.
- 271 Seki SS, Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, Katsuyama Y, Ishizuka K, et al. Stratification analysis of MICA triplet repeat polymorphisms and HLA antigens associated with ulcerative colitis in Japanese. *Tissue Antigens* 2001; 58(2): 71-6.
- 272 Croucher PJ, Mascheratti S, Hampe J, Huse K, Frenzel H, Stoll M, et al. Haplotype structure and association to Crohn's disease of CARD15 mutation in two ethnically divergent populations. *Eur J Hum Genet* 2003; 11(1): 6-16.
- 273 Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17(12): 1465-70.
- 274 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(12): 2393-404.
- 275 Rahman P, Bartlett S, Siannis F, Pellett FJ, Farewell VT, Peddle L, et al. CARD15: a pleiotropic autoimmune gene that confers susceptibility to psoriatic arthritis. *Am J Hum Genet* 2003; 73(3): 677-81.

- 276 Giardina E, Novelli G, Costanzo A, Nistico S, Bulli C, Sinibaldi C, et al. Psoriatic arthritis and CARD15 gene polymorphisms: no evidence for association in the Italian population. *J Invest Dermatol* 2004; 122(5): 1106-7.
- 277 Plant D, Lear J, Marsland A, Worthington J, Griffiths CE. CARD15/NOD2 single nucleotide polymorphisms do not confer susceptibility to type I psoriasis. *Br J Dermatol* 2004; 151(3): 675-8.
- 278 Lascorz J, Burkhardt H, Huffmeier U, Bohm B, Schurmeyer-Horst F, Lohmann J, et al. Lack of genetic association of the three more common polymorphisms of CARD15 with psoriatic arthritis and psoriasis in a German cohort. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(6): 951-4.
- 279 Ferreiros-Vidal I, Barros F, Pablos JL, Carracedo A, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. CARD15/NOD2 analysis in rheumatoid arthritis susceptibility. *Rheumatology* (Oxford) 2003; 42(11): 1380-2.
- 280 Addo a, Le J, Li W, Aksentijevich I, Balow J Jr, Lee A, et al. Analysis of CARD15/NOD2 haplotypes fails to identify common variants associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Scand J Rheumatol* 2005; 34(3): 198-2003.
- 281 Weidinger S, Klopp N, Rummeler L, Wagenpfeil S, Baurecht HJ, Gauger A, et al. Association of CARD15 polymorphisms with atopy-related traits in a population-based cohort of Caucasian adults. *Clin Exp Allergy* 2005; 35(7): 866-72.
- 282 Snyers B, Dahan K. Blau syndrome associated with a CARD15/NOD2 mutation. *Am J Ophthalmol* 2006; 142(6): 1089-92.
- 283 Henckaerts L, Vermeire S. NOD2/CARD15 disease association other than Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13(2): 235-41.
- 284 Newman B, Rubin LA, Siminovitch KA. NOD2/CARD15 gene mutation is nor associated with susceptibility to Wegener's granulomatosis. *J Rheumatol* 2003; 30(2): 305-7.
- 285 Steer S, Fisher SA, Fife M, Cuthbert A, Newton J, Wordsworth P, et al. Development of rheumatoid arthritis is not associated with two polymorphisms in the Crohn's disease gene CARD15. *Rheumatology* (Oxford) 2003; 42(2): 304-7.
- 286 Uyar FA, Saruhan-Direskeneli G, Gul A. Common Crohn's disease-predisposing variants of the CARD15/NOD2 gene are nor associated with Behcet's disease in Turkey. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22(4 Suppl 34): S50-2.
- 287 Stockton JC, Howson JM, Awomoyi AA, McAdam KP, Blackwell JM, Newport MJ. Polymorphism in NOD2, Crohn's disease, and susceptibility to pulmonary tuberculosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 412(2): 157-60.
- 288 Abreu MT. Nod2 in normal and abnormal intestinal immune function. *Gastroenterology* 2005; 129(4): 1302-4.
- 289 Chamaillard M, Philpott D, Girardin SE, Zouali H, Lesage S, Chareyre F, et al. Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(6): 3455-60.
- 290 Bender K, Bissbort S, Hiller C, Mayerova A, Wineker TF. On regional mapping of human chromosome 6. Review and own findings. *Acta Anthropogenetica* 1983; 7:85-105.
- 291 Deverson EV, Gow IR, Coadwell WJ, Monaco JJ, Butcher GW, Howard JC. MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Nature* 1990; 348:738-41.
