

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología



TESIS DOCTORAL

**Estudio de polimorfismos genéticos en los genes *HLA*, *MICA*, *NOD2*
y *TLRs* en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alba Martínez Chamorro

Directores

Miguel Ángel López Nevot

María Rosario Gómez García

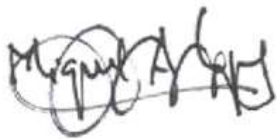
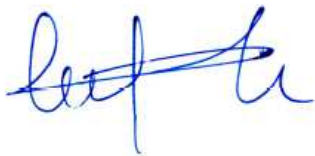
Granada, 2016

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: Alba Martínez Chamorro
ISBN: 978-84-9125-992-3
URI: <http://hdl.handle.net/10481/44086>

El doctorando **Alba Martínez Chamorro** y los directores de la tesis **Miguel Ángel López Nevot** y **María Rosario Gómez García** garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a 20 de mayo de 2016

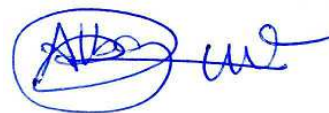
Director/es de la Tesis



Fdo.: Miguel Ángel López Nevot

María Rosario Gómez García

Doctorando



Fdo: Alba Martínez Chamorro

ÍNDICE

ABREVIATURAS	13
RESUMEN	17
1 INTRODUCCIÓN	23
1.1 DEFINICIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	25
1.1.1 Características generales y epidemiología.....	25
1.1.2 Características clínicas.....	25
1.1.3 Diagnóstico.....	29
1.1.4 Tratamiento.....	32
1.2 FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA EII.....	33
1.2.1 Factores ambientales.....	33
1.2.1.1 Tabaco.....	34
1.2.1.2 Apendicectomía.....	34
1.2.1.3 Tratamiento farmacológico.....	34
1.2.1.4 Dieta.....	35
1.2.1.5 Estilo de vida.....	35
1.2.1.6 Infecciones.....	35
1.2.2 Microbiota intestinal.....	36
1.2.3 Factores genéticos.....	37
1.2.3.1 Estudios familiares y de concordancia en gemelos.....	37
1.2.3.2 Estudios de ligamiento y de asociación genética con la EII.....	38
1.2.3.3 Estudios de asociación del genoma completo (GWAS).....	40
1.3 INMUNOPATOGENIA.....	44
1.3.1 Mucosa intestinal y sistema inmunitario asociado a la mucosa en ausencia de enfermedad.....	44
1.3.2 Alteraciones en la enfermedad inflamatoria intestinal.....	47
1.3.2.1 Alteración de la barrera epitelial.....	48
1.3.2.2 Autofagia y estrés del Retículo Endoplásmico.....	49
1.3.2.3 Inmunidad innata.....	50
1.3.2.4 Células linfoides innatas, citoquinas e inmunidad adaptativa.....	51
1.4 GENES ESTUDIADOS.....	54
1.4.1 HLA.....	54
1.4.1.1 Aspectos generales.....	54
1.4.1.2 HLA y la EII.....	56
1.4.2 MICA.....	61
1.4.2.1 Aspectos generales.....	61
1.4.2.2 MICA y la EII.....	63
1.4.3 RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES.....	64
1.4.3.1 NOD2.....	65
1.4.3.1.1 Señalización a partir de NOD2 y su relación con la EII.....	68
1.4.3.1.2 Asociación genética de NOD2 con la EII.....	71
1.4.3.2 RECEPTORES TIPO TOLL (TLRs).....	72
1.4.3.2.1 Señalización a partir de TLRs.....	74
1.4.3.2.2 TLRs en la mucosa intestinal.....	76
1.4.3.2.3 Asociación genética de TLRs con la EII.....	79
2 OBJETIVOS	81
3 METODOLOGÍA	85

3.1	PACIENTES.....	87
3.2	CONTROLES.....	88
3.3	EXTRACCIÓN DE ADN Y CONTROL DE CALIDAD.....	89
3.4	GENOTIPADO DE LAS MUESTRAS.....	90
3.4.1	Tipaje HLA.....	90
3.4.2	Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en TLRs y NOD2.....	91
3.4.3	Microsatélites en MICA y NOD2.....	95
3.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	97
3.5.1	Descripción de la cohorte.....	97
3.5.2	Estudio caso-control.....	98
3.5.3	Estratificación de los pacientes.....	99
3.5.4	Equilibrio de Hardy-Weinber (EHW).....	100
3.5.5	Desequilibrio de ligamiento.....	102
3.5.6	Análisis multivariable.....	103
3.5.7	Corrección de Bonferroni.....	103
3.5.8	Paquetes estadísticos utilizados.....	105
3.5.9	Frecuencias alélicas y genotípicas en otras poblaciones.....	106
4	RESULTADOS.....	107
4.1	DESCRIPCIÓN DE LAS COHORTES. DATOS CLÍNICOS Y DEMOGRÁFICOS ..	109
4.2	HLA Y LA EII.....	117
4.2.1	Relación de HLA-DRB1*01:03 y HLA-DQB1*05:01 con la EII.....	117
4.2.2	Asociación de HLA-C*12:02 y HLA-DRB1*15:02 con la CU.....	119
4.2.3	Otros alelos relacionados con la CU o con su fenotipo.....	120
4.2.4	Otros alelos relacionados con la EC o con su fenotipo.....	120
4.3	MICA Y LA EII.....	122
4.3.1	Papel protector de MICA*A4 frente a la CU.....	122
4.3.2	Relación de otros alelos de MICA y la EII.....	123
4.4	NOD2 Y LA EII.....	124
4.4.1	NOD2 y la CU.....	125
4.4.2	NOD2 y la EC.....	125
4.4.2.1	NOD2 y riesgo de desarrollar EC.....	125
4.4.2.2	NOD2 y fenotipo de la EC.....	127
4.5	TLRs Y LA EII.....	129
4.5.1	TLR1, TLR2, TLR6 y TLR10 en la EII.....	130
4.5.2	TLR3 en la EII.....	133
4.5.3	TLR4 en EII.....	133
4.5.4	TLR5 en la EII.....	137
4.5.5	TLR7, TLR8 y TLR9 en la EII.....	137
5	DISCUSIÓN.....	141
5.1	DESCRIPCIÓN DE LA COHORTE.....	143
5.2	HLA Y LA EII.....	145
5.2.1	Relación de HLA-DRB1*01:03 y HLA-DQB1*05:01 con la EII.....	146
5.2.2	Asociación de HLA-C*12:02 y HLA-DRB1*15:02 con la CU.....	148
5.2.3	Otros alelos relacionados con la CU o con su fenotipo.....	149
5.2.4	Otros alelos relacionados con la EC o con su fenotipo.....	150
5.3	MICA Y LA EII.....	152
5.3.1	Papel protector de MICA*A4 frente a la CU.....	153
5.3.2	Relación de otros alelos MICA y la EII.....	154

5.4	NOD2 Y LA EII	156
5.4.1	NOD2 y la CU.....	157
5.4.2	NOD2 y la EC	157
5.4.2.1	NOD2 y riesgo de desarrollar EC.....	157
5.4.2.2	NOD2 y fenotipo de la EC.....	158
5.5	TLRs Y LA EII.....	160
5.5.1	TLR1, TLR2, TLR6 y TLR10 en la EII	161
5.5.1.1	TLR2	161
5.5.1.2	TLR1	162
5.5.1.3	TLR6	163
5.5.1.4	TLR10.....	164
5.5.2	TLR3 en la EII	165
5.5.3	TLR4 en la EII	165
5.5.4	TLR5 en la EII	171
5.5.5	TLR7 y TLR8 y TLR9 en la EII	172
5.5.5.1	TLR7 y TLR8.....	172
5.5.5.2	TLR9	174
6	CONCLUSIONES	177
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	181
8	ANEXO.....	207
8.1	GENES ASOCIADOS CON ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.....	209
8.2	TIPAJE HLA Y MICA	210
8.2.1	Tipaje HLA-A.....	210
8.2.2	Tipaje HLA-B.....	211
8.2.3	Tipaje HLA-C.....	212
8.2.4	Tipaje HLA-DRB1	213
8.2.5	Tipaje HLA-DQB1	215
8.2.6	Tipaje de MICA.....	216
8.3	CONSTRUCCIÓN DE HAPLOTIPOS Y ESTUDIO DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO.....	218
8.3.1	HLA-B/HLA-C	218
8.3.2	HLA-B/MICA	219
8.3.3	HLA-DRB1/HLA-DQB1	220

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico (<i>DNA: Deoxyribonucleic acid</i>)
AIEC	<i>Escherichia coli</i> adherente-invasiva (del inglés <i>Adherent-invasive Escherichia coli</i>)
AINE	Anti-inflamatorio no esteroideo
ARN	Ácido Ribonucleico (<i>RNA: Ribonucleic acid</i>)
ARNm	ARN mensajero
BCR	Receptor de células B (del inglés <i>B cell receptor</i>)
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas (del inglés <i>Caspase Recruitment Domain</i>)
CD	del inglés <i>Cluster of Differentiation</i>
CEI	Células epiteliales intestinales
CEP	Colangitis Esclerosante Primaria
CI	Colitis Indeterminada
CPA	Célula Presentadora de Antígeno
CTE	Complicaciones tromboembólicas
CU	Colitis Ulcerosa
DAMPs	Patrones moleculares asociados a peligro (del inglés <i>Danger-associated molecular patterns</i>)
DD	Dominio de muerte (del inglés <i>Death Domain</i>)
DSS	del inglés <i>Dextran Sulfate Sodium</i>
DT1	Diabetes tipo 1
EC	Enfermedad de Crohn
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
EMO	Enfermedad metabólica ósea
Epa	Enfermedad perianal
FAE	Epitelio asociado al folículo (del inglés <i>Follicle-associated epithelium</i>)
GALT	Tejido linfoide asociado a mucosa intestinal (del inglés <i>Gut-associated lymphoid tissue</i>)
GMZ	Gemelo monocigótico
GDZ	Gemelo dicigótico
GWAS	Estudio de asociación del genoma completo (del inglés <i>Genome Wide Association Study</i>)
HLA	Antígeno Leucocitario Humano (del inglés <i>Human Leukocyte Antigen</i>)
IBD	del inglés <i>Inflammatory Bowel Disease</i>
IC	Intervalo de Confianza
IFN	Interferón
ILC	Células linfoides innatas (del inglés <i>Innate lymphoid cells</i>)
KIR	del inglés <i>Killer Inhibitory Receptors</i>
LB	Linfocito B
LD	Desequilibrio de ligamiento (del inglés <i>Linkage Disequilibrium</i>)
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
LIE	Linfocito intraepitelial
LLP	Linfocitos de la Lámina propia
LPS	Lipopolisacárido
LRR	Repeticiones ricas en Leucina (del inglés <i>Leucine-rich repeat</i>)
LT	Linfocito T

ABREVIATURAS

LTi	del inglés <i>Lymphoid tissue-inducer</i>
MALT	del inglés <i>Mucosa-associated lymphoid tissue</i> (tejido linfoide asociado a mucosas)
MAMP	Patrones moleculares asociados a microbios (del inglés <i>Microbe-Associated Molecular Patterns</i>)
MDP	Muramil dipéptido
MED	Manifestaciones extradigestivas
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad (del inglés <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MICA	del inglés <i>MHC Class I chain-related A</i>
MNL	Ganglio linfático mesentérico (del inglés <i>Mesenteric Node Lymphocytes</i>)
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NBD	Dominio de unión de nucleótidos (del inglés <i>Nucleotide Binding Domain</i>)
NK	del inglés <i>Natural Killers</i>
NKG2D	del inglés <i>Natural Killer group 2, member D</i>
NLR	Receptor tipo NOD (del inglés <i>Nod-like receptor</i>)
NOD2	del inglés <i>Nucleotid-binding oligomerization domain-containing protein 2</i>
NS	No significativo
OR	<i>Odds ratio</i>
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>)
pb	Pares de bases (<i>bp: base pairs</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PG	Peptidoglicano
PP	Placas de Peyer
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
RE	Retículo Endoplásmico
rs	Número de referencia del SNP (del inglés <i>Reference SNP Number</i>)
RT-PCR	PCR a tiempo real (del inglés <i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>)
SNP	Polimorfismo de un sólo nucleótido (del inglés <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SSO	Oligonucleótido de secuencia específica (del inglés <i>Sequence specific oligonucleotide</i>)
STR	Repeticiones cortas en tándem (del inglés <i>Short Tandem Repeat</i>)
TCR	Receptor de células T (del inglés <i>T cell receptor</i>)
TDS	Tracto digestivo superior
TEP	Tromboembolismo pulmonar
Th	Células T colaboradoras (del inglés <i>T helper</i>)
TIR	del inglés <i>Toll-IL1 receptor</i>
TLR	Receptor tipo <i>Toll</i> (del inglés <i>Toll-like Receptor</i>)
TM	Transmembrana
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α (del inglés <i>Tumoral necrosis factor α</i>)
Treg	Células T reguladoras
TVP	Tromboembolismo venoso profundo
UPR	Respuesta de proteínas no plegadas (del inglés <i>Unfolded protein response</i>)
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VSG	Velocidad de Sedimentación Globular

RESUMEN

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) es un proceso inflamatorio crónico que afecta al tracto digestivo en el que se alternan brotes de actividad con periodos normales y que afecta a más de 3 millones de personas en el mundo. Algunos de los síntomas que acompañan a la enfermedad son el dolor abdominal, diarrea severa, sangrado rectal y pérdida de peso. Las dos entidades principales que se engloban dentro de la EII son la Colitis Ulcerosa (CU) y la Enfermedad de Crohn (EC). Ambas enfermedades tienen características en común, y en ocasiones puede resultar complicado distinguirlas entre sí, pero son síndromes independientes ya que existen importantes diferencias. La CU se caracteriza por una inflamación difusa crónica que afecta preferentemente a colon y recto. La inflamación afecta únicamente a la capa mucosa del intestino grueso, que suele presentar aspecto eritematoso y granular, edema, friabilidad del epitelio, pseudopólipos, sangrado espontáneo y ulceraciones, que alteran la función absorptiva. Por otro lado, en la EC se observa una inflamación transmural del tracto digestivo de forma discontinua, donde, a diferencia de la CU, se alternan lesiones ulcerosas y granulomatosas con áreas adyacentes normales. La mucosa de la EC se caracteriza por la presencia de úlceras aftoides, que pueden dar lugar a un *aspecto empedrado* en etapas avanzadas de la enfermedad. Cualquier parte del aparato digestivo puede verse afectada, desde la boca hasta el ano, siendo más frecuente la afectación del íleon terminal y colon proximal.

La EII se trata de un desorden de etiología desconocida en el que intervienen múltiples factores, tanto en el comienzo de la enfermedad como en la aparición de brotes, siendo los más importantes los factores ambientales (como el tabaco, la dieta, el estilo de vida, el tratamiento farmacológico o la apendicectomía), la flora comensal presente en el intestino y el componente genético del individuo. Hasta la fecha se han descrito más de 160 loci de susceptibilidad frente a la EII, la mayoría de ellos compartidos por la CU y la EC. Los productos codificados por los genes incluidos en estos loci intervienen en múltiples procesos como la producción de citoquinas, la respuesta inmunitaria innata, la autofagia, la respuesta al estrés oxidativo, el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial, la respuesta inmunitaria adaptativa y la actividad antimicrobiana. La hipótesis con más peso actualmente es que la EII está causada por una respuesta inmunitaria excesiva frente a la flora comensal en individuos genéticamente predispuestos. Tanto en el caso de la CU como de la EC se ha observado una alteración del diálogo entre flora comensal y sistema inmunitario así como de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. En el caso de la CU predomina una respuesta Th2 en la mucosa intestinal mientras que en la EC las respuestas predominantes son Th1 y Th17 fundamentalmente.

El principal objetivo de esta tesis doctoral es estudiar la posible relación entre variantes de genes que codifican para moléculas directamente implicadas en la respuesta inmunitaria y la EII. En este trabajo se estudian los genes *HLA*, (relacionados con la presentación antigénica), *MICA* (sensor de estrés y daño celular), *NOD2* y *TLRs* (receptores de reconocimiento de patrones claves en el diálogo con la flora comensal).

En el estudio se incluyeron 340 pacientes con CU, 371 pacientes con EC y 636 controles sanos. A partir de muestras de sangre periférica se extrajo ADN

genómico que se empleó para el genotipado. La caracterización de los genes *HLA* se llevó a cabo empleando la técnica SSO (*Sequence specific oligonucleotide*) mediante Luminex. En el gen *MICA* se estudió la repetición en tándem de un trinucleótido en el exón 5 combinando PCR y electroforesis capilar. En el gen *NOD2* y los genes que codifican para los *TLRs* se analizaron polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) gracias a la realización de PCR a tiempo real empleando sondas TaqMan®. Además, en el gen *NOD2* se estudió una inserción en la posición 1007 mediante análisis de microsátélites por electroforesis capilar. La selección de polimorfismos en *TLRs* y *NOD2* incluidos en el estudio se llevó a cabo en base a lo publicado en la bibliografía. El análisis estadístico realizado incluyó un estudio caso control para cada uno de los polimorfismos, estudio de asociación con el fenotipo dentro de cada grupo de pacientes y de las relaciones epistáticas y de desequilibrio de ligamiento entre los distintos genes.

Dentro de los genes *HLA* se confirmaron algunas asociaciones previamente descritas en la bibliografía y se encontraron otras nuevas. El alelo *HLA-DRB1*01:03* se confirmó como alelo de susceptibilidad a CU y a EC, siendo la asociación más fuerte encontrada dentro de los genes *HLA* en ambos casos. Además, los alelos *HLA-C*12:02*, *HLA-DRB1*11:01* y *HLA-DRB1*15:02* se asociaron con mayor riesgo de desarrollar CU mientras que el alelo *HLA-DRB1*03:01* resultó ser protector. En cuanto a la EC, se confirmó la relación de protección de *HLA-DRB1*01:01* previamente descrita por otros autores y se describió por primera vez la asociación de *HLA-A*29:02* y de *HLA-B*49:01* con la EC. El alelo *HLA-DRB1*05:03* se asoció con manifestaciones hepatobiliares secundarias a la EII y *HLA-A*11:01* fue protector frente a la aparición de complicaciones digestivas en nuestra población de pacientes con EC.

El alelo *MICA*A4* resultó ser protector frente a la CU en nuestra población, hecho que nunca antes se había descrito. El alelo *MICA*A5.1* se relacionó con la aparición de abscesos y con un diagnóstico temprano o tardío dentro de la población de pacientes con CU.

En nuestra población de pacientes con EC se replicaron una vez más los resultados en cuanto a asociación de *NOD2* con mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, así como de la dependencia de la dosis mutacional. En relación al fenotipo, *NOD2* se relacionó con una EC ileal, fistulizante, de diagnóstico temprano y con una mayor incidencia de manifestaciones hepatobiliares. Al contrario de lo obtenido por otros autores, no se ha relacionado *NOD2* con un patrón evolutivo estenosante en nuestro estudio.

Se demostró el papel protector del SNP *TLR1 rs5743611-C* frente a EC y CU en nuestra población. Además, se relaciona con mayor incidencia de cáncer de colon y manifestaciones articulares en pacientes con CU y con afectación del tracto digestivo superior en pacientes con EC. En nuestra población de pacientes con EC se describió una relación epistática entre el gen *TLR4* y *NOD2*: las variantes minoritarias de *rs4986790* y *rs4986791* fueron un factor de riesgo adicional frente a EC en pacientes portadores de mutación en *NOD2*. Además *TLR4* se relacionó con un patrón evolutivo estenosante, siendo esta relación más fuerte en presencia de mutación en *NOD2*. El polimorfismo *TLR9 rs352140* no se distribuyó de manera homogénea entre los distintos sexos dentro de la población de pacientes con EC,

siendo la variante minoritaria protectora frente a la enfermedad en mujeres de nuestra población. Otras variantes de los TLRs se relacionaron con ciertas características clínicas en nuestra población, como por ejemplo la asociación de *TLR6 rs5743810* con una enfermedad complicada o la protección de *TRL3 rs5743305-A* frente a la aparición de manifestaciones oculares.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 DEFINICIÓN DE LA ENFERMEDAD

1.1.1 Características generales y epidemiología

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) es un síndrome complejo que se caracteriza por una inflamación crónica del tracto gastrointestinal, con alternancia de periodos de inactividad y brotes. Dentro de la EII se pueden distinguir dos entidades principales: Enfermedad de Crohn (EC) y Colitis Ulcerosa (CU)(1, 2). Ambas enfermedades son desórdenes independientes, a pesar de que presenten características comunes, ya que difieren en ciertos aspectos como la localización de las lesiones, las capas del intestino que están afectadas, el tipo de respuesta inmunológica que predomina o el riesgo de desarrollar cáncer de colon, entre otros.

Aproximadamente 3,6 millones de personas sufren EII en todo el mundo. La prevalencia de la enfermedad sigue un gradiente norte-sur, oeste-este y urbano-rural (3), siendo mayor en países del norte de Europa, Norteamérica y Reino Unido, donde la incidencia oscila entre 3,2-20,3/10⁵ habitantes en CU y 3,0-15,6/10⁵ habitantes en EC (4, 5). En España la incidencia es mucho menor que en Norteamérica o norte de Europa (3,8/10⁵ habitantes en CU y 1,9/10⁵ habitantes en EC), aunque existe cierta tendencia al alza debido, entre otras causas, a la mejora de las técnicas diagnósticas y a un mayor conocimiento de la enfermedad (6). La incidencia en países en desarrollo es baja, aunque está aumentando gradualmente, probablemente por la introducción de hábitos y alimentación cada vez más occidentalizados. Los datos publicados de incidencia y prevalencia en diferentes poblaciones pueden consultarse en la revisión realizada por Molodecky *et al* (7). La EII puede debutar a cualquier edad, habiéndose descrito casos pediátricos y pacientes diagnosticados a edad muy avanzada, pero el mayor pico de incidencia se sitúa en la edad adulta temprana, entre la segunda y tercera década de la vida (2, 4). Algunos estudios sugieren una distribución bimodal de la edad al diagnóstico, con un segundo pico de incidencia entre 60 y 70 años (3). No está claro si la prevalencia de la enfermedad es mayor en hombres o en mujeres, ya que se han publicado resultados muy variados al respecto.

1.1.2 Características clínicas

La colitis ulcerosa se caracteriza por una inflamación difusa crónica que comienza en el recto y puede extenderse a lo largo del colon de forma continua (8, 9). La inflamación afecta únicamente a la capa mucosa del intestino grueso, que suele presentar aspecto eritematoso y granular, edema, friabilidad del epitelio, pseudopólipos, sangrado espontáneo y ulceraciones, que alteran la función absorptiva. El síntoma más característico durante los brotes de actividad es la diarrea, que puede ir acompañada de sangre, moco, urgencia y tenesmo. Además, pueden aparecer otros síntomas como fiebre, dolor abdominal tipo cólico, pérdida de peso, estado de malnutrición y anemia. En algunos pacientes con CU también se

ha observado la aparición de complicaciones como megacolon tóxico, microcolon o perforación (10, 11).

Actualmente se utiliza en la práctica clínica la clasificación de Montreal, según la cual los pacientes con CU se agrupan dependiendo de la extensión de la enfermedad y la gravedad de la misma (Tabla 1) (12). Si la enfermedad tan sólo afecta al recto se denomina proctitis, si la inflamación se extiende hasta el ángulo esplénico sin sobrepasarlo se trata de colitis distal y si sobrepasa el ángulo esplénico se denomina pancolitis.

Tabla 1. Clasificación de Montreal para Colitis Ulcerosa (CU)

Colitis Ulcerosa			
Extensión	E1	Proctitis	Limitada al recto (la extensión proximal de la inflamación es distal a la unión rectosigmoidea)
	E2	Colitis Distal	La inflamación se extiende hasta el ángulo esplénico
	E3	Pancolitis	La inflamación se extiende proximal al ángulo esplénico
Gravedad	S0	Remisión clínica	Asintomático
	S1	CU leve	≤4 deposiciones diarias (con o sin sangre), ausencia de enfermedad sistémica, marcadores inflamatorios normales
	S2	CU moderada	>4 deposiciones diarias, con mínimo compromiso sistémico
	S3	CU severa	≥6 deposiciones sanguinolentas diarias, pulso≥90 pulsaciones/minuto, temperatura≥37°C, Hb<10,5g/dL y VS.G≥30mm/hora.

Hb=Hemoglobina; VS.G=Velocidad de Sedimentación Globular

En pacientes con CU, cada brote agudo de la enfermedad puede clasificarse por gravedad según la cantidad y características de las deposiciones y la afectación sistémica del paciente. Al tratarse de una enfermedad en la que alternan brotes de actividad con períodos carentes de síntomas, la clasificación basada en la gravedad/actividad de la enfermedad normalmente tan sólo sirve para un corto período de tiempo; además el criterio para determinar la gravedad a veces depende del clínico y puede ser demasiado subjetivo, por lo que resta utilidad a esta clasificación (13). A pesar de que este criterio no está incluido como tal en la clasificación de Montreal, en la práctica clínica se suele clasificar la enfermedad según su evolución en intermitente o continua, considerándose continua cuando el tiempo transcurrido entre brotes es inferior a 6 meses y durante los mismos el paciente no es capaz de hacer vida normal. Algunos autores se plantean la necesidad de incluir la evolución de la enfermedad en futuras clasificaciones (14).

La enfermedad de Crohn se caracteriza por una inflamación transmural del tracto digestivo de forma discontinua, donde, a diferencia de la CU, se alternan lesiones ulcerosas y granulomatosas con áreas adyacentes normales. La mucosa de la EC se caracteriza por la presencia de úlceras aftoides, que pueden dar lugar a un aspecto “empedrado” en etapas avanzadas de la enfermedad. Cualquier parte del aparato digestivo puede verse afectada, desde la boca hasta el ano, siendo más

frecuente la afectación del íleon terminal y colon proximal (8). En la EC los síntomas son bastante más heterogéneos que en la CU y los brotes de actividad suelen ir acompañados de diarrea, en este caso menos frecuentemente acompañada de sangre y moco, y dolor abdominal, aunque también puede aparecer estenosis intestinal, fístulas y/o abscesos. La aparición de fístulas perianales (enfermedad perianal) es bastante común en pacientes con EC mientras que es muy poco frecuente en CU (10). Además, en la EC los síntomas sistémicos tales como fiebre, anorexia o malestar general son más comunes (11) y también puede observarse retraso del crecimiento en pacientes pediátricos.

En el caso de la EC, la clasificación de Montreal modifica ciertos aspectos de la clasificación de Viena de 1998 (15). La enfermedad se clasifica dependiendo de la edad en el momento del diagnóstico, el comportamiento de la enfermedad y la localización (Tabla 2). Se ha demostrado una mayor gravedad en pacientes diagnosticados de EC a edades tempranas (16), por lo que la clasificación de Montreal tiene en cuenta este parámetro para agrupar a los pacientes: A1 (antes de los 17 años), A2 (entre 17 y 40 años) y A3 (más de 40 años). Dependiendo de la localización de la enfermedad, los pacientes se agrupan en EC colónica, EC ileal o EC ileocólica, añadiendo el modificador del tracto digestivo superior (TDS) siempre que esté afectado. Por último, se tiene en cuenta el comportamiento de la enfermedad, distinguiendo patrón no estenosante/no fistulizante (o patrón inflamatorio), patrón estenosante y patrón fistulizante. Tras la modificación de la clasificación de Montreal, los pacientes con EC y fístulas perianales no se incluyen dentro del patrón fistulizante sino que se utiliza el modificador de la enfermedad perianal (p) para caracterizarlos (12). Además, los pacientes que cursan con un patrón fistulizante Y estenosante suelen incluirse dentro de la categoría fistulizante.

Tabla 2. Clasificación de Montreal para la Enfermedad de Crohn (EC)

Enfermedad de Crohn			
Edad			
	A1	≤16 años	
	A2	17-40 años	
	A3	>40 años	
Localización		Modificador TDS (L4)	
	L1	Ileon terminal	L1+L4 Ileon terminal + TDS
	L2	Colon	L2+L4 Colon + TDS
	L3	Ileocolon	L3+L4 Ileocolon + TDS
	L4	Tracto Digestivo Superior	
Comportamiento		Modificador Epa (p)	
	B1	No fistulizante, no estenosante	B1p No fistulizante, no estenosante + Epa
	B2	Estenosante	B2p Estenosante + Epa
	B3	Fistulizante	B3p Fistulizante +Epa

TDS=Tracto Digestivo Superior; Epa=Enfermedad Perianal

Tanto la EC como la CU son enfermedades dinámicas e inestables cuyo curso puede modificarse a lo largo del tiempo. Por este motivo, es complicado clasificar de forma estricta a los pacientes en el momento del diagnóstico y es preferible esperar un período de tiempo determinado antes de clasificar la enfermedad de forma definitiva, así como ir revisando periódicamente la categoría dentro de la que se ha incluido (14). Ambas enfermedades se asocian con mayor riesgo de desarrollar cáncer de colon (11), sin embargo este riesgo es considerablemente mayor en pacientes con CU. El riesgo de padecer cáncer se relaciona en la CU con la extensión de la enfermedad, la actividad inflamatoria y el tiempo desde que se realizó el diagnóstico: mientras que el riesgo de padecer cáncer de colon tras 30 años de enfermedad en pacientes con proctitis ulcerosa es entre 0 y 12%, en pacientes con pancolitis ulcerosa el riesgo puede llegar a alcanzar un 47% (12).

La EII puede ir acompañada de Manifestaciones Extradigestivas (MED) además de los síntomas propiamente digestivos; las MED son más comunes en pacientes con EC que con CU. Dependiendo del sistema que se vea afectado, las principales MED que se pueden encontrar son:

- MED musculoesqueléticas. Artritis periférica (poli y pauciarticular), espondilitis, sacroileitis, enfermedad metabólica ósea (osteoporosis, osteopenia).
- MED oculares. Uveítis, epiescleritis, tromboflebitis.
- MED dermatológicas. Pioderma gangrenoso, eritema nodoso, lesiones de la mucosa oral, síndrome de Sweet.
- MED hepatobiliares. Esteatosis hepática, Colangitis Esclerosante Primaria (CEP), colelitiasis.

- Complicaciones tromboembólicas (CTE). Tromboembolismo Venoso Profundo (TVP), Tromboembolismo Pulmonar (TEP).

1.1.3 Diagnóstico

Para el diagnóstico de la EII el médico debe integrar datos clínicos, endoscópicos, radiológicos, analíticos e histológicos, así como la historia familiar del paciente. En la mayoría de los casos se trata de un diagnóstico diferencial, en el que se van excluyendo otras patologías, como colitis infecciosa, intolerancias alimentarias o síndrome del intestino irritable. Dentro de los pacientes con EII es también importante determinar si se trata de EC o CU, ya que la aparición de complicaciones y el manejo terapéutico pueden ser diferentes.

En pacientes con sospecha de CU es prácticamente obligatoria la realización de una colonoscopia para observar el estado de la mucosa, determinar la extensión de las lesiones, la toma de una biopsia para su análisis histológico y descartar la presencia de cáncer de colon. En la colonoscopia de un paciente con CU la mucosa muestra un aspecto eritematoso y granular, con pérdida del patrón vascular, petequias, exudados, ulceraciones y sangrado espontáneo o al roce del endoscopio (Figura 1) (17). En cuanto a los hallazgos histológicos, en la biopsia de la mucosa de un paciente con CU activa se pueden observar microabscesos en las criptas y atrofia de las mismas, además de una alteración en las células epiteliales, con disminución del número de células caliciformes y menor capa de moco. También puede observarse un importante infiltrado inflamatorio en la lámina propia compuesto por linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos (18) (Figura 1). Por regla general, la radiografía abdominal no suele mostrar anomalías en pacientes con CU, y, a veces, puede ser necesaria la realización de una ecografía abdominal para descartar determinadas complicaciones.

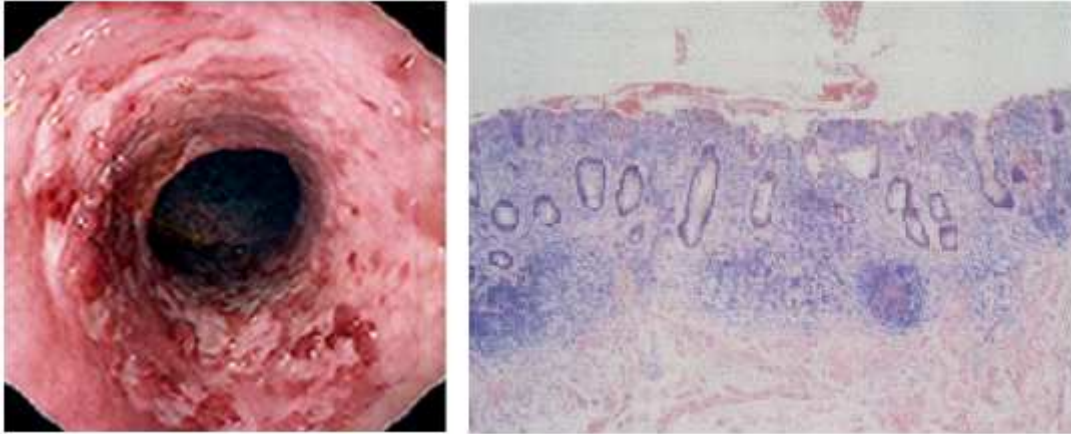


Figura 1. Mucosa intestinal en la Colitis Ulcerosa (CU). A la izquierda puede observarse una imagen endoscópica de la mucosa, que se caracteriza por excesiva ulceración, con aspecto irregular, quebradizo, eritematoso y con pérdida del patrón vascular. A la derecha se observa un corte histológico de la mucosa en la CU, en el que se puede apreciar una clara distorsión de las criptas e irregularidad de la superficie epitelial, con un aumento difuso de la celularidad en la lámina propia y agregados linfoides frecuentes. Figura modificada a partir de Jenkins *et al* (18)

La aparición de síntomas determina el orden de las pruebas a realizar para el diagnóstico de la EC: en pacientes con abundantes diarreas la colonoscopia sería la prueba más adecuada en primer lugar mientras que en pacientes con dolor abdominal se suelen realizar primero pruebas de imagen. En la colonoscopia de un paciente con EC se suele encontrar inflamación aguda y crónica así como ulceraciones aftosas focales con áreas normales adyacentes (Figura 2). Histológicamente, la EC se caracteriza por la presencia de granulomas entre el 30 y el 50% de los casos, un infiltrado transmural inespecífico, fisuras o grietas que pueden alcanzar hasta la capa muscular y una menor alteración de la superficie del epitelio, de las criptas y de la capa mucosa comparada con el caso de la CU (18) (Figura 2). Dentro de los estudios de imagen más frecuentemente empleados en pacientes con EC destacan radiología simple de abdomen, ecografía abdominal, tomografía axial computerizada y resonancia magnética.

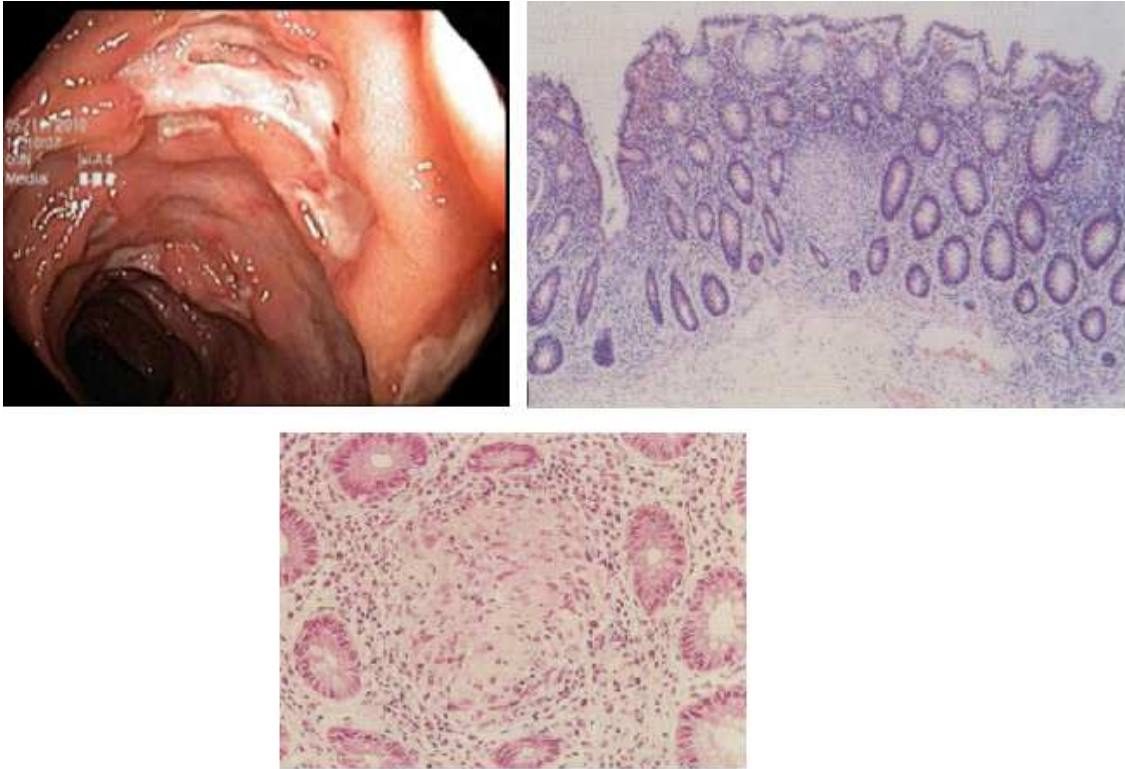


Figura 2. Alteraciones observadas en un paciente con Enfermedad de Crohn (EC). En la imagen endoscópica de arriba a la izquierda se observan úlceras aftosas con áreas normales adyacentes, aspecto característico de la EC. Arriba a la derecha se muestra un corte histológico de la mucosa intestinal con ligera desorganización de las criptas e irregularidad de la superficie, criptitis y formación de un granuloma. Abajo en el centro puede apreciarse un granuloma más de cerca. Figura modificada a partir de Jenkins *et al* (18)

No hay hallazgos analíticos patognomónicos de la EII, o de la EC o la CU por separado; sin embargo los resultados de laboratorio pueden ser útiles para el diagnóstico diferencial y para monitorizar los periodos de actividad de la enfermedad. En la analítica de estos pacientes se puede observar anemia (ferropénica, de enfermedades crónicas, hemolítica o por déficit de B12) (19), alteración del equilibrio electrolítico por la diarrea, y marcadores de inflamación como leucocitosis, elevación de la velocidad de sedimentación globular y/o aumento en los niveles de proteína C reactiva en sangre y calprotectina en heces (20, 21). La detección en suero de anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo con patrón periférico (pANCA) y anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), entre otros, pueden ayudar al diagnóstico diferencial entre la CU y la EC: aproximadamente el 70% de los pacientes con CU presentan niveles más o menos elevados en suero de pANCA, mientras que los ASCA se detectan predominantemente en la EC (22). Por otro lado, también es importante descartar el origen infeccioso del cuadro, para lo que suelen analizarse las heces en busca de la toxina de *Clostridium difficile*, *Giardia* o el serotipo de *Escherichia coli* O157:H7.

El término de Colitis Indeterminada (CI) suele emplearse en la práctica clínica para denominar a aquellos pacientes con clara sospecha de EII pero en los que las pruebas realizadas no permiten distinguir si se trata de EC o de CU. Según lo recomendado en la reunión de Montreal en 2005, sólo debe emplearse el

diagnóstico de CI en aquellos casos en los que se ha realizado una colectomía y los patólogos no son capaces de llegar a un diagnóstico definitivo entre EC o CU (14).

1.1.4 Tratamiento

El tratamiento en los pacientes con EII no es curativo sino sintomático y depende del estado del enfermo y de las complicaciones que aparezcan (11):

- Los aminosalicilatos son probablemente los fármacos más utilizados para el tratamiento de la EII. Se trata de un fármaco antiinflamatorio cuya administración puede ser vía oral o de aplicación rectal (en líquido, supositorio o espuma) y la dosis depende del estado del paciente. Se utilizan en brotes leves en CU o como mantenimiento de la enfermedad. También puede emplearse en el mantenimiento de la EC, aunque tan sólo se ha conseguido demostrar su eficacia clínica en el caso de la EC colónica y para evitar la recurrencia postquirúrgica.
- El tratamiento con corticoides también es común en pacientes con EII. Normalmente suele introducirse en brotes o reactivación de la enfermedad. Los corticoides más utilizados son la prednisona y la prednisolona y la administración puede ser intravenosa, si el paciente está ingresado, o vía oral en pauta descendente tras el control de los síntomas. Aproximadamente los dos tercios de los pacientes responden bien al tratamiento con corticoides, aunque hay casos de corticodependencia y corticorresistencia en los que hay que plantear otras alternativas terapéuticas. Además, es importante controlar los periodos de tratamiento con corticoides ya que estos fármacos tienen importantes efectos secundarios.
- Cuando la enfermedad se complica y no se consiguen controlar los síntomas con aminosalicilatos y corticoides, se suele introducir el tratamiento con inmunosupresores. Los más utilizados son las tiopurinas, azatioprina o mercaptopurina; es importante un estudio previo y un seguimiento del paciente para controlar la posible aparición de efectos secundarios (tales como leucopenia, hepatotoxicidad o neoplasias), pero por regla general funcionan muy bien y consiguen mantener la enfermedad inactiva, sobrepasando los efectos beneficiosos a los posibles efectos secundarios (23). En casos de intolerancia o falta de respuesta se puede plantear el uso de otros inmunosupresores, como metotrexato, o, menos frecuentemente, tacrólimus y micofenolato, en el caso de la enfermedad de Crohn, o ciclosporina intravenosa en brotes graves de colitis ulcerosa.
- En determinados casos, en los que la enfermedad presenta complicaciones graves que no responden al resto de tratamientos, es necesario iniciar terapia biológica. Los biológicos más comúnmente empleados son el infliximab y el adalimumab. Ambos son anticuerpos monoclonales anti-TNF α , con la diferencia de que el adalimumab no tiene en su composición ningún fragmento proteico murino y se inyecta de forma subcutánea, mientras que la administración del infliximab es intravenosa, exigiendo al paciente el traslado al hospital para cada infusión. Estos fármacos biológicos se emplean sobre todo en el tratamiento de la EC aunque

también se administran en algunos casos complicados de CU. El vedolizumab (anticuerpo humanizado frente a la integrina $\alpha 4\beta 7$) se ha aprobado recientemente para el tratamiento tanto de la CU como de la EC. Aunque algunos autores relacionen la administración de este tipo de tratamiento con la aparición de neoplasias no hay consenso al respecto (24, 25).

Otros fármacos se encuentran en ensayos clínicos actualmente para el tratamiento de la EII, como el tofacitinib (inhibidor de JAK1 y JAK3) o el ustekinumab (anticuerpo monoclonal frente a la subunidad p40 de IL-12 e IL-23). Además del tratamiento mencionado, puede ser necesaria la administración de vitamina B12, ácido fólico o puntualmente antibióticos.

En pacientes con una enfermedad complicada, con resistencia al tratamiento y múltiples brotes, a veces es necesaria la intervención quirúrgica. Dado que la aparición de complicaciones digestivas es más frecuente en pacientes con EC que en la CU, también lo es la necesidad quirúrgica: hasta el 75% de los pacientes con EC requiere algún tipo de cirugía a lo largo de la evolución mientras que tan sólo un 30% de enfermos con CU necesitan intervención quirúrgica. Las cirugías en el caso de la CU suelen ser colectomías, totales o parciales, y los motivos más comunes son la falta de respuesta al tratamiento farmacológico, refractariedad de la enfermedad, carcinoma de colon o displasia (11). En el caso de la EC, además de las cirugías de resección intestinal, son frecuentes las estricturoplastias, las fistulectomías y las cirugías para drenaje de abscesos complicados.

1.2 FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA EII

La EII se considera una enfermedad multifactorial, ya que para su desarrollo es necesario que confluyan múltiples factores. Se puede distinguir entre factores ambientales y factores genéticos; aunque la flora bacteriana intestinal pueda considerarse un factor ambiental, dada su importancia en el desarrollo de la enfermedad, se considerará aparte en este trabajo.

1.2.1 Factores ambientales

Como ya se ha comentado previamente, se pueden observar diferencias en cuanto a la tasa de incidencia de EII dependiendo de la población estudiada. Esto, junto con el hecho de que la incidencia de EII es cada vez mayor en todo el mundo, y que apenas se observen diferencias entre inmigrantes que llegan a zonas con alta prevalencia de la enfermedad y nativos, demuestra el papel clave que desempeña el ambiente en el desarrollo de la enfermedad (4, 5, 26, 27). Las condiciones de vida de las personas han cambiado considerablemente con la industrialización: un estilo de vida cada vez más sedentario, con dietas ricas en azúcares y grasas saturadas, más estrés relacionado con estudios y trabajo, hogares con mayor nivel de higiene, saneamiento y agua de grifo de gran calidad, mayor consumo de tabaco, exposición a contaminación ambiental, etc. Todos estos factores pueden contribuir, en mayor o menor medida a la susceptibilidad de padecer EII (28).

1.2.1.1 Tabaco

Uno de los factores mejor estudiado es sin duda el consumo de tabaco. En la colitis ulcerosa, múltiples trabajos han demostrado que el mayor riesgo de desarrollar la enfermedad se observa en ex-fumadores, seguido de personas que no han fumado nunca y con un riesgo reducido en fumadores actuales. Además, el consumo de tabaco también se ha relacionado en pacientes con CU con menos complicaciones de la enfermedad, reflejado en una tasa de colectomía menor y menos uso de corticoides (29-33). Por el contrario, en enfermedad de Crohn el consumo de tabaco está ligado a un diagnóstico a edades tempranas de la enfermedad y a un curso grave, incluyendo más complicaciones digestivas o recidivas tras procedimientos quirúrgicos y endoscópicos, además de a localización ileal de las lesiones (33, 34).

1.2.1.2 Apendicectomía

Múltiples estudios han relacionado el apéndice con la EII (4). La retirada del apéndice mediante apendicectomía parece ser protectora frente a la aparición de CU, además de relacionarse con un diagnóstico más tardío de la enfermedad y menor tasa de colectomía (35, 36). Por el contrario, la apendicectomía parece estar asociada a un mayor riesgo de padecer EC, debutando la enfermedad en algunos casos justo tras la intervención (37). El apéndice funciona como reservorio de flora comensal e interviene en la respuesta inmunológica en el colon ya que contiene una alta concentración de células NKT y es importante en el desarrollo de células plasmáticas productoras de IgA; esto sugiere que el apéndice pudiera desempeñar un papel en la patogénesis de la CU y que el uso de la apendicectomía podría plantearse con fin terapéutico (38).

1.2.1.3 Tratamiento farmacológico

Algunos estudios del tipo caso-control han sugerido la relación entre la ingesta de anticonceptivos orales con la EII. Los resultados de estos estudios no son concluyentes, ya que en muchos casos no existe significación estadística o ésta desaparece tras introducir el consumo de tabaco en el análisis. En general, parece existir una débil asociación entre los anticonceptivos orales, quizá también con la dosis ingerida, y la EII, principalmente la EC. La propiedad trombogénica de estos fármacos en el contexto de una mucosa intestinal dañada podría contribuir al desarrollo de la enfermedad (39).

El tratamiento antibiótico también se ha relacionado con la EII, debido al desequilibrio que produce en la flora intestinal. Múltiples estudios han demostrado que este tratamiento es un factor de riesgo para desarrollar EII, tanto en adultos como en niños, coincidiendo en algunos casos con el debut de la enfermedad (40-42).

1.2.1.4 Dieta

Dadas las diferencias en cuanto a incidencia de la EII que han sido descritas de unas zonas a otras y que, después de la flora bacteriana, la alimentación sea la mayor fuente de antígenos lumenales intestinales, es lógico pensar que la dieta pueda ser uno de los factores que desencadenen la enfermedad. A pesar de que es difícil diseñar un estudio de asociación entre dieta y enfermedad, en algunos casos se ha conseguido relacionar una mayor ingesta de azúcares (43) o de grasas (ácidos grasos poliinsaturados, omega-6 y grasas totales) (44, 45) con la EII. Sin embargo, la relación con macronutrientes más evidente es sin duda la asociación inversa con el consumo de fibra (45, 46). La fibra soluble procedente de frutas y verduras es metabolizada por las bacterias intestinales a ácidos grasos de cadena corta que inhiben la transcripción de mediadores inflamatorios; además, la fibra ayuda al mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial y, por tanto, impide la penetración de bacterias en la mucosa intestinal (3). Es difícil determinar si las asociaciones encontradas se deben a la dieta en sí o al estilo de vida que lleva la gente que sigue ese tipo de alimentación.

1.2.1.5 Estilo de vida

En estudios observacionales se ha demostrado un aumento del riesgo de padecer EII con estrés, depresión y ansiedad. Del mismo modo, en pacientes ya diagnosticados, estos trastornos suelen llevar asociada una recaída de la enfermedad. El estrés puede producir inflamación intestinal a través del eje hipotálamo-pituitaria-glándula adrenal o a través del Sistema Nervioso Autónomo, que van a inducir la producción de citoquinas proinflamatorias, activación de los macrófagos y alteración de la permeabilidad epitelial y de la microbiota (47). Además, la actividad física se ha relacionado de manera inversa con el riesgo de desarrollar EII (48) mientras que las alteraciones del sueño aumentan el riesgo de la enfermedad así como de las recaídas (49).

1.2.1.6 Infecciones

Se ha demostrado un riesgo incrementado de padecer EC tras una gastroenteritis infecciosa, en la que la composición de la flora bacteriana varía y aumenta el número de bacterias en la mucosa, por lo que la búsqueda de una especie patógena que pueda ser agente causante de la enfermedad continúa (50). Las lesiones de la EC en el intestino recuerdan a la enterocolitis granulomatosa causada por micobacterias (como *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium avium paratuberculosis*), por lo que la búsqueda del patógeno causante de la enfermedad se ha centrado en este grupo bacteriano (51). La detección de micobacterias en biopsias y sangre de pacientes con EC (52-54) apoya la teoría de que las micobacterias pudieran participar en la patogénesis de la enfermedad; sin embargo, los hallazgos no son concluyentes (4). Además, se ha demostrado la ineficacia del tratamiento antimicobacteriano en la EC. A pesar de que algunos autores encontraron asociación de patógenos, como *Salmonella* o *Campylobacter*, con la EII (55), este resultado no se ha conseguido replicar en otras cohortes. Frecuentemente se asocian las recaídas de la EII con infecciones bacterianas,

siendo el desencadenante más frecuente *Clostridium difficile*, patógeno asociado con morbilidad de la EII (56). En cuanto a infecciones víricas, en modelos animales se ha observado cómo la infección por Norovirus en ratones con defectos genéticos en autofagia desencadenaba un defecto en las células de Paneth y una reacción inflamatoria parecida a la de la EC (*Crohn-like*) (57).

1.2.2 Microbiota intestinal

Gracias a estudios como el Proyecto del Microbioma Humano (58) o el Meta HIT (metagenómica del tracto intestinal humano) (59) se ha descrito la presencia de más de 1000 especies bacterianas, la mayoría de ellas anaerobias, de los cuatro filos principales (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*) en el intestino humano, con al menos 160 especies presentes en cada individuo (59). Existe un gradiente entre el estómago y el intestino grueso, situándose la mayor concentración bacteriana en este último, donde puede alcanzar 10^{11} - 10^{12} células bacterianas por gramo de contenido luminal. Estas bacterias no patógenas presentes en el intestino se denominan flora comensal, microbiota intestinal o microflora y en su composición intervienen múltiples factores, como el componente genético, la dieta, la higiene, la edad, determinados tratamientos o el consumo de tabaco, por lo que puede variar a lo largo de la vida del individuo (60).

La microbiota intestinal interviene en múltiples procesos fisiológicos, no sólo metabólicos (como la producción de vitamina K) sino también relacionados con la regulación de la respuesta inmunitaria (61). En gran parte gracias a estudios en modelos murinos, se ha relacionado el microbioma con la aparición de múltiples enfermedades, como diabetes (62), hipertensión (63), esteatosis (64), artritis inflamatoria (65) o cáncer colorrectal (66). Pero sin duda son la EC y la CU las patologías en las que la intervención de la microbiota en la patogénesis se ha demostrado de forma más clara (67). No se conoce exactamente el papel que desempeña la flora intestinal en la etiología de la EII pero una de las hipótesis más aceptadas es que se produce una ruptura del comensalismo existente entre bacterias y hospedador debido a un desequilibrio de la proporción de bacterias comensales y patógenas (disbiosis) en el intestino (68).

Tanto en la EC como en la CU activa, se ha demostrado una microbiota intestinal anómala si se compara con controles sanos (sin EII) o con pacientes en remisión. Uno de los cambios principales que se ha observado en la EII es la disminución de la diversidad de bacterias comensales, fundamentalmente a costa del filo *Firmicutes* (69). Hay estudios que demuestran que esta disminución de la diversidad en pacientes con EII también afecta al filo *Bacteroidetes* (70), aunque otros autores afirman que existe un aumento de las bacterias de este filo en la enfermedad (71). En la mucosa de pacientes con EII también se ha observado un incremento de bacterias no comensales, principalmente del grupo de las proteobacterias, incluyendo cepas patógenas de *Escherichia coli* (72). Debido a una alteración de la capa protectora de moco en la mucosa intestinal, entre otros factores, en la EII se ha observado una mayor densidad de bacterias adherentes, como *E.coli* adherente-invasiva (AIEC, del inglés *Adherent-invasive Escherichia coli*); en la mucosa de pacientes con EC se ha constatado la replicación de AIEC dentro de los macrófagos con la formación de granulomas *in vitro* y aumento en la producción de TNF- α (73). Por otro lado, la disbiosis intestinal en pacientes con EII

se ha relacionado con ciertas características fenotípicas de la enfermedad, como la aparición de abscesos, la necesidad de cirugía y el comienzo más temprano en pacientes con EC (70) o el aumento del riesgo de cáncer de colon en pacientes con CU y mayor presencia de *Fusobacterium* (60). Aunque la mayoría de estudios del microbioma se centran en la composición bacteriana, ya que analizan ARN ribosomal 16S, en la EII también se ha constatado un aumento de la diversidad fúngica (74).

Algunos géneros bacterianos presentes en el lumen intestinal desempeñan cierto papel protector y/o anti-inflamatorio (67): los géneros *Bacteroides* y *Clostridium* inducen la expansión de células T reguladoras, mientras que *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Faecalibacterium* inclinan el balance de citoquinas hacia la producción de citoquinas antiinflamatorias (IL-10) en detrimento de las inflamatorias (IL-17) (60). Se ha observado la disminución de bacterias del grupo de *Clostridium leptum* en pacientes con EC ileal en comparación con EC colónica o del grupo de *Clostridium coccoides* en pacientes con CU (75-77). La presencia de la especie *Faecalibacterium prausnitzii* es menor en pacientes con EII y se ha relacionado con el mantenimiento del estado de remisión clínica en la CU y con una tasa de cirugía menor en la EC (60).

Ni la pérdida de diversidad, ni la presencia de especies patógenas son suficientes para desencadenar la EII, ya que, según se ha demostrado en modelos animales, es necesaria la predisposición genética del individuo (78).

1.2.3 Factores genéticos¹

1.2.3.1 *Estudios familiares y de concordancia en gemelos*

Los diferentes datos de incidencia entre poblaciones, la demostrada agregación familiar y los estudios de concordancia en gemelos monocigóticos demuestran que el componente genético es uno de los factores a tener en cuenta en la etiología de la EII. La concordancia en gemelos monocigóticos (GMZ) alcanza el 20-50% en la enfermedad de Crohn, mientras que en gemelos dicigóticos (GDZ) tan sólo alcanza el 10% (3). También se ha observado concordancia en características fenotípicas en GMZ (como localización, edad al diagnóstico o evolución) (28). En cuanto a la colitis ulcerosa, la concordancia en GMZ y GDZ es considerablemente menor (16% y 4% respectivamente) (79). El hecho de que la concordancia no sea completa en ninguna de las dos entidades principales de la EII significa que, además de la de factores genéticos, la influencia de factores ambientales es clave en el desarrollo de la enfermedad.

Otro dato que apoya la base genética de la EII es la agregación familiar. Entre el 2 y el 14% de pacientes con EC y entre el 8 y el 14% de pacientes con CU tiene historia familiar de EII (3); el riesgo de padecer EII es de 4 a 20 veces superior si se tiene un familiar de primer grado afectado que en la población

¹ A lo largo de todo el trabajo se distingue el gen de su producto proteico gracias a la utilización de una nomenclatura diferente. Mientras que el símbolo del gen se representa en mayúsculas y cursiva, el nombre de la proteína se escribe en mayúscula y redonda. Por ejemplo, *NOD2* se refiere al gen mientras que NOD2 se refiere a la proteína.

general (10), y si ambos padres sufren EII, la probabilidad de que un hijo desarrolle la enfermedad es aproximadamente un tercio (80). En la mayoría de los casos de agregación familiar existe concordancia en cuanto al tipo de enfermedad (81) pero dentro de una misma familia puede haber casos de EC y CU por lo que puede heredarse la susceptibilidad de sufrir EII sin necesidad de tratarse de la misma enfermedad que sufre el progenitor (82). La concordancia en cuanto a características clínicas en familias es bastante elevada, al menos si se compara con la población general de pacientes no emparentados (83, 84). El hecho de que exista concordancia fenotípica dentro de una misma familia sugiere que la base genética del individuo influya en el fenotipo y no sólo en el aumento de susceptibilidad a sufrir la enfermedad.

1.2.3.2 Estudios de ligamiento y de asociación genética con la EII

La EII se puede definir como un desorden poligénico, con herencia compleja, a pesar de que se hayan descrito casos en los que la EII pueda tratarse de un desorden monogénico, como la EC de comienzo temprano por mutación en *IL-10R* (85) o formando parte de síndromes de herencia monogénica (Wiskott-Aldrich o Inmunodeficiencia con poliendocrinopatía y eccema) (86). Gracias a los estudios de ligamiento en familias, se consiguieron identificar regiones del genoma compartidas por los individuos afectados con EII (2, 87). Dentro de estas regiones de susceptibilidad, denominadas IBD (del inglés, *Inflammatory Bowel Disease*), pueden encontrarse varios genes, asociados con ambas enfermedades o con la EC o la CU por separado. Como se puede apreciar en la Figura 3, estos loci están distribuidos por zonas del genoma localizadas en distintos cromosomas: 16q12 (IBD1), 12q14 (IBD2), 6p (IBD3), 14q11-q12 (IBD4), 5q31-33 (IBD5), 19p13 (IBD6), 1p36 (IBD7), 16p12 (IBD8) y 3p26 (IBD9) (88, 89). La identificación de estos loci de susceptibilidad confirma la base genética de la EII y el carácter poligénico de la misma.

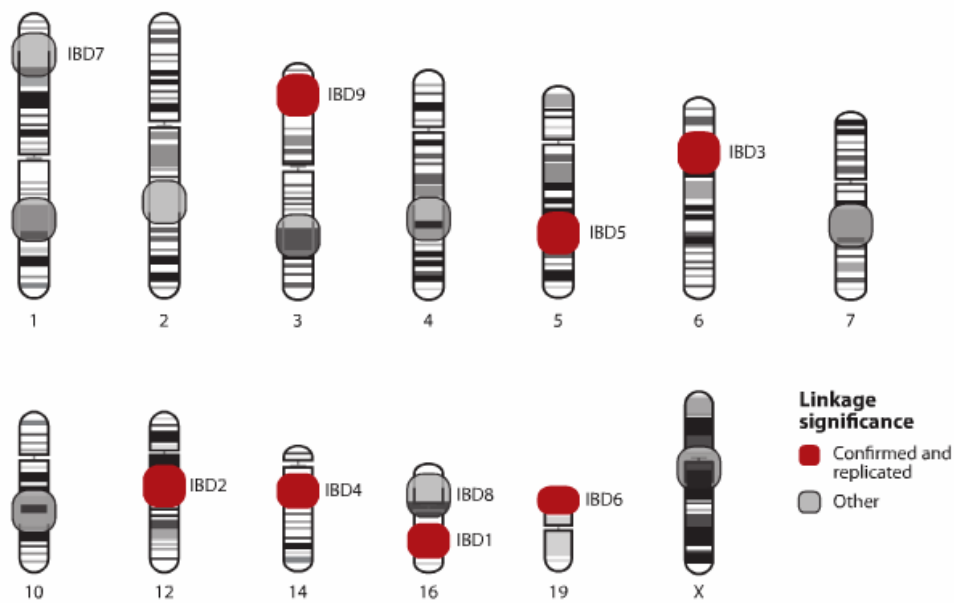


Figura 3. Localización de loci de susceptibilidad en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal tras la realización de estudios de ligamiento. Se muestran en color rojo aquellas asociaciones replicadas y confirmadas. Figura modificada a partir de Limbergen *et al* (104)

Posteriormente, se han realizado múltiples estudios de asociación y de aproximación de genes candidatos, con el fin de identificar regiones asociadas con la EII de forma más precisa. Los estudios de asociación se basan en el análisis de microsatélites, principalmente polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), de genes seleccionados previamente por su localización en zonas de susceptibilidad o porque su función pueda estar implicada en la patología de la enfermedad. Las frecuencias alélicas y genotípicas se comparan entre población enferma y población control. En este tipo de estudios es necesario el conocimiento previo de las variantes funcionales del gen que se está estudiando (8). Las regiones IBD1 (*NOD2*), IBD3 (*HLA*) e IBD5 han sido las más replicadas y las más importantes en cuanto a significación estadística (90):

- **IBD1.** En esta región se encuentra el gen *NOD2*, uno de los ejemplos más claros de asociación genética con EII, y que representa uno de los factores genéticos que confieren más riesgo de desarrollar EC (91). *NOD2* fue el primer gen para el que se describió asociación genética con EC (92, 93) y múltiples estudios han confirmado y replicado estos resultados, no sólo con asociación con la EC sino también con el fenotipo (94-96).
- **IBD3.** En esta región se localiza el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), dentro del cual se encuentran los genes *HLA* (del inglés *Human Leukocyte Antigen*) así como otros relacionados con la respuesta inmunitaria (citoquinas, complemento, *MICA*, etc). La asociación de *HLA* con la EC y la CU, así como con el fenotipo, ha sido demostrada en múltiples trabajos (97-100), si bien dado el polimorfismo tan elevado de estos genes,

no en todos los casos se han conseguido replicar los resultados en diferentes poblaciones.

- **IBD5.** Esta región de susceptibilidad, situada en el brazo corto del cromosoma 5, ha sido replicada en múltiples estudios y confirmada mediante estudios de asociación del genoma completo (101). Rioux y colaboradores (102) describieron la asociación de un haplotipo específico en el conjunto de genes de citoquinas situado en esta región con la EC. Además, también se han asociado variantes de *SLC22A4* y *SLC22A5*, que codifican para dos transportadores de carnitina y cationes (OCTN1, OCTN2) con la enfermedad (103). Muchos estudios han sugerido la asociación de IBD5 con una EC más grave (104).

1.2.3.3 Estudios de asociación del genoma completo (GWAS)

Recientemente se ha dado un paso de gigante en los estudios de asociación genética con los estudios de asociación del genoma completo (del inglés, GWAS). En este tipo de estudios se lleva a cabo un barrido de todo el genoma, sin hipótesis previa ni genes candidatos, y se analizan miles de marcadores genéticos en distintas poblaciones de pacientes y controles (105, 106). Se han realizado múltiples estudios de este tipo en EII, y en EC y CU por separado. Los cuatro primeros GWAS realizados en la EC fueron llevados a cabo por North American National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney diseases (NIDDK) (107), IBD Genetics Consortium (108), un grupo belga-francés (109) y Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC) (105), gracias a los cuales se descubrió la asociación de múltiples loci con la EC, como por ejemplo *ATG16L1* e *IRGM*, ambos relacionados con la autofagia. En años posteriores se han realizado otros GWAS en la EC (110-113), en la CU (114-117) y en el conjunto de ambas enfermedades (118-120), así como metanálisis, aumentando considerablemente el tamaño muestral de las poblaciones de enfermos y de controles, y permitiendo la identificación de múltiples loci de susceptibilidad (101, 121, 122).

En 2012 se realizó un gran estudio en el que, gracias a la colaboración de muchos equipos a nivel mundial, se integraron resultados de múltiples GWAS e Inmunochip en pacientes con EC y CU (123). En este trabajo se identificaron un total de 163 loci asociados con la EII, de los cuales 110 se asociaron con ambas enfermedades, 23 exclusivamente con la CU (como por ejemplo *TNFRSF14* o *IRF5*) y 30 con la EC (como *NOD2* o *ATG16L1*). De los 110 loci compartidos, 50 ejercían el mismo efecto en ambas enfermedades mientras que 60 contribuían de forma distinta en la EC y la CU, pudiendo incluso un gen estar asociado con una enfermedad o ser protector frente a la otra, como es el caso de *PTPN22* y *NOD2* que, según este estudio, son protectores frente a CU pero están asociados a la EC. En 2015, Liu y su equipo (124) llevaron a cabo otro gran estudio en el que no sólo se incluyeron individuos de ascendencia europea sino también casi 10000 individuos de ascendencia no europea; se identificaron 38 nuevos loci asociados con la EII; los loci de susceptibilidad descritos hasta la fecha explican un 13,1% y un 8,2% de la variabilidad presente en enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, respectivamente. En este último estudio también se pusieron en evidencia ciertas diferencias en cuanto a la carga genética de individuos con EII en distintas

poblaciones, como por ejemplo la no asociación de *NOD2* o *IL-23R* en pacientes de origen asiático con la EC.

Aproximadamente el 70% de los loci asociados con EII también están asociados con otras enfermedades mediadas por el sistema inmunitario, inmunodeficiencias primarias o con susceptibilidad mendeliana a enfermedad causada por micobacterias (Figura 4). Por ejemplo, la EII comparte 20 de los 39 loci con la Diabetes tipo 1 (DT1), 8 de los 11 con espondilitis anquilosante o 14 de los 17 en psoriasis. Situados en los loci asociados con EII e inmunodeficiencias primarias encontramos genes relacionados con la disfunción del sistema inmunitario, sobre todo implicados en la regulación de células T, como por ejemplo *ADA*, *CD40*, *TAP1/2*, *STAT3* o *STAT5B* (123).

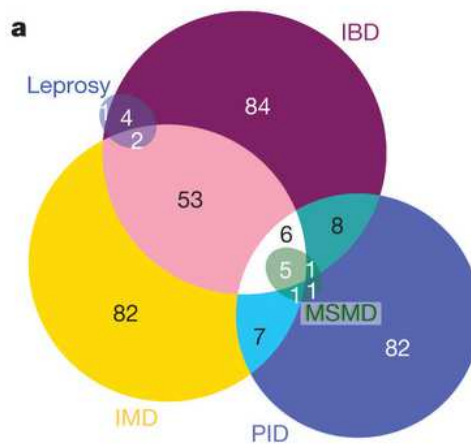


Figura 4. Loci asociados con enfermedad inflamatoria intestinal y otras patologías. En la imagen pueden verse los loci compartidos por diferentes enfermedades (IBD: *Inflammatory Bowel Disease*; IMD: *Immune-Mediated Diseases*, MSMD: *Mendelian Susceptibility to Micobacterium Disease*, PID: *Primary Immunodeficiencies*) Figura modificada a partir de Jostins *et al* (123)

Estos genes compartidos entre diferentes enfermedades pueden tener efectos distintos en unas y otras: un claro ejemplo es el gen *PTPN22*, cuya variante *R620W* está fuertemente asociada a la CU, artritis reumatoide y DT1 pero es protectora frente a la EC (125, 126). Todos los loci y genes que se han relacionado con la EC, la CU y la EII pueden consultarse en el trabajo publicado por Jostins y su equipo (123); además, en la Tabla suplementaria 1 se enumeran los genes candidatos más relevantes localizados en los loci de susceptibilidad. En términos de ontología génica y vías de señalización, los procesos más afectados en la EII son la regulación de la producción de citoquinas (sobre todo IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-10), activación de linfocitos (T, B y NK), respuesta a moléculas de origen bacteriano y vía de señalización JAK-STAT (90).

El descubrimiento de *ATG16L1* e *IRGM* como genes de susceptibilidad para EII, focalizó el interés de la comunidad científica sobre el proceso de autofagia. Mientras que *ATG16L1* se ha asociado únicamente con la EC, *IRGM* y otros genes relacionados con autofagia, como *LRRK2*, también lo están con la CU (123). El gen *XBP1*, cuyo producto está implicado en el estrés en el Retículo Endoplásmico (RE), también se ha asociado con la EII (127). Hoy día se sabe que tanto la autofagia

como el estrés en el RE son unas de las vías alteradas claves en la EII (107, 128). También se han encontrado genes de susceptibilidad relacionados con vías de señalización y de regulación del sistema inmunitario, por ejemplo genes implicados en las vías de diferenciación hacia Th17 o Treg, como *IL23R*, *IL12B*, *JAK2* o *STAT3* (108, 121, 126, 129). Otros genes relacionados con la regulación de la función inmunitaria también se han asociado con la EII, como *CARD9*, *IL12R*, *REL*, *SMAD3* y *PRDM1* (130).

La identificación de loci de susceptibilidad aumenta el conocimiento de los mecanismos patogénicos. El hecho de que la mayoría de loci de susceptibilidad sea común para la EC y la CU indica que muchas de las vías alteradas en ambas enfermedades son comunes. Aunque de una forma simplificada, podría decirse que los genes asociados con la EII se relacionan principalmente con respuesta inmunitaria innata, autofagia, mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial, respuesta inmunitaria adaptativa, restitución y reparación de la lesión epitelial, respuesta al estrés oxidativo y actividad antimicrobiana (126). En la Figura 5 se puede observar un esquema de qué procesos están alterados en la EII y con qué defecto génico están relacionados. En el Apartado 1.3, donde se desarrolla más a fondo la patogénesis de la EII, se mencionarán algunos genes asociados con la enfermedad en relación con las vías en las que participan los productos que codifican.

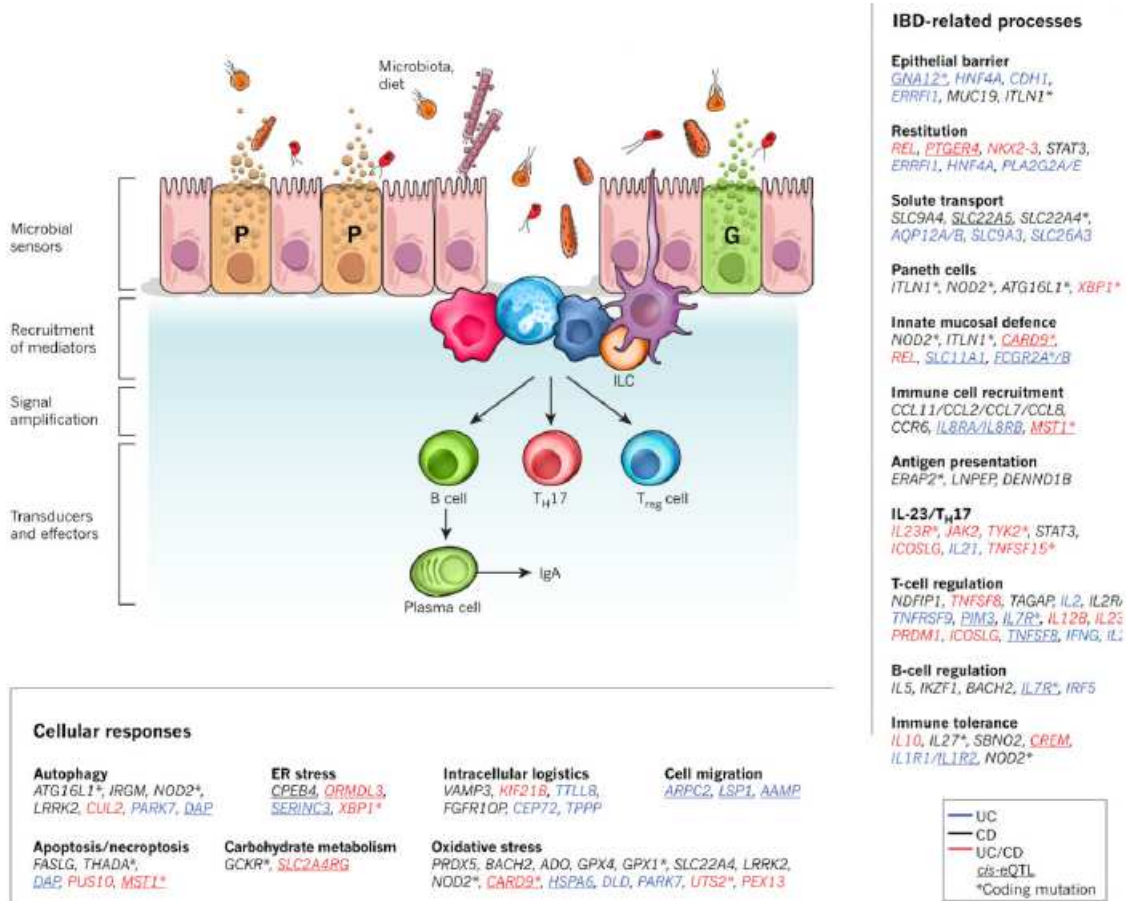


Figura 5. Esquema de algunos genes asociados con diferentes vías de señalización, respuestas y procesos celulares en enfermedad inflamatoria intestinal. Resaltados en azul se encuentran los genes asociados con colitis ulcerosa, en negro con enfermedad de Crohn y en rojo con ambas enfermedades. En los genes marcados con un asterisco (*) se ha encontrado mutación en la secuencia codificante y en los que están subrayados se ha detectado efecto en los niveles de expresión (cis-eQTL). G=Células globosas; P=Células de Paneth. Figura modificada a partir de Khor *et al* (126)

Los loci asociados con la EII tan sólo explican parte de la heredabilidad calculada de la enfermedad; este fenómeno, conocido como “heredabilidad perdida” se puede deber a la presencia de variantes génicas raras no incluidas en los GWAS, aunque también puede deberse en gran parte a las interacciones entre genes (relaciones epistáticas) e interacciones gen-ambiente (131). A pesar de lo revolucionario de los GWAS, estudios de asociación de genes candidatos en distintas cohortes, así como estudios funcionales, siguen siendo necesarios.

1.3 INMUNOPATOGENIA

1.3.1 Mucosa intestinal y sistema inmunitario asociado a la mucosa en ausencia de enfermedad

La primera barrera entre antígenos presentes en la luz y la mucosa intestinal es el propio epitelio. Las células epiteliales intestinales (CEI), o enterocitos, son células polarizadas, con microvellosidades en su zona apical, especializadas para la absorción de nutrientes. Entre las células que componen el epitelio no hay sustancia intercelular ya que se encuentran unidas entre sí mediante uniones estrechas (*tight junctions*) formando una barrera física que impide la entrada de microorganismos y otras sustancias en la mucosa intestinal. Además de los enterocitos, existen una serie de células especializadas que desempeñan un papel muy importante en la función del epitelio (Figura 6) (132):

- Células caliciformes. Son células globosas productoras principalmente de mucinas glicosiladas (moco). Además, producen RELM β , importante en respuesta Th2 protectora frente a nemátodos, y transporta antígenos luminales pequeños a células dendríticas tolerogénicas. Son más abundantes en el íleon.
- Células de Paneth. Se sitúan en la base de las criptas del intestino delgado y están especializadas en la producción, almacenamiento y liberación de sustancias antimicrobianas (como lisozima, RegIII γ , fosfolipasa A2 secretada o defensinas) y mediadores inflamatorios. Estos productos contribuyen a la defensa de la mucosa intestinal y la regulación de la composición de la microbiota.
- Células M. Son células presentadoras de antígeno que captan péptidos luminales y los transportan al interior de la mucosa. Carecen de recubrimiento de glicocálix y en su superficie luminal presentan pliegues en lugar de las microvellosidades características del resto de enterocitos.
- Células enteroendocrinas. Suponen aproximadamente el 1% de las células epiteliales en el intestino y van a ser las encargadas de producir hormonas como la somatostatina, serotonina, colecistoquinina, péptido intestinal vasoactivo o enteroglucagón.

Recubriendo el epitelio intestinal existe un biofilm protector formado por moco, péptidos, el propio glicocálix de las CEI e IgA secretada. Esto, unido a la producción de productos antibacterianos, va a limitar en parte el contacto directo de las bacterias luminales y el interior de la mucosa. La capa de moco es sencilla en el intestino delgado mientras que en el colon es doble, probablemente debido a la importancia de la función absorptiva del delgado (133). En condiciones normales, cuando esta capa está intacta, las bacterias se adhieren a ella y generalmente no tienen contacto directo con las CEI (60). El epitelio intestinal, por tanto, además de para la absorción de nutrientes, es muy importante en la homeostasis del intestino gracias a la función de barrera o a la liberación de productos solubles.

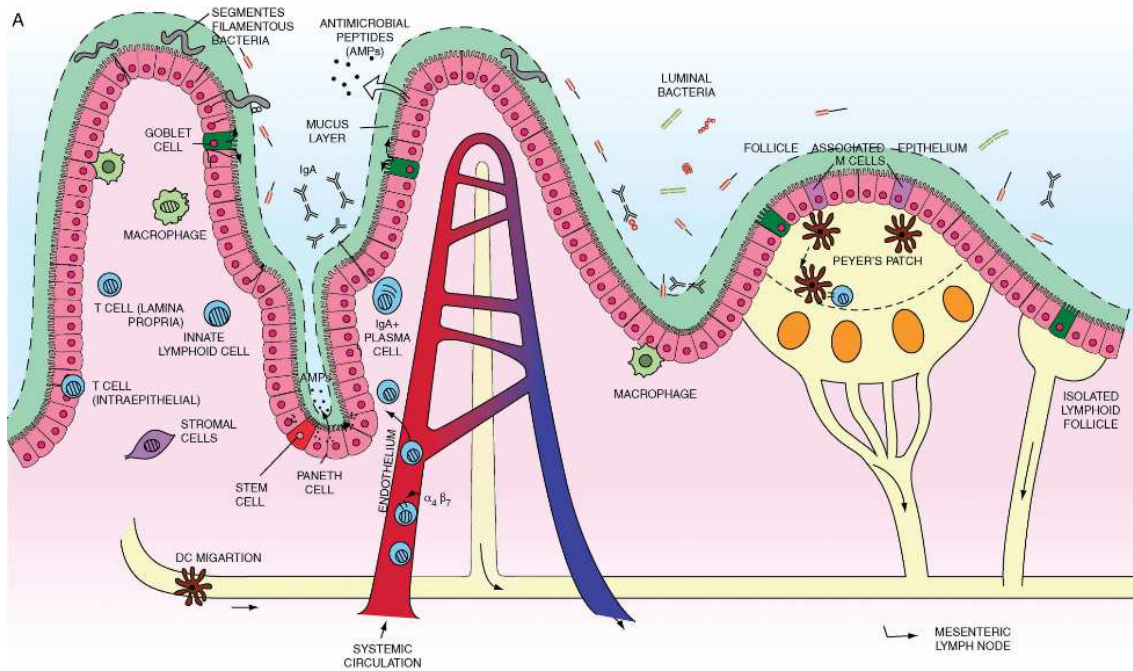


Figura 6. Esquema de la mucosa intestinal y del sistema inmunitario asociado en el intestino delgado. En la imagen puede observarse el epitelio intestinal constituido por enterocitos y células especializadas, como células M, células de Paneth o células caliciformes (globosas). Recubriendo al epitelio hay una capa de moco, péptidos antimicrobianos e IgA que contribuyen a la defensa del mismo. El sistema inmunitario asociado se sitúa disperso por la lámina propia, dentro del propio epitelio o en estructuras organizadas como las Placas de Peyer o los folículos linfoides aislados. Además de linfocitos pueden observarse otras células del sistema inmunitario como células plasmáticas, macrófagos o células dendríticas. Figura modificada a partir de Cader *et al* (132)

El tejido linfoide asociado a mucosa intestinal (GALT, del inglés *Gut-Associated Lymphoid Tissue*) está formado principalmente por folículos linfoides aislados, folículos linfoides asociados a Placas de Peyer o a ganglios linfáticos mesentéricos, linfocitos intraepiteliales y linfocitos de la lámina propia (134, 135) (Figura 6):

- **Placas de Peyer (PP).** Están formadas por agregados linfoides macroscópicos y se sitúan en la parte terminal del ileon. Están separadas del lumen intestinal por una monocapa de células epiteliales rica en células M, denominada FAE (del inglés, *Follicle-associated epithelium*). La región situada entre el FAE y el folículo se denomina cúpula subepitelial y está integrada por células de la inmunidad innata, como células dendríticas y macrófagos. La PP tiene estructura de órgano linfoide secundario y presenta múltiples folículos formados por células B, precursores de células plasmáticas productoras de IgA y células de memoria. En las zonas interfoliculares se puede encontrar tejido linfoide difuso rico en linfocitos T colaboradores, además de células dendríticas o macrófagos.
- **Ganglios linfáticos mesentéricos (MNL).** Como su propio nombre indica se encuentran en el mesenterio del intestino, y, al igual que el resto de ganglios linfáticos, se dividen en corteza, paracorteza y médula. En la corteza se pueden encontrar folículos primarios y secundarios ricos en linfocitos B; rodeando a estos folículos se sitúa la paracorteza formada por linfocitos T y

células dendríticas. En la zona más interna, la médula, hay principalmente células plasmáticas, macrófagos, linfocitos T y linfocitos B.

- Linfocitos intraepiteliales (LIEs). Por cada 100 enterocitos hay entre 10 y 30 LIEs. Los LIEs son mayoritariamente células T: el 90% expresan el correceptor CD8 y sólo un 8% expresan CD4. Existe también una subpoblación que no expresa ninguna de estas moléculas (CD4-/CD8-). En cuanto a los subtipos de TCR, el 90% de los LIEs expresa el $\alpha\beta$, mientras que el 10% expresa el $\gamma\delta$ (principalmente $\gamma1\delta1$). Dentro de estos últimos, más del 80% son CD4-/CD8-.
- Linfocitos de la lámina propia (LLP). La lámina propia es un tejido conjuntivo ubicado entre el epitelio y la submucosa. Los linfocitos presentes en este compartimento son células T, con TCR $\alpha\beta$ CD8+ y CD4+, siendo estos últimos los más abundantes. Además, en la lámina propia se pueden encontrar células dendríticas, macrófagos y algunos linfocitos B o células plasmáticas productoras de IgA.

Podría decirse que dentro del GALT se distinguen dos componentes funcionales: uno inductor de la respuesta (PP y MNL) y otro donde se lleva a cabo la respuesta efectora (LIEs y LLP). Además, en la respuesta inmunitaria en el intestino intervienen también células no linfoides, como los propios enterocitos, y factores solubles, como componentes humorales o citoquinas. En ausencia de enfermedad, el GALT debe ser capaz de diferenciar estímulos patogénicos de señales inocuas y montar una respuesta inmunitaria únicamente frente a los potencialmente peligrosos (136).

Los antígenos lumbinales van a ser presentados por células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales y no profesionales; las CPA no profesionales presentan el antígeno a linfocitos T vírgenes (Th0) a través de MHC-I, o en algunos casos MHC-II, pero al carecer de señal coestimuladora en ausencia de inflamación, se suprimen o se induce anergia en las células T de la mucosa. Las CPA profesionales, van a ser principalmente las células dendríticas; existen muchos fenotipos y subtipos de células dendríticas, siendo aquellas que expresan CD103 importantes para el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Estas células son capaces de reconocer determinados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) como los receptores tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLRs) o los receptores tipo NOD (*Nod-like receptors*, NLRs). Este tipo de receptores están presentes en muchos tipos celulares, incluyendo células de la inmunidad innata, adaptativa o los propios enterocitos (28). Las células dendríticas son el tipo celular con el mayor repertorio de PRRs gracias a los cuales son capaces de interactuar con los antígenos lumbinales a través de sus prolongaciones dendríticas y diferenciar entre flora comensal y patógenos; como también expresan moléculas coestimuladoras, pueden controlar la respuesta inmunitaria adaptativa, como el balance de diferenciación a células T efectoras (Th1, Th2, Th17) y células T reguladoras, así como la respuesta inmunitaria innata o la activación de células NK y otras poblaciones de células linfoides innatas. En individuos sanos, tras el reconocimiento de antígenos de la flora comensal por linfocitos T vírgenes se estimula su diferenciación hacia células T reguladoras (Th3 o Tr1) en lugar de

células T efectoras. En ausencia de inflamación existe un balance, controlado a través de citoquinas y contactos celulares, entre células efectoras y reguladoras; en individuos sanos la inflamación en la mucosa intestinal está controlada por un delicado balance entre respuestas Th1, Th17, Th2, Th3, Th9 y células T reguladoras. Las células B de la mucosa se diferencian a células plasmáticas y producen IgA que recubre el epitelio (89, 137).