- 292 Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsed A, Kelly A. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature* 1990; 348:741-4.
- 293 Campbell RD. The molecular genetics and polymorphism of C2 and Factor B. *Br Med Bull* 1987; 43: 37-49.
- 294 Carroll MC, Alper CA. polymorphism and molecular genetics of human C4. *Br Med Bull* 1987; 43: 50-65.
- 295 Sargent CA, Dunham I, Trowsdale J, Campbell RD. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock proteins HSP70. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:1968-72.
- 296 Kein J. Natural history of the major histocompatibility complex. A Wiley Interscience publication. John Wiley and sons, New York, 1986.
- 297 Peterson OA, Cunningham BS, Berggard I, Edelman GM. 2-microglobulin a free immunoglobulin domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69: 1671-1701.
- 298 Goodfellow PN, Jopnes EA, Van Heyningen V, Solomon E, Borrow M, Miggiano V, et al. The beta-2 microglobulin gene is on chromosome 15 and not in HLA region. *Nature* 1975; 254: 267-9.

- 299 Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Ann Rev Biochem* 1990; 59: 253-88.
- 300 Saper MA, Bjorkman PJ, Wiley DC. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at a 2.6 Å resolution. *J Mol Biol* 1991; 219: 277-319.
- 301 Rammensee HG, Kalk K, Roztzschke O. MHC molecules as peptide receptors. *Curr Opin Immunol* 1993; 5: 35-44.
- 302 Malissen J, Malissen B, Jordan BR. Exon-intron organization and complete nucleotide sequence of an HLA gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 893-7.
- 303 Jordan BR, Caillol D, Damotte M, Delovich T, Ferrier P, Khan-Perles B, et al. HLA class I genes: from structure to expression, serology and function. *Immunol Rev* 1985; 84: 73-92.
- 304 Gussow D, Rein R, Ginjaar I, Hotchtenbach F, Seemann G, Kotmann A, et al. The human beta-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit. *J Immunol* 1987; 139: 3132-8.
- 305 Srivastava R, Ducean BW, Biro PA, Sood AK, Weissman SM. Molecular organization of the class I genes of human histocompatibility complex. *Immunol Rev* 1985; 84: 93-121.
- 306 Parham P, Lawlor DA, Saleter RD, et al. HLA-A, B, C: patterns of polymorphism in peptide binding proteins. *Immunology of HLA*, vol II 1989. Ed. B. Dupont, Springer-Verlag, New York; pages 10-33
- 307 Parham P, Lawlor DA, Loem CE, Ennis PD.. Diversity and diversification of HLA-A, B, C alleles. *J Immunol* 1989; 142: 3937-50.
- 308 Das HK, Lawrence SK, Eissman SM. Structure and nucleotide sequence of the heavy chain gene of HLA-DR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 3543-7.
- 309 Brown JH, Jardetzky TS, Gotka JC, Stern LJ, Urban RG Strominger JL, et al. Three dimensional structure of the class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993; 364: 33-9.
- 310 Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing and general rules. *Immunogenetics* 1994; 39: 230-42.
- 311 Spies T, Sorrentino R, Boss JM, Okada K, Strominger JL. Structural organization of the DR subregion of the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 5165-9.
- 312 Anderson G, Larhammer D, Widmark E, Serenius B, Peterson PA, et al. Class II genes of the human major histocompatibility complex. Organization and evolutionary relationship of the DRB gene. *J Biol Chem* 1987; 262: 8748-58.
- 313 Tonegawa S. Somatic Generation of antibody diversity. *Nature* 1983; 302: 575-8.
- 314 Fowlkes BJ, Pardoll DM. Molecular and cellular events in T cell development. *Adv Immunol* 1989; 44: 207-63.
- 315 Brodsky FM, Guagliardi LE. The cell biology of antigen processing and presentation. *Ann Rev Immunol* 1991; 7: 707-44.
- 316 Zinkernagel RM, Doherty PC. MHC-restricted cytotoxic T cells. Studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T cells restriction specificity. Function and responsiveness. *Adv Immunol* 1979; 27: 57-62.
- 317 Eckels DD, Lamb JR, Lake P, Woody JN, Johnson AH, Hartzman RJ. Antigen-specific human T lymphocytes clones. Genetic restriction of influenza virus-specific response to HLA-D region genes. *Hum Immunol* 1982; 4: 313-20.