Los macrófagos presentes en la mucosa intestinal, principalmente en la lámina propia, van a desempeñar un papel importante no sólo en la defensa frente a microorganismos sino también en el mantenimiento de la homeostasis en ausencia de enfermedad. Estos macrófagos, que característicamente no expresan en membrana CD14, tienen función bactericida y fagocítica, pero en condiciones normales van a ser refractarios a estímulos inflamatorios, producen IL-10 y contribuyen a la diferenciación hacia células Treg. Podría decirse que estos macrófagos participan en la defensa frente a bacterias patógenas y también en el mantenimiento de una respuesta inmunitaria adecuada no exacerbada en el intestino (138).

Recientemente se ha descrito una población celular denominada células linfoides innatas (ILCs, del inglés *Innate Lymphoid Cells*), que se caracteriza por: 1) los genes de los receptores antígeno específico (BCR y TCR) no están reordenados y por tanto no se expresan en la membrana citoplasmática; 2) no expresan en membrana marcadores de la estirpe mieloide ni de células dendríticas; 3) tienen morfología linfocítica. Dentro de esta población celular se incluyen las células NK y las células LTi (del inglés, *Lymphoid tissue-inducer*), descritas ambas hace ya muchos años, y otras poblaciones celulares con origen bastante similar (139). Las ILCs van a producir patrones de citoquinas que pueden asemejarse a los que producen células Th y dependiendo de este patrón, y de otras características fenotípicas y funcionales, se pueden diferenciar 3 subgrupos diferentes (grupo 1, grupo 2, grupo 3). Los 3 grupos de ILCs desempeñan funciones esenciales en la inmunidad de la mucosa ya que intervienen en la organogénesis linfocítica, la remodelación tisular, la inmunidad antimicrobiana o la inflamación. En el intestino, las ILCs están en diálogo continuo con células epiteliales, otras células del sistema inmunitario y la flora comensal y van a ser fundamentales en el mantenimiento de la homeostasis intestinal gracias, por ejemplo, a la producción de citoquinas como la IL-22, IFN- γ o IL-17 (140, 141).

1.3.2 Alteraciones en la enfermedad inflamatoria intestinal

La etiología de la EII es aún desconocida, si bien las características de la enfermedad, los hallazgos histopatológicos y la eficacia de la terapia inmunosupresora indican la implicación del sistema inmunitario en la patogénesis (142). Una de las hipótesis más extendidas que intenta explicar la etiopatogénesis de la EII es la ruptura de la tolerancia existente en el intestino frente a la flora comensal y la respuesta exacerbada del sistema inmunitario frente a microorganismos no potencialmente patógenos, todo ello en individuos genéticamente predispuestos. La disbiosis en el intestino de pacientes con EII es un hecho, por lo que la siguiente pregunta que se plantea es si la alteración en la composición de la flora comensal es la responsable de la respuesta inmunitaria

alterada en la mucosa o si es precisamente ésta uno de los factores que provoca la disbiosis intestinal. Desde hace décadas, la mayoría de las investigaciones se han centrado en estudiar la inmunidad de la mucosa intestinal en la EII, poniendo especial atención sobre la inmunidad adaptativa mediada por células T. Hoy día se sabe que no sólo está alterada esta respuesta sino que también intervienen alteraciones relacionadas con la inmunidad innata, la reparación del daño tisular, la propia función de barrera del epitelio, la interacción con la microbiota de la luz intestinal, y ciertos mecanismos intracelulares como el estrés del retículo endoplásmico o la autofagia.

1.3.2.1 Alteración de la barrera epitelial

La integridad del epitelio intestinal es clave para el mantenimiento del equilibrio existente entre el sistema inmunitario y la flora comensal, ya que se trata de una barrera física que separa ambos compartimentos. En pacientes con EII se ha observado una alteración de la función y aumento de la permeabilidad de la barrera epitelial, que permite la entrada de bacterias y productos bacterianos a la mucosa intestinal, donde la densidad de células del sistema inmunitario es alta (89, 130, 143). La integridad de la barrera epitelial se puede ver comprometida por variaciones genéticas en elementos clave, respuesta alterada al daño o por agentes externos (como tratamiento con AINEs) (10).

Ciertas evidencias ponen de manifiesto el papel que desempeña la alteración de la integridad de la barrera epitelial en el desarrollo de la enfermedad. En la EII se han observado alteraciones de la barrera epitelial a varios niveles: producción de moco, uniones estrechas entre enterocitos y secreción de productos antibacterianos (130). La alteración del epitelio intestinal es especialmente importante en la colitis ulcerosa. En la mucosa de pacientes con CU se ha observado una capa de moco defectuosa, en parte debido a la disminución de células caliciformes, que favorece la entrada de bacterias lumbales (38); además, por GWAS se han identificado los loci *MUC1*, *MUC19* y *PTGER4* como loci de susceptibilidad para EII (117). También se ha descrito en la EII la alteración de las uniones estrechas entre enterocitos, probablemente debido al cambio en la expresión de proteínas que intervienen en estas uniones, como las claudinas (144, 145) o la E-cadherina (126). La producción de defensinas en el epitelio intestinal de pacientes con EC también se ha visto alterada (146): podría ser que el defecto en la producción de defensinas en EC se debiera a fallo en las propias células de Paneth, ya sea por alteración de la respuesta proteica de estas células debido a la presencia de mutación en *ATG16L* (28), o por el daño epitelial existente en la enfermedad. No está claro por tanto si el defecto en la liberación de defensinas es causa o consecuencia de la EII (147).

En resumen, la alteración de la función de la barrera epitelial contribuye a la inflamación crónica característica de la EII ya que, un epitelio dañado y más permeable favorece la entrada de productos bacterianos que estimulan al GALT, siendo esta disfunción de la barrera epitelial más importante en el caso de la colitis ulcerosa que de la enfermedad de Crohn. Por otro lado, los productos bacterianos de la flora comensal pueden estimular la superficie del epitelio a través de receptores de la inmunidad innata, promoviendo la producción de citoquinas y

quimioquinas y el reclutamiento y activación de células del sistema inmunitario (10).

1.3.2.2 Autofagia y estrés del Retículo Endoplásmico

La autofagia es uno de los procesos encargados del mantenimiento de la homeostasis intracelular ya que contribuye a la degradación y reciclaje de subproductos citosólicos y orgánulos, además de intervenir en otros procesos. La autofagia comienza con la formación de una estructura membranosa denominada autofagosoma que engloba estructuras celulares internas dañadas o patógenos intracelulares; el contenido incluido en el autofagosoma se degrada tras la fusión con lisosomas celulares. La autofagia está relacionada con algunos aspectos de la inmunidad innata y adaptativa (148):

- Eliminación de microorganismos. Se induce autofagia al detectar competencia de nutrientes con microorganismos presentes en el citosol o tras la estimulación de PRR, por ejemplo, tras la unión de muramil dipéptido (MDP) a NOD2.
- Control de la señalización proinflamatoria. La autofagia tiene función antiinflamatoria ya que suprime la activación del inflamasoma y disminuye la señalización de IFN tipo 1.
- Inmunidad adaptativa. La autofagia aumenta el procesamiento y la presentación dependiente de MHC-II de antígenos extracelulares fagocitados. Es importante por tanto en la diferenciación y selección del repertorio de células T en el timo, la diferenciación Th y presentación por parte de las células dendríticas a células T en el intestino.
- Secreción de mediadores inmunitarios. La autofagia modula también la secreción de productos celulares, como la lisozima por parte de las células de Paneth o las inmunoglobulinas por parte de las células plasmáticas.

Como se ha comentado previamente, se centró la atención sobre este proceso intracelular en relación con la patogénesis de la EII tras la identificación de genes de susceptibilidad relacionados. La variante *T300A* del gen *ATG16L1* se ha asociado con un defecto en la autofagia en pacientes con EC (107); las funciones de la proteína ATG16L1 y de NOD2 están estrechamente relacionadas, porque el reclutamiento de ATG16L1 al sitio de entrada de la bacteria se produce tras la señalización mediada por NOD2 después de unirse a su ligando MDP (149). Por tanto, mutaciones en *NOD2* o *ATG16L1* van a causar defectos en la autofagia. Dentro de las alteraciones observadas en pacientes con EC relacionadas con la autofagia cabe destacar la alteración en la eliminación de microorganismos intracelulares, mayor producción de IL-1 β e IL-18 por parte de macrófagos (citoquinas proinflamatorias), fallo funcional de las células de Paneth con la consecuente disminución de la producción de productos antimicrobianos o fallo en la presentación de antígenos exógenos por parte de las células dendríticas a los linfocitos T. Otros genes relacionados con la autofagia y también asociados con la EC son *IRGM*, *SMURF1* o *ULK1*, entre otros (123, 148).

El Retículo Endoplásmico (RE) es un orgánulo esencial para la síntesis de proteínas y el correcto plegamiento de las mismas. La concentración de proteínas es tan elevada en el interior del RE que podría decirse que la textura es casi la de un gel, por lo que es muy importante la regulación de la concentración y el tiempo que pasan las proteínas dentro del compartimento para asegurar la homeostasis. Sólo tras su correcto plegamiento la proteína abandona el RE, por lo que existen mecanismos para detectar y solucionar fallos en el plegamiento de proteínas y evitar el estrés que esto produce en el RE. Esta respuesta se denomina “Respuesta de proteínas no plegadas” o *Unfolded Protein Response* (UPR), y, aunque sea un mecanismo citoprotector, si no se resuelve el problema puede llevar a la célula a sufrir apoptosis. En células con actividad de síntesis y secreción de proteínas elevada, los niveles basales de estrés en RE son altos (130, 148). El estrés en el RE y la autofagia están íntimamente relacionados, ya que el aumento de estrés en el RE puede inducir por sí solo el proceso de autofagia y un defecto en la autofagia puede también producir estrés en RE (150). En células de Paneth de pacientes con EC con defecto en autofagia y niveles elevados de estrés en el RE, se observa un descenso muy marcado de los gránulos secretores en el citoplasma y una gran desorganización de los mismos, por lo que la liberación de productos microbianos está seriamente comprometida. Estos pacientes suelen sufrir EC ileal, fistulizante, con alto número de *E.coli* adherente-invasiva en biopsias y necesidad de cirugía elevada (90). Además, el aumento de estrés en el RE induce autofagia, apoptosis y liberación de IL-23, citoquina clave en la inflamación intestinal en la EII. En pacientes con EC y variantes hipomórficas del gen *XBP1*, relacionado con el estrés del RE (127), se ha observado una hiperrespuesta inflamatoria en el intestino además de la alteración en la maduración y función de las células de Paneth; también se ha descrito asociación de *XBP1* con la CU. Otros genes relacionados con el estrés del RE para los que se ha descrito asociación con la EII son *ORMDL3* o *AGR2* (86).

Estos dos procesos, autofagia y estrés del RE, junto con la señalización microbiana a través de PRR, van a estar implicados en la función de las células de Paneth y van a ser fundamentales para entender la patogénesis de la EII. Sin embargo, no son suficientes para desencadenar y mantener la inflamación en el intestino por lo que otros defectos y/o estímulos deben estar implicados (132).

1.3.2.3 *Inmunidad innata*

El hecho de que en pacientes con inmunodeficiencias primarias que afectan a componentes de la inmunidad innata, como la enfermedad granulomatosa crónica o el síndrome Hermansky-Pudlak, el riesgo de desarrollar EII sea mayor es una prueba más de que alteraciones de la inmunidad innata en la mucosa intestinal pueden condicionar la presentación tanto de la EC como de la CU (126). Varios estudios genéticos y funcionales han puesto de manifiesto diferentes vías alteradas de la inmunidad innata en la EII. Los PRR, presentes en células de la inmunidad innata, pero también en las propias CEI, van a ser fundamentales para el equilibrio de la flora comensal y la homeostasis intestinal; en la mucosa de la EII se han descrito anomalías en cuanto a niveles de expresión, repertorio y función de estos receptores (89, 151), que se comentarán más adelante en este trabajo.

En la mucosa intestinal de pacientes con EC se ha observado la presencia de una población de macrófagos, que expresan marcadores de macrófagos y de células dendríticas, y que van a producir grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias como IL-23, IL-6 o TNF- α (152). En la CU también se ha demostrado un aumento en la producción luminal, fecal y sérica de TNF- α , y su correlación con la actividad de la enfermedad (153). El papel que desempeña el TNF- α en la patogénesis de la enfermedad se demuestra con la eficacia de la terapia con anticuerpos monoclonales anti-TNF- α tanto en la EC como en la CU; la administración de este tipo de terapia no sólo neutraliza la propia citoquina sino que también induce la formación de macrófagos reguladores y la apoptosis de células T y monocitos activados. En pacientes con EII también se ha observado un aumento de células dendríticas en la lámina propia.

En modelos experimentales de colitis, se ha observado la acumulación en el colon inflamado de un subtipo de células dendríticas que expresan E-cadherina (el receptor de CD103), aumento de expresión de TLRs y producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6 e IL-23) (154). También se ha observado un aumento de células dendríticas activadas en la mucosa de pacientes con EII y respuesta aberrante ante algunos patrones, como CpG o lipopolisacárido (LPS). Por otro lado, las CEI, que normalmente inducían anergia en las células T al carecer de señal coestimuladora, aumentan la expresión de MHC en presencia de altas concentraciones de IFN- γ , como las presentes en la mucosa de la EII, y pueden activar a células T utilizando moléculas coestimuladoras alternativas (89).

El inflamasoma se define como una plataforma multimérica de la que forman parte una serie de proteínas receptoras y adaptadoras que cuando se agrupan conducen al reclutamiento de la procaspasa 1 y, por lo tanto, a la activación de la caspasa 1. Como resultado de la activación de la vía de las caspasas se promueve la maduración y liberación de citoquinas inflamatorias (IL-1 β e IL-18, principalmente) (155, 156). Dado que se han detectado niveles elevados de estas citoquinas en zonas de la mucosa con una EC activa, parece existir una relación entre el inflamasoma y la EII. El gen *NLRP3* codifica para un miembro de la familia NLR que forma parte del inflamasoma. La activación de la ruta de las caspasas dependiente de NLRP3 se produce en respuesta a determinados ligandos, como ATP, cristales de ácido úrico, ARN viral, ADN bacteriano o MDP, este último reconocido también por NOD2 (157-159). NLRP3 interacciona con NOD2, y, al igual que éste, se han relacionado variantes funcionales con EC en varios estudios (160, 161), aunque el papel de las variantes analizadas en la producción de citoquinas no está claro todavía. Esta asociación no se ha conseguido replicar en estudios posteriores, incluyendo GWAS (123, 162).

1.3.2.4 Células linfoides innatas, citoquinas e inmunidad adaptativa

En ausencia de enfermedad o inflamación, en la mucosa intestinal existe un balance entre respuesta efectora y respuesta reguladora. Está claro que en la EII se produce una ruptura de este equilibrio, inclinándose la balanza hacia una respuesta efectora en lugar de reguladora. Durante mucho tiempo se ha considerado que el sistema inmunitario adaptativo, era el responsable de la inflamación presente en el intestino y de perpetuarla, aunque probablemente no

de iniciarla (28). En base a los niveles de citoquinas encontrados en la mucosa intestinal de pacientes, se ha considerado que en la EC predomina una respuesta Th1 y Th17 y en la CU una respuesta Th2: mientras que en la mucosa de pacientes con EC se observan niveles elevados de IL-17, IL-22 e IFN- γ , en pacientes con CU predominan IL-4, IL-5 e IL-13 (132). El hecho de que en modelos experimentales de colitis con ratones *Rag*^{-/-} se observen niveles elevados de IL-17, IL-22 e IFN- γ , apoya la idea de que las células de la inmunidad adaptativa no son la única fuente de estas citoquinas en la mucosa inflamada de la EII. Como ya se ha comentado, la existencia de células linfoides innatas (ILCs) fue descrita recientemente; éstas producen perfiles de citoquinas similares a las células Th, y van a contribuir al *pool* de citoquinas que perpetúa la inflamación en la mucosa de la EII (163).

El hallazgo de niveles elevados de IL-17 e IL-22 en la mucosa de pacientes con EII centró la atención sobre las células Th17. Estas células son una subpoblación de células T que se caracterizan por la producción de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. Las ILCs del grupo 3 (ILC3 y LTi principalmente) son células que producen también IL-17 e IL-22, y además, al igual que las Th17, su desarrollo depende del factor de transcripción ROR γ t y su proliferación es promovida por la IL-23 (139). La IL-23, liberada en mayor parte por células dendríticas activadas, macrófagos y monocitos tras el reconocimiento de PAMP a través de sus receptores de patrones (152, 164) o mediante la activación del inflamasoma del que forma parte NLRP3 (165), va a ser fundamental por tanto para el desarrollo de las células Th17 e ILC3, las principales productoras de IL-17 e IL-22 en la mucosa intestinal. Se ha observado un aumento en los niveles de ILCs del grupo 3 localizados en la mucosa de pacientes con EC (141). La IL-17 estimula a los monocitos y las células endoteliales para producir mediadores proinflamatorios que promueven el rápido reclutamiento de neutrófilos. La IL-22 por su parte es esencial en la homeostasis del intestino ya que induce la expresión de productos antimicrobianos e interviene en la reparación del daño tisular (166). En pacientes con EC también se han observado niveles elevados de IFN- γ en la mucosa intestinal; esta citoquina es liberada por células Th1, ILC1, células NK y células T CD8+, pero cuando la concentración de IL-23 es elevada, se produce un descenso de expresión (downregulación) del factor de transcripción ROR γ t en las ILC3s, adquiriendo éstas también la capacidad de producir IFN- γ (167). El aumento de producción de IL-17, IL-22, y ahora también IFN- γ , en respuesta a IL-23 y el hecho de que varios genes de la vía de señalización del eje IL-23/Th17 estén asociados con EII (*IL-23R*, *STAT3*, *IL12p40*, *CCR6*, *TNFSF15* o *JAK2*), sugiere que la IL-23 es una molécula clave en la inflamación del intestino (126, 130).

En la EC existe un desequilibrio entre células T efectoras (Th1 y Th17 principalmente) y células T reguladoras (nTreg de origen tímico o Tr1, Th3 e iTreg inducidas en la mucosa intestinal). La diferenciación de estos tipos celulares está reducida en la EC, predominando las células T efectoras (28, 168). Dado que el TGF- β es fundamental para el desarrollo de Th17 y de Treg, algunos estudios sugieren que ambas subpoblaciones proceden de un mismo precursor, y que la diferenciación hacia una u otra va a depender de las señales en el medio (169). TGF- β solo, en ausencia de IL-6, conduce hacia la diferenciación de células Treg; en la mucosa intestinal hay unos niveles elevados de TGF- β , lo cual contribuye a la homeostasis intestinal promoviendo el desarrollo de células Treg en la lámina

propia. En presencia de inflamación hay otras señales presentes, como otras citoquinas (IL-6, principalmente), productos microbianos o algunos metabolitos, y se induce la diferenciación a Th17 (170). Mediante GWAS se ha demostrado la asociación con la enfermedad de genes directamente relacionados con diferenciación de células Treg (*IL10*, *IL2RA*, *SMAD3*), Th1 y Th17 (por ejemplo, *CPEB4*, *STAT4* o *CD40*) (171-173).

En pacientes con CU, predomina una respuesta Th2 atípica caracterizada por niveles elevados de IL-5 e IL-13, principalmente (174). Estas citoquinas son producidas por células CD4+ Th2, células NKT e ILCs del grupo 2 (ILC2). En la mucosa intestinal de pacientes con CU, la IL-4 producida es rápidamente suprimida por los niveles elevados de IL-13 (153). La IL-13 es especialmente importante en la patogénesis de la CU debido a la función citotóxica frente a las células epiteliales, incluyendo la inducción de apoptosis y la alteración de la composición proteica de las uniones estrechas célula-célula, alterando la integridad del epitelio (175, 176). Además, la IL-13 ejerce una retroalimentación positiva sobre las células NKT, aumentando así el daño tisular. Por otro lado, la pérdida de función de la IL-10 o de su receptor está relacionado con una CU más grave, indicando la importancia de la señalización a través del receptor de esta citoquina en la patogénesis de la enfermedad (85). Debido a la infiltración de neutrófilos que también se observa en la mucosa de pacientes con CU y que *IL-23R* también es un gen de susceptibilidad en este caso, probablemente las células Th17 también puedan desempeñar un papel importante en la patogénesis de la CU (86).

La respuesta de células B también está alterada en la mucosa de pacientes con EII (126). Uno de los puntos clave en la función de células B es la secreción de IgA, ya que es fundamental para el mantenimiento del equilibrio de la flora comensal y la homeostasis en la mucosa intestinal. En pacientes con EII se ha observado una producción de IgA alterada; además, algunos genes asociados con EII también lo están con el déficit de IgA (*ORMDL3*, *REL*, *PTPN22*) (177). En la mucosa de pacientes con EII se produce un aumento de la producción de IgG específica frente a bacterias luminales, en lugar de la IgA protectora presente en una mucosa no enferma (178). Por otro lado, se ha asociado con EII un defecto en las células B reguladoras (Breg), que secretan citoquinas antiinflamatorias, como IL-10 o TGF- β ; un fallo en la función de estas células reduce los niveles de IL-10 en la mucosa y, por tanto, aumenta la producción de IFN- γ y TNF- α por parte de las células T CD4+, contribuyendo así a la inflamación intestinal.

1.4 GENES ESTUDIADOS

1.4.1 HLA

1.4.1.1 *Aspectos generales*

Los genes que codifican para el MHC, denominados HLA en humanos (del inglés *Human Leukocyte Antigen*), se sitúan agrupados en el brazo corto del cromosoma 6 (6p). El conjunto de genes que constituyen el MHC se localiza en una de las regiones más densas del genoma humano, con más de 200 loci identificados (179). Más del 40% de los genes situados en esta región están relacionados con la respuesta inmunitaria, ya sea con la presentación antigénica, con el procesamiento antigénico, citoquinas, proteínas del complemento, etc. (180). Como se puede observar en la Figura 7, donde se representa la región MHC, se distinguen diferentes grupos de genes; además, hay un número elevado de pseudogenes que no se traducen (181):

- *MHC-I*. Estos genes se sitúan en la parte más telomérica de la región y abarcan 2Mb. Dentro de este grupo se encuentran los llamados genes *MHC-I* clásicos (*HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-C*) y los no clásicos (como por ejemplo *HLA-E*, *HLA-F*, *HLA-G*, *MICA* o *MICB*).
- *MHC-II*. Ocupan una extensión de 1,2 Mb y también se distingue entre clásicos (*HLA-DR*, *HLA-DQ* y *HLA-DP*) y no clásicos (como *HLA-DM*, *HLA-DO* o *HLA-DN*). Dentro de este grupo de genes también se encuentran algunos que codifican para proteínas implicadas en el procesamiento del antígeno, como *TAP1* y *TAP2*.
- *MHC-III*. Ocupan la región de 0,9 Mb situada entre *MHC-I* y *MHC-II* y dentro de ellos hay genes que codifican para proteínas del complemento, citoquinas (como el *TNFA* y *TNFB*) o proteínas de shock térmico (Hsp).

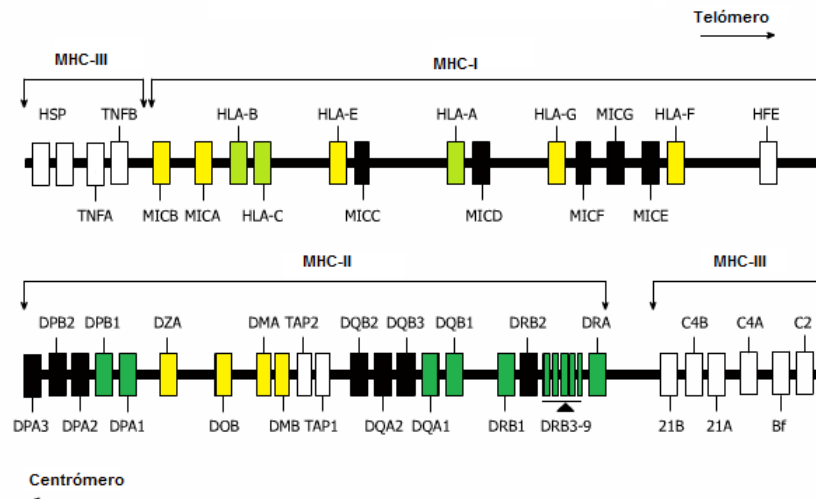


Figura 7. Región del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) situada en el brazo corto del cromosoma 6. En este esquema se representan en verde los genes MHC-I y MHC-II clásicos (claro y oscuro respectivamente), en amarillo los considerados genes MHC no clásicos, en negro los pseudogenes y en blanco otros genes situados en esta región. Figura modificada a partir de Muro *et al* (192)

Los genes *HLA-I* (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*) y *HLA-II* (*HLA-DR*, *HLA-DQ*, *HLA-DP*) clásicos son los mejor estudiados en cuanto a estructura, diversidad y función y los más polimórficos del genoma humano (179): hasta la fecha se han descrito 3285 alelos *HLA-A*, 4077 alelos *HLA-B*, 2801 alelos *HLA-C*, 1932 alelos *HLA-DRB1*, 876 alelos *HLA-DQB1* y 587 alelos de *HLA-DPB1* (<http://hla.alleles.org/>)². A pesar del elevado número de alelos posibles, la cantidad de haplotipos observados es mucho menor a la esperada por azar; esto es debido a que existe un gran desequilibrio de ligamiento (LD, del inglés *Linkage Disequilibrium*) y suelen heredarse conjuntamente (182). Estos genes se expresan de forma codominante, es decir se expresa tanto la copia materna como la copia paterna. La codominancia sumada al elevado polimorfismo de estos genes hace que exista un amplio repertorio de moléculas MHC que facilita la presentación antigénica de una gran variedad de péptidos.

Las moléculas de HLA de clase I y de clase II están directamente implicadas en la respuesta inmunitaria, concretamente en la presentación antigénica a linfocitos T. Ambas moléculas difieren en varios aspectos relacionados con la estructura, el tipo de péptido que unen, su patrón de expresión o el tipo celular al que presentan el péptido, entre otros. En la Figura 8 se representa la estructura de MHC-I y de MHC-II.

² Para el tipaje de los genes *HLA* se pueden emplear técnicas serológicas o genómicas. En el caso del tipaje *HLA* obtenido por técnicas genómicas, se emplea la nomenclatura actual para los alelos *HLA* (por ejemplo, *HLA-B*27:05*). Esta nomenclatura no puede aplicarse al tipaje HLA realizado mediante técnicas serológicas, ya que no se identifican alelos sino antígenos (por ejemplo, HLA-B27).

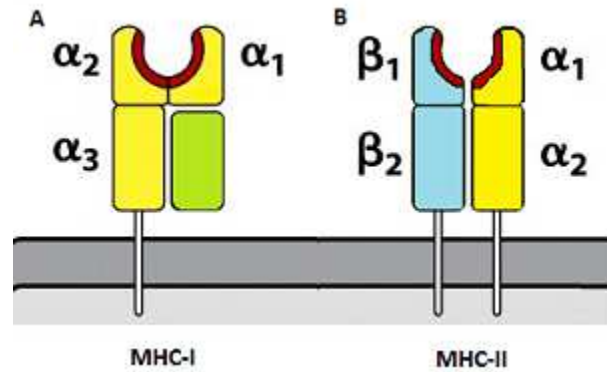


Figura 8. Estructura de las moléculas de MHC de clase I y clase II. En la imagen están representadas en amarillo las cadenas α , en azul la cadena β y en verde la cadena β -microglobulina. En rojo se representa el surco de unión al péptido. Figura modificada a partir de Janeway 7th (183)

Las moléculas de HLA de clase I están formadas por una cadena peptídica α , codificada dentro de la región MHC, y una cadena β invariante, codificada en el cromosoma 15 y denominada β 2-microglobulina. La cadena α está constituida por tres dominios de tipo inmunoglobulina, formando α 1 y α 2 el surco de unión al péptido. Los péptidos que presentan las moléculas de HLA de clase I por regla general tienen origen endógeno y su longitud es de 8 ó 9 aminoácidos. Prácticamente todas las células nucleadas del organismo expresan MHC-I y son las encargadas de presentar péptidos de origen endógeno a linfocitos T CD8+ (linfocitos T citotóxicos) Por su parte, las moléculas de MHC de clase II están formadas por una cadena α y otra β , ambas codificadas en la región MHC del cromosoma 6 (Figura 8); el surco de unión al péptido lo conforman los dominios extracelulares α 1 y β 1, pero el polimorfismo se concentra sobre todo en β 1, siendo la cadena α muy poco polimórfica. La expresión de las moléculas de HLA-II está más restringida a células de sistema inmunitario, principalmente CPAs profesionales (células dendríticas, macrófagos y linfocitos B) pero también puede observarse en otros tipos celulares, como en linfocitos T activados. Se encargan de presentar péptidos de origen exógeno, de unos 12 o 13 aminoácidos, a linfocitos T CD4+ (linfocitos T colaboradores o *helpers*). Tanto en caso de MHC-I como en MHC-II la unión de las dos cadenas que las forman y del péptido en la hendidura es imprescindible para que se expresen en membrana; en ausencia de infección, y por tanto de péptidos antigénicos procedentes de patógenos, la expresión de MHC en membrana va acompañada de péptidos propios, frente a los cuales el sistema inmunitario no responde en ausencia de enfermedad gracias al correcto establecimiento de la tolerancia durante el desarrollo de las células T en el timo (181, 183).

1.4.1.2 HLA y la EI

Las moléculas MHC son claves en la respuesta inmunitaria. En primer lugar van a ser imprescindibles en el desarrollo de linfocitos T, ya que intervienen en los procesos de selección positiva y selección negativa en el timo, que tienen como

objetivo la eliminación de clones de linfocitos T autorreactivos. Además, son fundamentales en la respuesta inmunitaria ante patógenos intracelulares y extracelulares, ya que el reconocimiento del péptido presentado por MHC por parte del linfocito T es una de las señales necesarias en la sinapsis inmunológica (183). Todo esto explica la relación que existe entre HLA y la susceptibilidad frente a determinados patógenos o la relación con enfermedades autoinmunes. Más de 100 enfermedades, la mayoría de ellas autoinmunes, se han relacionado con HLA, siendo algunos de los ejemplos más claros la enfermedad celiaca (asociación con *DQB1*02:01* y *DQB1*03:02*) (184), la espondilitis anquilosante (asociación con *B*27*) (185), la enfermedad de Behçet (asociación de *B*51*) (186) o la diabetes mellitus tipo I (asociación con *DRB1*03* o *DRB1*04*) (187).

Dentro de las enfermedades mediadas por el sistema inmunitario para las que se ha descrito asociación de *HLA* se encuentra la EII. Gracias a la utilización de técnicas serológicas, Gleeson y su equipo (188) llevaron a cabo en 1972 el primer estudio de asociación de antígenos HLA con EII. Los genes *HLA*, como ya se ha comentado previamente, se sitúan en el brazo corto del cromosoma 6, donde se localizó una de las regiones de susceptibilidad de EII denominada IBD3 (2, 87, 189-191). Aunque es difícil de determinar con exactitud, se estima que la región *HLA* podría contribuir entre un 10 y un 33% al riesgo genético de padecer la EC, y entre un 64% y un 100% en el caso de la CU (192, 193), indicando que la asociación con *HLA* es más importante en el caso de la CU. La realización de estudios de asociación caso-control ha demostrado la relación de diferentes alelos con la enfermedad; los resultados obtenidos en estos trabajos no siempre se confirman de una población a otra, debido, entre otros motivos, a que el estudio de asociación de *HLA* con enfermedad es muy complejo por el alto desequilibrio de ligamiento existente entre los diferentes loci y el elevado polimorfismo de los mismos (98). La realización de GWAS y metanálisis posteriores han confirmado la fuerte asociación de la región MHC tanto con la CU como con la EC (101, 114, 116, 118). En el metanálisis realizado por Stokkers y colaboradores en 1999 (97) se recopilaron resultados de 29 estudios entre 1980 y 1998, en los que se habían utilizado técnicas serológicas o genómicas, en diferentes poblaciones. En este trabajo se describió la asociación de *HLA-DR2*, *HLA-DR9* y *HLA-DRB1*01:03* con la CU y el papel protector de *HLA-DR4*; en cuanto a la EC, *HLA-DR7* y *HLA-DQ4* se calificaron como alelos de susceptibilidad mientras que *HLA-DR2* y *HLA-DR3* resultaron ser protectores.

Probablemente el estudio más importante hasta el momento en cuanto a asociación de *HLA* con EII se publicó en el año 2015; en él, gracias a la colaboración de grupos de todo el mundo, se analizaron más de 7000 SNPs en la región MHC en más de 32000 pacientes con EII y casi 35000 controles sanos (100). En este estudio se demostró nuevamente la asociación de diferentes alelos con la EII, tanto con la CU como con la EC, siendo especialmente relevantes los alelos de *HLA-II* y principalmente *HLA-DRB1*: el diseño del estudio se basa en un modelo centrado en *DRB1* (*HLA-DRB1-focused model*) en el que se realizan una serie de regresiones logísticas condicionadas posteriores para intentar evitar falsas asociaciones debido al LD. Según estos autores, las relaciones encontradas entre *HLA* y EII explican el 2% y 5% de la varianza observada en la EC y la CU respectivamente, sugiriendo

nuevamente que la importancia de estos genes es mayor en el caso de la CU. Los resultados obtenidos en este estudio se representan en la Figura 9.

En el estudio de Goyette y colaboradores la asociación más fuerte con la CU es la de *DRB1*01:03*. Probablemente este resultado sea uno de los más reproducidos en otros estudios en relación a *HLA* y la CU (98, 194-200), no sólo con respecto al aumento de la susceptibilidad a padecer la enfermedad sino también con características clínicas, como pancolitis (84, 118, 194, 201), una tasa más alta de colectomía (98, 194, 197) o el aumento de la aparición de manifestaciones extradigestivas, sobre todo articulares (201, 202). Otros muchos autores han asociado el alelo *DRB1*15:02* con la CU (98, 195, 199, 203-208), sin embargo en el estudio de Goyette y colaboradores se asocia el alelo *DRB1*15:01* mientras que la asociación de *DRB1*15:02* la consideran secundaria al LD existente con otros alelos *HLA* (100). *DRB1*15* también se ha asociado con peor pronóstico y necesidad de colectomía en pacientes con CU (197, 209), indicando Masuda y colaboradores (210) que la gravedad de la enfermedad y la falta de respuesta están relacionadas con *DRB1*15:02* mientras que *DRB1*15:01* se asocia con CU tratable. Además, los alelos *DRB1*11*, *DRB1*12*, y *DRB1*13* se han asociado con la CU en el estudio de Goyette y colaboradores (100). Satsangi *et al* (83) también encontraron asociación de *DRB1*12* con la CU en población inglesa y otros autores con *DRB1*11* (180, 199). Por el contrario, Uyar *et al* (204) describieron el papel protector del alelo *DRB1*13* frente a la enfermedad.

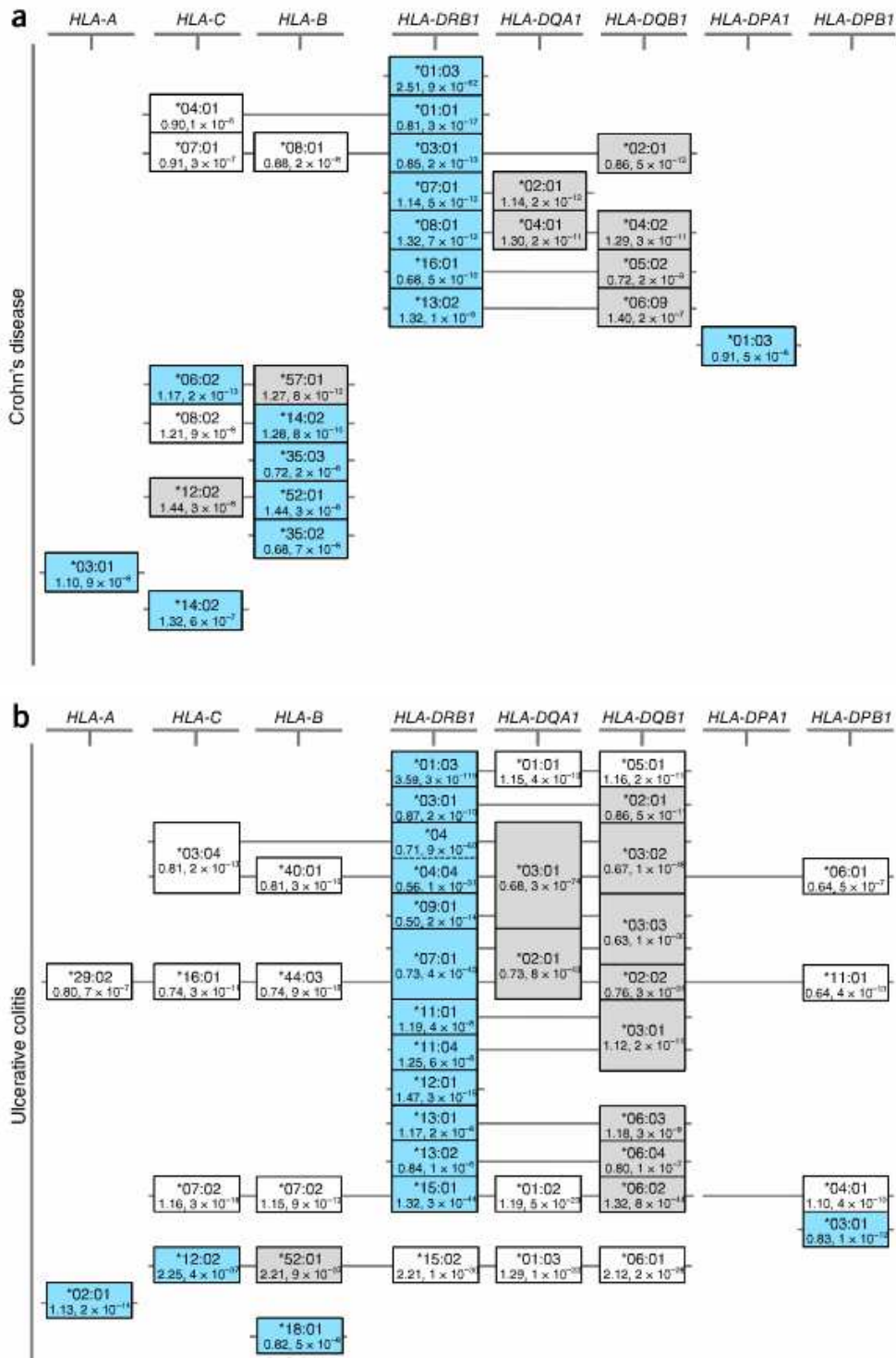


Figura 9. Modelo de asociación de HLA de clase I y de clase II con enfermedad inflamatoria intestinal propuesto por Goyette *et al* (100). Según este modelo centrado en HLA-DRB1, los alelos seleccionados y asociados de forma independiente con enfermedad de Crohn (a) o colitis ulcerosa (b) se representan dentro de una caja azul; los alelos dentro de una caja gris tienen un efecto equivalente al de los anteriores. El efecto de los alelos representados dentro de una caja blanca es secundario al de los alelos seleccionados en azul y desaparece al realizar regresión logística condicionada.

El alelo *DRB1*01:03* también se ha relacionado con EC (195, 196, 199, 208), siendo ésta la asociación más fuerte descrita de *HLA* con la EC en el trabajo de Goyette (100). *DRB1*01:03* se ha relacionado sobre todo con localización colónica de las lesiones (99, 118, 196) y con la presencia de Epa (211). Por el contrario, el alelo *DRB1*01:01* es protector frente a la EC en el trabajo de Goyette *et al* (100). Probablemente otra de las asociaciones más fuertes de *HLA* con EC sea la de *DRB1*07*. Este alelo se ha asociado con la enfermedad en muchas cohortes diferentes (99, 100, 199, 211-213) y con la localización de las lesiones, en este caso con EC ileal (99, 209, 211), o con un comienzo temprano de la enfermedad (213). Por otro lado, los alelos *DRB1*08:01* (100) y *DRB1*13:02* (100, 208, 209, 214, 215) también se han relacionado con aumento de susceptibilidad a padecer EC en algunas poblaciones. *DRB1*04* se ha asociado con EC, fundamentalmente en población japonesa pero también en población caucásica (199, 205, 208, 216), y con falta de respuesta a corticoides (209) o EC ileal (88), mientras que en algunos estudios se ha demostrado su papel protector frente a CU (98, 100, 208).

Para algunos alelos *HLA* se ha descrito su papel protector frente a la EII, dentro de los cuales destacan *DRB1*04* (97, 98, 100, 208), *DRB1*03:01* (100, 198, 217), *DRB1*07*, *DRB1*09* y *DRB1*13*, protectores frente a la CU (100), y *DRB1*01:01* (100), *DRB1*03:01* (97, 100, 212, 213), *DRB1*15:01* (211) y *DRB1*16:01* (100), protectores frente a la EC.

La contribución de los alelos *HLA* de clase I al riesgo de padecer EII es menor que en el caso de *HLA-II*, sin embargo se han descrito una serie de asociaciones que merece la pena destacar. Probablemente la asociación más fuerte dentro de los alelos de *HLA-I* sea la de los alelos *B*52:01* y *C*12:02* con CU (98, 100). *B*52* también se ha relacionado con localización colónica en pacientes con EC (218). *A*02:01*, *A19* y *A24* también se han relacionado con aumento de riesgo de padecer CU mientras que *B*18:01* desempeña un papel protector (100, 199). En relación con la susceptibilidad a padecer EC y *HLA-I*, en el trabajo de Goyette y colaboradores, se describe la asociación de *A*03:01*, *C*06:02*, *B*14:02*, *B*52:01* y *C*14:02*, mientras que el alelo *B*35* resultó ser protector (100). En otros trabajos también se han asociado con la EC los alelos *HLA-B18* y *HLA-B21* (199).

1.4.2 MICA

1.4.2.1 Aspectos generales

Los genes MIC (del inglés, *MHC class I chain related*) fueron descritos simultáneamente por dos grupos diferentes a mediados de los años 90 (219, 220) y se clasifican dentro de los genes MHC de clase I no clásicos o moléculas de MHC de clase Ic (221). Hasta la fecha se han descrito 7 genes *MIC* (*MICA*, *MICB*, *MICC*, *MICD*, *MICE*, *MICF* y *MICG*) de los que tan sólo *MICA* y *MICB* codifican para una proteína, siendo el resto pseudogenes (222). El gen que codifica para *MICA* se sitúa en el cromosoma 6, a unas 46kb en dirección al centrómero de *HLA-B*, entre los genes de *HLA-B* y *TNFA* (223). Es un locus polimórfico, si bien bastante menos que las MHC-I clásicas, y a fecha de hoy hay más de 100 alelos descritos, que codifican para 81 proteínas diferentes (<https://hla.alleles.org>). A pesar de que *MICA* comparta entre un 18 y un 36% de su secuencia con las moléculas de MHC-I, no interviene en la presentación de antígenos, ya que es incapaz de unir y presentar péptidos antigénicos (224); además, *MICA* se expresa en membrana sin ir acompañada de β -2-microglobulina. El gen contiene 6 exones que codifican para un tallo citoplasmático, una región transmembrana y tres dominios extracelulares (α 1, α 2 y α 3) (223), dando lugar a una glicoproteína de 383 aminoácidos (225). Los dominios α 1 y α 2 contienen las hélices que en moléculas de MHC-I clásicas forman la hendidura de unión al péptido (226); estas últimas son las regiones más variables, donde el polimorfismo puede tener un significado funcional (223, 227) (Figura 10).

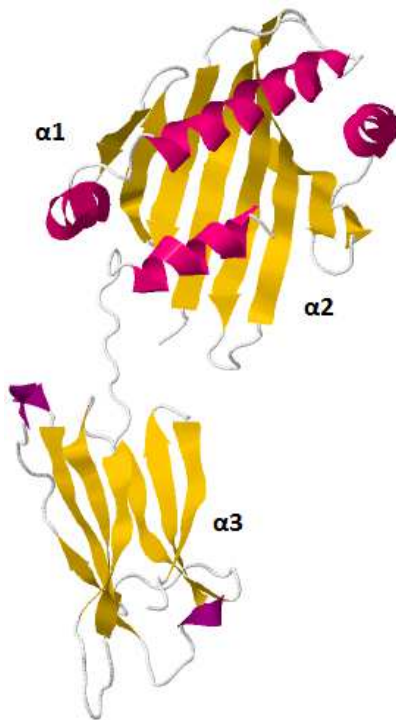


Figura 10. Vista de una representación de la estructura cristalizada de MICA. Sólo se muestra la región extracelular, que consiste en 2 dominios estructurales: la plataforma α 1 α 2 y α 3. La unidad formada por α 1 α 2 consiste en cuatro α hélices organizadas en ocho láminas β antiparalelas. El dominio α 3, un dominio de tipo inmunoglobulina, no está en contacto directo con la plataforma. Imagen obtenida del Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB ID:1B3J) (227).

MICA se une a receptores NK, concretamente NKG2D (*Natural Killer group 2, member D*) (226, 228), presente no sólo en células NK sino también en linfocitos T $\gamma\delta$ y linfocitos T $\alpha\beta$ CD8+. También se ha observado expresión anómala de NKG2D en linfocitos T colaboradores CD4+ en lugar de CD28 (229). NKG2D es una glicoproteína que se expresa en membrana en forma de homodímero y que pertenece a la superfamilia de las lectinas tipo C, cuyo gen se sitúa en el cromosoma 12 (12p13.2) (230). NKG2D reconoce además otros ligandos con los que MICA comparte alrededor de un 25% de aminoácidos en los dominios $\alpha 1\alpha 2$ (230, 231): estos ligandos son principalmente MICB y proteínas homólogas a RAE-1 murina (ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3) (231, 232). La señal producida tras la unión de MICA con NKG2D invalida la señal inhibitoria recibida en la célula NK tras el reconocimiento de HLA-C/E por parte de KIRs y NKG2A/B, y activa la actividad citolítica de las células NK (233). En linfocitos T, la unión de NKG2D a su ligando actúa como señal coestimuladora que regula la señal del TCR, sirviendo como nexo de unión entre inmunidad innata y adquirida. La señalización a través de NKG2D necesita de una proteína adaptadora llamada DAP10, con motivos YXXM similares a los presentes en CD28 (señal coestimuladora el LT vírgenes) (234). La unión MICA|NKG2D desempeña un papel importante en la eliminación de células infectadas o tumorales (235), interviniendo de esta manera en el mantenimiento de la integridad del epitelio intestinal gracias a la eliminación de células dañadas (224).

MICA también es capaz de unirse a determinadas poblaciones de LIEs $\gamma\delta$ (con la región V δ 1) a través de su TCR (236, 237). Esta población de linfocitos, en cuyo desarrollo desempeña MICA un importante papel, tiene una variabilidad de su receptor muy limitada, por lo que se ha sugerido que respondan a los llamados “antígenos de estrés” más que a antígenos microbianos. Entre sus funciones se pueden destacar la actividad antitumoral (a través de citolisis y liberación de citoquinas como TNF- α e IFN- γ), inmunorregulación o reparación del daño de las mucosas (liberación de factores de crecimiento para fibroblastos, tejido conectivo y queratinocitos) (237). Algunos estudios demuestran la acumulación y expansión clonal de estos linfocitos en la mucosa inflamada de pacientes con EC (238, 239).

Aunque a día de hoy se ha observado una expresión ubicua de *MICA* a excepción del sistema nervioso central, al menos a nivel de transcrito primario, (235), durante mucho tiempo se pensó que su expresión estaba restringida al epitelio gastrointestinal y tumores epiteliales (206, 223, 240), y es en estos tejidos donde es especialmente importante. Mientras que la expresión de *MICA* es muy baja en condiciones normales, bajo condiciones de estrés celular, como shock térmico (224), transformación, infección viral (241) o aloinjerto (237), ésta aumenta considerablemente, por lo que se la ha considerado como sensor del estado celular. Por otro lado, se ha sugerido el papel de MICA en la inmunovigilancia, ya que su expresión también aumenta tras la malignización celular (226). Sin embargo, las células tumorales epiteliales han desarrollado una serie de mecanismos de escape inmunológico, dentro de los que destacan los siguientes (242): 1) disminución de la expresión de MICA en membrana; 2) aumento de la producción de MICA soluble (sMICA) a partir de moléculas de membrana (243); 3) aumento de la expresión de HLA-G, cuya forma soluble desencadena apoptosis en células NK y LT CD8+ activados.

Se ha descrito un polimorfismo STR (*Short Tandem Repeat*) en el exón 6, que codifica para la región transmembrana (TM), consistente en 4, 5, 6 ó 9 repeticiones del trinucleótido GCT como variantes más frecuentes (244), siendo los alelos de 7, 8 ó 10 repeticiones variantes raras (245-247). GCT codifica para el aminoácido alanina y dependiendo del número de repeticiones se nombran los correspondientes alelos. Además, se ha caracterizado otro alelo en esta región (*MICA*A5.1*) en el que hay cinco repeticiones del triplete GCT y una inserción de una guanina en el segundo triplete (GGCT) que produce un cambio en el marco de lectura y da lugar a un codón *stop* prematuro en la región TM de la proteína (248). Esta proteína truncada no sólo difiere del resto de proteínas MICA en su longitud sino también en ciertos aspectos como la localización celular, la unión a la membrana, la modificación postraducional o la forma en la que es liberada al exterior celular (244, 249-252). Dependiendo de la población, la frecuencia de los alelos *MICA-STR* es variable. La frecuencia del alelo *MICA*A5.1* es elevada en diferentes poblaciones, alcanzando hasta el 55% en la población caucásica (244); sin embargo en otras cohortes el alelo más frecuente es *MICA*A6* (248, 253, 254).

1.4.2.2 *MICA y la EII*

La expresión de MICA en el epitelio intestinal es baja en condiciones normales y su localización es fundamentalmente basolateral. Su presencia actúa como sensor de estrés y de daño en las CEI; y, gracias al reconocimiento por parte de NK y LT, permite la eliminación de células dañadas y el mantenimiento de la integridad del epitelio (255). La localización de la proteína *MICA*A5.1* en el enterocito es apical en lugar de basolateral, principalmente debido a la carencia de secuencia señal, lo cual dificulta la interacción con su receptor en células NK y células T (244). Por otro lado, la expresión de MICA es mayor en colonocitos que en células epiteliales del intestino delgado. Esto está justificado en parte por el enorme estrés al que está sometido el intestino grueso ante la presencia de abundante flora bacteriana (224), e, incluso, se ha demostrado el aumento de expresión de MICA en infección por determinadas cepas de *Escherichia coli* (256). En la mucosa intestinal de pacientes con EII se ha observado una alteración de la expresión de MICA. Mientras que en la CU se observa un defecto global en la expresión de moléculas de MHC de clase I no clásicas, como CD1d, MICA o HLA-E (224, 257), en la EC no sólo se ha observado presencia de MICA sino también un aumento de la expresión en el epitelio intestinal (256). Estas diferencias podrían justificar, como se comentará más adelante, por qué hay numerosos estudios de asociación de *MICA* con la CU y muchas menos evidencias de asociación con la EC.

Desde que MICA se describió, son múltiples los estudios que van encaminados a desvelar qué papel puede desempeñar en la etiopatogénesis de enfermedades autoinmunes. Hampe y colaboradores (2) encontraron un locus de susceptibilidad para la EII en la región *HLA*, cerca del gen que codifica para el TNF- α ; sin embargo no encontraron asociación entre este gen y ninguna de las dos formas de la EII. Ya que el gen *MICA* se sitúa en esta región, es un buen candidato como gen de susceptibilidad genética frente a la EII. Los resultados obtenidos en los estudios de asociación de *MICA* con EII son cuanto menos contradictorios ya que no siempre son reproducibles entre grupos. Seki *et al* (206) describieron

asociación de *MICA*A6* con la CU en población japonesa; sin embargo en estudios posteriores el mismo grupo confirmó que la asociación se debía en realidad a *HLA-B*52*, alelo con el cual *MICA*A6* se encuentra en LD (258). Por otra parte, algunos investigadores han descrito asociación del alelo *MICA*A5.1* con la CU en distintas poblaciones (199, 222, 223, 257). Ni la asociación de *MICA*A5.1* ni de *MICA*A6* se lograron replicar en población alemana (259), británica (255) o española (198, 225, 260). Además de estudios de asociación con susceptibilidad a padecer colitis ulcerosa, también se han realizado estudios de asociación con determinadas características clínicas, como la localización, la edad de comienzo de la sintomatología o la presencia de manifestaciones extradigestivas. En este caso también existen resultados controvertidos. Sugimura *et al* (258), describen asociación de *MICA*A6* con comienzo temprano de la enfermedad y con colitis extensa (pancolitis). Por otra parte, el grupo de Kamoun (261) asocia este alelo en población tunecina con la presencia de MED; este mismo grupo asocia *MICA*A5* con inicio tardío de la enfermedad. Ding *et al* (222) relacionan el alelo *MICA*A5.1* con la presencia de MED y mientras que el alelo *MICA*A4* es menos frecuente en pacientes con pancolitis. En la población española estudiada por Fdez-Morera (260), no hay diferencias en cuanto a asociación de *MICA-STR* con la CU pero sí al analizar la localización de la enfermedad: al contrario de lo observado en otras poblaciones, el alelo *MICA*A5.1* es protector frente a una localización extensa de la colitis mientras que *MICA*A5* se asocia con pancolitis. En población inglesa, Orchard *et al* (223), encontraron la asociación del alelo *MICA*A5.1* con la aparición de artritis periférica de tipo 2.

La relación entre *MICA-STR* y la EC ha sido mucho menos estudiada y pocos son los trabajos en los que se ha encontrado asociación. Kamoun y su equipo (261) describieron el papel protector de *MICA*A5.1* frente a la enfermedad mientras que el alelo *MICA*A6* se asoció con una mayor actividad de la EC en esa población. Sí que se ha observado aumento de la expresión de *MICA* en CEI de pacientes con enfermedad de Crohn y aumento de LT *helper* CD4+ NKG2D+ en la lámina propia (262).

1.4.3 RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES

La presencia de una concentración tan elevada de bacterias en el intestino humano requiere una estrecha regulación de la respuesta por parte del GALT. La mayoría de las bacterias luminales, lejos de ser nocivas, son indispensables para el correcto desarrollo del organismo. Es por tanto necesario reconocer esta flora como comensal y distinguirla de las especies patógenas, frente a las cuales habrá que iniciar una respuesta inmunitaria para combatirlas. Los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) son receptores transmembrana o citosólicos incluidos dentro de los llamados receptores de la inmunidad innata, ya que no son antígeno-específicos, aunque su expresión no está restringida a las células de la inmunidad innata sino que también los expresan células de la inmunidad adquirida y células no inmunitarias. Los PRRs reconocen PAMPs, o, como se denominaron posteriormente, patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs), presentes en bacterias, virus y hongos (183). Dentro de los PRRs se pueden distinguir al menos tres grandes familias: receptores tipo Toll (TLRs), receptores tipo NOD

(NLRs) y receptores tipo RIG (RLRs) (263). Los TLRs y NOD2, receptores en los que se va a centrar este trabajo, se expresan ampliamente en la mucosa digestiva y van a intervenir activamente en la defensa frente a microorganismos a cuatro niveles (264):

- Reconocimiento de patrones moleculares asociados a microbios
- Expresión en la interfaz entre el lumen (ambiente) y la mucosa intestinal
- Nexo de unión entre la inmunidad innata y la adquirida mediante la inducción de la producción de citoquinas pro y antiinflamatorias y quimioquinas
- Inducción de vías antimicrobianas

Por tanto, el papel de estos receptores es clave en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, ya que la inducción de una actividad antimicrobiana contribuye a la protección de la barrera epitelial al impedir la invasión por parte de las bacterias del lumen, además de contribuir a la defensa frente a microorganismos patógenos y a la tolerancia frente a la flora comensal (Figura 11).

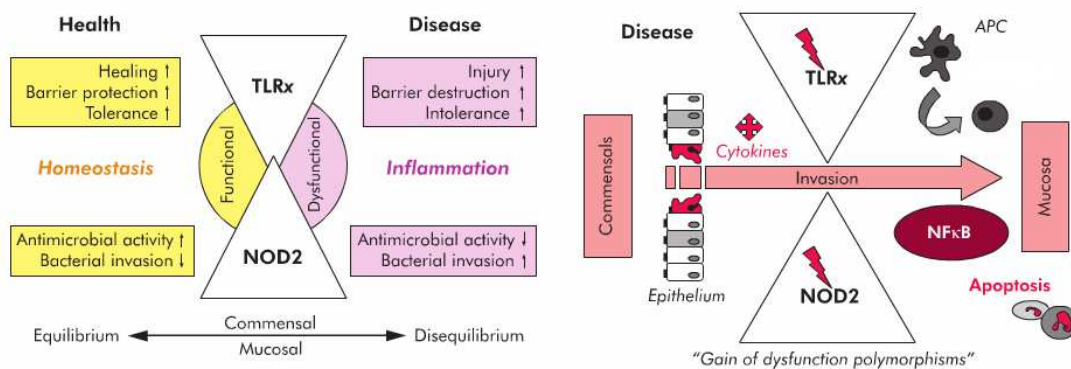


Figura 11. Esquema que representa el papel de los TLRs y NOD2 en el intestino. Figura modificada a partir de Cario *et al*, 2005 (264)

1.4.3.1 *NOD2*

Las proteínas NOD (del inglés *Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein*) pertenecen a los NLR (*Nod like receptors*), un tipo de PRR intracelular. Los principales representantes de las proteínas NOD son NOD1 y NOD2, que reconocen productos derivados de la pared celular bacteriana, y que inducen la transcripción génica a través de la activación de NFκB o de la vía de las MAPK: el ligando de NOD1 es el ácido meso-diaminopimélico presente fundamentalmente en bacterias Gram (-) mientras que NOD2 reconoce MDP, un producto de degradación del peptidoglicano (PG) (91). Además, el ácido N-glicolil diaminopimélico presente en micobacterias y el ARN de cadena sencilla vírico (ARNss) pueden ser también ligandos de NOD2 (150).

NOD2 está formado por dos dominios amino-terminales en tándem de reclutamiento de caspasas (CARD), un dominio central NBD de unión de

nucleótidos (también llamado NOD) y una serie de repeticiones ricas en leucina (LRR) en el extremo carboxi-terminal de la proteína (92). En la Figura 12, se muestra un esquema de la estructura de NOD2 junto con la localización de las variantes más comunes. Hasta el 93% de las variantes de NOD2 descritas hasta ahora se sitúan en la región rica en leucina (LRR) (86).

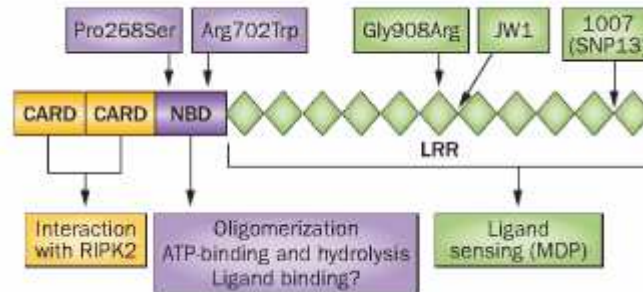


Figura 12. Esquema de NOD2 y situación de las mutaciones más comunes en enfermedad de Crohn. 1007insC y Gly908Arg se sitúan en la región rica en leucina (LRR), que es la encargada del reconocimiento del ligando. Arg702Trp y Pro258Ser se sitúan en la región de oligomerización y unión de ATP. LRR= *Leucine-rich repeat*, NBD=*Nucleotide Binding Domain*; CARD= *Caspase Recruitment Domain*; MDP=Muramil dipéptido. Figura modificada a partir de Limbergen *et al*, 2014 (90)

Desde su descubrimiento, NOD2 se ha considerado como receptor de PG, o más tarde de MDP, y se ha dado por hecho que existe un reconocimiento directo y una unión entre ligando y receptor, concretamente entre MDP y el dominio con LRR. Sin embargo, existe un gran desconocimiento sobre si efectivamente NOD2 es capaz de unir directamente MDP sin necesidad de ninguna proteína adaptadora y sobre cómo se produce exactamente esta unión. En un trabajo reciente, Mo y colaboradores (265) afirman que el dominio de unión de nucleótidos NBD desempeña un papel fundamental en el reconocimiento y unión de MDP, incluso más que la región LRR; la región LRR, sin embargo, también es importante en la unión de MDP ya que se demostró la unión del ligando por proteínas NOD1 recombinantes con la región LRR de NOD2. La demostrada disfunción en la señalización a través de NOD2 en proteínas con mutación en LRR se debe a una menor respuesta al MDP. Además, la unión de ATP es imprescindible para la señalización a través de NOD2 y su hidrólisis marca la inactivación de la proteína (Figura 13).

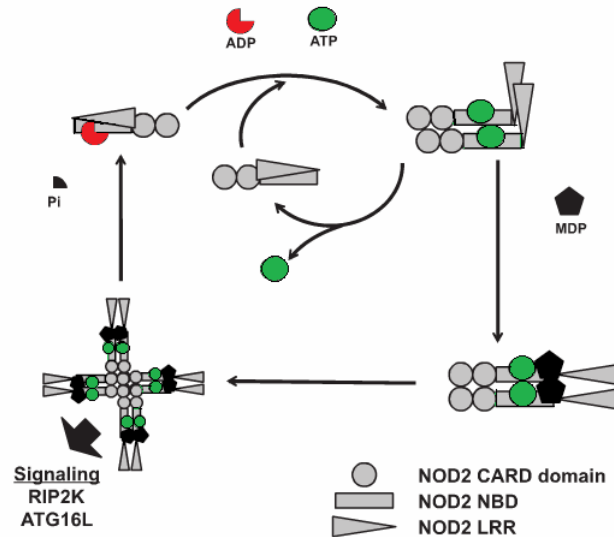


Figura 13. Modelo hipotético de activación de la señalización a través de NOD2. Según este modelo NOD2 se encuentra en estado inactivo cuando no une ATP o una ADP (3/4 círculo rojo). Tras la unión de ATP (círculo verde) se produce un cambio conformacional que induce la homooligomerización y permite la unión de MDP (pentágono); esto promueve la oligomerización y la señalización a través de NOD2. Cuando se hidroliza el ATP a ADP se vuelve al estado basal. CARD= *Caspase Recruitment Domain*; NBD= *Nucleotide Binding Domain*; LRR= *Leucine Rich Repeat*; MDP= Muramil dipéptido. Figura modificada a partir de Mo *et al*, 2012 (265)

NOD2 es un receptor intracelular, por lo que el PG debe penetrar en la célula para poder ser reconocido. La entrada de PG no implica necesariamente invasión por parte de bacterias intracelulares patógenas, sino que puede ser introducido en la célula por endocitosis, a través de determinados transportadores e incluso “inyectado” por determinadas bacterias patógenas como *Helicobacter pilory* (266). El PG puede ser liberado por bacterias al medio durante la división celular, como se demuestra en el sobrenadante de medios de cultivo de bacterias Gram (+) y Gram (-) (267). Por lo tanto, incluso en ausencia de enfermedad y de infección, existen unos niveles basales de PG liberado por la flora comensal en el lumen intestinal y una activación tónica de NOD2 que contribuyen a la homeostasis intestinal (91).

La expresión de *NOD1* está muy extendida por diversos tipos celulares, sin embargo la de *NOD2* está restringida al compartimento hematopoyético, tanto de origen linfóide como mielóide. Existe una excepción a nivel de mucosa intestinal, en la que *NOD2* no sólo se expresa en células del sistema inmunitario innato, como monocitos o células dendríticas, o células de la inmunidad adquirida, como células T, sino también en células epiteliales intestinales (86, 91): la expresión de *NOD2* en CEI es baja o ausente pero aumenta considerablemente en respuesta a la inflamación o a citoquinas inflamatorias (90), siendo la expresión más alta de *NOD2* dentro del epitelio intestinal en las células de Paneth (268). En las células del sistema inmunitario la expresión de *NOD2* también se puede regular por varias señales, como se ha demostrado en macrófagos tras la estimulación con LPS, IFN tipo I y TNF.

1.4.3.1.1 Señalización a partir de NOD2 y su relación con la EII

Tras la unión del ligando se induce un cambio conformacional en la proteína que favorece la oligomerización mediada por el dominio NBD. Esta oligomerización promueve el reclutamiento de la proteína adaptadora RIP2 a través de una unión homotípica CARD|CARD; la intervención de RIP2 es una de las diferencias principales entre esta vía de señalización y la de los TLRs. RIP2 recluta y activa al complejo TAK1-TAB2-TAB3, que a su vez activa al complejo IKK. IKK es el encargado de fosforilar y degradar I κ B, inhibidor de NF κ B, y como resultado se activa NF κ B. Además de la vía de NF κ B, NOD2 puede activar la vía de las MAPK, a través de ERK, ERK2, JUN, JNK y p38. A través de estas dos vías, se activa la transcripción de genes de mediadores inflamatorios, como *TNFA*, *IL-6*, *IL-8*, *CCL2*, *CXCL8*, *CXCL2* o péptidos antimicrobianos como las defensinas. Gracias a la liberación de estos factores se reclutan y activan células del sistema inmunitario innato, como neutrófilos y monocitos, que van a contribuir a la eliminación bacteriana (269). En macrófagos homocigotos para variantes hipofuncionales de *NOD2* se ha observado también la disminución de la expresión de *IL-10*, debido a la inhibición de la ribonucleoproteína hnRNP-A1 y la supresión directa de la transcripción del gen *IL-10*; esta citoquina es clave para el mantenimiento de la tolerancia frente a la microbiota y de la homeostasis intestinal ya que se trata de una citoquina inmunosupresora y antiinflamatoria (270). En respuesta al ARNss viral se incrementa la producción de IFN- β gracias a la activación por parte de NOD2 de la vía de IRF3 a través de MAVS. (150). Además, recientemente se ha descrito la activación de la señalización a través de Notch y la regulación epigenética de promotores de genes de citoquinas como resultado de la señalización a través de NOD2 (91).

La localización de NOD2 dentro de la célula es variable: puede ser reclutado por proteínas adaptadoras a la membrana plasmática para detectar la invasión bacteriana en el mismo punto de entrada, lo que va a estar relacionado con la capacidad de NOD2 de activar NF κ B. También se sitúa inmerso en el citosol donde puede responder al PG introducido por vesículas en el interior celular (91). La degradación de NOD2 está fuertemente regulada para asegurar una respuesta controlada; así, la unión de MDP desencadena la degradación de NOD2 y de RIP2 a través del proteasoma (271). Se han descrito algunos reguladores de la señalización de NOD2, como por ejemplo la inhibición a través de interacciones con RAC1 y ARHGEF7, que son reguladores del citoesqueleto (91). En relación también con el citoesqueleto, se ha demostrado la interacción de NOD2 con el filamento intermedio vimentina a través de su región LRR en el interior celular. En variantes de NOD2 que no se unen correctamente a vimentina, se ha observado un fallo en la localización cercana a la membrana plasmática y un fallo en la activación de NF κ B (272).

NOD2 está continuamente estimulado por los niveles basales de PG en la mucosa intestinal. Además, la señalización a través de NOD2 sinergiza con la señalización a través de los TLRs aumentando la respuesta de estos receptores frente a su ligando, como se comentará con detalle más adelante (269). La acción de citoquinas del medio junto con la activación directa de NOD2 en el interior de las células dendríticas, estimula la respuesta Th2, que podría considerarse una

respuesta homeostática en el intestino. Cuando hay algún defecto funcional en NOD2 se altera esta polarización de la respuesta, y se favorece una respuesta Th1 desencadenada por los TLRs en respuesta a la microbiota intestinal. Por otro lado, en células dendríticas preestimuladas con MDP, se observó *in vitro* una disminución en la inducción de la producción de citoquinas proinflamatorias tras la estimulación de TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 y TLR9; esto sugiere que NOD2 también ejerce un efecto “tolerogénico” al inhibir en parte la señalización a través de los TLRs (273).

NOD2 también regula la producción de IL-23 a través de un microARN (miR-29) que controla su expresión, y, por lo tanto, también interviene en la diferenciación hacia Th17 (91, 126). Esta activación tónica contribuye a la eliminación temprana por parte del sistema inmunitario de bacterias patógenas y a la tolerancia frente a la flora comensal. Cuando falla la señalización a través de NOD2, como por ejemplo en presencia de mutaciones que impliquen una pérdida de función, falla la detección de bacterias no patógenas y no invasivas y se altera la homeostasis intestinal (86, 269). Tan estrecha es la relación entre NOD2 y la flora comensal que se han descrito diferencias en la composición de la misma al comparar pacientes con mutación y pacientes sin mutación en *NOD2* (274).

Por otro lado, NOD2 va a ser importante en la defensa frente a microorganismos patógenos, como se ha observado gracias al aumento de susceptibilidad a infección por *Listeria monocytogenes* o AIEC en ratones deficientes en *NOD2* (91). Como ya se ha mencionado, la unión de NOD2 a MDP induce, entre otras cosas, la producción de péptidos antimicrobianos. Algunos microorganismos han desarrollado mecanismos para evitar el reconocimiento por parte de NOD2, en su mayoría relacionados con la modificación del PG de su pared (275). Está demostrado que la activación de NOD2 induce la expresión de péptidos antimicrobianos en las células de Paneth (126), y en la EC se ha observado disminución en la producción de defensinas por parte de estas células. Sin embargo no queda claro si esto se debe a la mutación en *NOD2* o está relacionado con la inflamación y el daño producido en la mucosa intestinal, ya que también se observa en pacientes con EC que no presentan esta mutación (276).

NOD2 es clave en el proceso de autofagia, ya que interacciona directamente con la proteína ATG16L1 y la recluta hacia el sitio de entrada de las bacterias en la membrana plasmática. Esta interacción es independiente de NFκB y RIP2. Variantes de *NOD2* con defecto en la localización cerca de la membrana se unen a ATG16L1 y lo retienen en el citosol, impidiendo su acercamiento a la membrana plasmática y, por tanto, alterando el proceso de autofagia (149). En pacientes con EC y mutación en *NOD2* el proceso de autofagia y por tanto la eliminación de bacterias intracelulares está alterado (132).

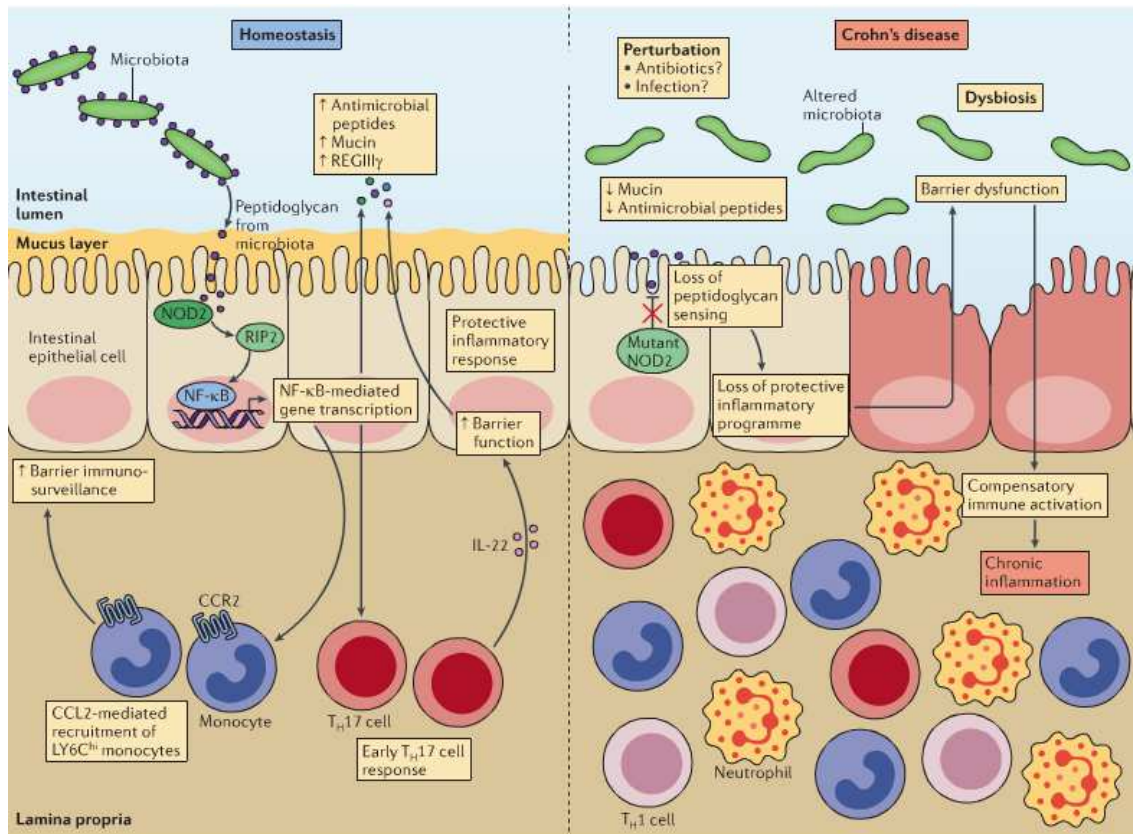


Figura 14. Papel de NOD2 en la enfermedad de Crohn. La detección de muramil dipéptido (MDP) liberado por la microbiota por parte de NOD2 es clave en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. La señalización a través de este receptor estimula la producción de péptidos antimicrobianos y moco, que mantiene a la microbiota físicamente separada de las células epiteliales. (imagen de la izquierda). NOD2 estimula la producción de IL-23 por parte de las células dendríticas activadas, lo que favorece una respuesta Th17 temprana. Las células Th17 contribuyen a la función de barrera gracias a la liberación de citoquinas (como la IL-22), productos antimicrobianos (REGIIIγ) y quimioquinas (como la CCL2, que atrae a macrófagos). En la mucosa de pacientes con enfermedad de Crohn portadores de mutación en *NOD2* (imagen de la derecha), la función de barrera del epitelio y la respuesta inmunitaria protectora está alterada, por lo que ante cualquier perturbación se desencadena una respuesta inflamatoria crónica compensatoria. Imagen modificada a partir de Philpott *et al*, 2014 (91)

En resumen, NOD2 desempeña un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis intestinal a través de la fortificación de la barrera epitelial intestinal, la regulación de la microbiota y de la inmunidad innata y adaptativa en el intestino (Figura 14). En pacientes con EC, la mutación de *NOD2* contribuye a la ruptura de la homeostasis ya que se produce una desregulación de la respuesta inmunitaria frente a la microbiota a nivel de la inmunidad adaptativa (eje IL-23/Th17, desequilibrio hacia Th1), innata (fallo en el reclutamiento de neutrófilos y monocitos) y de la propia composición bacteriana al estar alterados el proceso de autofagia y la liberación de péptidos antimicrobianos. Por lo tanto, la mutación en *NOD2* no es la causa de la enfermedad pero al verse alterada la homeostasis intestinal favorece una respuesta inflamatoria compensatoria inadecuada frente a la disbiosis presente en el lumen de pacientes con EC.

1.4.3.1.2 Asociación genética de *NOD2* con la EII

Como se ha comentado previamente, el gen *NOD2* (también conocido como *CARD15*) fue el primer gen para el que se describió asociación con la EII, concretamente con la enfermedad de Crohn (92, 93). Una persona con *NOD2* mutado en heterocigosis tiene entre 2-4 veces más riesgo de padecer EC, alcanzando estas cifras hasta 40 veces más si la mutación se encuentra en homocigosis (3). Aunque se hayan descrito muchos más genes asociados con la EC, sólo *NOD2* es capaz de explicar hasta el 20% de la predisposición genética (277). Existen algunos estudios que han asociado la mutación en *NOD2* con la CU (278-280) o con alguna característica fenotípica (como la pouchitis crónica) (281) pero la mayoría de trabajos no han descrito esta relación. La mutación en *NOD2* también se ha asociado con síndrome Blau, pero en este caso se trata de una variante de ganancia de función (282).

Son tres las variantes principales del gen *NOD2* que se han asociado con la EC (*SNP8*, *SNP12* y *SNP13*). En la variante *SNP8* se produce un cambio de una arginina por un triptófano en la posición 702 (R702W) mientras que en la *SNP12* el cambio es de una glicina por una arginina en la posición 908 de la proteína (G908R). La variante *SNP13* se produce por la inserción de una citosina dando lugar al cambio de una leucina por una prolina en la posición 1007 de la proteína (1007insC) y generando un codón *stop* prematuro. Además de *SNP8*, *SNP12* y *SNP13*, que suponen el 80% del total, se han descrito otras variantes menos comunes en *NOD2* que también están asociadas de forma independiente con la EC y otras tantas en LD con las anteriores (283). En la variante J1W, por ejemplo, hay un cambio de aminoácido en la secuencia palindrómica de la región de corte-empalme (*splicing*) en el intrón 8 y en la variante P258S se produce el cambio de una prolina por una serina en la posición 258 (90, 104).

La asociación de *NOD2*, principalmente de las tres variantes comunes, con la EC se ha descrito en poblaciones muy diferentes (99, 211, 284-297). Esto contrasta con lo encontrado en algunas cohortes de origen asiático, en las que los alelos mutantes de *NOD2* son prácticamente indetectables tanto en pacientes como en población sana (298-300) o en cohortes del norte de África (301). En algunas poblaciones de origen asiático no se han asociado las tres variantes principales pero sí que se ha encontrado relación de EC con JW1 o P268S (302, 303). La presencia de mutación en *NOD2* no sólo se ha asociado con susceptibilidad de padecer EC sino también con su fenotipo. Existen resultados diferentes dependiendo de la población a estudio, pero la mayoría de trabajos coinciden en que la mutación en *NOD2* se asocia con una enfermedad de comienzo temprano, complicada, que evoluciona con un patrón estenosante o fistulizante, con mayor necesidad de cirugía y localización ileal de las lesiones (96, 211, 304-306). La relación de *NOD2* con el fenotipo también se ha observado en población asiática, sobre todo en relación con la EC de comienzo temprano, estenosante e ileal (218). En relación al fenotipo también se ha observado un efecto de dosis mutacional y la presencia de dos variantes mutadas del gen *NOD2* tiene un 98% de especificidad de sufrir una EC complicada (96).

1.4.3.2 RECEPTORES TIPO TOLL (TLRs)

Los receptores tipo Toll (del inglés *Toll-like receptors*, TLRs) son probablemente el grupo de PRRs mejor caracterizado (307). Se han descrito 13 tipos de TLRs en mamíferos, de los que tan sólo 10 son funcionales en humanos (TLR1-TLR10) (308). Los genes que codifican para los TLRs en humanos se sitúan en diferentes cromosomas: *TLR1*, *6* y *10* están codificados en el brazo corto del cromosoma 4 (4p14), *TLR2* y *TLR3* en el brazo largo del cromosoma 4 (regiones 4q32 y 4q35, respectivamente), *TLR4* en el cromosoma 9 (9q32-q33), *TLR5* en el cromosoma 1 (1q41-42), *TLR7* y *8* en el brazo corto del cromosoma X (Xp22.3) y *TLR9* en el cromosoma 3 (3p21.3) (309). La expresión de los TLRs depende del tipo celular y se pueden subdividir en extracelulares (*TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR6* y *TLR10*) e intracelulares (*TLR3*, *TLR7*, *TLR8* y *TLR9*) dependiendo de si el producto que codifican se expresa en la membrana plasmática o en compartimentos intracelulares (165). En el caso del TLR4 se ha observado expresión tanto en la membrana plasmática como en la membrana de compartimentos intracelulares como los fagosomas o el aparato de Golgi (151, 310) Dependiendo de la homología de su secuencia de aminoácidos los TLRs pueden agruparse en 5 familias: familia del *TLR2* (incluye *TLR1*, *TLR2*, *TLR6* y *TLR10*), *TLR9* (incluye *TLR7*, *TLR8* y *TLR9*), *TLR3*, *TLR4* y *TLR5* (308, 311). Por ejemplo, la homología en el dominio extracelular de TLR1 y TLR6 es de 69,3%, alcanzando ésta hasta el 90% en el dominio TIR (308).

Los TLRs son glicoproteínas de tipo I que se caracterizan por un endodominio tipo TIR (*Toll-IL1 receptor*) y un ectodominio con motivos con LRR (Figura 15) (312-314). El dominio citoplasmático de los TLRs y del receptor de la IL-1 (IL-1R) es muy similar así como la cascada que se inicia tras la activación del receptor, sin embargo el dominio extracelular es bastante diferente ya que el del IL-1R tiene tres dominios del tipo Ig. El dominio TIR está formado por unos 200 aminoácidos en el tallo citoplasmático de la proteína en el que se pueden diferenciar tres cajas muy conservadas que van a ser cruciales para la señalización a través del receptor. Entre el 20 y el 30% de los aminoácidos en el dominio TIR están conservados de unas proteínas a otras (315).

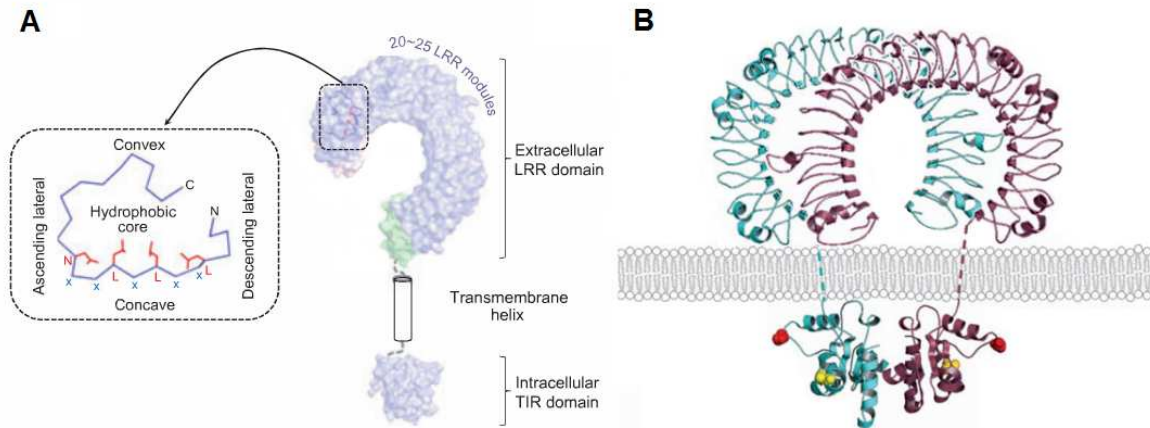


Figura 15. Representación esquemática de la estructura de los receptores tipo Toll (TLRs). A) En la figura se muestra un esquema de la estructura de TLR4. En el dominio extracelular hay una serie de dominios con repeticiones ricas en leucina (ampliadas en el cuadro) que posibilitan la unión del ligando. El dominio intracelular contiene un dominio TIR al que se unirán las moléculas adaptadoras para la internalización de la señal. LRR: *Leucine Rich Repeat* Imagen modificada a partir de Song *et al*, 2012 (314). B) En la figura se muestran dos TLRs formando un heterodímero. Imagen modificada a partir de Beutler *et al*, 2006 (319)

El dominio extracelular de los TLRs está formado por 19-25 copias en tándem del motivo LRR. Cada repetición consiste en 24-29 aminoácidos y contiene la secuencia rica en leucina XLXXLXX y otra secuencia conservada X#XX#XFXXLX, donde X representa a cualquier aminoácido y # a cualquier aminoácido hidrofóbico. Los motivos LRR dan forma de herradura a la región extracelular de los TLRs, cuya superficie cóncava se piensa que está implicada directamente en el reconocimiento del ligando. A pesar de que los motivos LRR estén altamente conservados de unos TLRs a otros, existen diferencias considerables en cuanto al ligando que reconoce cada uno de ellos (315). En la Tabla 3 se puede observar el conjunto de ligandos que reconoce cada TLR (310). Además de su papel como sensores de la presencia de microorganismos, algunos TLRs pueden ser activados por factores endógenos no microbianos producidos por las células dañadas o estresadas (309), los llamados DAMPs (del inglés, *Danger-associated molecular patterns*), especialmente tras un daño masivo del tejido como el que se produce tras la isquemia (316); por ejemplo, HSP70 y HSPgp96 (ambas proteínas de shock térmico) son ligandos tanto de TLR2 como de TLR4, TLR2 puede unir también ácidos grasos saturados y TLR4 fibrinógeno o ácido hialurónico (procedentes de la degradación de la matriz extracelular) (307, 309). El TLR11, que une profilina en ratón y reconoce bacterias uropatógenas, no es funcional en humanos debido a un codón *stop* prematuro (317).