- 318 Teyton L, O'Sullivan D, Dickson PW, Lotteau V, Sette A, Fink P, et al. Invariant chains distinguishes the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature* 1990; 348: 39-44.
- 319 Roche PA, Cresswell P. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenetic peptide binding. *Nature* 1990; 345: 615-8.
- 320 Peters PJ, Neeffjes JJ, Orchot V, Ploegh HL. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 1991; 349: 669-76.
- 321 Lamb CA, Cresswell P. Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-D-invariant chains complexes. *J Immunol* 1992; 138: 3478-82.
- 322 Townsend A, Bodmer H. Antigen recognition by class I restricted T lymphocytes. *Ann Rev Immunol* 1989; 7: 601-24.
- 323 Goldberg AL, Rock KL. Proteolysis, proteosomes and antigen presentation. *Nature* 1992; 357: 375-80.

- 324 Djaballah H, Rowe AJ, Harding SE, Rivett AJ. The multicatalytic proteinase complex (proteasome): structure and conformational changes associated with changes in proteolytic activity. *Biochem J* 1993; 292: 857-62.
- 325 Glynne R, Powis S, Beck S, Kelly A, Kerr L, Trowsdale J. A proteasome related gene between the two transporters loci in the class II region of human MHC. *Nature* 1991; 353: 357-60.
- 326 Martinez CK, Monaco JJ. Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene. *Nature* 1991; 353: 664-7.
- 327 Goate AM, Cooper DN, Hall C, Leung TK, Solomon E, Lim L. Localization of a human heat shock protein HSP-70 gene sequence to chromosome 6 and detection of two other loci by somatic cell hybridation and restriction fragment length polymorphism analysis. *Hum Genet* 1987; 75: 123-8.
- 328 Howard JC. Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 69-76.
- 329 Kelly MA, Powis SH, Kerr LA, Mockridge I, Elliot T, et al. Assembly and function of the two ABC transporter protein encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature* 1992; 355: 641-4.
- 330 Spies T, Cerundolo V, Colonnari M, Cresswell P, Townsend A, DeMars R. Presentation of viral antigen by MHC class I molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer. *Nature* 1992; 355: 644-6.
- 331 Bentley GA, Mariuzza RA. The structure of the T cell antigen receptor. *Ann Rev Immunol* 1996; 14: 563-90.
- 332 Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Ann Rev Immunol* 1993; 11: 637-85.
- 333 Cantrell D. T cell receptor signal and transduction pathway. *Ann Rev Immunol* 1996; 14: 259-74.
- 334 Doyle C, Strominger JL. Interactions between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* 1987; 330: 256-9.
- 335 Gammarota G, Scheirle A, Takacs B. Identification of a CD4 binding site on the β 2 domain of HLA-DR molecules. *Nature* 1992; 356: 796-9.
- 336 Salter RD, Benjamin RJ, Wesley PK. A binding site for T cell co-receptor CD8 on α 3 domain of HLA-A2. *Nature* 1990; 345: 41-5.
- 337 Knight SC, Stagg AJ. Antigen presenting cell types. *Curr Opin Immunol* 1993; 5: 374-82.
- 338 De La Concha EG, Fernandez-Arquero M, Santa-Cruz S, Lopez-Nava G, Figueredo MA, Diaz-Rubio M, et al. Positive and negative association of distinct HLA-DR2 subtypes with ulcerative colitis (UC). *Clin Exp Immunol* 1997; 108(3): 392-5.
- 339 Van Heel DA, Satsangi J, Carey AH, Jewell DP. Inflammatory bowel disease: progress toward a gene. *Can J Gastroenterol* 2000; 14(3): 207-18.
- 340 De La Concha E, Fernandez-Arquero M, Martinez A, Vigil P. Amino acid polymorphism at residue 71 in HLA-DR beta chain plays a critical role in susceptibility to ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 2324-9.
- 341 Trachtenberg E, Yabg H, Hayes E, Vinson M. HLA class II haplotype associations with inflammatory bowel disease in Jewish (Ashkenazi) and non-Jewish Caucasian populations. *Hum Immunol* 2000; 61: 326-33.
- 342 Yamamoto-Furusho J, Uscanga L, Vargas-Alarcon G, Ruiz-Morales G. clinical and genetic heterogeneity in Mexican patients with ulcerative colitis. *Hum Immunol* 2003; 64: 119-23.