Tabla 3. Ligandos de los Toll-like Receptors

Receptor	Ligando	Origen del ligando
<i>TLR1</i>	Lipopéptidos triacilados Factores solubles	Bacterias y micobacterias <i>Neisseria meningitidis</i>
<i>TLR2</i>	Lipoproteínas y lipopéptidos Peptidoglicano Ácido lipoteicoico Lipoarabidomanano Modulinas solubles en fenol Glicoinositolfosfolípidos Glucolípidos Porinas Lipopolisacárido atípico Lipopolisacárido atípico Zymosan Hsp70	Varios patógenos Bacterias Gram(+) Micobacterias <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Tripanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria</i> <i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> Hongos Hospedador
<i>TLR3</i>	ARN de doble cadena	Virus
<i>TLR4</i>	Lipopolisacárido Taxol Proteína de fusión Proteína de envuelta Hsp60 Hsp70 Extradominio A de tipo III de la fibronectina Oligosacáridos del ácido hialurónico Fragmentos polisacáridos del heparán sulfato	Bacterias Gram(-) Plantas Virus Respiratorio Sincitial MMTV Hospedador
<i>TLR5</i>	Fribinógeno Flagelina	Bacterias
<i>TLR6</i>	Lipopéptidos diacilados Ácido lipoteicoico Zymosan	<i>Mycoplasma</i> Bacterias Gram(+) Hongos
<i>TLR7</i>	Imidazoquinolina Loxoribina Bropirimina ARN de cadena sencilla	Compuestos sintéticos Virus
<i>TLR8</i>	Imidazoquinolina ARN de cadena sencilla	Compuesto sintético Virus
<i>TLR9</i>	ADN con motivos CpG	Bacterias y virus
<i>TLR10</i>	ND	ND
<i>TLR11</i>	No conocido	Bacterias uropatógenicas

TLR=Toll-like receptor; MMTV=Mouse Mammary-Tumour Virus; ND=No determinado

1.4.3.2.1 Señalización a partir de TLRs

Tras la unión del ligando, el TLR dimeriza y se produce el cambio conformacional necesario para el reclutamiento y activación de las proteínas adaptadoras que van a intervenir en la señalización (315, 318) (Figura 16). TLR2 puede formar heterodímeros funcionales con TLR1 y TLR6: en modelos animales

se demostró que la asociación con TLR6 es clave para la unión de péptidos diacilados de origen bacteriano mientras que la formación del heterodímero TLR1/TLR2 interviene en el reconocimiento de lipopéptidos triacilados y algunos factores solubles, pudiendo ser la deficiencia en TLR1 en parte compensada por TLR6 (308, 319). Esto explica en parte la gran variedad de ligandos que es capaz de reconocer TLR2 (311).

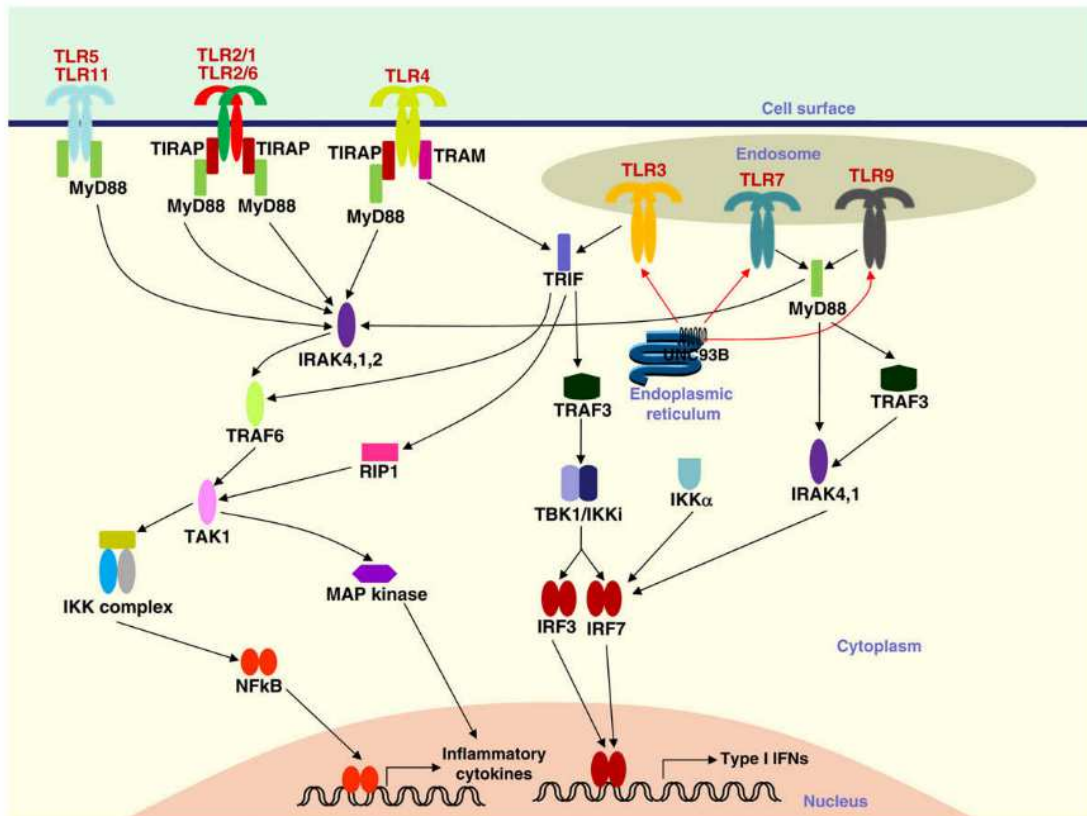


Figura 16. Representación esquemática de la señalización a través de los Toll-like Receptors (TLRs). La transducción de la señal de los TLRs requiere de proteínas adaptadoras, siendo la principal MyD88. TLR3 utiliza fundamentalmente vías independientes de MyD88 mientras que TLR4 y TLR2 pueden utilizar MyD88 u otras proteínas adaptadoras como TRAM, TRIF o TIRAP. Como resultado de la señalización a través de los TLRs se activan factores de transcripción, por ejemplo NFκB o IRF, que regulan la expresión génica. Figura modificada a partir de Kumar *et al*, 2009 (318)

Para la unión del ligando puede ser necesaria la intervención de proteínas accesorias, como en el caso del TLR4 que para la unión del LPS se necesita de la presencia de CD14 o MD2, que interacciona con la parte externa del TLR4 y va a potenciar la respuesta ante el LPS (308). CD14, y también CD36, pueden intervenir en la señalización del TLR2, sin embargo su presencia no es indispensable para que se internalice la señal (320).

La primera proteína adaptadora reclutada es MyD88, formada por un dominio TIR y un dominio de muerte (DD, del inglés *Death Domain*) separados por una corta secuencia. MyD88 se une al TLR en forma de homodímero a través de su dominio TIR y recluta al sitio de inicio de la señal a proteínas de la familia de las

IRAKs mediante una unión homotípica DD|DD; concretamente IRAK-1 e IRAK-4 son las que intervienen en la señalización de los TLRs gracias a su actividad Ser/Thr quinasa. IRAK-4 fosforila a IRAK-1, que posteriormente se autofosforila y recluta a TRAF-6 a la membrana plasmática. IRAK-1 y TRAF-6 se escinden e interaccionan con el complejo preformado TAK1-TAB1-TAB2; TAK-1 y TAB-2 son fosforiladas y el complejo se separa y se dirige al citosol junto con TRAF-6 y TAB-1. Como resultado de la activación de este complejo, se degrada el inhibidor de NFκB, permitiendo que este factor de transcripción penetre en el núcleo. TAK-1 también produce activación de la vía de las MAPK (315).

MyD88 es esencial para la producción de citoquinas inflamatorias a partir de todos los TLRs. Sin embargo, se han descrito otras proteínas adaptadoras necesarias para la transducción de la señal a través de los TLRs y que van a intervenir, entre otros procesos, en la activación de IRF3 y la inducción de IFN tipo I. Las proteínas adaptadoras más importantes después de MyD88 son TIRAP, TRIF y TRAM (Figura 16). A diferencia del resto de TLRs, la señalización a partir de TLR3 es mayoritariamente independiente de MyD88 (307). Por su parte, principalmente TLR4, pero también TLR2, pueden utilizar vías de transducción de la señal en las que intervenga o no MyD88. Estas vías por regla general no son del todo redundantes sino que se diferencian en el ligando ante el que se activan y el patrón de transcripción de genes que regulan (315, 320). La transducción de la señal a través de los TLRs internos (TLR7, TLR8 y TLR9) puede conducir a la liberación de productos inhibidores de la respuesta inmunológica, como la IL-10, además de citoquinas proinflamatorias (321).

En la vía de señalización a través de NOD2, al igual que en la de los TLRs, se activa NFκB mediante la degradación de su inhibidor. La activación de ambos tipos de receptores en respuesta a un patógeno intracelular no es redundante aunque sí que se ha demostrado que ambas vías están relacionadas. Por un lado, existe cierto sinergismo entre la vía de señalización de TLRs y la de NOD2 (322): mientras que los TLRs principalmente inducen una respuesta del tipo Th1, tras la activación de NOD2 se favorece una respuesta inmunitaria adaptativa del tipo Th2. Sin embargo, cuando la señalización a través de NOD2 y TLRs se produce simultáneamente, actúan de forma sinérgica para favorecer la respuesta Th1 (323). Por otro lado, NOD2 también actúa como inhibidor o regulador de la respuesta de los TLRs en respuesta a PG, ya que, por ejemplo, se ha observado una inhibición de la respuesta por parte del TLR4 frente al LPS (324, 325).

1.4.3.2.2 TLRs en la mucosa intestinal

Los TLRs son esenciales en la primera línea de defensa, regulando la activación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa (151, 316), así como el reclutamiento de leucocitos y la internalización de microorganismos por células fagocitarias profesionales. La importancia de los TLRs en la inmunidad de la mucosa intestinal reside en la gran concentración de bacterias, comensales y patógenas, presentes en el lumen (310). Las funciones de los TLRs en la mucosa intestinal son varias y todas ellas contribuyen al mantenimiento de la homeostasis tisular y al equilibrio en el intestino.

En primer lugar, participan en el equilibrio entre flora comensal y microorganismos patógenos, contribuyendo a la eliminación de estos últimos y asegurando el establecimiento de la tolerancia frente a la microbiota comensal no patógena. Esto se lleva a cabo, entre otros mecanismos, gracias a la liberación de α -defensinas por las células de Paneth o la inducción del cambio de isotipo hacia IgA₂ protectora (151). Por otro lado, los TLRs también intervienen en el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial, ya sea por la regulación de los complejos de uniones estrechas entre células o promoviendo la proliferación y regeneración tras el daño tisular gracias a la liberación de factores de crecimiento y regulando la apoptosis (316, 326). También van a contribuir a la regulación del balance entre respuesta inmunitaria reguladora y efectora, por ejemplo en cuanto a respuesta de células Treg o T efectoras (151). Una desregulación de la señalización de los TLRs produce un incremento incontrolado de la inflamación, lo que contribuye al desarrollo y progresión de enfermedades crónicas, como la aterosclerosis, artritis reumatoide y cáncer (307).

Diferentes tipos celulares, del sistema inmunitario o no, presentes en el intestino expresan TLRs de forma constitutiva o inducible: células que forman el epitelio (enterocitos, células de Paneth, células caliciformes, células enteroendocrinas), miofibroblastos subepiteliales y células inmunitarias profesionales de la lámina propia (monocitos/macrófagos, células dendríticas, células T CD4+, células B) (264, 307). Se ha detectado la presencia de casi todos los TLRs en la mucosa intestinal, al menos a nivel de transcrito primario, aunque los niveles de expresión van a variar dependiendo del momento y del tipo celular (326). Los niveles de TLR2 y TLR4 en el epitelio intestinal son muy bajos (327); sin embargo TLR3, TLR5 y TLR9 se expresan de forma constitutiva (151, 165, 263, 328). En el epitelio intestinal también se observa una polarización de la expresión de TLRs (326). Por ejemplo, la expresión de TLR5 es mayor en CEI del colon y fundamentalmente basolateral, limitando así el contacto con su principal ligando, la flagelina (263). Por regla general, en condiciones normales los niveles de detección de TLRs en la mucosa intestinal son bajos, gracias a mecanismos reguladores que pueden intervenir a nivel de transcripción génica, a nivel de localización subcelular mediante compartimentalización o por la presencia de reguladores negativos endógenos y exógenos (307, 329). Estos mecanismos reguladores, como la baja expresión de TLR4 o la localización basolateral en lugar de apical del TLR5, contribuyen a una minimización de la respuesta frente al ambiente y a la tolerancia frente a la flora comensal en el intestino (151, 330). Por otro lado, el estado de activación basal de los TLRs por el contacto continuo con sus ligandos procedentes de bacterias del lumen, también contribuye a la homeostasis intestinal, debido en parte a la inducción de factores protectores (como Hsp, IL-6, TNF o KC-1) que intervienen en la citoprotección, reparación del tejido y angiogénesis (331). La presencia de una amenaza en el intestino activa la señal de alarma, se apagan los mecanismos reguladores negativos y aumenta la respuesta de los TLRs para asegurar una respuesta inmunitaria correcta y la eliminación temprana del daño. Por tanto, la expresión de TLRs va a depender de las necesidades de cada tipo celular en un momento y emplazamiento determinado (151).

A pesar de que los niveles de TLR5 o TLR3 permanecen constantes en la mucosa inflamada de EII si se compara con población control, la expresión y activación de otros TLRs, principalmente TLR2 y TLR4, sí que se ve alterada (332). Se ha observado un aumento considerable de la expresión de TLR4 en CEI tanto en pacientes con EC como con CU, sobre todo en las criptas del epitelio, en parte debido a los niveles elevados de TNF- α e IFN- γ , dos citoquinas importantes para la patogénesis de la EII (151, 333). También se ha observado un incremento de la expresión de TLR4 en células dendríticas mieloides y de TLR4 y TLR2 en monocitos dentro de la lámina propia de enfermos con EII (89, 165, 334). El incremento de expresión de TLRs y su activación excesiva contribuyen a la inflamación crónica de la mucosa: la señalización a partir del TLR4 está considerablemente aumentada en pacientes con EC y CU activa (151). Además, la presencia de variantes hipomórficas de *NOD2* asociadas a la EC contribuye a este aumento de señalización a través de TLRs, ya que existe una alteración de la inhibición de la respuesta Th1 secundaria a la activación de los TLRs, sobre todo tras estimulación crónica; en estos pacientes, una desregulación de la señalización a través de los TLRs contribuye al aumento de la respuesta Th1, y las variantes de *NOD2* más comúnmente asociadas a la EC inducen una respuesta defectuosa frente a LPS en el intestino (324). Esta desregulación de la señalización a través de TLR4 podría explicar en parte la respuesta exacerbada frente a flora comensal no patógena. En el caso de TLR3, Cario y Podolsky encontraron una disminución de la expresión en pacientes con EC activa cuando los compararon con EC inactiva, pero no obtuvieron ninguna diferencia en el caso de la CU (327); por el contrario, tras su experimento Østvik y su equipo concluyeron que la expresión de TLR3 aumenta en la mucosa pacientes con EII activa (335). Por otro lado, debido al aumento de permeabilidad que existe en el epitelio intestinal de pacientes con EII, la señalización a través del TLR5 no se encuentra inhibida y la unión de su ligando flagelina contribuye a la inflamación intestinal (89). También se ha observado un aumento de la expresión, a nivel de transcrito primario y a nivel de proteína, de TLR8 en la mucosa colónica de pacientes con EC y CU activas (336).

En resumen, el aumento de la respuesta a través de los TLRs en la mucosa de pacientes con EII podría deberse a un incremento de la expresión de estos receptores, al fallo en la regulación mediante *NOD2* en pacientes portadores de alguna variante hipofuncional, o ser secundario a la inflamación preexistente en la mucosa dañada. Por otro lado, una respuesta defectuosa a través de los TLRs también se ha relacionado con la EII, probablemente debido a un fallo en la regeneración del epitelio en respuesta al daño tisular, lo que facilita la entrada de las bacterias de la flora comensal dentro de la mucosa (332). En definitiva, la desregulación de la señalización de los TLRs en pacientes con EII, ya sea por exceso o por defecto, va a contribuir a la alteración de la composición de la microflora del lumen y la intolerancia frente a la microbiota comensal, al daño de la función de barrera de la mucosa y de la renovación de enterocitos y a la rotura del equilibrio entre repuesta inmunitaria efectora y reguladora; una señalización aberrante va a producir una respuesta desmesurada e incontrolada frente al ambiente, contribuyendo a la inflamación crónica intestinal que caracteriza a esta enfermedad (151).

1.4.3.2.3 Asociación genética de TLRs con la EII

Una prueba más de la implicación de los TLRs en la etiopatogenia de la EII son los estudios de asociación de variantes de estos genes con la enfermedad. A pesar de que en los GWASs realizados en población de pacientes con EII no se han identificado como regiones de susceptibilidad (123), múltiples estudios caso-control han asociado los TLRs con la enfermedad; sin embargo, en la mayoría de los casos los resultados son contradictorios y no se replican de una población a otra.

El gen *TLR4* probablemente sea uno de los más estudiados en relación con la EII. En modelos animales se demostró la asociación de *TLR4* con la enfermedad, ya que en ratones *tlr4*^{-/-} se observó una colitis más severa tras el tratamiento con DSS (del inglés, *Dextran Sulfate Sodium*) que en los ratones *wild type* (331). En pacientes con EII se ha encontrado asociación de las dos variantes principales de *TLR4*, (D299G y T399I) con susceptibilidad a padecer la enfermedad. Los resultados obtenidos no son concluyentes, ya que hay estudios que afirman la asociación de variantes de este gen con la EC, la CU o ambas, mientras que otros autores no consiguen replicar estos resultados; la mayoría de trabajos realizados al respecto pueden consultarse en los metanálisis llevados a cabo en los últimos años (337-339). *TLR4* también se ha relacionado con el fenotipo de la EC, por ejemplo con la localización colónica (340, 341) o el comienzo temprano de la enfermedad (342). Además, genes que codifican para proteínas implicadas en la vía de señalización del TLR4, como *CD14* o *TIRAP*, también se han asociado con la EC (280, 343, 344).

En un estudio en población del centro de Europa realizado por Bank y su equipo (345), se relacionó una variante intrónica del *TLR2* (*rs1816702*) con un mayor riesgo de desarrollar EC y CU. Otros estudios han relacionado la variante R753G del *TLR2* con el fenotipo de la CU, concretamente con pancolitis (346). El polimorfismo *rs5743836*, situado en la región promotora del *TLR9*, se ha asociado con EII, principalmente con la EC, aunque los resultados publicados también son contradictorios, tal y como puede consultarse en el metanálisis realizado recientemente por Shang *et al* (347). En otros estudios también se ha asociado variantes de *TLR10* con susceptibilidad de padecer EC (348, 349) y con características clínicas, como edad al diagnóstico, presencia de MED, localización ileocólica o aumento de la necesidad de cirugía (349). La variante L616F del gen *TLR5* también se ha relacionado con mayor riesgo de padecer EC en población caucásica (350); por el contrario, en una cohorte de judíos Ashkenazi, se demostró el papel protector de un polimorfismo en el gen del *TLR5* que da lugar a la aparición de un codón *stop* prematuro, aunque esta relación no se demostró en población no judía (351). Aunque no se ha descrito asociación hasta la fecha de *TLR1* con un mayor riesgo de padecer EII, sí que se ha relacionado la variante R80T con pancolitis en pacientes con CU (346). En mujeres portadoras de determinados haplotipos del gen *TLR8* se ha observado un mayor riesgo de desarrollar EC (352, 353); también se ha descrito la existencia de haplotipos protectores de polimorfismos en *TLR8* frente a CU y EC (352).

2 OBJETIVOS

Los principales objetivos de este estudio se detallan a continuación:

- Estudio de la relación de los genes *HLA de clase I* (*HLA-A*, *HLA-B*, y *HLA-C*) y algunos de los genes *HLA de clase II* (*HLA-DRB1* y *HLA-DQB1*) con el riesgo de desarrollar colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn así como con el fenotipo de las mismas. Con nuestro trabajo pretendimos confirmar asociaciones/relaciones de protección ya descritas en la bibliografía o en nuestra propia población así como el hallazgo de nuevos alelos de susceptibilidad.
- Estudio de polimorfismos en el exón 5, que codifica para la región transmembrana, de *MICA* en relación con susceptibilidad y fenotipo en pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.
- Búsqueda de haplotipos *HLA* y *HLA/MICA* de riesgo frente a la enfermedad inflamatoria intestinal o alguna característica clínica.
- Estudio de las tres variantes principales de *NOD2* con el fin de replicar los resultados obtenidos en otros estudios de asociación con la enfermedad de Crohn y su fenotipo, e investigar la posible interacción con otros genes implicados en la respuesta inflamatoria en el intestino.
- Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismos en los genes de los *TLRs* en pacientes con colitis ulcerosa y con enfermedad de Crohn. Relación de estos polimorfismos con riesgo de desarrollar la enfermedad y determinadas características clínicas.

3 METODOLOGÍA

3.1 PACIENTES

En este estudio se incluyeron pacientes procedentes de la consulta de enfermedad inflamatoria intestinal del Servicio de Digestivo del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada. Estos pacientes fueron diagnosticados de enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o colitis indeterminada. Dado que se trata de un estudio genético, es importante delimitar bien la población de origen: se eliminaron del estudio los pacientes de ascendencia no española así como los de etnia gitana. Los enfermos fueron informados y dieron su consentimiento para participar en el proyecto, aprobado por el comité ético del Hospital Virgen de las Nieves (HUVN) y por su comisión de investigación. Esta investigación fue seleccionada para su financiación por el Servicio Andaluz de Salud mediante la concesión de dos proyectos de investigación (PI 0374 y PI 13/02119).

La enfermedad inflamatoria intestinal por regla general no es un ente estático y pueden variar la localización, evolución o patrón clínico así como ir apareciendo síntomas a lo largo de los años. Siguiendo este razonamiento, los pacientes incluidos en el estudio se diagnosticaron siguiendo criterios clínicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos estándar (354), al menos 1 año antes de su inclusión en el estudio. Los datos recogidos se refieren a la última consulta de EII antes de comenzar este trabajo (febrero de 2014).

Siguiendo los criterios de la clasificación de Montreal, los pacientes con CU se agruparon dependiendo de la localización de la enfermedad en pancolitis, colitis distal y proctitis; para la mayoría de estudios estadísticos realizados la localización *proctitis* se engloba dentro de *colitis distal*, convirtiendo la variable en dicotómica (colitis distal vs. pancolitis). Los pacientes con enfermedad de Crohn también se clasificaron en base a la localización, en este caso en EC ileal, EC ileocólica y EC colónica. En los tres casos se tuvo en cuenta, tal y como indica la clasificación de Montreal, la afectación del tracto digestivo superior (TDS), introduciendo el modificador "TDS" si fuera necesario. En cuanto al patrón clínico, los pacientes con EC se clasificaron en patrón inflamatorio, estenosante y fistulizante, añadiendo el modificador "p" en presencia de Epa. Tanto los pacientes con CU como con EC se dividieron en tres grupos dependiendo de la edad a la que fueron diagnosticados:

- Grupo 1. Diagnosticados con 16 años o menos
- Grupo 2. Diagnosticados entre 17 y 40 años
- Grupo 3. Diagnosticados con más de 40 años

En algunos casos fue necesario agrupar a los pacientes en dos categorías (diagnosticados con más o menos de 40 años) por requerimientos del análisis estadístico. Los enfermos también se clasificaron de acuerdo con la evolución de la enfermedad (crónica o continua).

Con ayuda de los propios pacientes y de los facultativos de la consulta de EII, se recopilaron una serie de datos relacionados con la aparición de complicaciones

digestivas y extradigestivas, necesarios para la realización del estudio. Dentro de las complicaciones digestivas registradas cabe destacar Epa, microcolon, megacolon tóxico, perforación, fístulas y abscesos. También se registraron los casos de cáncer colorrectal. Debido en gran parte a las complicaciones más graves, en ocasiones fue necesaria la intervención quirúrgica de los pacientes. Dentro de este estudio se han subdividido las cirugías a las que se han sometido los pacientes en dos grandes grupos:

- Resección intestinal (sea cual sea el fragmento de intestino) llevada a cabo por la falta de respuesta al tratamiento, cuando no se pudo alcanzar una buena calidad de vida del paciente con tratamiento médico, por perforaciones, complicaciones de fístulas, etc.
- Cirugía de fístulas y abscesos (drenajes y fistulectomías).

Con respecto a las manifestaciones extradigestivas (MED) se tuvieron en cuenta las que se muestran en la Tabla 4. Además, también se registró el tratamiento recibido (salicilatos, corticoides, inmunosupresores y tratamiento biológico).

Tabla 4. Variables clínicas relacionadas con complicaciones extradigestivas incluidas en el estudio.

Complicaciones extradigestivas	
MED articulares	Artritis periférica
	Espondilitis
	Sacroileítis
MED dermatológicas	Pioderma gangrenoso
	Eritema nodoso
	Aftas orales
	Síndrome Sweet
MED hepatobiliares	CEP
	Colelitiasis
	Esteatosis
MED oculares	Uveítis
	Epiescleritis
	Blefaritis
Complicaciones tromboembólicas	TEP
	TVP

MED=Manifestaciones extradigestivas; CEP=Colangitis Esclerosante Primaria; TEP=Tromboembolismo pulmonar; TVP=Tromboembolismo Venoso Profundo.

3.2 CONTROLES

Como controles sanos se utilizaron 636 muestras de sangre de voluntarios del Banco Regional de donantes de médula ósea. La población control fue seleccionada de manera que fuera lo más parecida a la población de Granada, en cuanto a la proporción entre hombres y mujeres, y eliminando individuos de ascendencia no española,

población gitana y familiares entre sí. Al igual que los enfermos, los voluntarios sanos fueron informados y dieron su consentimiento para participar en el estudio.

3.3 EXTRACCIÓN DE ADN Y CONTROL DE CALIDAD

El ADN genómico se extrajo a partir de muestras de sangre periférica total, conservada con EDTA como anticoagulante, de pacientes con EII y controles. La extracción se llevó a cabo mediante la tecnología de partículas magnéticas en el BioRobot *Genovisión M-48* (QIAGEN, Hilden, Germany) con el kit de extracción *MagAttract DNA Blood Mini M48* (QIAGEN, Hilden, Germany).

Una vez extraído el ADN, diluido en 200 μ L de agua libre de ARNasas, se cuantificó midiendo absorbancia a una longitud de onda de 260nm en *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). El primer punto del control de calidad se sitúa en este momento, justo antes de la reacción de amplificación. A pesar de que las técnicas empleadas son bastante robustas y funcionan bastante bien aun con concentraciones de ADN bajas, ante una concentración excesivamente baja que no nos asegure el éxito de la PCR es necesario repetir la extracción. Para comprobar la pureza de las muestras de ADN se tuvieron en cuenta los ratios de absorbancia 260nm/280nm y 260nm/230nm: lo ideal es tener un ratio 260nm/280nm entre 1,8 y 2 y un ratio 260nm/230nm entre 2 y 2,2. Cuando los ratios obtenidos para una muestra se alejaron de estos intervalos se realizó una nueva extracción de ADN o se pidió nueva muestra de sangre periférica. Un segundo punto de control es la comprobación de que efectivamente la reacción de amplificación se ha llevado a cabo correctamente. Para ello una técnica sencilla y rápida es detectar la presencia de amplificado mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 2%. En la preparación del gel se añadió, además del tampón y la agarosa, *SYBR safe*, que es una sustancia fluorescente que se asocia al ADN interactuando con su hendidura menor. Si la PCR ha salido bien y ha habido amplificado se observarán bandas de ADN al visualizar el gel en un transiluminador de luz UV.

Otro punto de control, y probablemente uno de los más importantes, es controlar en todo momento que no existe contaminación de los reactivos (cebadores, polimerasa, agua, etc.) ni del material fungible empleado (puntas de pipeta, microtubos, placas de reacción...) con ADN foráneo, para lo que en cada PCR se introduce:

- Un control negativo. En vez de ADN se puso la cantidad equivalente del agua que se empleó para hacer la mezcla de reacción.
- Un control de tipaje conocido. En el caso de SNPs se utilizaron tres controles (uno homocigoto para el alelo A, un homocigoto para el alelo B y un heterocigoto).

En caso de detectar amplificación en el control negativo o el tipaje del control de tipaje conocido no coincide con el resultado previo, se desechó el resultado obtenido y se repitió la PCR con reactivos y material fungible nuevos.

3.4 GENOTIPADO DE LAS MUESTRAS

3.4.1 Tipaje *HLA*

El tipaje *HLA* de Clase I y de Clase II de cuatro dígitos se llevó a cabo mediante la técnica de SSO (*Sequence specific oligonucleotide*) con el *LIFECODES® HLA-SSO typing kit* (Immucor, Norcross, Georgia, USA). En primer lugar se realizó una PCR para aumentar el número de copias del fragmento en concreto que se quiere estudiar. Para cada reacción de amplificación se necesitan 80 ng de ADN por muestra (unos 2-3 μ L dependiendo de la concentración) y las siguientes cantidades de reactivo por muestra:

- 6 μ L de *Primer Mix* (específico para cada locus)
- 0,20 μ L de GoTaq® Hot Start Polymerase M500B (Promega, Madison, WI, USA)
- Agua sin nucleasas (hasta llegar al volumen final de 20 μ L)

Los genes estudiados en este caso fueron: *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DRB1* y *HLA-DQB1*. El programa de amplificación se puede observar en la Figura 17a. Tras la PCR se hibridó una parte del ADN amplificado (2,5 μ L) con 7,5 μ L de la mezcla de microesferas marcadas con fluorescencia específicas para cada locus (Figura 17b).

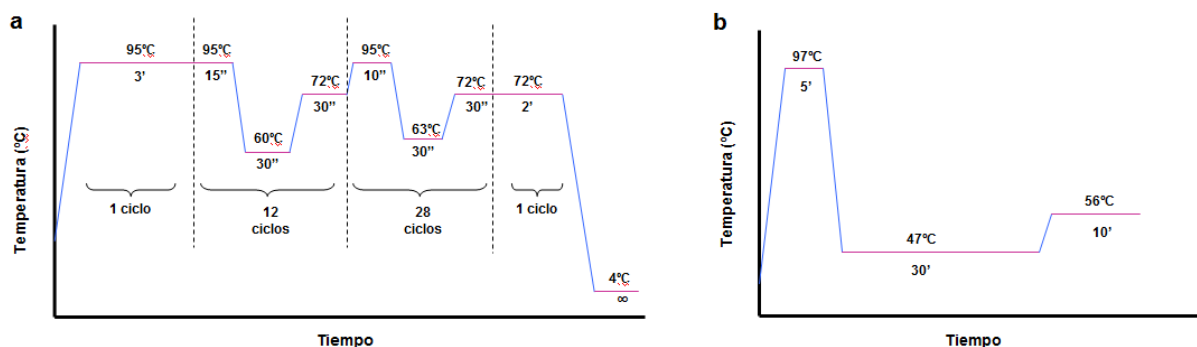


Figura 17. Programas utilizados en el termociclador para el tipaje *HLA*. a) Programa de amplificación y b) programa de hibridación

Una vez terminada la reacción de hibridación, se añadieron 100 μ L de la solución de estreptavidina (99,6 μ L de solución de dilución + 0,4 μ L de estreptavidina). A continuación se introdujo inmediatamente en el aparato de *Luminex* para la lectura de la fluorescencia. La interpretación de los resultados se realizó con el software *Match it! DNA v1.1* (Immucor, Norcross, Georgia, USA) (Figura 18).



Figura 18. Tipaje HLA utilizando el programa informático Match it. En el eje de abscisas se muestran las diferentes microesferas o *beads* de ese locus en concreto y en el eje de ordenadas la fluorescencia observada asociada a cada microesfera. Analizando el patrón de fluorescencia en las diferentes *beads* el programa informa un tipaje (*HLA-C*16:01, C*07:02* en este ejemplo)

3.4.2 Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en *TLRs* y *NOD2*

El genotipado de SNPs se realizó mediante ensayos de discriminación alélica empleando sondas TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las sondas TaqMan® nos permiten discriminar diferencias en un solo nucleótido en una secuencia concreta: en la reacción de amplificación, además de haber un par de juegos de cebadores (*primers*), hay dos tipos de sondas que hibridan cada una con uno de los dos alelos posibles. El funcionamiento de las sondas Taqman® está esquematizado en la Figura 19.

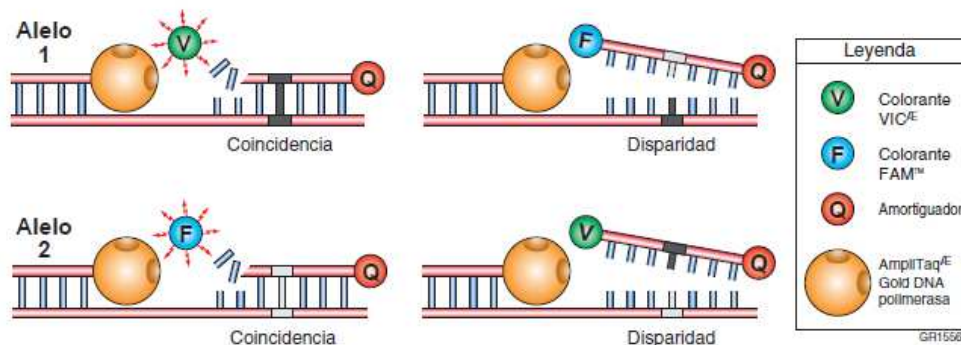


Figura 19. Funcionamiento de las sondas Taqman®. La sonda que hibrida con el alelo 1 está marcada con el fluoróforo VIC (círculo verde) y la sonda que hibrida con el alelo 2 está marcada con el fluoróforo FAM (círculo azul). La fluorescencia de estos fluoróforos es absorbida por un amortiguador (círculo rojo), de manera que cuando la sonda no está unida al ADN para la que es complementaria no se emite fluorescencia al medio. En la fase de desnaturalización del ADN, durante la PCR, la sonda puede hibridar con su secuencia complementaria; el fluoróforo será liberado al medio gracias a la acción exonucleasa de la Taq-Polimerasa cuando ésta vaya avanzando sobre la hebra molde durante la síntesis de ADN. La fluorescencia emitida por el fluoróforo liberado ya no es absorbida por el amortiguador y se puede detectar en el medio. El ensayo de discriminación alélica es un ensayo a punto final, es decir, se mide la fluorescencia antes de la PCR y después: comparando los niveles de fluorescencia de un fluoróforo y de otro podemos saber si nuestra muestra es homocigota para ese SNP (sólo se detecta un fluoróforo) o heterocigota (se detectan los dos). Figura extraída del protocolo *Guía de Primeros Pasos para la Discriminación Alélica con el Sistema de PCR en Tiempo Real 7300/7500/7500 Fast* que puede consultarse en: https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_042315.pdf

La selección de los SNPs estudiados se hizo en base a la bibliografía consultada y la base de datos de SNP del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>); la secuencia contexto de los mismos, el alelo minoritario³ y el cambio de aminoácido que se produce en la proteína se muestran en la Tabla 5.

³ En la bibliografía es común que se haga referencia al alelo minoritario de un polimorfismo como alelo mutado, aunque la presencia de éste no implique un cambio funcional en la proteína que codifica ese gen. En este trabajo se emplea los términos “mutado” y “minoritario” indistintamente. Por el contrario, para hacer referencia al alelo mayoritario, se podrán emplear los términos “sin mutar” o “salvaje”.

Tabla 5. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) analizados

Gen	Crom	rs	Secuencia contexto del SNP*	Alelo minoritario	Cambio de aa
<i>TLR1</i>	4	5743611	AGGATTTT G AATTTCTCATAATA[C/G]AATCCAGTATCTTGATATCAGTGTT	C	R80T
<i>TLR2</i>	4	5743704	GCCTGGCTCCAGGCCAAAAGGAAGC[A/C]CAGGAAAGCTCCCAGCAGGAACATC	A	P631H
		5743708	ATTCCCCAGCGCTTCTGCAAGCTGC[A/G]GAAGATAATGAACACCAAGACCTAC	A	R753Q
<i>TLR3</i>	4	3775291	GAGATTTTATTCTTGGTTAGGTTGA[A/G]TATGTGTAAGGGAGAATGAGCAAGT	A	L412F
		5743305	CCTGAGCCCAGTAATAAAAGCGG[A/T]CTAGCTGAAGCTGGAGCCCACAAGA	A	Promotor
<i>TLR4</i>	9	4986790	GCATACTTAGACTACTACCTCGATG[A/G]TATTATTGACTTATTTAATTGTTTG	G	D299G
		4986791	TGTTCTCAAAGTGATTTTGGGACAA[C/T]CAGCCTAAAGTATTTAGATCTGAGC	T	T399I
<i>TLR5</i>	1	2072493	GAATGTGAACCTTAGCACTTTTATCA[A/G]TTGGCTTAATCACACCAATGTCACT	G	N592S
		5744174	CATATATTGTGTGTACCCTGACTCG[C/T]TCTCTGGGGTTTCCCTCTTCTCTCT	C	F616L
<i>TLR6</i>	4	5743795	GGTTTGTGTTATTTTCAGGGCAAAC[A/G]TAGAGCAAGTCCACTGGCAAATCTG	A	Intrón
		5743810	ATTTTTATCAGAACTCACCAGAGGT[C/T]CAACCTTACTGAATTTTACCCTCAA	T	S249P
<i>TLR7</i>	X	179008	TTTCCAATGTGGACTGAAGAGAC[A/T]AATTCTTATCCTTTTTAACATAATC	T	Q11L
<i>TLR8</i>	X	3764880	AATGAAAAATTAGAACAACAGAAAC[A/G]TGGTAAGCCACTTCTATTTCTTTAG	G	M1V
<i>TLR9</i>	3	352140	AGCTGAGGTCCAGGGCCTCCAGTCG[C/T]GGTAGCTCCGTGAATGAGTGCTCGT	T	P545P
<i>TLR10</i>	4	4129009	TTTCTGGGCAAACCTTCGAGCTGCT[A/G]TTAATGTTAATGTATTAGCCACCAG	G	I775V
		11096955	AACAGACGAGTTGTTTAAAAGAACT[A/C]TCCAACCTGCCTCACTGAAAACCTCT	C	I369L
<i>NOD2</i>	16	2066844	CCAGACATCTGAGAAGGCCCTGCTC[C/T]GGCGCCAGGCCTGTGCCCGCTGGTG	T	R702W
		2066845	CTCTTTTGGCCTTTTCAGATTCTGG[C/G]GCAACAGAGTGGGTGACGAGGGGGC	C	G908R

En negrita y entre corchetes se muestran los dos alelos posibles en cada caso

*Secuencia extraída de la base de datos de SNP (dbSNP) del National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Crom=Cromosoma, rs=Reference SNP number, A=Adenina, C=Citosina, G=Guanina, T=Timina, aa=aminoácido

El estudio de discriminación alélica consta de tres partes principales: una lectura de fluorescencia previa, amplificación de ADN mediante PCR a tiempo real (RT-PCR) y una lectura de fluorescencia tras la amplificación. En este caso se empleó el equipo *Applied Biosystem 7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en el modo estándar, placas de reacción ópticas de 96 pocillos (*MicroAmp™ Fast optical 96-well reaction plate*) y un volumen final de reacción por pocillo de 10 µL. Las cantidades de reactivo por pocillo y muestra fueron las siguientes:

- 5 µL de TaqMan® Genotyping Master Mix 2x (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- 0,5 µL de TaqMan® Genotyping Assay Mix 20x. Contiene primers y sondas específicas de cada SNP. (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- 4,5 µL de ADN diluido en agua libre de nucleasas (1-20 ng)

Después del ciclo de prelectura de fluorescencia de cada pocillo (un minuto aproximadamente a 60°C) se procedió a la RT-PCR. Las condiciones de PCR se muestran en la Figura 20.

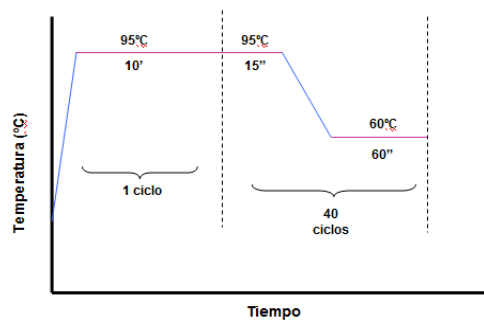


Figura 20. Condiciones de PCR a tiempo real para el genotipado de SNPs por sondas Taqman®

Tras la RT-PCR se realizó la lectura posterior y se analizaron los resultados. El *software* empleado para el análisis fue el *SDS 1.3.1*. Este programa utiliza un avanzado algoritmo de multicomponentes para calcular la señal con la que se ha marcado cada alelo midiendo la fluorescencia para cada muestra durante la lectura. La gráfica que se obtiene dependiendo de la intensidad de fluorescencia detectada puede verse en la Figura 21.

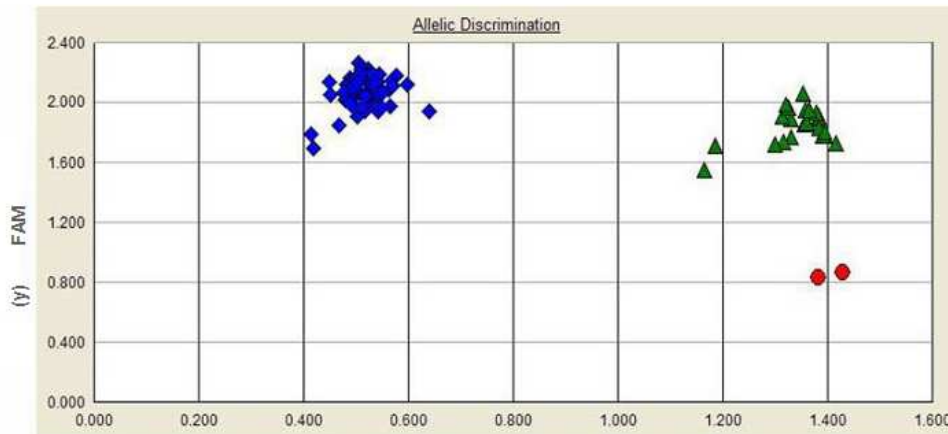


Figura 21. Gráfica donde se muestran los niveles de fluorescencia obtenidos tras un estudio de discriminación alélica. Cada figura representa una muestra. Los rombos azules representan muestras homocigotas para el alelo marcado con FAM, los círculos rojos homocigotas para el alelo marcado con VIC y los triángulos son muestras heterocigotas.

3.4.3 Microsatélites en *MICA* y *NOD2*

En este estudio se analizan dos microsatélites que no son SNP: repeticiones en tándem en la región TM del gen *MICA* y la inserción de una citosina en el codón 1007 de *NOD2*. Las secuencias de los cebadores, que fueron sintetizados por *Applied Biosystems*, se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Cebadores (*primers*) empleados para la reacción de amplificación de los polimorfismos de *MICA* y *NOD2* estudiados

Gen	Microsatélite		
<i>MICA</i>	(GCT) ₄₋₉	<i>Primer fw</i>	5'-CCTTTTTTTCAGGGAAAGTGC-3'
		<i>Primer rv</i>	5'-CCTTACCATCTCCAGAAACTGC-3'
<i>NOD2</i>	1007insC	<i>Primer fw</i>	5'-GGCAGAAGCCCTCCTGCAGGGC-3'
		<i>Primer rv</i>	5'-CCTCAAAATTCTGCCATTCC-3'

fw=forward; rv=reverse; fs=frameshift

Las cantidades de cada uno de los reactivos por muestra para amplificar el segmento TM de *MICA* que nos interesa y la región del polimorfismo de *NOD2* fueron los siguientes:

- 7,5 µL de AmpliTaq Gold 360 Master Mix (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA)
- 0,3 µL primer forward y 0,3 µL primer reverse (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA)
- 4,5 µL agua libre de nucleasas

La cantidad de ADN de la muestra empleado fue de 2 μ L. Tras varias pruebas se seleccionaron las condiciones de PCR óptimas para cada polimorfismo. Las condiciones de PCR para la amplificación de *MICA* y *NOD2* se muestran en la Figura 22.

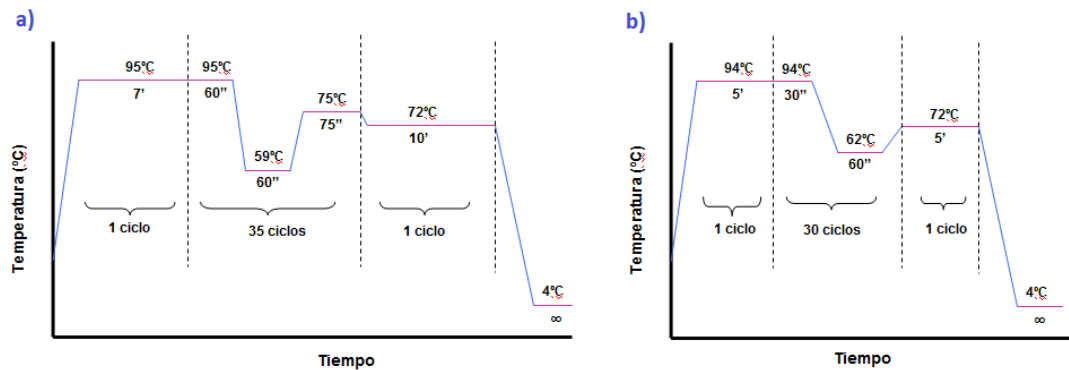


Figura 22. Condiciones de PCR para amplificar el fragmento transmembrana de *MICA* (a) y la región donde se sitúa el polimorfismo de *NOD2* (b)

Una vez terminada la PCR, se desnaturizó el ADN amplificado durante 3 minutos a 96°C para la separación de las hebras. Para la reacción de desnaturalización:

- 9,5 μ L de formamida
- 0,25 μ L de estándar de tamaño (500pb marcado en naranja-LIZ)
- 2 μ L del ADN amplificado

Ya desnaturizado se introdujo en el secuenciador (ABI Prism 3130XL, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para determinar el tamaño del amplificado en cada caso. Este analizador genético realiza una electroforesis capilar (16 capilares) a través de un polímero que actúa como matriz de separación y que podrá variar dependiendo del tamaño de los fragmentos que se quieran analizar y del secuenciador utilizado: en este caso se utilizó el polímero POP-7™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Gracias al programa *GeneMapper*® v.4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) se determinó el tamaño en número de nucleótidos de los fragmentos amplificados en cada caso (Figura 23).

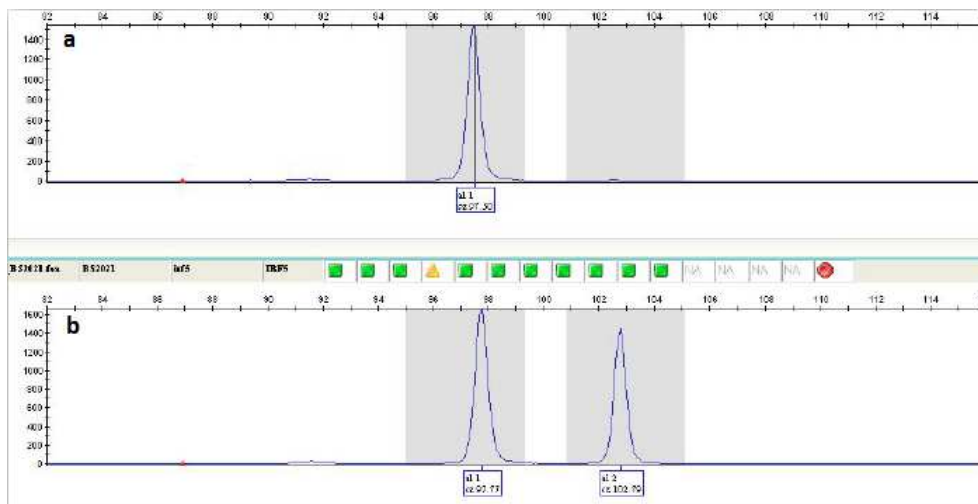


Figura 23. Análisis de microsatélites con el programa GeneMapper® v.4.0. La presencia de un sólo pico (a) indica un genotipo homocigoto mientras que con la presencia de dos (b) se trata de un heterocigoto.

El tamaño de los fragmentos encontrados para el gen *MICA* y para el gen *NOD2* se muestra en la Tabla 7:

Tabla 7. Tamaño de los alelos detectados por electroforesis capilar de los genes *MICA* y *NOD2*

Gen	Alelo	Tamaño (pb)
<i>MICA</i>	A4	178
	A5	182
	A5.1	183
	A6	185
	A9	194
<i>NOD2</i>	Salvaje	152
	insC	153

pb=pares de bases; ins=Inserción

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las frecuencias tanto alélicas como genotípicas se obtuvieron por conteo directo. Para simplificar el estudio y manejar datos que puedan tener verdadera significancia clínica, los alelos o haplotipos raros para genes *HLA* y *MICA* (con frecuencias inferiores al 1% en población control) no se tendrán en cuenta o, en algún caso, se agruparán.

3.5.1 Descripción de la cohorte

Se caracterizó cada población de enfermos en base a las características clínicas ya mencionadas previamente (Apartado 3.1). Para el análisis estadístico posterior se trabajará con frecuencias absolutas y relativas (%). En el caso de la variable “edad al

diagnóstico”, la única variable cuantitativa del estudio, se eligió la mediana en lugar de la media como medida de centralidad y el rango intercuartílico (RIQ) como medida de desviación, dada la gran dispersión de los datos. Se estudió la relación entre las diferentes variables, mediante un test de χ^2 de Pearson, para facilitar el posterior análisis multivariable y asegurar una correcta interpretación de los resultados de asociación genética.

3.5.2 Estudio caso-control

Para el estudio de asociación con enfermedad para cada uno de los polimorfismos estudiados se construyeron tablas de contingencia 2x2 y se realizó el test de χ^2 de Pearson. Se estimó la Odds Ratio (OR) y se calculó el Intervalo de Confianza (IC). En el caso de un locus bialélico la construcción de la tabla de contingencia es sencilla:

	Enfermos	Controles
Alelo X	a	b
Alelo Y	c	d

Algunos de los genes analizados son altamente polimórficos (*MICA*, *HLA-A*, *HLA-B*, etc) y se han descrito múltiples alelos. En el caso de querer analizar la asociación de algún alelo de un locus multialélico con enfermedad, es imposible construir una tabla 2x2 sin recodificar la variable; si no tenemos una tabla 2x2 no podremos calcular la OR ni el IC. Para solucionar esto hay que recodificar la variable en variables distintas dicotómicas del tipo “presencia/ausencia del alelo Z” y así poder construir una tabla 2x2.

	Enfermos	Controles
Presencia del alelo Z	a	b
Ausencia del alelo Z	c	d

En el caso del locus bialélico se tomará como referencia para el cálculo de la OR el alelo mayoritario y si se trata de un locus multialélico la ausencia del alelo mutado en cada caso. El estudio de genotipos puede ofrecer información interesante al estudio. Cuando se trata de loci bialélicos, existen diferentes modelos genéticos aplicables donde los genotipos pueden ser agrupados dependiendo de lo que se quiera demostrar (355):

- Modelo genético dominante: La sola presencia del alelo mutado es suficiente para causar el efecto. Se agrupan genotipos con el alelo mutado.
- Modelo genético recesivo: El efecto sólo se manifiesta si el alelo mutado está en homocigosis. Se agrupan el genotipo heterocigoto y el homocigoto salvaje.
- Modelo genético multiplicativo: El riesgo de padecer la enfermedad se multiplica (r^2) por cada copia del alelo mutado.

- Modelo genético aditivo: El riesgo de padecer la enfermedad se multiplica por 2 ($2r$) en el genotipo homocigoto mutado con respecto al heterocigoto.

Por regla general, en este estudio se ha seguido el modelo genético dominante para locus bialélicos, dividiendo los genotipos en portadores o no del alelo mutado, y utilizando el genotipo salvaje como referencia. Así, a pesar de la baja frecuencia del genotipo mutante homocigoto en algunos casos, puede llevarse a cabo el análisis estadístico. En ocasiones, el alelo mutado puede llegar a ser incluso más frecuente que el salvaje en nuestra población; cuando se da esta situación es interesante estudiar los tres genotipos por separado y ver qué efecto diferencial puede tener el heterocigoto y el homocigoto mutante. A lo largo del estudio se indicará en cada caso qué tipo de análisis estadístico se ha realizado.

El test de χ^2 compara frecuencias observadas con frecuencias esperadas. El cálculo de las frecuencias esperadas se hace de la siguiente manera (Ecuación 1): por ejemplo, para calcular la frecuencia esperada de la celda con $n=a$:

Ecuación 1. Cálculo de frecuencias esperadas para el test de χ^2

$$(a+b)(a+c)/N, \text{ donde } N=a+b+c+d$$

Uno de los principales requisitos para que pueda realizarse este test es que la frecuencia esperada sea superior a 5 en al menos el 80% de las celdas (*regla de Cochran*); en el caso de una tabla 2x2 quiere decir que en ninguna celda puede haber una frecuencia esperada inferior a 5. Si esto ocurriera habría que elegir un test estadístico alternativo: en este caso se ha elegido el *Test exacto de Fisher*. Cuando no hay ninguna casilla con frecuencias esperadas inferiores a 5 pero éstas son bajas en alguna celda (entre 5 y 10) se realizó el test de χ^2 de *Pearson* pero con la *Corrección de Yates* o corrección por continuidad. Algunos autores consideran la aplicación de esta corrección un método demasiado conservador, ya que en algunas ocasiones tras aplicar la Corrección de Yates no se rechaza la hipótesis nula (no hay diferencias significativas); en este estudio se consideró más importante evitar falsos positivos por lo que se aplican tanto la Corrección de Yates como la de Bonferroni, de la que se hablará más adelante.

3.5.3 Estratificación de los pacientes

Tras el estudio de asociación con enfermedad de cada uno de los polimorfismos, se llevó a cabo la estratificación de los pacientes en base al sexo, comparando hombres y mujeres entre sí en cada población de enfermos para frecuencias alélicas y genotípicas de cada polimorfismo. En caso de encontrar diferencias, se compararon los grupos por separado con la población control.

Además, también se estratificaron los pacientes en base a otras características fenotípicas. En ambos grupos de pacientes se crearon subgrupos atendiendo a localización de las lesiones (colitis distal vs. pancolitis en el caso de CU e ileal vs. ileocólica vs. colónica en EC), evolución de la enfermedad, edad al diagnóstico, presencia

de complicaciones digestivas, presencia de MED (en general y cada uno de los subgrupos). Además, los pacientes con EC se estratificaron en base al patrón de la enfermedad (inflamatorio vs. estenosante vs. fistulizante).

En el caso de los pacientes con enfermedad de Crohn, dada la conocida asociación del gen *NOD2* con la enfermedad, también se estratificaron los pacientes dependiendo de la presencia/ausencia de mutación en cualquiera de los tres polimorfismos estudiados en el gen (R702W, G908R o 1007insC). Se distinguirá entre *NOD2*⁺ para los pacientes que porten alguna de las variantes minoritarias (ya sean heterocigotos compuestos, heterocigotos simples u homocigotos) y *NOD2*⁻ para el resto de pacientes. El análisis estratificado de los pacientes nos permitirá comprobar la posible interacción epistática entre *NOD2* y otros genes incluidos en el estudio.

Todos estos análisis se llevaron a cabo mediante la realización de un test de χ^2 y sólo se mencionará en el texto en el caso de que se hayan encontrado diferencias significativas. Con respecto a la variable “edad al diagnóstico”, se realizaron varios tipos de análisis, ya que se puede considerar cualitativa policotómica (agrupando a los pacientes en rangos de edad) o cuantitativa. En el primer caso, el análisis estadístico se llevó a cabo como con el resto de las variables pero al considerar la variable cuantitativa, se realizaron otro tipo de test estadísticos. Como tras la realización del test de Kolmogorov-Smirnov resultó no seguir una distribución normal, tuvieron que realizarse test estadísticos no paramétricos:

- Para el contraste de hipótesis en el que la variable predictora o independiente es una variable cualitativa policotómica y la variable resultado o dependiente es cuantitativa no paramétrica se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para k muestras.
- Para el contraste de hipótesis en el que la variable predictora o independiente es una variable cualitativa dicotómica y la variable resultado o dependiente es cuantitativa no paramétrica se utilizó el test no paramétrico de U Mann-Whitney.

3.5.4 Equilibrio de Hardy-Weinber (EHW)

En 1908 un matemático (Hardy) y un físico (Weinberg) enunciaron un teorema según el cual “las frecuencias de los alelos y los genotipos en el acervo genético de una población permanecen constantes de generación en generación, siempre y cuando solo trabajen la segregación mendeliana y la recombinación de los alelos” (356). Esto quiere decir que, si se cumplen una serie de requisitos dentro de una población, las frecuencias alélicas y genotípicas permanecerán constantes de una generación a la siguiente: puede decirse entonces que la población está en *Equilibrio de Hardy-Weinberg* (EHW). Los requisitos que deben cumplirse para que una población esté en equilibrio son (357):

- Tamaño lo suficientemente grande para evitar el papel que desempeñan las fluctuaciones aleatorias en las frecuencias de alelos de una generación a otra (deriva genética).
- Ausencia de flujo génico mediante migración
- Ausencia de mutaciones que puedan modificar el acervo genético

- Apareamiento aleatorio (panmixia)
- Ausencia de selección natural

En una población que cumple todos estos requisitos, y que por tanto está en equilibrio, podrían calcularse las frecuencias genotípicas a partir de las alélicas (355). La ecuación del EHW se muestra a continuación (Ecuación 2):

Ecuación 2. Frecuencias genotípicas para un locus bialélico según la ecuación de Hardy-Weinberg

<p>Frecuencia de AA= p^2 Frecuencia de aa= q^2 Frecuencia de Aa= $2pq$</p> <p>$p^2 + q^2 + 2pq = 1$</p>

Si se quiere comprobar que una población está en EHW bastaría con conocer sus frecuencias genotípicas y, mediante un test de χ^2 de Pearson comparar las frecuencias observadas con las esperadas. Si tras inferir el valor del estadístico (grados de libertad = Número de genotipos - número de alelos) se obtiene un p-valor inferior a 0,05 significa que existen diferencias significativas entre frecuencias observadas y esperadas y, por lo tanto, la población no está en EHW.

En el caso de un locus con múltiples alelos (por ejemplo los genes *HLA*), puede que no todos los genotipos posibles estén presentes en la población (su frecuencia es igual a 0). Esto hace que la suposición asintótica de la distribución χ^2 no se sostenga y sea necesario utilizar otro test para calcular si la población está en EHW, como el *Test exacto de Levene-Haldane* o la *Prueba de Razón de verosimilitud*. La verosimilitud de los datos según esta última prueba es directamente proporcional a la probabilidad de obtener los datos observados dado el parámetro o parámetros estimados; como sólo tiene en cuenta los valores observados y no los más extremos o los no esperados, es el método escogido en nuestro estudio para calcular el EHW para locus multialélicos. Al igual que en el test de χ^2 , un p-valor superior a 0,05 indica que la población está en EHW.

El hecho de que una población no esté en EHW puede deberse a razones biológicas o a errores de genotipado. Si esto ocurriera se deberían revisar tanto la selección de la población control (presencia o no de extranjeros o familiares, endogamia, etc.) como las técnicas realizadas en el laboratorio y los resultados obtenidos: la comprobación de que la población control está en EHW para cada uno de los loci analizados es, por tanto, un punto más del control de calidad (358, 359).

3.5.5 Desequilibrio de ligamiento

En estudios de asociación génica hay que tener especial cuidado con loci próximos entre sí, ya que pueden no segregarse de forma independiente, es decir, puede que estén en Desequilibrio de Ligamiento (LD, del inglés *Linkage Disequilibrium*). Dos loci están en desequilibrio de ligamiento cuando sus alelos no se asocian al azar y la frecuencia de los haplotipos que forman no es la multiplicación de las frecuencias alélicas por separado (360). Cuanto mayor sea la distancia genética entre dos loci, mayor será la recombinación y menor el desequilibrio de ligamiento. El LD puede medirse comparando la frecuencia observada de cada haplotipo con su frecuencia esperada: suponiendo dos loci A y B, cada uno con dos alelos, siendo $p(A_1B_1)$ la frecuencia observada del haplotipo y $p(A_1)p(B_1)$ la frecuencia esperada si A y B fueran independientes, puede calcularse el índice **D** (Ecuación 3).

Ecuación 3. Cálculo del índice D para la medida del desequilibrio de ligamiento entre el locus A y el B

$$D = p(A_1B_1) - p(A_1)p(B_1)$$

Un inconveniente del índice D es que su valor va a depender de las frecuencias de ambos loci por lo que normalmente se emplea **D'**, que resulta de la estandarización de D según el máximo valor que pueda tomar (361) (Ecuación 4):

Ecuación 4. Estandarización de D (D')

$$D' = D / D_{\max}$$

También puede emplearse el coeficiente de correlación entre ambos loci (**r²**) (Ecuación 5):

Ecuación 5. Cálculo del coeficiente de correlación (r²)

$$r^2 = \frac{D^2}{pA_1(1 - pA_1)pB_1(1 - pB_1)}$$

Los valores de |D'| y r² se sitúan entre 0 y 1. A pesar de que ambas son medidas de LD no son equivalentes: r² es más restrictivo y D' se ve más afectado por el tamaño muestral. Un r²=1 significa ligamiento completo mientras que D'=1 puede darse, por ejemplo, si en una casilla de la tabla 2x2 hay un valor de 0, por lo que no significa que los alelos estén ligados.

En muchos estudios los datos de los que se disponen son genotípicos, sin conocer la fase gamética ni la frecuencia de los diferentes haplotipos. Asumiendo que los loci están en EHW, existen herramientas bioinformáticas para el cálculo de haplotipos. Una de las más usadas se basa en la implementación del *algoritmo EM* (Esperanza-

Maximización) para obtener las frecuencias haplotípicas esperadas (362, 363). En el caso de no conocer la fase gamética y, por lo tanto tener que obtener las frecuencias haplotípicas a través de esta herramienta estadística, el cálculo de D , D' y r^2 tendría que hacerse con las frecuencias esperadas y no las reales. Gracias al test de *Razón de verosimilitudes* se pueden comparar las frecuencias haplotípicas calculadas multiplicando la frecuencia de ambos alelos con las frecuencias haplotípicas calculadas mediante el algoritmo EM. Con este test se comparan la verosimilitud del modelo cuando se asume el equilibrio de ligamiento con la verosimilitud cuando se tiene en cuenta el desequilibrio: se comparan las frecuencias haplotípicas calculadas multiplicando la frecuencia de ambos alelos con las frecuencias haplotípicas calculadas mediante el algoritmo EM (363). Dos loci se considerarán en LD cuando el p-valor es inferior a 0,05. Sin embargo, para determinar el LD existente entre los diferentes alelos no es tan sencillo; algunos paquetes estadísticos permiten la estimación de las fases gaméticas a través del *algoritmo EBL* (364): asumiendo que esas son la fases gaméticas reales podemos calcular D , D' y r^2 . Aunque al trabajar con datos estimados y no reales la probabilidad de cometer errores es mayor, es la única manera de poder calcular estas medidas de LD. Dos alelos se considerarán en LD cuando el p-valor sea inferior a 0,05.

En este trabajo se calculó la frecuencia haplotípica usando un algoritmo EM para datos genotípicos multilocus cuando la fase gamética es desconocida. Además, se comprobó la existencia de LD entre cada par de alelos calculando D , D' y r^2 , tras haber estimado las fases gaméticas implementando el algoritmo EBL.

3.5.6 Análisis multivariable

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los diferentes análisis por separado, se realizó un análisis multivariable a través de una *regresión logística* cuando se consideró oportuno. Este tipo de análisis nos permitió establecer una variable dependiente y una serie de covariables o variables independientes y ver qué efecto tenían cada una de estas últimas sobre la primera. Empleando el método *forward* (hacia atrás) por pasos del paquete estadístico, las covariables que no fueran significativas irán siendo eliminadas en cada paso del análisis. Al final quedarán en la ecuación únicamente las variables con un p-valor inferior a 0,05. Esto nos permitió corregir asociaciones ya que en el análisis multivariable pudimos introducir supuestas variables de confusión, como por ejemplo el sexo o la edad al diagnóstico. En todos los casos, tras el estudio de LD y para confirmar la asociación de un polimorfismo con enfermedad o con una determinada característica clínica, se llevó a cabo un análisis multivariable incluyendo como covariables aquellas que pudieran actuar como variables de confusión. Siempre que no se indique en el texto, significará que la significación continúa tras la regresión logística.

3.5.7 Corrección de Bonferroni

En estadística se entiende por error tipo I (α) a la probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando es verdadera (probabilidad de falsos positivos) y error tipo II (β) a la probabilidad de aceptar la hipótesis nula cuando es falsa (falsos negativos). Al realizar un test estadístico cualquiera, el investigador establece cuál es el riesgo que está dispuesto a asumir, es decir, en qué punto va a establecer su límite de significación o, lo

que es lo mismo, cuál será el valor de su α . Por regla general, en un estudio de asociación de polimorfismos génicos con enfermedad se suele establecer un valor de α de 0,05. Esto es correcto para las comparaciones simples, por ejemplo: se quiere comparar si alguna de las variantes de un único locus bialélico está asociado con una determinada enfermedad. En este caso, la probabilidad de obtener un resultado correcto es de 0,95, siempre que consideremos el error de tipo 1=0,05 ($0,95=1-\alpha$).

En el caso de comparaciones múltiples es más complejo: suponiendo que se realizaran 20 comparaciones, la probabilidad de obtener un resultado correcto sería la multiplicación de la probabilidad de cada comparación por separado ($0,95^{20}=0,36$). Si la probabilidad de que el resultado sea correcto es de 0,36, la probabilidad de equivocarnos es de 0,64, y, evidentemente, esto no es aceptable. Para corregir este error hay varios métodos, pero uno de los más empleados es el de *Bonferroni*. Según la corrección de Bonferroni lo correcto sería establecer un nuevo límite de significación para cada grupo de comparaciones (Ecuación 6) (365):

Ecuación 6. Corrección del p-valor según Bonferroni para comparaciones múltiples

$$P \text{ corregida} = 1(1-P)^{1/n}$$

siendo P el nivel de significación elegido por el investigador (normalmente 0,05) y n el número de comparaciones. El resultado es prácticamente igual si simplificamos la fórmula a la Ecuación 7:

Ecuación 7. Simplificación de la corrección del p-valor según Bonferroni

$$P \text{ corregida} = \alpha/n$$

En el caso del ejemplo anterior de un análisis con 20 comparaciones, el p-valor sería 0,00256 según la Ecuación 6 o 0,0025 según la Ecuación 7. Esto significa que el p-valor obtenido tras el análisis estadístico tiene que ser menor de 0,00256 para que lo podamos considerar significativo. Es importante hacer hincapié en que el valor de α no varía, es decir, las correcciones que se hacen en cada caso son precisamente para asegurar que la probabilidad de rechazar la hipótesis nula siendo ésta cierta continúa siendo del 5%: lo único que varía es el p-valor a partir del cual consideramos que las diferencias son significativas.

Existe mucha controversia en bioestadística a la hora de determinar cuál es el número de comparaciones en estudios genéticos. En principio, número de comparaciones se referiría al número de test estadísticos realizados sobre el mismo conjunto de datos para comprobar si la hipótesis nula es cierta o no. Por ejemplo, si en un estudio se analizan 10 000 SNPs el nivel de significación se establecería en 5×10^{-6} ($\alpha/10\ 000$) ya que se han realizado 10 000 pruebas estadísticas diferentes. Este es uno de los puntos sobre el cual los autores no se ponen de acuerdo: ¿significa eso que si un autor publica sólo parte de los datos, los niveles de significación tienen que hacer referencia a variables que el lector desconoce? ¿Tienen que tener en cuenta los estudios

actuales los posibles estudios futuros? ¿Se deberían de modificar los resultados actuales cuando se incluyan nuevas variables en estudios posteriores? En este caso el nivel de significación dependería de cuál fuera la hipótesis nula que se estableciera en un principio, del investigador y del momento (365).

El caso de los genes *HLA* es particular. Son genes muy polimórficos y, en realidad, aunque consideremos cada gen por separado, la hipótesis nula de la que partimos es “No existe asociación entre *HLA-X* y nuestra enfermedad” y para comprobar la veracidad de ese enunciado realizamos múltiples pruebas estadísticas (365). Como se ha indicado anteriormente, para poder calcular la OR y el IC necesitamos variables dicotómicas, por lo que si se han detectado 20 alelos para *HLA-B* se han de construir 20 variables del tipo *ausencia/presencia* para cada uno de los 20 alelos, y, por lo tanto, realizar 20 test estadísticos. En este caso sí que se ha corregido siguiendo el método de Bonferroni para evitar dentro de lo posible falsos positivos (aun a costa de aumentar la probabilidad de falsos negativos o error β). La corrección dependerá en cada caso del número de comparaciones que se hagan. Por ejemplo: para determinar si existe asociación entre *HLA-B* y enfermedad el factor de corrección empleado será 20 pero si estamos comparando haplotipos *HLA-B/MICA* y tenemos 24 haplotipos posibles el factor de corrección será de 24.

En muchas ocasiones se utiliza el *Método de la Desigualdad de Bonferroni*, multiplicando el p-valor obtenido tras el análisis estadístico en una comparación determinada por el número de comparaciones realizadas (366). Aunque este método puede resultar en ocasiones demasiado conservador, es muy sencillo de aplicar y facilita la comprensión del estudio por terceras personas, ya que hay un único nivel de significación establecido y no uno diferente para cada grupo de comparaciones. Por ejemplo, en el caso de asociación de *HLA-B* con enfermedad, si hacemos 20 comparaciones habrá que corregir cada p-valor obtenido multiplicando por 20.

3.5.8 Paquetes estadísticos utilizados

Los programas informáticos empleados para el análisis estadístico fueron:

- Los principales programas utilizados para la creación de bases de datos fueron *Microsoft Office Excel 2007*, *Notepad++ v.2*, *Textpad 7.2.0* y *Statistical Package for the Social Sciences v.15 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA)*. La elección de uno u otro dependió de los requerimientos del paquete estadístico.
- Para el estudio descriptivo de los datos, ya sea análisis de frecuencias o tablas de contingencia, así como estudios de regresión logística, test de normalidad o pruebas no paramétricas se utilizó el *SPSS v.15*.
- Para facilitar la construcción de tablas de contingencia y el cálculo de OR e IC se empleó el programa para análisis epidemiológico de datos tabulados *Epidat v3.1*.
- Para análisis de EHW se utilizó el paquete estadístico *PopGene v1.32 (University of Alberta, Canada)*.
- Se utilizó el programa *Arlequín v.3.1* para el cálculo de haplotipos usando un algoritmo para datos genotípicos multilocus cuando la fase gamética es desconocida, estimación de fases gaméticas y el LD.

3.5.9 Frecuencias alélicas y genotípicas en otras poblaciones

Las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas para cada uno de los polimorfismos estudiados en la población control se compararon con las de otras poblaciones similares (europea, caucásica, española, mediterránea). Para ello se utilizaron bases de datos internacionales como por ejemplo:

- *Database of Single Nucleotide Polymorphisms* ([dbSNP](#))
- [Ensembl project](#)
- Allele Frequency Net Database ([AFND](#))

4 RESULTADOS

4.1 DESCRIPCIÓN DE LAS COHORTES. DATOS CLÍNICOS Y DEMOGRÁFICOS

En el presente estudio se incluyeron un total de 751 pacientes procedentes de la consulta de enfermedad inflamatoria intestinal del HUVN de Granada. Éstos se diagnosticaron según criterios radiológicos, endoscópicos, clínicos e histológicos estándares y se distinguió entre Colitis Ulcerosa (CU) y Enfermedad de Crohn (EC). Se excluyeron del estudio pacientes de ascendencia no española y de etnia gitana. También se excluyeron del estudio pacientes diagnosticados de Colitis Indeterminada (CI).

Como población control se seleccionaron 636 individuos sanos procedentes del Banco Regional de donantes de médula ósea. Se tuvo especial cuidado en que esta población control fuera lo más representativa posible de nuestro entorno, eliminando aquellas personas de ascendencia no española, de etnia gitana, familiares entre sí e intentando mantener la proporción de hombres y mujeres. Como puede observarse en la Tabla 8, donde se muestra la distribución de las tres poblaciones según el sexo, en ambas poblaciones de enfermos el porcentaje de hombres es mayor que el de mujeres, al contrario de lo que ocurre en la población control. Al comparar las proporciones de hombres y mujeres en enfermos y controles mediante un análisis estadístico, se pudo observar que el hecho de ser hombre era un factor de riesgo tanto para sufrir CU como EC, o, lo que es lo mismo, el hecho de ser hombre aumentaba las probabilidades de sufrir EII.

Tabla 8. Distribución de los pacientes de Colitis Ulcerosa (CU) y Enfermedad de Crohn (EC) y controles por sexo

Sexo	Controles n (%)	CU n (%)	EC n (%)
Hombres	267 (42,0%)	187 (55,0) ^a	202 (54,4) ^b
Mujeres	369 (58,0%)	153 (45,0)	169 (45,6)

^a CU vs. Control: $P < 0,001$; OR (IC95%) $\hat{\phi} = 1,689$ (1,295-2,203)

^b EC vs Control: $P < 0,001$; OR (IC95%) $\hat{\phi} = 1,652$ (1,276-2,138)

Según los criterios de la clasificación de Montreal los pacientes con EC se deben dividir en tres grupos dependiendo de la edad a la que fueron diagnosticados. A pesar de que este criterio no se incluye en el caso de la CU según la reunión de Montreal, en nuestro estudio se han clasificado todos los pacientes, tanto con EC como con CU, por grupos de edad. En ambas enfermedades la dispersión en la edad al diagnóstico fue muy elevada: había casos en los que enfermedad debutaba en la infancia y casos diagnosticados en la tercera edad. En la EC encontramos más casos en la infancia y bastantes menos en edades superiores a 40 años que en la CU (Tabla 9).

Tabla 9. Distribución de la población de pacientes de Colitis Ulcerosa (CU) y Enfermedad de Crohn (EC) según la edad al diagnóstico

Grupo de edad	CU n (%)	EC n (%)
0-16	22 (6,5)	33 (8,9)
17-40	194 (57,1)	239 (69,8)
>40	124 (36,5)	79 (21,3)

La distribución de edad de los dos grupos de pacientes pueden observarse en el Gráfico 1. La edad media de diagnóstico de nuestros pacientes con colitis ulcerosa fue de 36,97 y la enfermedad de Crohn de 31,48, si bien, al haber mucha dispersión (edad mínima y máxima de 5 y 83 en CU y de 10 y 80 en EC), es más conveniente fijarse en la mediana (34 años en la CU y 28 en la EC) para poder comparar ambas poblaciones.

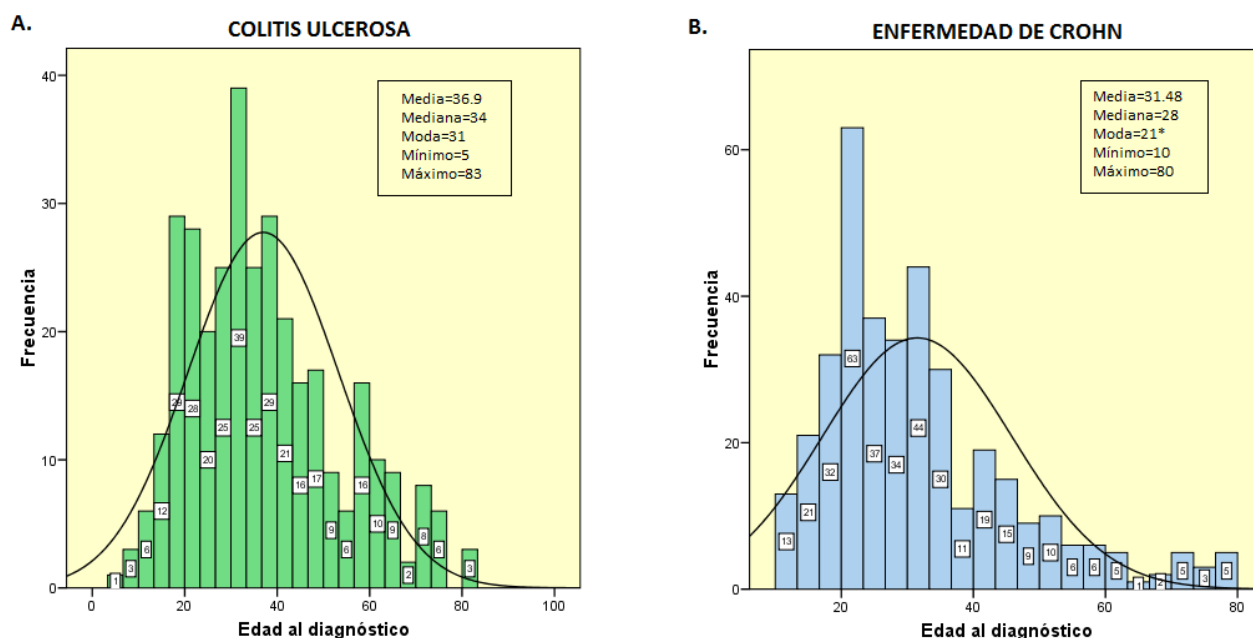


Gráfico 1. Distribución de la edad al diagnóstico de pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. Se muestra la curva de normalidad.

*Existen varias modas (se muestra la menor de ellas)

En pacientes con colitis ulcerosa, según el test de U de Mann Whitney, el sexo influye en la edad al diagnóstico ($P=0,014$): mientras que en mujeres la edad media de diagnóstico es 34,7 años y la mediana 32, en hombres la media es de 38,8 y la mediana de 36 años. Dentro del grupo de pacientes con enfermedad de Crohn también se observan diferencias al realizar el test de U de Mann Whitney ($P=0,009$). En este caso, al contrario de lo observado en la CU, en los hombres la edad de diagnóstico es más temprana (media y mediana 30,3 y 26,5 años respectivamente) que en mujeres (media y mediana 32,9 y 31 años respectivamente).

Siguiendo de nuevo los criterios de la clasificación de Montreal, se subdividió a la población de enfermos en grupos dependiendo de la localización: proctitis, colitis distal y pancolitis (Tabla 10) para enfermos de CU y colónica, ileocólica, ileal o del TDS para enfermos de EC (Tabla 11). El grupo dentro del que se engloba un paciente en el momento del diagnóstico puede variar a lo largo de la evolución de la enfermedad; para este estudio se ha clasificado al paciente según las últimas pruebas de imagen, de anatomía patológica y el último informe clínico. La mayoría de los pacientes con CU (42,4%) tenía afectación de todo el colon, un 39,4% del colon izquierdo y sólo un 18,2% afectación exclusiva del recto.

Tabla 10. Localización y evolución de la enfermedad en pacientes con Colitis Ulcerosa

		Montreal	n (%)
Localización	Proctitis	E1	62 (18,2)
	Colitis Distal	E2	134 (39,4)
	Pancolitis	E3	144 (42,4)
Evolución	Aguda fulminante		1 (0,3)
	Crónica continua		71 (20,9)
	Crónica intermitente		268 (78,8)

Otro criterio clasificatorio empleado en este estudio para los pacientes con CU es si la evolución de la enfermedad es intermitente o continua. La mayoría de los pacientes (casi un 80%) presentó una evolución intermitente y sólo se registró un caso de colitis aguda fulminante (Tabla 10).

En la mayoría de pacientes con enfermedad de Crohn (Tabla 11) se observó una afectación exclusiva del ileon terminal (40,2%), en un 36,4% afectación de colon e ileon y localización exclusivamente colónica en un 19,4% de los casos. Un 4% de los pacientes, además, tenía afectado algún tramo del TDS, generalmente el estómago. La clasificación de Montreal también establece que los enfermos deben agruparse dependiendo del patrón clínico que presenten. En nuestro caso, la mayoría de los pacientes evolucionó con un patrón no fistulizante/no estenosante o inflamatorio (51,5%), un 18,9% con un patrón estenosante y un 29,6% con un patrón fistulizante. Cabe destacar que algunos pacientes podrían catalogarse dentro de un grupo “fistulizante/estenosante”; en este caso los hemos incluido en fistulizante. Al igual que en el caso de la CU, la mayoría de los pacientes mostró una evolución intermitente (77,9%).

Tabla 11. Localización de las lesiones en Enfermedad de Crohn, patrón clínico y evolución de los pacientes

		n (%)		n (%)	
Localización	Ileal	154 (41,5)	Ileon	L1	149 (40,2)
	Colónica	76 (20,5)	Ileon + TDS	L1 + L4	5 (1,3)
			Colon	L2	72 (19,4)
			Colon + TDS	L2 + L4	4 (1,1)
Ileocólica	141 (38,0)	Ileocólica	L3	135 (36,4)	
			Ileocólica + TDS	L3 + L4	6 (1,6)
Patrón evolutivo	Inflamatorio	B1	191 (51,5)		
	Estenosante	B2	70 (18,9)		
	Fistulizante	B3	110 (29,6)		
Evolución	Intermitente		289 (77,9)		
	Continua		82 (22,1)		

TDS=Tracto Digestivo Superior

Se observaron diferencias destacables en cuanto a la presencia de complicaciones digestivas en enfermos con CU con respecto a enfermos con EC. Si entendemos por complicación digestiva las que se reflejan en la Tabla 12, el 49,6% de los pacientes con EC ha sufrido este tipo de complicaciones en algún momento mientras que tan solo han aparecido en el 12,4% de los pacientes con CU. La aparición de fístulas y abscesos fue muy común dentro de la población de pacientes con EC (41,5 y 29,6% de los pacientes, respectivamente); en pacientes con CU, por el contrario, sólo el 4,1% presentó fístulas en algún momento de la enfermedad. Algo similar ocurre con la presencia de abscesos (4,1% en CU y 29,6% en EC) o la Epa (19,4% de pacientes con EC y 3,5% en pacientes con CU). La perforación intestinal es otra de las complicaciones graves asociadas a EII: en este caso también fue más frecuente en pacientes con EC que en pacientes con CU. Sin embargo, la presencia de microcolon en algún momento de la enfermedad fue más frecuente en CU que en EC en nuestra población (3,2% en CU y 0,5% en EC). Afortunadamente tan sólo se detectaron 8 casos de cáncer de colon en nuestra población de enfermos; todos excepto uno fueron secundarios a la colitis ulcerosa.