- 343 Roussomoustakaki M, Satsangi J, Welsh K, Louis E. Genetic markers may predict disease behavior in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997; 112: 1845-53.
- 344 Silverberg M, Mirea L, Bull S, Murphy J. A population- and family- based study of Canadian families reveals association of HLA DRB1*0103 with colonic involvement in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9: 1-9.
- 345 Orchard TR, Thiagaraja S, Welsh KI, Wordsworth BP, Hill Gaston JS, Jewell DP. Clinical phenotype is related to HLA genotype in the peripheral arthropathies of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000; 118(2): 274-8.
- 346 Nunez C, Alecsandru DM, Mendoza JL, Urcelay E, Diaz-Rubio M, de la Concha EG, et al. Genetic markers linked to rheumatoid arthritis are also strongly associated with articular manifestations in ulcerative colitis patients. *Hum Immunol* 2006; 67: 324-30.
- 347 Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, et al. The molecular classification of the clinical manifestation of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 854-66.

- 348 Fernandez L, Mendoza JL, Martinez A, Uecelay E, Fernandez-Arquero M, Garcia-Paredes J, et al. IBD1 and IBD3 determine location of Crohn's disease in the Spanish population. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 715-22.
- 349 Asakura H, Tsuchiya M, Aiso S, Watanabe M. Association of the human lymphocyte-DR2 antigen with Japanese ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1982; 82: 413-8.
- 350 Toyoda H, Wang S, Yang H, Redford A. Distinct association of HLA class II genes with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993; 104: 741-8.
- 351 Fernandez-Arquero M, Lopez Nava G, De La Concha EG, Figueredo MA, Santa Cruz S, Dumitru CG, et al. HLA-DR2 gene and Spanish patients with ulcerative colitis. *Rev Esp Enferm Dig*. 1998; 90(4): 243-9.
- 352 Futami S, Aoyama N, Honsako Y, Tamura T. HLA-DRB1*1502 allele, subtype of DR15, is associated with susceptibility to ulcerative colitis and its progression. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 814-8.
- 353 Ahmad T, Armuzzi A, Neville M, Bunce M, Ling KL, Welsh KI et al. The contribution of human leucocyte antigen complex genes to disease phenotype in ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 2003; 62: 527-35.
- 354 Cuthbert A, Fisher S, Mirza M, King K. The contribution of NOD2 gene mutation to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122(4): 867-74.
- 355 Stokkers PC, Reitsma PH, Tytgat GN, van Deventer SJ. HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut* 1999; 45(3): 395-401.
- 356 Hesresbach D, Alizadeh M, Bretagne JF, Gautier A, Quillivic F, Lemarchand B, et al. Investigation of the association of major histocompatibility complex genes, including HLA class I, class II and TAP genes, with clinical forms of Crohn's disease. *Eur J Immunogenet*. 1996; 23(2): 141-51.
- 357 Ahmad T, Marshall SE, Jewell D. Genetics of inflammatory bowel disease: the role of the HLA complex. *World J Gastroenterol*. 2006; 12(23): 3628-35.
- 358 Van Hell. *Am J Med Gent* 2002; 111:253-259
- 359 C Saro Gismera, M Lacort Fernández, G Arguelles Fernández, J Antón Margazo, C A Navascues, R García López, et al. Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal crónica en Gijón. Asturias. *Gastroenterol Hepatol* 2001; 24:228-35.
- 360 Garrido A, Martínez MJ, Ortega JA, Lobato A, Rodríguez MJ, Guerrero FJ. Estudio epidemiológico de la enfermedad inflamatoria intestinal en la zona norte de Huelva. *Rev Esp Enf Dig* 2004; 96: 691-4.
- 361 Spanish Epidemiological and Economic Study Group on Crohn's Disease. Epidemiological and clinical features of Spanish patients with Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 1121-7.
- 362 J Oliver, A Márquez, M Gómez-García, A. Martínez, JL Mendoza, JR Vilchez, M A López-Nevot, A Piñero, EG de la Concha, A Nieto, E Urcelay and J Martín. Association of the macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms with inflammatory bowel disease. *Gut* 2007; 56: 150-1
- 363 Mendoza JL, Murillo LS, Fernández L, Peña AS, Lana R, Urcelay E, et al. Prevalence of Mutations of the NOD2/CARD15 Gene and Relation to Phenotype in Spanish Patients with Crohn Disease. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38:1235-1240.