Tabla 12. Complicaciones digestivas observadas en pacientes con Colitis Ulcerosa (CU) y Enfermedad de Crohn (EC)

Complicación	CU n (%)	EC n (%)
Epa	12 (3,5)	72 (19,4)
Microcolon	11 (3,2)	2 (0,5)
Megacolon tóxico	2 (0,6)	2 (0,5)
Perforación	6 (1,8)	22 (5,9)
Abscesos	14 (4,1)	110 (29,6)
Fístulas	14 (4,1)	154 (41,5)

Epa=Enfermedad perianal

En nuestros pacientes se demostró la relación entre la aparición de complicaciones digestivas y la localización de la enfermedad. La localización pancolónica se relacionó con la aparición de complicaciones digestivas, fístulas y abscesos principalmente, en pacientes con CU, ya que el 17,4% de estos pacientes las sufrió mientras que sólo el 8,7% del resto de pacientes las desarrolló ($P=0,016$; $OR=2,212$). En pacientes con EC fístulas y abscesos aparecieron con la misma frecuencia independientemente de la localización de las lesiones. Sin embargo, sí que se observaron diferencias al analizar asociación entre localización y Epa. Hasta un 31,6% de los pacientes con localización colónica ha desarrollado Epa mientras que sólo un 16,3% de los pacientes con localización ileal o ileocólica ($P=0,003$; $OR=2,375$).

Debido en gran parte a las complicaciones más graves, en ocasiones fue necesaria la intervención quirúrgica. Como ya se comentó en el Apartado 3.1, se han subdividido las cirugías a las que se han sometido los pacientes en dos grandes grupos: resección intestinal y cirugía de fístulas y abscesos. Nuevamente se observaron diferencias en cuanto a la gravedad de las enfermedades en nuestra población de pacientes (Tabla 13): más de la mitad de los pacientes con EC tuvieron que ser intervenidos mientras que sólo un 11,5% de pacientes con CU se sometió a cirugía.

Tabla 13. Necesidad de cirugía en pacientes con Colitis Ulcerosa (CU) y Enfermedad de Crohn (EC)

		CU n (%)	EC n (%)		CU n (%)*	EC n (%)*
Necesidad de CIRUGÍA	SI	39 (11.5)	187 (50.4)	Resección	19 (5.6)	121 (32.6)
				Fistulectomía o drenaje	23 (6.8)	110 (29.6)
	NO	301 (88.5)	184 (49.6)			

*Los porcentajes se refieren a los pacientes que se han sometido a ese tipo de cirugía con respecto a la población total de pacientes. Un mismo paciente puede haber tenido que someterse a ambos tipos de cirugía.

Además de las complicaciones digestivas ya mencionadas, se examinó la presencia de manifestaciones extradigestivas (MED) (Tabla 14): un 33,2% de pacientes con CU y más del 40% de pacientes con EC presentaron alguna MED durante el curso de su enfermedad. Es común que un paciente no sólo manifieste una sino varias. Se subdividieron en articulares, dérmicas, oculares, hepatobiliares y complicaciones tromboembólicas.

Tabla 14. Manifestaciones extradigestivas observadas en pacientes con Colitis Ulcerosa (CU) y Enfermedad de Crohn (EC)

	CU n (%)	EC n (%)		CU n (%)*	EC n (%)*		CU n (%)*	EC n (%)*
SI	113 (33.2)	156 (42.0)	Articulares	66 (19,4)	51 (13,7)	Artritis periférica	57 (16,8)	39 (10,5)
						Espondilitis	7 (2,1)	11 (3,0)
Sacroileitis	13 (3,8)	9 (2,4)						
MED			Dérmicas	21 (6,2)	47 (12,7)	Pioderma gangrenoso	4 (1,2)	4 (1,1)
						Eritema nodoso	5 (1,5)	22 (5,9)
						Aftas orales	15 (4,4)	22 (5,9)
						Síndrome Sweet	2 (0,6)	4 (1,1)
			Hepatobiliares	40 (11,8)	76 (20,5)	CEP	4 (1,2)	1 (0,3)
						Colelitiasis	17 (5,0)	40 (10,8)
						Esteatosis	24 (7,1)	46 (12,4)
			Oculares	11 (3,2)	9 (2,4)	Uveitis	8 (2,4)	5 (1,3)
						Episcleritis	1 (0,3)	1 (0,3)
						Blefaritis	3 (0,9)	2 (0,5)
CTE						10 (2,9)	21 (5,7)	
NO	227 (66.8)	215 (58.0)						

MED=Manifestaciones extradigestivas; CEP=Colangitis Esclerosante Primaria; CTE=Complicaciones Tromboembólicas

*Los porcentajes siempre se refieren al total de la población de pacientes en cada caso, ya que un mismo paciente puede presentar varias MED

En el caso de la colitis ulcerosa las manifestaciones más frecuentes fueron las articulares (19,4%) y dentro de ellas la artritis periférica (16,8%). Por dificultades a la hora de la recogida de datos no se distinguió en este trabajo entre artritis periférica de tipo 1 y de tipo 2, pero en la mayoría de los casos se trataba de artritis mono o *pauci*-articular. El 17,4% de los pacientes con CU sufrió Enfermedad Metabólica Ósea (EMO), ya sea osteoporosis, osteopenia o ambas; aunque podría incluirse dentro de las MED se ha decidido excluir del estudio porque está muy condicionada tanto por el tratamiento recibido (sobre todo corticoideo) como por el sexo del paciente. El siguiente grupo de MED más frecuente fue el de las hepatobiliares (11,8%), donde se incluye esteatosis hepática, colelitiasis y CEP (en ese orden de frecuencia en nuestra población de pacientes con CU). Las manifestaciones dermatológicas aparecieron en un 6,2% de los pacientes con CU; las más destacadas fueron las lesiones de la mucosa oral (4,4%, sobre todo en forma de aftas orales), pioderma gangrenoso (1,2%) y eritema nodoso (1,5%). Sólo dos pacientes de los incluidos en el estudio desarrollaron síndrome de Sweet. Dentro de las MED oculares destacó la uveítis, presente en el 2,4% de los pacientes. Por último, la aparición de complicaciones tromboembólicas se observó en el 2,9% de los pacientes, bien en forma de tromboembolismo pulmonar (TEP), tromboembolismo venoso profundo (TVP) o tromboflebitis.

Como ya se ha comentado, casi la mitad de los pacientes con enfermedad de Crohn sufrió algún tipo de MED. Las más frecuentes fueron las hepatobiliares, y dentro de ellas la esteatosis hepática (12,4% de los pacientes). Las segundas en importancia fueron las que afectan al aparato músculo-esquelético, siendo la más frecuente, como ocurría en pacientes con CU, la artritis periférica. En este caso tampoco se tiene en cuenta la aparición de EMO (14,6% de los pacientes con EC). La incidencia de alteraciones dérmicas secundarias a la EC fue más del doble que el caso de enfermos con CU (aftas orales, eritemas nodoso, pioderma gangrenoso y síndrome de Sweet, ordenados de la más frecuente a la menos frecuente). Algo parecido ocurrió con las complicaciones tromboembólicas: el 5,7% de los pacientes con EC sufrió algún tipo de episodio de este tipo, casi el doble que en el caso de la CU. Por el contrario, las manifestaciones oculares fueron ligeramente más frecuentes en CU que en EC (2,4% de los pacientes con EC).

En la Tabla 15 se muestra el tratamiento recibido en algún momento de su enfermedad por los pacientes de este estudio. Prácticamente la totalidad de los pacientes (99,4% en CU y 93,3% en EC) han sido tratados con salicilatos, generalmente mesalazina. En muchos casos este tratamiento mantenido controla la enfermedad, usando corticoides en pauta descendente en el momento del brote (67,1% en la CU y 73% en la EC); otros permanecen asintomáticos aún tras la retirada de los salicilatos y otros necesitan de un tratamiento complementario o sustitutivo para controlar la aparición de brotes (inmunosupresores, terapia biológica, cirugía).

Tabla 15. Tratamiento suministrado a los pacientes con Colitis Ulcerosa (CU) y Enfermedad de Crohn (EC)

		CU	EC
		n (%)*	n (%)*
Salicilatos		338 (99,4)	346 (93,3)
Corticoides		228 (67,1)	271 (73,0)
Inmunosupresores	Azatioprina	82 (24,1)	207 (55,8)
	Mercaptopurina	27 (7,9)	58 (15,6)
	Tacrolimus	6 (1,8)	4 (1,1)
	Ciclosporina	12 (3,5)	1 (0,3)
	Metotrexato	2 (0,6)	22 (5,9)
Biológicos	Infliximab	36 (10,6)	82 (22,1)
	Adalimumab	5 (1,5)	57 (15,4)
	Otros	1 (0,3)	3 (0,9)
Granulocitoaféresis		2 (0,6)	2 (0,5)

*Los porcentajes siempre se refieren al total de la población de pacientes ya que la mayoría han recibido más de un tratamiento a lo largo de su enfermedad.

El 35,3% de los pacientes de colitis ulcerosa y el 67,9% de pacientes con enfermedad de Crohn, casi del doble, necesitó en algún momento la administración de inmunosupresores. Generalmente se emplearon tiopurinas (azatioprina o mercaptopurina) que podrán reemplazar a la mesalazina o administrarse conjuntamente. El uso de otros inmunosupresores diferentes a las tiopurinas fue mucho menos frecuente, empleándose únicamente en casos puntuales de enfermedad complicada y refractaria al tratamiento. La estrategia terapéutica en estos casos fue diferente en el caso de la EC y la CU: mientras que en pacientes con EC se empleó metotrexato (5,9%), en el caso de la CU fue la ciclosporina el inmunosupresor elegido (3,5%). El tratamiento con tiopurinas puede producir daños a nivel pancreático o hepático por eso es importante tener en cuenta si las complicaciones hepatobiliares se deben a una manifestación extraintestinal de la EII o son un efecto secundario del tratamiento recibido. Al analizar la aparición de MED hepatobiliares en relación al tratamiento no encontramos diferencias en CU: la frecuencia de aparición de estas complicaciones es idéntica en pacientes que han recibido tratamiento con tiopurinas y en los que no (11,8% en ambos casos). Sin embargo, en pacientes con EC que han recibido tratamiento con azatioprina o mercaptopurina vemos un ligero aumento de las complicaciones hepatobiliares (23,5% vs. 14,8%). Estas diferencias no llegan a ser significativas ($P=0,051$) por lo que podríamos atribuir las al azar, si bien es importante tener el tratamiento en cuenta a la hora del análisis multivariable.

El uso de biológicos en pacientes con CU fue necesario en el 11,2% de los casos: el más usado es el infliximab (anti-TNF α , empleado en el 10,6% de los pacientes) o el adalimumab (anti-TNF- α , usado únicamente en el 1,5% de los casos, generalmente cuando falla el infliximab o se muestran reacciones adversas). En este estudio, además, un paciente recibió otro tratamiento biológico diferente (golimumab) por intolerancia a infliximab y adalimumab y refractariedad de la enfermedad. Dada la mayor frecuencia de aparición de complicaciones graves, tanto digestivas como extradigestivas, el manejo terapéutico de la EC es más complicado y hasta en el 29,4% de los casos tuvo que

administrarse terapia biológica. De nuevo el más usado es el infliximab (22,1% de los pacientes), seguido por adalimumab (15,4% de los pacientes). En el caso de la EC, tres pacientes recibieron otro tratamiento biológico diferente: rituximab, etanercept y certolizumab, prescritos por otros servicios para controlar diferentes patologías o refractariedad e intolerancia al tratamiento. Por último, dos pacientes con CU y dos pacientes con EC se sometieron a granulocitoaféresis, también por falta de respuesta al tratamiento.

4.2 HLA Y LA EII

Se han incluido en el estudio los genes *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DRB1* y *HLA-DQB1*. En primer lugar se comprobó la existencia de EHW en la población control para los genes estudiados (Tabla 16) mediante la prueba de razón de verosimilitudes. Se consideró que la población estaba en EHW cuando el p -valor $> 0,05$.

Tabla 16. Estudio del Equilibrio de Hardy-Weinberg para los genes *HLA* en la población control

	G²	P
<i>HLA-A</i>	149,356	0,987
<i>HLA-B</i>	306,649	0,760
<i>HLA-C</i>	89,684	0,519
<i>HLA-DRB1</i>	65,914	0,834
<i>HLA-DQB1</i>	9,347	0,499

Se realiza la prueba de Razón de Verosimilitudes y se considera que la población está en equilibrio cuando $P > 0,05$

A continuación se detallan, por orden de importancia, los hallazgos más relevantes en nuestra población. Las frecuencias alélicas de todos los genes *HLA* en las dos poblaciones de enfermos y en la población control pueden ser consultadas en el ANEXO, dentro del apartado 8.2.

4.2.1 Relación de *HLA-DRB1*01:03* y *HLA-DQB1*05:01* con la EII

Una de las asociaciones más importantes encontradas en este estudio entre los genes situados en la región MHC y la EII fue la relación entre *HLA-DRB1*01:03* y un mayor riesgo de desarrollar tanto CU como EC. Como puede consultarse en la Tabla suplementaria 5 y la Tabla suplementaria 6, la frecuencia de este alelo en pacientes fue hasta cuatro veces superior en el caso de la CU (4,1%) y más de tres veces en el caso de la EC (3,3%) que en población control (1%). De acuerdo con los valores de OR (Tabla 17), la asociación de *DRB1*01:03* con la CU fue la más fuerte descrita en nuestra población, mientras que en el caso de la EC sólo fue superada por la asociación con *NOD2*.

Tabla 17. Asociaciones encontradas entre *HLA-DRB1*01:03* y mayor riesgo de desarrollar enfermedad inflamatoria intestinal y con el fenotipo

		<i>HLA-DRB1*01:03</i> n (%)	<i>P_c</i>	Odds ratio (IC95%)
CU	Colitis Ulcerosa	30 (4,1)	<0,001	4,846 (2,465-9,529)
	Fístulas	6 (21,4)	0,022*	7,136 (2,650-19,215)
EC	Enfermedad de Crohn	26 (3,3)	<0,001	3,510 (1,745-7,061)
	EC colónica	11 (7,2)	0,002**	3,463 (1,519-7,892)

CU=Colitis ulcerosa; EC=Enfermedad de Crohn; *P_c*=*P* tras la corrección de Bonferroni; IC=Intervalo de Confianza

**DRB1*01:03* vs. resto de alelos, fístulas vs. no fístulas

***DRB1*01:03* vs. resto de alelos, EC colónica vs. EC ileal+ileocólica

En relación al fenotipo de la CU, el alelo *HLA-DRB1*01:03* fue más frecuente en pacientes que presentan algún tipo de complicaciones digestivas y dentro de los que han necesitado colectomía, sin embargo las diferencias tan sólo continuaron tras la corrección estadística en el caso de la presencia de fístulas (Tabla 17): la frecuencia del alelo alcanzó el 21,4% dentro de los pacientes con CU que desarrollaron fístulas, mientras que fue de 3,7% en el resto de enfermos. Tras la realización de un análisis multivariable, en el que se introdujeron la edad, el sexo, la localización y el alelo *DRB1*01:03* como variables independientes, se confirmó la asociación de este alelo con la aparición de fístulas ($P<0,001$; OR=8,037). Además, la frecuencia del alelo *DRB1*01:03* fue mayor en relación con otras variables como evolución continua, artritis periférica o MED, por lo que también se observó un aumento de necesidad de tratamiento inmunosupresor con respecto al resto de los pacientes con CU, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas tras la corrección de Bonferroni en este caso.

Por otro lado, en pacientes con EC, el alelo *DRB1*01:03* se asoció con localización colónica (Tabla 17): la frecuencia del alelo en enfermos con afectación exclusivamente colónica fue de 7,2% y en pacientes con afectación ileal o ileocólica fue de 2,2%. Al realizar el análisis multivariable, con edad, sexo y patrón evolutivo como variables independientes, se confirmó la asociación de *HLA-DRB1*01:03* con la afectación del colon ($P=0,003$; OR=3,772). En este caso no se observó relación entre el alelo y la aparición de complicaciones digestivas o el tratamiento.

El alelo *DRB1*01:03* se encuentra en LD con *HLA-DQB1*05:01* (Tabla suplementaria 13). El haplotipo *DRB1*01:03/DQB1*05:01* se asoció con mayor riesgo de desarrollar CU ($P<0,001$; OR=4,704) y EC ($P=0,036$; OR=3,044), sin embargo ni *HLA-DQB1*05:01* por separado ni los haplotipos que forma con otros *HLA-DRB1* se relacionaron con la EII. En pacientes con CU, este alelo se asoció además con la aparición de complicaciones digestivas, como fístulas ($P=0,005$; OR=3,731), y con la necesidad de cirugía ($P=0,020$; OR=2,265). Tras la realización del análisis multivariable, incluyendo sexo, edad, localización y *DRB1*01:03* y *DQB1*05:01* como covariables, ambos alelos continuaron estando asociados con la aparición de fístulas ($P_{DRB1*01:03}=0,006$ y $P_{DQB1*05:01}=0,015$). Por otro lado, mientras que la frecuencia del haplotipo *DRB1*01:03/DQB1*05:01* fue mayor en pacientes con fístulas (11,5% vs. 4%), no se

observó un aumento de la frecuencia en el resto de haplotipos de los que forma parte *DQB1*05:01* en estos pacientes. La asociación de este alelo con la necesidad de cirugía fue secundaria a la presencia de complicaciones digestivas ($P=0,179$ tras la regresión logística).

4.2.2 Asociación de *HLA-C*12:02* y *HLA-DRB1*15:02* con la CU

En nuestra población, el alelo *HLA-C*12:02* se asoció con un mayor riesgo de desarrollar CU (Tabla 18); la frecuencia de este alelo en pacientes fue significativamente mayor que en la población control (4,5% vs. 1,8%), y, según la OR, el riesgo de desarrollar la enfermedad es más del doble en presencia de *C*12:02*. La frecuencia de *HLA-B*52:01* fue también mayor en pacientes que en controles, sin embargo no se apreciaron diferencias tras la corrección estadística. Ambos alelos se encuentran en estrecho LD ($r^2=0,738$ en población control), y la frecuencia del haplotipo formado por ambos fue el doble en pacientes con CU que en controles (Tabla suplementaria 11), aunque la asociación de este haplotipo con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad no pudo demostrarse estadísticamente ($P_c > 0,05$).

Tabla 18. Comparación de las frecuencias de los alelos *HLA-B*52:01*, *HLA-C*12:02*, *HLA-DRB1*15:02* y *HLA-DQB1*06:01* entre pacientes con Colitis Ulcerosa (CU) y población control

Alelo	Control n (%)	CU n (%)	P	P _c	Odds ratio (IC95%)
<i>HLA-B*52:01</i>	19 (1,5)	21 (3,1)	0,018	NS	
<i>HLA-C*12:02</i>	23 (1,8)	30 (4,5)	0,001	0,016	2,538 (1,462-4,405)
<i>HLA-DRB1*15:02</i>	16 (1,3)	41 (5,7)	<0,001	<0,001	3,246 (1,736-6,067)
<i>HLA-DQB1*06:01</i>	14 (1,1)	24 (3,5)	<0,001	<0,001	3,287 (1,689-6,398)

Se realiza test de χ^2 , o test exacto de Fisher cuando fue necesario, y se considera que existen diferencias significativas cuando $P < 0,05$. $P_c = P$ tras la corrección de Bonferroni; IC=Intervalo de Confianza; NS=No significativo

Los alelos *DRB1*15:02* y *DQB1*06:01* también se asociaron con la CU en nuestra población (Tabla 18), ya que en ambos casos las frecuencias alélicas en pacientes prácticamente triplicaron a las encontradas en controles. Estos alelos se encuentran en LD ($r^2=0,874$ en controles) y el haplotipo *DRB1*15:02/DQB1*06:01* también se asoció con mayor riesgo de CU en nuestro estudio [1,1% vs. 3,4%; $P_c=0,025$; OR (IC95%)=3,133 (1,592-6,165)]. No se han encontrado en nuestra población otros haplotipos con frecuencia superior al 1% de los que formen parte estos alelos; al realizar un análisis multivariable incluyendo ambos alelos como covariables, la asociación de *DRB1*15:02* continuó ($P=0,004$) mientras que la de *DQB1*06:01* no ($P > 0,05$).

Ya que en este estudio no se han construido haplotipos completos que incluyan todos los genes *HLA*, para determinar si la asociación de *C*12:02* o *DRB1*15:02* se debe al LD existente entre ambos, se realizó una nueva regresión logística introduciendo ambos alelos como covariables y la CU como variable dependiente: tras este análisis multivariable se confirmó la asociación independiente de ambos alelos con la enfermedad.

4.2.3 Otros alelos relacionados con la CU o con su fenotipo

En población control, la frecuencia del alelo *DRB1*03:01* fue casi del 12% mientras que en pacientes no llegó al 7% (Tabla 19). Tras el análisis estadístico, la OR indicó el papel protector de este alelo frente a la CU en nuestra población. El alelo *HLA-DQB1*02:01* también resultó ser protector frente a la enfermedad en nuestro estudio ($P_c=0,026$; $OR=0,598$); ambos alelos se encuentran en LD prácticamente completo tanto en población control como en pacientes con CU ($r^2=0,955$ y $r^2=0,957$, respectivamente) y, como cabría esperar, el haplotipo *DRB1*03:01/DQB1*02:01* era protector frente a la CU en nuestra población [6,9% vs. 11,4%; $P_c=0,048$; OR (IC95%)=0,575 (0,406-0,815)]. Tras la realización del análisis multivariable incluyendo ambos alelos como variables independientes, se demostró el papel protector de *DRB1*03:01* ($P=0,002$) pero *DQB1*02:01* fue eliminado de la ecuación ($P>0,05$).

Tabla 19. Otros alelos relacionados con Colitis Ulcerosa (CU)

Alelo	Control n (%)	CU n (%)	P_c	Odds ratio (IC95%)
<i>DRB1*03:01</i>	147 (11,6)	50 (6,9)	0,044	0,581 (0,414-0,817)
<i>DRB1*11:01</i>	86 (6,8)	74 (10,2)	0,044	1,659 (1,196-2,300)
<i>DQB1*02:01</i>	149 (11,7)	50 (7,4)	0,026	0,598 (0,428-0,836)

Se realiza test de χ^2 , o test exacto de Fisher cuando fue necesario, y se considera que existen diferencias significativas cuando $P<0,05$. $P_c=P$ tras la corrección de Bonferroni; IC=Intervalo de Confianza; NS=No significativo

El alelo *DRB1*11:01* también se asoció con la CU en nuestra población (Tabla 19). La frecuencia de este alelo en controles sanos fue de 6,8% mientras que en pacientes alcanzó el 10,2%, y, tal y como indica el valor de OR, la asociación de este alelo con un mayor riesgo de desarrollar CU fue más débil que en los casos anteriores. El haplotipo *HLA-DRB1*11:01/DQB1*03:01* también se asoció con un mayor riesgo de desarrollar CU [$P_c=0,025$; OR (IC95%)=1,725 (1,239-2,403)]; ni *DQB1*03:01*, alelo en LD con *DRB1*11:01*, ni los haplotipos que forma con otros alelos *HLA-DRB1*, se asociaron con la CU en nuestra población.

4.2.4 Otros alelos relacionados con la EC o con su fenotipo

Además de la asociación de *DRB1*01:03*, se han relacionado otros alelos con la EC en nuestra población (Tabla 20). La frecuencia del alelo *HLA-A*29:02* fue significativamente mayor en pacientes que en controles (9,5% vs. 5,7%), mientras que el alelo *HLA-A*29:01* fue mucho menos frecuente en pacientes (tan sólo presente en uno de ellos) y resultó ser protector frente a la enfermedad. Dentro de los genes de *HLA* de clase I, también se describió la asociación de *B*49:01* con mayor riesgo de desarrollar EC en nuestra población, ya que su frecuencia fue más del doble en pacientes que en controles. *B*49:01* se encuentra en LD con *C*07:01* y con *MICA*A6* (Tabla suplementaria 11 y Tabla suplementaria 12) y las frecuencias de los haplotipos que forma con cada uno de ellos fueron mayores en pacientes que en controles, aunque en el caso de *HLA-C* las diferencias desaparecieron tras la corrección (4,2% vs. 2,1%; $P=0,009$; $P_c>0,050$). El

haplotipo *B*49:01/MICA*A6* sí que se asoció con mayor riesgo de EC [$P_c=0,005$; OR (IC95%)=2,432 (1,501-3,942)] pero no así los haplotipos formados por *MICA*A6* y otros alelos *HLA-B* con los que se encuentra en LD.

Tabla 20. Otros alelos relacionados con Enfermedad de Crohn (EC)

Alelo	Control n (%)	EC n (%)	P	P _c	Odds ratio (IC95%)
<i>A*29:01</i>	28 (2,2)	1 (0,1)	<0,001	0,003	0,061 (0,008-0,446)
<i>A*29:02</i>	73 (5,7)	70 (9,5)	<0,001	0,016	1,732 (1,231-2,436)
<i>B*49:01</i>	33 (2,6)	40 (5,4)	0,001	0,021	2,164 (1,352-3,463)
<i>DRB1*01:01</i>	103 (8,1)	33 (4,2)	0,002	0,044	0,528 (0,353-0,790)
<i>DRB1*07:01</i>	209 (16,4)	162 (20,8)	0,005	NS	

Se realiza test de χ^2 , o test exacto de Fisher cuando fue necesario, y se considera que existen diferencias significativas cuando $P < 0,05$. $P_c = P$ tras la corrección de Bonferroni; IC=Intervalo de Confianza; NS=No significativo

Se describió el papel protector del alelo *HLA-DRB1*01:01* frente a la EC en nuestra población, siendo la frecuencia de éste casi la mitad en pacientes que en controles (4,2% vs. 8,1%). Al igual que *DRB1*01:03*, *DRB1*01:01* también se encuentra en estrecho LD con *DQB1*05:01*, y el haplotipo *DRB1*01:01/DQB1*05:01* fue protector frente a la enfermedad [$P_c=0,024$; OR (IC95%)=0,506 (0,333-0,769)]. Por otro lado, el alelo *DRB1*07:01* fue más frecuente en pacientes que en controles (20,8% vs. 16,4%); sin embargo, tras la corrección las diferencias estadísticas desaparecieron ($P=0,005$; $P_c > 0,050$).

Con respecto al fenotipo, se encontraron algunas relaciones en nuestra población de pacientes con EC que merece la pena destacar. El alelo *HLA-A*11:01* fue protector frente a la aparición de complicaciones digestivas, como fístulas o abscesos [$P_c=0,032$; OR (IC95%)=0,347 (0,172-0,701)], lo que significa que pacientes portadores de dicho alelo tienen menos probabilidad de sufrir este tipo de complicaciones. En relación al tipo de EC según la localización de las lesiones, la frecuencia del alelo *DRB1*07:01* fue mayor en pacientes con EC ileal que en el resto (25,3% vs. 18,7%); sin embargo, las diferencias no continuaron tras la corrección de Bonferroni ($P=0,029$; $P_c > 0,050$).

El alelo *DRB1*14:01* se asoció con la presencia de MED hepatobiliares en nuestra población, principalmente esteatosis, ya que su frecuencia fue mucho mayor en pacientes con esta complicación que en los que no la sufren [8,6% vs. 2,4%; $P_c < 0,001$; OR (IC95%)=3,848 (1,769-8,371)]. Por otro lado, el alelo *DQB1*05:03* también se asoció con la aparición de MED hepatobiliares [11,2% vs. 2,7%; $P_c < 0,001$; OR (IC95%)=4,518 (2,226-9,170)]. *HLA-DRB1*14:01* y *DQB1*05:03* están en estrecho LD (Tabla suplementaria 13) y el haplotipo formado por ambos fue más frecuente en pacientes con esteatosis (7,8% vs. 2,7%) aunque las diferencias no continuaron tras la corrección ($P=0,023$; $P_c > 0,050$). Al realizar una regresión logística incluyendo ambos alelos junto con edad, sexo y tratamiento con tiopurinas como variables independientes y la aparición de MED hepatobiliares como variable dependiente, se confirmó la asociación

de *DQB1*05:03* ($P<0,001$; $OR=4,643$), así como la del tratamiento con tiopurinas ($P<0,001$; $OR=2,310$), pero no la de *DRB1*14:01* ($P>0,05$).

4.3 MICA Y LA EII

De acuerdo con el tamaño en pares de bases (pb) de los productos de la PCR, se detectaron en total cinco alelos de *MICA*: *MICA*A4* (179pb), *MICA*A5* (182 pb), *MICA*A5.1* (183 pb), *MICA*A6* (185 pb) y *MICA*A9* (194 pb). Una vez más se demostró el EHW con respecto a los genotipos de *MICA* en la población control ($G^2=14,700$; $P=0,144$). Los resultados obtenidos en el tipaje del polimorfismo en la región TM de *MICA* se muestran en la Tabla suplementaria 9 y la Tabla suplementaria 10. En las tres poblaciones el alelo más común fue *MICA*A6* (35,9% en CU, 35,6% en EC y 34,3% en controles sanos).

4.3.1 Papel protector de *MICA*A4* frente a la CU

*MICA*A4* resultó ser protector frente a la colitis ulcerosa en nuestra población: la frecuencia del alelo fue significativamente menor en pacientes (10,6%) que en controles (15,6%), sugiriendo la OR el papel protector del mismo (Tabla 21). Al analizar genotipos, se observó que tan sólo dos pacientes portaban el genotipo homocigoto *MICA*A4/A4* (0,6%) mientras que éste estaba presente en un 1,9% de los controles sanos (Tabla suplementaria 9). A pesar de ser casi el doble la frecuencia del genotipo homocigoto en controles, no se pudo demostrar la diferencia estadísticamente.

Tabla 21. Frecuencias de *MICA*A4* y de los haplotipos *HLA-B*18:01/MICA*A4* y *HLA-B*27:05/MICA*A4* en población control y pacientes con Colitis Ulcerosa (CU)

	Control n (%)	CU n (%)	<i>Pc</i>	Odds Ratio (IC95%)
<i>MICA*A4</i>	193 (15,6)	73 (10,6)	0,015	0,643 (0,482-0,858)
<i>HLA-B*18/MICA*A4</i>	125 (10,1)	37 (5,7)	0,024	0,533 (0,364-0,779)
<i>HLA-B*27/MICA*A4</i>	30 (2,4)	3 (0,5)	0,046	0,185 (0,056-0,609)

Se realiza test de χ^2 , o test exacto de Fisher cuando fue necesario, y se considera que existen diferencias significativas cuando $P<0,05$. $Pc=P$ tras la corrección de Bonferroni; IC=Intervalo de Confianza

*MICA*A4* se encuentra en LD con *HLA-B*18:01* y con *HLA-B*27:05*, siendo el coeficiente de correlación de *HLA-B*18:01/MICA*A4* más del triple que el de *HLA-B*27:05/MICA*A4* en población de pacientes con CU ($r^2=0,512$ y $r^2=0,050$, respectivamente), tal y como se puede consultar en la Tabla suplementaria 12. La frecuencia de ambos alelos *HLA-B* fue menor en pacientes con CU que en controles, aunque las diferencias desaparecieron tras la corrección estadística (Tabla suplementaria 3). Al analizar haplotipos y comparar las frecuencias entre población de enfermos y población control, en ambos casos se observaron diferencias significativas por lo que ambos haplotipos se consideraron protectores frente a la enfermedad (Tabla 21).

Como ya se ha comentado al principio del capítulo de resultados (sección 4), tan sólo 7 de nuestros pacientes con colitis ulcerosa han desarrollado cáncer colorrectal. 5 de estos pacientes portaban *MICA*A4*, lo que conlleva un aumento de la frecuencia del alelo en este subgrupo. Sin embargo, la posible asociación de *MICA*A4* con cáncer de colon no se evidenció estadísticamente en nuestro estudio.

4.3.2 Relación de otros alelos de *MICA* y la EII

A pesar de no existir diferencias estadísticamente significativas, la frecuencia de *MICA*A5.1* fue mayor en pacientes con CU que en controles (28,2% y 25,1%, respectivamente), así como la del genotipo homocigoto *MICA*A5.1/A5.1* (Tabla suplementaria 9). Las frecuencias alélicas de *MICA*A6* fueron bastante similares en la población control y la población de pacientes con CU y no se apreciaron diferencias significativas. No obstante, una vez realizado el análisis de haplotipos *HLA-B/MICA*, se observó que la frecuencia de *HLA-B*52:01/MICA*A6* era significativamente mayor en pacientes que en controles [3,2% vs. 1,1%; $P_c=0,034$; OR (IC95%)=2,896 (1,462-5,733)]. Dado que *HLA-B*52:01* se encuentra a su vez en LD con *C*12:02* y previamente habíamos descrito la asociación de este alelo con la CU, se realizó un análisis multivariable incluyendo los tres alelos en la ecuación: la relación entre *B*52:01* y *MICA*A6* con mayor riesgo de desarrollar CU desapareció ($P>0,050$), mientras que la de *C*12:02* continuó ($P=0,001$).

Tras la estratificación de pacientes de acuerdo con el fenotipo, se encontraron algunas diferencias. No se observó asociación de *MICA*A5.1* con la edad al diagnóstico en pacientes con CU cuando se realizó el test de Kruskal-Wallis ($P=0,398$) pero al subdividir los pacientes por grupos de edad y comparar la frecuencia de *MICA*A5.1* entre ellos sí que se observaron diferencias: mientras que en el grupo 1 y 3 las frecuencias de *MICA*A5.1* fueron de 31,8% y 33,9% respectivamente, en el grupo 2 fue solamente de 24,2% (Tabla 22). Algo parecido ocurrió con el genotipo homocigoto *MICA*A5.1/A5.1*, para el que las frecuencias en el grupo 1, 2 y 3 fueron respectivamente 13,6%, 5,7%, 12,9%.

Tabla 22. Algunas características clínicas y su asociación con *MICA*A5.1* en pacientes con Colitis Ulcerosa (CU)

	<i>MICA*A5.1</i> n (%)	Otros alelos n (%)	<i>Pc</i>	<i>Odds ratio</i> (IC95%)
Edad al diagnóstico				
Grupo 1 + Grupo 3	98 (33,6)	194 (66,4)	0,035	1,580 (1,129-2,211)
Grupo 2	94 (24,2)	294 (75,8)		
Abscesos				
Abscesos	15 (53,6)	13 (46,4)	0,010	3,097 (1,445-6,638)
No abscesos	177 (27,1)	475 (72,9)		
Fístulas				
Fístulas	12 (42,9)	16 (57,1)	NS	
No fístulas	180 (27,6)	472 (72,4)		

Se muestra la frecuencia de *MICA*A5.1* y del resto de alelos *MICA* en cada subgrupo clínico. Se realiza test de χ^2 , o test exacto de Fisher cuando fue necesario, y se considera que existen diferencias significativas cuando $P < 0,05$. $P_c = P$ tras la corrección de Bonferroni; IC=Intervalo de Confianza; NS=No significativo

La presencia del alelo *MICA*A5.1* también se asoció en nuestra población de pacientes con CU con la aparición de abscesos (Tabla 22): el 7,8% de los pacientes portadores de este alelo desarrolló abscesos en algún momento de la enfermedad, mientras que esta complicación sólo apareció en el 2,7% del resto de enfermos. La frecuencia del alelo dentro del grupo de pacientes con abscesos fue superior al 50%, indicando la OR que *MICA*A5.1* es un factor de riesgo para desarrollar esta complicación. También se observó un aumento de la frecuencia en pacientes con fístulas, pero las diferencias desaparecieron tras la corrección de Bonferroni.

4.4 *NOD2* Y LA EII

Como ya se describió en la sección de METODOLOGÍA, se han estudiado tres polimorfismos en el gen *NOD2*: dos de ellos SNPs y otro una inserción. Previa al estudio de asociación, se comprobó que la población control se encontraba en EHW para los tres polimorfismos (Tabla 23) y se realizó un estudio de desequilibrio de ligamiento (LD) para cada par de loci, confirmándose el equilibrio en ambos casos.

Tabla 23. Estudio del equilibrio de Hardy-Weinberg para los tres polimorfismos de *NOD2* en la población control

Polimorfismo	χ^2	<i>P</i>
<i>rs2066844</i>	2,087	0,149
<i>rs2066845</i>	2,677	0,102
<i>rs2066847</i>	0,113	0,737

Se considera que la población está en equilibrio cuando $P > 0,05$

A lo largo del texto se hará referencia a estos polimorfismos en base a la nomenclatura que se maneja en la bibliografía o según el cambio que se produce en la proteína:

- *rs2066844*: *SNP8* o R702W
- *rs2066845*: *SNP12* o G908R
- *rs2066847*: *SNP13* o 1007insC

4.4.1 *NOD2* y la CU

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los tres polimorfismos en población control y colitis ulcerosa se pueden consultar en la Tabla 24. Estas frecuencias fueron bastante parecidas y, estadísticamente hablando, no se encontraron diferencias entre ambas poblaciones, ya que en todos los casos el valor de $P > 0,05$.

Tabla 24. Frecuencias alélicas y genotípicas de los tres polimorfismos estudiados para el gen *NOD2* en población control y Colitis Ulcerosa (CU)

Polimorfismo	Alelo/Genotipo	Control n (%)	CU n (%)
<i>SNP8</i>	C	1096 (96,3)	639 (94,8)
	T	42 (3,7)	35 (5,2)
	CC	529 (93,0)	303 (89,9)
	TT + CT	40 (7,0)	34 (10,1)
<i>SNP12</i>	C	23 (2,0)	6 (0,9)
	G	1125 (98,0)	668 (99,1)
	GG	552 (96,2)	331 (98,2)
	CC + CG	22 (3,8)	6 (1,8)
<i>SNP13</i>	-	1149 (98,5)	663 (98,1)
	C	17 (1,5)	13 (1,9)
	--	566 (97,1)	325 (96,2)
	CC + -C	17 (2,9)	13 (3,8)

Tras la realización del test de χ^2 , o test exacto de Fisher cuando fue necesario, no se encuentran diferencias significativas entre ambas poblaciones ($P > 0,05$)

Considerando todas las variantes de *NOD2* en conjunto, el 12,3% de los controles presentó alguna de las variantes mutadas mientras que el 15,3% de los pacientes con CU tenía *NOD2* mutado ($P = 0,184$).

4.4.2 *NOD2* y la EC

4.4.2.1 *NOD2* y riesgo de desarrollar EC

En el caso de la EC todas las variantes de *NOD2* estudiadas se asociaron con la enfermedad. Como puede observarse en la Tabla 25, en todos los casos la frecuencia del

RESULTADOS

alelo minoritario fue más del doble en pacientes, con valores de P y OR muy significativos. Fue especialmente llamativo el caso del polimorfismo *rs206684* (*SNP8*), para el que la frecuencia de pacientes portadores del alelo T (ya sea en heterocigosis u homocigosis) alcanzó un 19,2%, casi tres veces más que en controles. Para facilitar el estudio estadístico, para los tres polimorfismos, se agruparon los genotipos dependiendo de la presencia o ausencia del alelo mutado, según el modelo genético dominante. Considerando en conjunto las tres variantes, el 31% de los pacientes con EC tenía *NOD2* mutado, mientras que esto tan sólo se observó en un 12,3% de los controles [$P < 0,001$; OR (IC95%)=3,214 (2,326-4,404)]. Al comparar la frecuencia de mutación en *NOD2* entre pacientes con CU y EC se observó que ésta fue significativamente mayor en pacientes con EC [15,3% vs. 31%, $P < 0,001$; OR (IC95%)=3,214 (2,326-4,404)]; esta diferencia también se pudo apreciar al analizar las tres variantes de *NOD2* por separado (Tabla 25).

Tabla 25. Frecuencias del alelo menor y genotipos mutados para los tres polimorfismos estudiados de *NOD2* y comparación estadística entre población control y pacientes con Enfermedad de Crohn (EC)

Variante	Alelo/ Genotipo	Control n (%)	EC n (%)	P vs. Control	Odds ratio (IC 95%)	P vs. CU
<i>SNP8</i>	C	1096 (96,3)	653 (89,5)	<0,001	3,077 (2,087-4,537)	<0,001
	T	42 (3,7)	77 (10,5)			
	CC	529 (93,0)	295 (80,8)	<0,001	3,138 (2,075-4,746)	0,001
	TT + CT	40 (7,0)	70 (19,2)			
<i>SNP12</i>	C	23 (2,0)	33 (4,5)	0,002	2,316 (1,349-3,977)	<0,001
	G	1125 (98,0)	697 (95,5)			
	GG	552 (96,2)	333 (91,2)	0,002	2,411 (1,378-4,219)	<0,001
	CC + CG	22(3,8)	32 (8,8)			
<i>SNP13</i>	-	1149 (98,5)	693 (96,0)	<0,001	2,828 (1,543-5,185)	0,022
	C	17 (1,5)	29 (4,0)			
	--	566 (97,1)	332 (92)	<0,001	2,908 (1,574-5,373)	0,020
	CC + -C	17 (2,9)	29 (8,0)			

IC=Intervalo de Confianza

En población control tan sólo se encontraron tres homocigotos para mutaciones de *NOD2* (dos para *SNP8* y uno para *SNP12*) y un heterocigoto compuesto (dos mutaciones en diferentes polimorfismos de *NOD2*). En el caso de los pacientes con EC, hubo hasta siete homocigotos para *SNP8* y un homocigoto para *SNP12*. El número de heterocigotos compuestos fue de dieciséis: en nuestra población no hubo ningún paciente que portara tres alelos mutados de *NOD2*. Al estudiar si la presencia de más de una mutación en *NOD2* en forma de homocigoto o heterocigoto compuesto estaba asociada con la EC vimos que tanto el valor de P ($P < 0,001$) como la OR [OR (IC95%)=10,443 (3,583-30,438)] indicaron una fuerte asociación.

4.4.2.2 *NOD2 y fenotipo de la EC*

Tras el estudio caso-control se llevó a cabo la estratificación de los pacientes dependiendo del fenotipo para determinar si existía alguna asociación con polimorfismos de *NOD2*. En la Tabla 26 se resumen las principales asociaciones encontradas entre polimorfismos de *NOD2* y el fenotipo de la enfermedad de Crohn. El polimorfismo *SNP8* se relacionó con la edad al diagnóstico, ya que al realizar el test de U de Mann-Whitney el valor de *P* fue significativo ($P=0,040$). Mientras que en pacientes portadores de la variante minoritaria *SNP8-T* la media y la mediana de la edad al diagnóstico fueron 28,9 y 25 años respectivamente, en pacientes con el genotipo salvaje era de 32,3 y 29 años. Si tenemos en cuenta los grupos establecidos por la clasificación de Montreal, la presencia del alelo mutado se asoció con un diagnóstico dentro del grupo 1 o del grupo 2 (antes de los 40 años). La frecuencia de los genotipos minoritarios de *SNP13* también fue mayor en pacientes diagnosticados antes de los 40 años (9,2% vs. 3,8%), aunque las diferencias no llegaron a ser significativas.