- 364 Núñez C, Barreiro M, Domínguez-Muñoz JE, Lorenzo A, Zapata C, Peña AS. CARD15 mutations in patients with Crohn's disease in a homogeneous Spanish population. *Am J Gastroenterol* 2004; 99(3):450-6.
- 365 De Diego C, Alcántara M, Valle J, Pérez-Grueso MJ, Muñoz-Rosas C, Carrobles JM, et al. Frequency of CARD15 Polymorphisms in Patients with Crohn's disease from Toledo, Spain: genotype-phenotype correlation. *Genet Test* 2006; 10:178-85.
- 366 Rodrigo L, Martínez-Borra J, Garrote JA, Niño P, León AJ, Riestra S, et al. Las mutaciones del gen CARD15 presentan escasa relación con los fenotipos de la enfermedad de Crohn en Asturias. *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99(10):570-5.
- 367 Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001; 357(9272): 1925-8.
- 368 Vavassori P, Borgiani P, Biancone L, D'Apice MR, Blanco G del V, Vallo L, et al. CARD15 mutation analysis in an Italian population: Leu100fsinsC but neither Arg702Trp nor Gly908Arg mutations are associated with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10(2): 116-21.

- 369 Annese V, Lombardi G, Perri F, D'Inca R, Ardizzone S, Riegler G, 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(1): 84-92.
- 370 Heresbach D, Gicquel-Douabin V, Birebent B, D'Halluin P N, Heresbach-Le Berre N, Dreano S, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms in Crohn's disease: a genotype-phenotype analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16(1): 55-62.
- 371 Murillo L, Crusius JB, van Bodegraven AA, Alizadeh BZ, Pena AS. CARD15 gene and the classification of Crohn's disease. *Immunogenetics* 2002; 54(1): 59-61.
- 372 Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, Fennell J, Smith BR, MacKinlay E, et al. NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetics heterogeneity within Europe? *Genes Immunol* 2004; 5(5): 417-25.
- 373 Helio T, Halme L, Lappalainen M, Fodstad H, Paavola-Sakki P, Turunen U, et al. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut* 2003; 52(4): 558-62.
- 374 Ferreira AC, Almeida S, Tavares M, Canedo P, Pereira F, Regalo G, et al. NOD2/CARD15 and TNFA, but not IL1B and IL1RN, are associated with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11(4): 331-9.
- 375 Van der Linde K, Boor P, Houwing-Duistermaat J, Crusius B, Wilson P, Kuipers E, et al. CARD15 mutations in Dutch familial and sporadic inflammatory bowel disease and an overview of European studies. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19(6): 449-59.
- 376 Buning C, Molnar T, Nagy F, Lonovics J, Weltrich R, Bochow B, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms in patients with inflammatory bowel disease: Is Hungary different? *World J Gastroenterol* 2005; 11: 407-11.
- 377 Hosek J, Bartosova L, Gregor P, Kolorz M, Dite P, Batovsky M, Bartos M. Frequency of Representative Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Inflammatory Bowel Disease in the Czech Republic and Slovak Republic. *Folia Biologica* 2008; 54: 88-96.
- 378 Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tanabe T, et al. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defects in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* 2003; 124(1): 140-6.
- 379 Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, et al. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 123(3): 679-88.
- 380 Vermeire S, Wild G, Kocher K, Cousineau J, Dufresne L, Bitton A, et al. CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure. *Am J Hum Gen* 2002; 71(1): 74-83.
- 381 Cavanaugh JA, Adams KE, Quak EJ, Bryce ME, O'Callaghan NJ, Rodgers HJ, et al. CARD15/NOD2 risk alleles in the development of Crohn's disease in the Australian population. *Ann Hum Genet* 2003; 67: 35-41.
- 382 Zouiten-Mekki L, Zaouali H, Boubaker J, Karoui S, Fekih M, Matri S, et al. CARD15/NOD2 in a Tunisian population with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2005; 50(1): 130-5.
- 383 Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, Fukuda Y, Takahashi S, Ogura Y, et al. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 123(1): 86-91.
- 384 Arnot ID, Satsangi J. Crohn's disease or Crohn's disease? *Gut* 2003; 52: 460-1.
- 385 Idestrom M, Rubio C, Granath F, Finkel Y, Hugot JP. CARD15 mutations are rare in Swedish pediatric Crohn's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40: 456-60.
- 386 Buning C, Genschel J, Buhner S, Kruger S, Kling K, Dignass A, 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.
- 387 Bairead E, Harmon DL, Curtis AM, Kelly Y, O'Leary C, Gardner M, et al. Association of NOD2 with Crohn's disease in a homogeneous Irish population. *Eur J Hum Genet* 2003; 11: 237-44.
- 388 Russell RK, Drummond HE, Nimmo EE, Anderson N, Smith L, Wilson DC, et al. Genotype-phenotype analysis in childhood-onset Crohn's disease: NOD2/CARD15 variants consistently predict phenotypic characteristics of severe disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 955-64.
- 389 Yamazaki K, Takazoe T, Kazumori T, Nakamura Y. Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. *J Hum Genet* 2002; 47: 469-72.
- 390 Gasche C, Grundter P. Genotypes and phenotypes in Crohn's disease: do they help in clinical management? *Gut* 2005; 54(1): 162-7.

- 391 Brant SR, Panhuysen CI, Bailey-Wilson JE, Rohal PM, Lee S, Mann J, et al. Linkage heterogeneity for the IBD1 locus in Crohn's disease pedigrees by disease onset and severity. *Gastroenterology* 2000; 119(6): 1483-90.
- 392 Brant SR, Picco MF, Achkar JP, Bayles TM, Kane SV, Brezezinski A, et al. Defining complex contribution of NOD2/CARD15 gene mutation, age, at onset, and tobacco use on Crohn's disease phenotypes. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9(5): 281-9.
- 393 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(6): 777-82.
- 394 Fidler HH, Olschwang S, Avidan B, Zouali H, Lang A, Bardan E, et al. Association between mutations in the CARD15 (NOD2) gene and Crohn's disease in Israeli Jewish patients. *Am J Med Genet A* 2003; 12(3): 240-4
- 395 Radlmayr M, Torok HP, Martin K, Folwaczny C. The c-insertion mutation of the NOD2 gene is associated with fistulizing and fibrostenotic phenotypes in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 2091-2.
- 396 Buning C, Genschel J, Buhner S, Kruger S, Kling K, Dignass A, et al. Mutation 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.
- 397 Álvarez-Lobos M, Aróstegui JL, Sans M, Tassies D, Plaza S, Delgado S, 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.
- 398 Mirza MM, Lee J, Teare D, Hugot JP, Laurent-Puig P, Colombel JF, et al. Evidence of linkage of the inflammatory bowel disease susceptibility locus on chromosome 16 (IBD1) to ulcerative colitis. *J Med Genet* 1998; 35(3): 218-21.
- 399 Yun J, Xu CT, Pan BR. Epidemiology and gene markers of ulcerative colitis in the Chinese. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 788-803.
- 400 Gómez-García M, Oliver J, Márquez A, Mendoza JL, López-Nevot MA, Fernández-Arquero M, González-Escribano MF, Díaz-Rubio M, de la Concha EG, Urcelay E, Martín J, Martínez a. Strong protective effect of DR3 against ulcerative colitis in the Spanish population. *Am J Gastroenterol* 2007; 102(12): 2762-6.
- 401 Heresbach D, Alizadeh M, Reumaux D, Colombel JF, Delamaire M, Danze PM, et al. Are HLA-DR or TAP genes genetic markers of severity in ulcerative colitis? *J Autoimmun* 1996; 9(6): 777-84.
- 402 Silverberg MS, Cho JH, Rioux JD, McGovern DP, Wu J, Annese V, et al. Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. *Nat Genet* 2009; 41(2): 216-20.
- 403 Black CM, Welsh KI, Fielder et al. HLA antigens and Bf allotypes in SLE: Evidence for the association being with specific haplotypes. *Tissue Antigens* 1982; 19: 115-20.
- 404 Farid NR, Stone E, Johnson G. Graves' disease and HLA: clinical and epidemiologic associations. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1980; 13: 535-44.
- 405 She JX. Susceptibility to type I diabetes: HLA-DQ and DR revisited. *Immunol Today* 1996; 17: 323-9.
- 406 Yoshitake S, Kimura A, Okada M, Yao T, Sasazuki T. HLA class II alleles in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens* 1999; 53: 350-8.
- 407 Myung SJ, Yang SK, Jung HY, Chang HS, Park B, Hong WS, et al. HLA-DRB1*1502 confers susceptibility to ulcerative colitis, but is negatively associated with its intractability: a Korean study. *Int J Colorectal Dis* 2002; 17: 233-7.