Como también puede observarse en la Tabla 26, se describió la relación entre *NOD2* y la localización de la enfermedad: tanto el alelo *SNP8-T* como *SNP13-insC* se asociaron con una EC ileal, es decir, los pacientes con alguno de los dos alelos mutados evolucionaron con una localización preferentemente ileal o ileocólica de las lesiones. Sólo el 10% de los pacientes portadores de *SNP8-T* y el 3,4% de los pacientes que portaba *SNP13-insC* evolucionó hacia una EC colónica. Tan sólo se detectaron 6 pacientes heterocigotos compuestos para *SNP8* y *SNP13* y en todos los casos se trató de pacientes con EC ileal, pero un número tan reducido de pacientes nos hizo imposible estudiar si el efecto de ambos genes es acumulativo. A pesar de que la frecuencia del *SNP12-C* fue menor en pacientes con localización colónica, no se pudieron demostrar diferencias significativas. La presencia del alelo *SNP13-insC* se relacionó con un aumento de la necesidad de resección intestinal en nuestros pacientes con EC; sin embargo tras la realización del análisis multivariable, incluyendo la localización como covariable, esta asociación desapareció mientras que la localización ileal continuó estando asociada ($P=0,021$).

Tabla 26. Relaciones encontradas entre las variantes de *NOD2* y el fenotipo en Enfermedad de Crohn (EC).

		<i>SNP8</i> TT + CT %*	<i>P</i>	OR (IC95%)	<i>SNP12</i> CC + CG %*	<i>P</i>	OR (IC95%)	<i>SNP13</i> CC + -C %*	<i>P</i>	OR (IC95%)	<i>NOD2</i> ^{***} %	<i>P</i>	OR (IC95%)
Edad	<40	21,3	0,047	2,422 (1,106- 5,303)	8,7	NS		9,2	NS		33,2	NS	
	>40	11,4			8,9			3,8					
Localización	Colon	9,2	0,013	2,748 (1,203- 6,277)	5,3	NS		1,4	0,038 ^o	7,617 (1,019- 56,951)	15,8	0,001	2,861 (1,477- 5,543)
	Ileal + Ileocólica	21,8			9,7			9,7			34,9		
Patrón	Inflamatorio	18,0	NS		6,4	NS		4,9	0,025	2,477 (1,096- 5,600)	27,2	NS	
	Fistulizante	17,8	NS		13,8	0,028	2,243 (1,077- 4,675)	10,1			34,5	NS	
	Estenosante	24,6	NS		7,2	ND		12,0			35,7	NS	
Resección intestinal	Sí	23,5	NS		8,4	NS		12,6	0,025	2,349 (1,094- 5,045)	37,2	NS	
	No	17,1			8,9			5,8			28,0		
MED hepatobiliares	Sí	27,6	0,035	1,870 (1,037- 3,371)	13,2	NS		10,5	NS		38,2	NS	
	No	17,0			7,6			7,4			29,2		
Esteatosis	Sí	28,3	NS		19,6	0,006	3,130 (1,347- 7,273)	13,0	NS		45,7	0,022	2,064 (1,102- 3,867)
	No	17,9			7,2			7,3			28,9		

OR=Odds ratio; IC=Intervalo de Confianza; NS=No significativo

*El porcentaje se refiere a la frecuencia de genotipo en cada subgrupo clínico. En todos los casos un valor de $P < 0,05$ indica diferencias entre subgrupos de pacientes.

***NOD2*⁺=Presencia de mutación en cualquiera de los 3 polimorfismos de *NOD2*

^oSe aplica la corrección de Yates.

En cuanto al patrón de la enfermedad, el alelo *SNP12-C* se asoció con un patrón fistulizante; el 42,8% de los pacientes portadores de esta variante evolucionó con este patrón, mientras que tan sólo el 28% del resto de los pacientes se comportó de esta manera. Como es lógico, la presencia del alelo también se asoció con la aparición de fístulas: el 62,5% de los pacientes con el genotipo mutado desarrolló fístulas, mientras que en pacientes con el genotipo salvaje la aparición de fístulas no llegó al 40% [$P=0,011$; OR (IC95%)=2,570 (1,216-5,434)]. La presencia de *SNP13-insC* se asoció en nuestra población de enfermos con un patrón de la enfermedad no inflamatorio; sin embargo, tras la realización del análisis multivariable incluyendo la localización ileal como covariable desaparecieron las diferencias significativas ($P=0,055$). Por el contrario, la asociación de *SNP12-C* con patrón fistulizante sí que continuó tras la regresión logística.

En pacientes portadores del alelo *SNP8-T* se observó un aumento de la aparición de MED hepatobiliares con respecto a los homocigotos *SNP8-CC* (30% vs. 18,6%). Se observó un aumento de los casos tanto de esteatosis como de colelitiasis, sin asociarse por separado a ninguna de ellas. Por otro lado, la presencia del alelo *SNP12-C* aumentó las probabilidades de desarrollar esteatosis, ya que su incidencia en estos pacientes fue del 28% mientras que sólo un 11% de pacientes con genotipo salvaje desarrolló esteatosis. Analizando el fenotipo en relación a la presencia o ausencia de cualquiera de las tres variantes mutadas (Tabla 26), se observó que la presencia de al menos una de ellas se asoció con una EC ileal, ya que tan sólo en un 10% de los pacientes con alguna mutación se restringen las lesiones al colon. Por último, al igual que con dos de los polimorfismos estudiados por separado, la presencia de mutación en *NOD2* se asoció con problemas hepatobiliares, concretamente esteatosis.

Aunque no se pudieran demostrar estadísticamente, se observaron una serie de diferencias fenotípicas entre los pacientes con EC con más de una mutación en *NOD2* y los que portaban una o ninguna. En estos pacientes la edad al diagnóstico era más temprana, ya que tan sólo uno de los pacientes con dos mutaciones en *NOD2* se diagnosticó con más de cuarenta años, presentaron afectación preferentemente del ileon (EC ileal o ileocólica) y un patrón clínico no inflamatorio (estenosante o fistulizante). En el caso de las MED hepatobiliares sí que vimos diferencias estadísticamente destacables: de los 23 pacientes, 11 presentaron este tipo de complicación [$P=0,002$; OR (IC95%)=3,991 (1,686-9,445)]. En resumen, los pacientes portadores de dos variantes minoritarias de *NOD2*, ya sean homocigotos o heterocigotos compuestos, preferentemente evolucionaron con un patrón clínico no inflamatorio (fistulizante o estenosante pero con más frecuencia fistulizante), localización ileal o ileocólica, sufrieron con más frecuencia MED hepatobiliares y, por lo general, más complicaciones digestivas.

4.5 TLRs Y LA EII

En este estudio se han incluido dieciséis SNPs en genes de los *TLRs*, seleccionados en base a lo consultado en la bibliografía y en la base de datos de SNPs disponible en la página web del [NCBI](#). En total se eligieron dos SNPs en los genes *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR6* y *TLR10* y un SNP en los genes *TLR1*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9* (Tabla 5). En primer

lugar, se comprobó la existencia de EHW en la población control para todos los polimorfismos, como se puede consultar en la Tabla 27.

Tabla 27. Estudio del equilibrio de Hardy-Weinberg para los polimorfismos en los genes de los TLRs en la población control

Gen	rs	χ^2	P
<i>TLR1</i>	<i>rs5743611</i>	1,886	0,170
<i>TLR2</i>	<i>rs5743704</i>	3,177	0,075
	<i>rs5743708</i>	0,048	0,827
<i>TLR3</i>	<i>rs3775291</i>	0,136	0,712
	<i>rs5743305</i>	0,309	0,578
<i>TLR4</i>	<i>rs4986790</i>	0,895	0,344
	<i>rs4986791</i>	1,065	0,302
<i>TLR5</i>	<i>rs5744174</i>	0,966	0,326
	<i>rs2072493</i>	3,677	0,056
<i>TLR6</i>	<i>rs5743795</i>	0,102	0,749
	<i>rs5743810</i>	0,040	0,841
<i>TLR7</i>	<i>rs179008</i>	0,138	0,710
<i>TLR8</i>	<i>rs3764880</i>	3,815	0,051
<i>TLR9</i>	<i>rs352140</i>	3,666	0,056
<i>TLR10</i>	<i>rs4129009</i>	0,041	0,840
	<i>rs11096955</i>	0,740	0,390

Se considera que la población está en equilibrio cuando $P > 0,05$

Una vez comprobado el equilibrio se analizó la posible relación de cada polimorfismo por separado con la susceptibilidad a padecer CU y EC y con el fenotipo de cada una de las enfermedades. El estudio se llevó a cabo siguiendo el modelo genético dominante o el modelo genético recesivo, según el caso. Como ya se comentó en la introducción (apartado 1.4.3.2), los TLRs se pueden dividir en 5 familias en base a la homología de su secuencia: la familia del TLR2 (que incluye TLR1, TLR2, TLR6 y TLR10), la del TLR9 (que incluye TLR7, TLR8 y TLR9) y TLR3, TLR4 y TLR5 que se consideran por separado. A continuación se relatan los hallazgos en nuestra población; para facilitar la lectura y la comprensión de este trabajo, se han agrupado los resultados obtenidos por familias de TLRs.

4.5.1 TLR1, TLR2, TLR6 y TLR10 en la EII

En la Tabla 28 se resumen las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs estudiados en los genes TLR1, TLR2, TLR6 y TLR10, todos ellos pertenecientes a la familia del TLR2, en población control y en las dos poblaciones de pacientes.

Tabla 28. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en los genes *TLR1*, *TLR2*, *TLR6* y *TLR10* en población control y ambas poblaciones de pacientes

Gen	rs	Alelo/Genotipo	Control n (%)	CU n (%)	EC n (%)		
<i>TLR1</i>	5743611	C	85 (6,7)	26 (3,8) ^a	24 (3,2) ^c		
		G	1187 (93,3)	652 (96,2)	718 (96,8)		
		GG	556 (87,4)	313 (92,3)	347 (93,5)		
		CC + CG	80 (12,6)	26 (7,7) ^b	24 (6,5) ^d		
<i>TLR2</i>	5743704	A	40 (3,1)	23 (3,4)	30 (4,1)		
		C	1232 (96,9)	655 (96,6)	708 (95,9)		
		CC	597 (93,9)	316 (93,2)	340 (92,1)		
		AA + AC	39 (6,1)	23 (6,8)	29 (7,9)		
	5743708	A	11 (0,9)	8 (1,2)	8 (1,1)		
		G	1261 (99,1)	672 (98,8)	734 (98,9)		
		GG	625 (98,3)	332 (97,6)	363 (97,8)		
		AA + AG	11 (1,7)	8 (2,4)	8 (2,2)		
<i>TLR6</i>	5743795	A	409 (32,2)	197 (29,1)	229 (30,9)		
		G	863 (67,8)	481 (70,9)	511 (69,1)		
		GG	291 (45,8)	167 (49,3)	174 (47,0)		
		AA + AG	345 (54,2)	172 (50,7)	196 (53,0)		
	5743810	C	845 (67,0)	460 (68,5)	500 (67,8)		
		T	417 (33,0)	212 (31,5)	238 (32,2)		
		CC	284 (45,0)	155 (46,1)	169 (45,8)		
		TT + CT	354 (55,0)	181 (53,9)	200 (54,2)		
		<i>TLR10</i>	4129009	A	874 (71,2)	502 (73,8)	542 (73,8)
				G	354 (28,8)	178 (26,2)	192 (26,2)
AA	310 (50,5)			188 (55,3)	206 (56,1)		
GG + AG	304 (49,5)			152 (44,7)	161 (43,9)		
11096955	A		657 (53,1)	359 (53,7)	402 (54,8)		
	C		581 (46,9)	309 (46,3)	332 (45,2)		
		AA	169 (27,3)	101 (30,2)	113 (30,8)		
		CC + AC	450 (72,7)	233 (69,8)	254 (69,3)		

rs=Reference SNP Number; TLR=Toll-like Receptor; CU=Colitis ulcerosa; EC=Enfermedad de Crohn

^aC vs. G, CU vs. Control: $P=0,010$; OR (IC95%)=0,557 (0,355-0,873)

^bCC+CG vs, TT, CU vs, Control: $P=0,019$; OR(IC95%)=0,577 (0,363-0,918)

^cC vs, G, EC vs, Control: $P=0,001$; OR (IC95%)=0,467 (0,294-0,741)

^dCC+CG vs, GG, EC vs, Control: $P=0,002$, OR (IC95%)=0,481 (0,299-0,773)

Tras la realización del análisis estadístico tan sólo se observaron diferencias en relación al *TLR1* rs5743611, cuyo alelo minoritario (rs5743611-C) resultó ser protector frente a la enfermedad inflamatoria intestinal. La frecuencia del alelo en población control (6,7%) fue significativamente mayor que en pacientes con CU (3,8%) y que en pacientes con EC (3,2%), indicando la OR que el alelo confiere una menor susceptibilidad a desarrollar ambas enfermedades. A nivel de genotipos también se detectaron estas diferencias; en este caso, debido a la baja frecuencia del alelo en los pacientes, ni en el caso de la CU ni en el caso de la EC hubo ningún portador del genotipo homocigoto rs5743611-CC mientras que la frecuencia del genotipo heterocigoto rs5743611-CG fue significativamente mayor en controles sanos que en pacientes. Con

respecto al fenotipo, el alelo *TLR1 rs5743611-C*, se asoció con la aparición de cáncer colorrectal en nuestra población de pacientes con CU ($P=0,002$). De los 7 pacientes con cáncer de colon en pacientes con CU, 4 portaban este alelo en heterocigosis, aumentando la frecuencia del alelo hasta el 25% dentro del grupo de pacientes con cáncer y sugiriendo que éste contribuye a una mayor susceptibilidad a cáncer colorrectal [OR (IC95%)=14,045 (3,289-59,986)]. La presencia de este alelo se asoció también con la aparición de MED articulares en pacientes con CU [$P=0,022$; OR (IC95%)=2,868 (1,237-6,653)]: el 38,5% de los pacientes portadores del alelo minoritario sufrió algún tipo de MED articular, mientras que en el resto de pacientes la frecuencia de aparición de este tipo de complicación fue de 17,9%. En pacientes con enfermedad de Crohn, el alelo *TLR1 rs5743611-C* se asoció con afectación del TDS: un 12,5% de los pacientes portadores del alelo menor presentaron afectación del TDS, mientras que esto se observó sólo en un 2,3% de los pacientes con el genotipo *rs5743611-GG* [$P=0,028$; OR (IC95%)=6,054 (1,496-24,504)].

No se ha descrito en nuestra población ninguna relación de los polimorfismos en el gen *TLR2* con un incremento de la susceptibilidad a la EII ni con su fenotipo. Por su parte, se detectó cierta relación entre el polimorfismo *TLR6 rs5743810* y la presencia de complicaciones digestivas o la necesidad de cirugía en ambas poblaciones de enfermos. El alelo minoritario *TLR6 rs5743810-T* se asoció dentro de los pacientes con CU con una mayor tasa de colectomía: de los 19 pacientes con CU que se tuvieron que someter a este tipo de intervención, el 75% era portador del alelo [$P=0,043$; OR (IC95%)= 3,411 (1,108-10,504)]. En pacientes con EC este alelo se asocia con la aparición de complicaciones digestivas, principalmente abscesos, ya que el 34,5% de los pacientes portadores de los genotipos *rs5743810-CT* o *rs5743810-TT* han desarrollado abscesos mientras que sólo un 24,3% de los *rs5743810-CC* ha sufrido esta complicación [$P=0,032$; OR (IC95%)=1,644 (1,041-2,597)]. Al igual que en el caso de la CU, la tasa de resección intestinal es significativamente mayor entre los pacientes portadores del alelo minoritario *TLR6 rs5743810-T* que en los que portaron el genotipo salvaje [38,5% vs. 26%; $P=0,011$; OR (IC95%)=1,778 (1,138-2,779)].

Por último, el polimorfismo en el *TLR10 rs4129009* también se relaciona con el fenotipo de la EII, pero en este caso tan sólo se aprecian diferencias entre pacientes con el alelo menor (*rs4129009-G*) en homocigosis en comparación con el resto, es decir, se necesita doble dosis del alelo mutado para observar el efecto fenotípico. El genotipo homocigoto *TLR10 rs4129009-GG* se asoció en nuestra población de pacientes con EC con la aparición tardía de los síntomas ya que casi el 40% de los pacientes con este genotipo se diagnosticaron con más de 40 años [38,7% vs.19,9%; $P=0,015$; OR (IC95%)=2,536 (1,173-5,480)]. Además, el 38,7% de los pacientes portadores de este genotipo cursó con una EC colónica, mientras que en el resto de pacientes esta localización se dió en el 19% de los casos [$P=0,010$; OR (IC95%)=2,684 (1,240-5,811)]. Tras la realización de sendos análisis multivariantes, incluyendo como variables independientes el SNP en el *TLR10*, sexo, edad/localización y patrón evolutivo, se confirmó la relación del genotipo *TLR10 rs4129009-GG* con diagnóstico tardío y localización colónica, y además se demostró la relación entre ambas: en pacientes diagnosticados con más de 40 años era más frecuente la localización colónica de las lesiones, ya que hasta el 31,6% evolucionó con este tipo de localización mientras que fuera del grupo 3 la frecuencia de esta localización no llegó al 20% ($P=0,006$).

4.5.2 TLR3 en la EII

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los dos polimorfismos estudiados en el gen *TLR3* se muestran en la Tabla 29.

Tabla 29. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en el gen *TLR3* en población control y en ambas poblaciones de pacientes

Gen	rs	Alelo/Genotipo	Control n (%)	CU n (%)	EC n (%)
<i>TLR3</i>	<i>rs3775291</i>	A	369 (29,9)	208 (30,7)	231 (31,5)
		G	867 (70,1)	470 (69,3)	503 (68,5)
		GG	306 (49,5)	165 (48,7)	166 (45,2)
		AA + AG	282 (50,5)	174 (51,3)	201 (54,8)
	<i>rs5743305</i>	A	514 (41,4)	279 (41,2)	305 (41,3)
		T	728 (58,6)	399 (58,8)	433 (58,7)
		TT	210 (33,8)	120 (35,4)	124 (33,6)
		AA + AT	411 (66,2)	219 (64,6)	245 (66,4)

rs=Reference SNP Number; TLR=Toll-like Receptor; CU=Colitis ulcerosa; EC=Enfermedad de Crohn

En este caso, aunque no se observaron diferencias entre población control y ninguna de las dos poblaciones de pacientes, hay que destacar la relación del polimorfismo *rs5743305* con la presencia de MED oculares en nuestros pacientes con EII. Tanto en la CU como en la EC, la presencia del alelo *rs5743305-A* es protectora frente a la aparición de este tipo de complicaciones, principalmente uveítis. Dentro de los pacientes con CU y el genotipo *rs5743305-TT*, el 6,7% desarrolla en algún momento de su enfermedad uveítis, mientras que la frecuencia de esta complicación dentro de los pacientes portadores del alelo *rs5743305-A* es tan sólo de 1,4% [$P=0,019$; OR (IC95%)=0,194 (0,051-0,747)]. Del mismo modo, en pacientes con EC la frecuencia del alelo *TLR3 rs5743305-A* es menor entre los pacientes con MED oculares (16,7% vs. 41,9%; $P=0,031$; OR (IC95%)=0,277 (0,079-0,965); sin embargo, a pesar de que ningún paciente con el genotipo *rs5743305-AA* desarrollara uveítis, las diferencias no se pudieron demostrar estadísticamente a nivel genotípico ($P=0,066$).

4.5.3 TLR4 en EII

Las frecuencias de los alelos minoritarios en los polimorfismos *rs4986790* y *rs4986791* del *TLR4* son mayores en pacientes con CU o EC que en controles, tal y como se muestra en la Tabla 30, aunque en ningún caso las diferencias llegan a ser estadísticamente significativas. Las frecuencias de los alelos menores en ambos polimorfismos son muy similares, y al observar los datos brutos se puede comprobar que la cosegregación de ambos alelos es prácticamente perfecta, es decir, la presencia de mutación en uno de los SNP va acompañada en la mayoría de los casos por mutación en el otro SNP. Así, por ejemplo la cosegregación alcanza el 89% en CU, el 83% en controles y el 87% en EC. Para cuantificar este desequilibrio, se realizó un estudio de LD entre los dos polimorfismos, obteniendo en población control un valor absoluto de D' de 0,955 y de r^2 de 0,836; en ambas poblaciones de enfermos se obtienen resultados similares.

Tabla 30. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en el gen *TLR4* en población control y ambas poblaciones de pacientes

Gen	rs	Alelo/Genotipo	Control n (%)	CU n (%)	EC n (%)
<i>TLR4</i>	4986790	A	1226 (96,4)	643 (94,6)	711 (95,8)
		G	46 (3,6)	37 (5,4)	31 (4,2)
		AA	590 (92,8)	304 (89,4)	341 (91,9)
		GG + AG	46 (7,2)	36 (10,6)	30 (8,1)
	4986791	C	1222 (96,1)	641 (94,3)	709 (95,6)
		T	50 (3,9)	39 (5,7)	33 (4,4)
		CC	586 (92,1)	301 (88,5)	338 (91,1)
		TT + CT	50 (7,9)	39 (11,5)	33 (8,9)

rs= Reference SNP Number; TLR=Toll-like Receptor; CU=Colitis ulcerosa; EC=Enfermedad de Crohn

Tras la estratificación de pacientes según la presencia de mutación en el gen *NOD2*, se encontraron ciertas diferencias en pacientes con EC, en relación a la susceptibilidad y el fenotipo de la enfermedad. En la Tabla 31 se muestran las frecuencias genotípicas en los pacientes con EC después de ser estratificados según la presencia de mutación en *NOD2*: la frecuencia de *rs4986790-G* fue significativamente mayor en pacientes portadores de alguna de las variantes minoritarias de *NOD2*. Estas diferencias se observaron al comparar pacientes con y sin mutación en *NOD2* y pacientes con mutación en *NOD2* frente a población control. Esto sugiere que existe una relación epistática entre ambos genes en nuestra población de pacientes con EC, ya que la distribución de los alelos de *TLR4* con respecto a *NOD2* no es tal y como se esperaría si sólo interviniera el azar. En la Tabla 31 sólo se muestran los resultados referentes a *TLR4 rs4986790*, pero los hallados para *TLR4 rs4986791* fueron muy similares, debido al estrecho LD existente entre ambos; por este motivo, a lo largo del trabajo, siempre que no se especifique lo contrario, los resultados obtenidos para uno de ellos podrán ser extrapolados al otro, o, igualmente, se podrá hacer referencia a la presencia de los alelos minoritarios utilizando *TLR4+*. Ni en población control ni en pacientes con CU se observaron diferencias significativas en las frecuencias alélicas del *TLR4* entre mutantes para *NOD2* y no mutantes.

Tabla 31. Comparación de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en *TLR4* entre pacientes con EC estratificados según las variantes de *NOD2*

Grupos de pacientes según las variantes de <i>NOD2</i>		<i>TLR4 rs4986790</i> AG+GG n (%)	<i>TLR4 rs4986790</i> AA n (%)	P
<i>NOD2+*</i>	<i>NOD2+</i>	15 (13,0)	100 (87,0)	0,019 ^a
	<i>NOD2-</i>	15 (5,9)	241 (94,1)	
<i>SNP8</i>	CG+GG	8 (11,4)	62 (88,6)	0,277
	CC	22 (7,5)	273 (92,5)	
<i>SNP12</i>	CC+CG	2 (6,3)	30 (93,8)	1,000
	GG	28 (8,4)	305 (91,6)	
<i>SNP13</i>	-/ <i>insC</i>	8 (27,6)	21 (72,4)	0,001 ^b
	-/-	22 (6,6)	310 (93,4)	

*Presencia o ausencia de al menos uno de los alelos mutados de las variantes de *NOD2*

^aAA vs. AG+GG, *NOD2+* vs. *NOD2-*: OR (CI95%)=2,410 (1,135-5,116)

AA vs. AG+GG, *NOD2+* vs. Control: OR (CI95%)=1,924 (1,034-3,577)

^bAA vs. AG+G, *SNP13*-/*insC* vs. -/-: OR (CI95%)=5,368 (2,135-13,497)

AA vs. AG+GG, *SNP13*-/*insC* vs. Control: OR (CI95%)=4,886 (2,051-11,637)

Al estratificar los pacientes dependiendo de la presencia de cada una de las variantes de *NOD2* por separado, se pudo observar que la frecuencia de mutación en *TLR4* tan sólo era significativamente mayor en el caso de *SNP13-insC*, y que la OR cuando comparamos este subgrupo de pacientes con población control aumentaba considerablemente con respecto a lo observado sólo con mutación en *SNP13-insC* (Tabla 31). En pacientes portadores de la variante *SNP8-T*, la presencia de mutación en *TLR4* también resultó ser mayor que en pacientes con el genotipo salvaje; sin embargo, en este caso las diferencias no llegaron a ser significativas. No se observaron diferencias en la distribución alélica de los polimorfismos de *TLR4* entre pacientes portadores de *SNP12-C* y los de genotipo salvaje.

En relación al fenotipo, los alelos *rs4986790-G* y *rs4986791-T* se asociaron en nuestros pacientes con EC con un patrón estenosante, tal y como puede verse en la Tabla 32. El 36,7% de los pacientes portadores de los alelos minoritarios de *TLR4* (*TLR4+*) evolucionó con un patrón estenosante, mientras que sólo el 17,3% de los pacientes *TLR4-* presentó este patrón clínico. Según el valor de OR, la presencia de los alelos minoritarios de estos dos polimorfismos en *TLR4* son factores de riesgo para la evolución con un patrón estenosante.

Tabla 32. Relación entre el patrón clínico y la localización con *TLR4* en pacientes con Enfermedad de Crohn (EC) estratificados según la mutación en *NOD2*

Variable	Pacientes con EC n=371		<i>NOD2+</i> n=115		<i>NOD2-</i> n=256	
	<i>TLR4+</i>	<i>TLR4-</i>	<i>TLR4+</i>	<i>TLR4-</i>	<i>TLR4+</i>	<i>TLR4-</i>
Patrón evolutivo						
Inflamatorio	11 (36,7)	180 (52,8)	3 (20,0)	49 (49,0)	8 (53,3)	131 (54,4)
Estenosante	11 (36,7) ^a	59 (17,3)	7 (46,7) ^b	18 (18,0)	4 (26,7)	41 (17,0)
Fistulizante	8 (26,7)	102 (29,9)	5 (33,3)	33 (33,0)	3 (20,0)	69 (28,6)
Localización						
Ileal	16 (53,3)	138 (40,5)	12 (80,0) ^c	37 (37,0)	4 (26,7)	101 (41,9)
Ileocólica	9 (30,0)	132 (38,7)	2 (13,0)	52 (52,0)	7 (46,7)	80 (33,2)
Colónica	5 (16,7)	71 (20,8)	1 (6,7)	11 (11,0)	4 (26,7)	60 (24,9)

^a*TLR4+* vs. Control, Estenosante vs. demás patrones: $P=0,013$; OR (IC95%)=2,391 (1,175-4,865)

^b*TLR4+/NOD2+* vs. demás haplotipos, Estenosante vs. demás patrones: $P=0,005$; OR(IC95%)=4,097 (1,433-11,711)

^c*TLR4+/NOD2+* vs. demás haplotipos, EC ileal vs. demás localizaciones: $P=0,002$; OR=6,028 (1,671-21,742)

*Se compara con la población control

Dado que en nuestra población se ha demostrado la relación epistática entre los genes *NOD2* y *TLR4*, se realizó una regresión logística para comprobar la asociación de *TLR4* con el patrón evolutivo, estableciendo como covariables *TLR4+*, *NOD2+*, la localización, la edad y el sexo. Tras el análisis multivariable se demostró la asociación de la EC ileal ($P<0,001$), el grupo 3 de edad ($P<0,001$) y de *TLR4+* ($P=0,010$) con el patrón clínico estenosante, pero no de *NOD2*. Sin embargo, aunque la asociación de *TLR4* pareciera independiente de *NOD2*, al analizar el patrón clínico de los pacientes teniendo en cuenta ambos genes, se observa que la probabilidad de evolucionar con patrón estenosante dentro de los pacientes con *TLR4+* aumenta significativamente cuando también hay mutación en *NOD2* (Tabla 32): el riesgo de evolucionar con un patrón estenosante es mayor si ambos genes están mutados que si sólo lo está *TLR4*, tal y como indican los valores de OR. Dentro del grupo de pacientes con *TLR4+/NOD2-*, la frecuencia del patrón estenosante también es mayor, aunque no haya diferencias estadísticamente significativas cuando lo comparamos con el resto. En nuestro estudio no se ha descrito asociación de *TLR4* con la localización de las lesiones, sin embargo tras la estratificación de pacientes según la presencia de mutación en *NOD2*, se puede observar que el hecho de tener *TLR4* mutado incrementa el riesgo de evolucionar con EC ileal en pacientes portadores de variantes minoritarias de *NOD2* (Tabla 32).

Por último, también se asoció la presencia de *TLR4+* con la perforación intestinal en pacientes con EC. El 14,7% de los pacientes que portan un alelo minoritario ha sufrido esta complicación en algún momento de su enfermedad, mientras que sólo el 5% del resto de pacientes lo ha hecho [$P=0,036$; OR (IC95%)=3,372 (1,157-9,823)]. Se siguió observando esta asociación tras la realización del análisis multivariable ($P=0,034$) y, aunque en pacientes con *TLR4+* y *NOD2+* se contabilizaron más casos de perforación que en el resto de grupos, no llegaron a apreciarse diferencias estratificando según mutación en *NOD2*.

4.5.4 TLR5 en la EII

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los dos polimorfismos estudiados en el gen *TLR5* pueden consultarse en la Tabla 33. No se encontraron diferencias significativas entre las tres poblaciones a estudio.

Tabla 33. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en el gen *TLR5* en población control y ambas poblaciones de pacientes

Gen	rs	Alelo/Genotipo	Control n (%)	CU n (%)	EC n (%)
<i>TLR5</i>	5744174	C	478 (37,6)	251 (36,9)	295 (39,8)
		T	794 (62,4)	429 (63,1)	447 (60,2)
		TT	242 (38,1)	135 (39,7)	132 (35,6)
		CC + CT	394 (61,9)	205 (60,3)	239 (64,4)
	2072493	A	1038 (82,2)	575 (84,6)	630 (84,9)
		G	225 (17,8)	105 (15,4)	112 (15,1)
		AA	420 (66,4)	240 (70,6)	267 (72,0)
		GG + AG	212 (33,6)	100 (29,4)	104 (28,0)

rs=Reference SNP Number; TLR=Toll-like Receptor; CU=Colitis ulcerosa; EC=Enfermedad de Crohn

Con respecto al fenotipo, la única relación encontrada en nuestra población es la de *rs5744174* con la aparición de manifestaciones extradigestivas en pacientes con EC. El 73,1% de los pacientes portadores del alelo *rs5744174-C* desarrolló este tipo de complicaciones [$P=0,003$; OR (IC95%)=1,954 (1,252-3,052)], alcanzando la frecuencia del alelo 43,9% dentro de este grupo mientras que en pacientes sin MED fue de 36,7%. Esta asociación se sigue observando tras la realización del análisis multivariable.

4.5.5 TLR7, TLR8 y TLR9 en la EII

Las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *TLR9 rs352140* se muestran en la Tabla 34. En esta misma tabla se muestran las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en el *TLR7* y en el *TLR8*, esta vez en hombres y mujeres por separado ya que ambos genes se sitúan en el cromosoma X. No se encontraron diferencias en ninguno de los tres polimorfismos al comparar la población control con cada una de las poblaciones de pacientes por separado. En el caso del polimorfismo *rs352140* del *TLR9*, a pesar de que en la [dbSNP](#) se especifique que el alelo ancestral es *rs352140-C*, en las tres poblaciones de nuestro estudio el alelo más frecuente fue *rs352140-T*.

Tabla 34. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en los genes *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* en población control y ambas poblaciones de pacientes

Gen	rs	Alelo/Genotipo	Control n (%)	CU n (%)	EC n (%)	
<i>TLR7*</i>	<i>rs179008*</i>	♂	A0	199 (77,4)	154 (82,8)	166 (83)
			T0	58 (22,6)	32 (17,2)	34 (17)
		♀	AA	232 (64,1)	96 (63,2)	110 (65,5)
			TT + AT	130 (35,9)	56 (36,8)	58 (34,6)
<i>TLR8*</i>	<i>rs3764880</i>	♂	A0	182 (70,3)	136 (72,7)	134 (67,7)
			G0	77 (29,7)	51 (27,3)	64 (32,3)
		♀	AA	186 (51,4)	88 (57,9)	79 (46,7)
			GG + AG	176 (48,4)	64 (42,1)	90 (53,3)
<i>TLR9</i>	<i>rs352140</i>	C	574 (46,3)	324 (47,8)	354 (47,8)	
		T	666 (53,7)	354 (52,2)	386 (52,2)	
		CC	121 (19,5)	82 (24,2)	75 (20,3)	
		TT + CT	499 (80,5)	257 (75,8)	295 (79,7)	

rs=Reference SNP Number; TLR=Toll-like Receptor; CU=Colitis ulcerosa; EC=Enfermedad de Crohn

*Este gen se sitúa en el cromosoma X por lo que se muestran las frecuencias genotípicas en hombres y mujeres por separado

Tras la estratificación de los pacientes en función del sexo se encontraron algunas diferencias con respecto al *TLR9* que merece la pena destacar. No hay diferencias en las frecuencias alélicas de este SNP entre hombres y mujeres dentro de la población control, ya que las frecuencias alélicas son muy similares (la frecuencia del alelo *rs352140-T* es de 53,3% y 54% en hombres y mujeres, respectivamente). Al analizar la población de pacientes con EC en función al sexo se observó que, tal y como puede observarse en la Tabla 35, la frecuencia del alelo *rs352140-T* es significativamente menor en enfermas con EC que en hombres, observándose estas diferencias también al comparar mujeres con EC con población control. En el caso de los genotipos sólo se observan diferencias en cuanto al genotipo homocigoto mutante *TT*, que, como cabría esperar, es significativamente menor en mujeres que en hombres, y también con respecto a la población control.

Tabla 35. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *TLR9 rs352140* en población control y en pacientes con enfermedad de Crohn tras la estratificación por sexo

Alelo/Genotipo	Control n (%)	Enfermedad de Crohn		P ♂vs.♀
		♂ n (%)	♀ n (%)	
C	574 (46,3)	177 (43,8)	177 (52,7)	0,016
T	666 (53,7)	227 (56,2)	159 (47,3) ^a	
CC	121 (19,5)	35 (17,3)	40 (23,8)	NS
CT	332 (53,5)	107 (53,0)	97 (57,7)	NS
TT	167 (27,0)	60 (29,7)	31 (18,5) ^b	0,012

Se realiza el test de χ^2 para comparar frecuencias alélicas y genotípicas entre hombres y mujeres dentro de la población de enfermos con EC y de cada grupo por separado con la población control. Se considera que hay diferencias significativas cuando $P < 0,05$.

^aC vs. T, EC♀ vs. Control: $P=0,038$; OR (IC95%)=0,774 (0,608-0,986)

^bTT vs. CT+CC, EC♀ vs. Control: $P=0,025$; OR (IC95%)=0,614 (0,400-0,942)

Ninguno de estos tres polimorfismos se relacionó con el fenotipo de la colitis ulcerosa en nuestra población, pero sí que se describieron algunas asociaciones con determinadas características clínicas en pacientes con enfermedad de Crohn. El polimorfismo *TLR9 rs352140* se relacionó con la aparición de complicaciones digestivas en pacientes con EC. El 52,2% de los pacientes portadores del alelo *rs352140-T* sufrió este tipo de complicaciones en algún momento de la enfermedad, mientras que en el resto de pacientes la frecuencia fue de 38,7% [$P=0,036$; OR (IC95%)=1,732 (1,032-2,908)]. Tras la realización de una regresión logística para confirmar este resultado, incluyendo sexo, localización, patrón evolutivo y *rs352140* como covariables, se confirmó la asociación del sexo masculino ($P=0,001$; OR=1,704) y del patrón fistulizante o estenosante ($P < 0,001$; OR=5,512) con la aparición de complicaciones digestivas, pero el polimorfismo *rs352140* fue eliminado de la ecuación ($P=0,174$).

A pesar de que, dentro de los pacientes con EC, en mujeres no se encontró ninguna asociación, en hombres se observó que el genotipo *TLR7 rs179008-T0* influía en la localización de la enfermedad. El 61,7% de los pacientes portadores de este genotipo evolucionó con localización ileocólica de la enfermedad, mientras que esta localización se observó en el 36% de los de los portadores del genotipo *rs179008-A0* [$P=0,006$; OR (IC95%)=2,854 (1,334-6,107)]. Al analizar la asociación del polimorfismo *TLR8 rs3764880* con el fenotipo en enfermedad de Crohn se obtuvieron algunos resultados interesantes. En mujeres con EC, el alelo minoritario *rs3764880-G* de este SNP se asoció con la aparición de abscesos, la presencia de MED oculares y complicaciones tromboembólicas (Tabla 36). Más del 60% de las mujeres portadoras de *rs3764880-GG* han tenido que ser intervenidas en alguna ocasión, en muchos de los casos debido a la complicación de abscesos (presentes en el 50% de las pacientes). La presencia de MED también fue más frecuente en estas mujeres que en el resto, ya que casi el 80% desarrolló alguna complicación de este tipo, concretamente se observaron diferencias significativas al analizar la incidencia de MED oculares, principalmente uveítis, y complicaciones tromboembólicas; sin embargo, los subgrupos clínicos formados tras la estratificación de los pacientes por sexo y fenotipo hace que disminuya la potencia estadística y los límites superior e inferior del intervalo de confianza estén alejados. Aunque en pacientes varones *rs3764880-G0* se observó un aumento de los casos de CTE

RESULTADOS

(un 9,4% vs. 2,2% en *rs3764880-A0*) no se llegaron a detectar diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 36. Asociación del polimorfismo *TLR8 rs3764880* con fenotipo en mujeres con Enfermedad de Crohn (EC)

		GG n(%)	AA + AG n(%)	P	Odds Ratio (IC95%)*
Abscesos	Sí	9 (20,9)	34 (79,1)	0,019 [†]	3,441 (1,266-9,352)
	No	9 (7,1)	117 (92,9)		
MED oculares	Sí	3 (50,0)	3 (50,0)	0,017 [†]	9,867 (1,828-53,266)
	No	15 (9,2)	148 (90,8)		
CTE	Sí	7 (63,6)	4 (36,4)	<0,001	23,386 (5,926-92,289)
	No	11 (7,0)	147 (93,0)		

*Tras comparación entre subgrupos clínicos

[†]Se calcula el test exacto de Fisher

IC=Intervalo de Confianza; MED=Manifestaciones extradigestivas; CTE=Complicaciones tromboembólicas.

La asociación del polimorfismo *TLR8 rs3764880* tan sólo se observa cuando hay doble dosis del alelo mutado *G*, es decir, en el caso del homocigoto mutante *GG*: esto podría explicar que en pacientes varones no se hayan encontrado diferencias significativas.

5 DISCUSIÓN

En este trabajo se ha incluido el estudio de *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1* y *MICA*, situados en la región MHC, y algunos polimorfismos en los genes de los *TLRs* y *NOD2*. Como se ha comentado previamente en la introducción (apartado 1.2.3), los polimorfismos incluidos en este trabajo ya han sido objeto de estudio por otros investigadores en relación con múltiples enfermedades autoinmunes, entre ellas la EII. Sin embargo, la reproducibilidad de los resultados obtenidos no siempre es la deseable, llegando a conclusiones diferentes o, en algunos casos, incluso contradictorias. Uno de los principales motivos que puede explicar estas supuestas incongruencias es sin duda la heterogeneidad entre poblaciones, como se pone de manifiesto en los estudios llevados a cabo por Jostins y su equipo en 2012 (123) y Lui *et al* en 2015 (124). En el primer estudio, realizado en población europea, se identificaron 163 loci que intervenían en la susceptibilidad a EII. En el segundo, en el que se incluyó población asiática, se demostró que la mayoría de regiones de susceptibilidad eran comunes pero que existían nuevos genes de susceptibilidad así como la ausencia de asociación de otros genes (como *NOD2* o *IL23R*). Estas diferencias también se pueden constatar en otros GWAS realizados en población asiática (367, 368). Además de las diferencias étnicas, a la hora de comparar los hallazgos de diferentes estudios entre sí es importante tener en cuenta otra serie de factores que pueden contribuir a la divergencia de los resultados, como por ejemplo la metodología empleada por cada autor (ya sea experimental o de análisis de datos), el tamaño muestral de la población, la heterogeneidad genética y la penetrancia incompleta, la dificultad a veces de establecer un diagnóstico diferencial entre la CU y la EC o la utilización de criterios clasificatorios diferentes (369). Por todos estos motivos, lejos de ser redundantes, siguen siendo necesarios más estudios de asociación genética en diferentes poblaciones para intentar comprender la patogénesis de la enfermedad, poder establecer marcadores genéticos para facilitar el diagnóstico precoz o determinar relaciones entre genotipo y fenotipo que contribuyan al desarrollo de una terapia cada vez más personalizada al paciente en cada población.

5.1 DESCRIPCIÓN DE LA COHORTE

En nuestra población de pacientes, la proporción de hombres es mayor en ambas enfermedades, contribuyendo el sexo masculino a una mayor susceptibilidad a padecer EII. Según los resultados obtenidos por Saro *et al* (370) y Garrido *et al* (371) en poblaciones del norte y del sur de España respectivamente, la proporción de hombres y mujeres para cada una de las enfermedades es similar, es decir, el sexo no se relacionó con la susceptibilidad a la EII en ninguno de estos dos estudios. En otros trabajos, principalmente llevados a cabo en poblaciones con alta prevalencia de EII, se ha descrito una mayor incidencia de CU en hombres y de EC en mujeres, mientras que en zonas de baja prevalencia parece no haber diferencias o haber más casos de hombres que de mujeres dentro de la población con EC(372-375). Estas discrepancias no permiten determinar cuál es la relación entre el sexo y la EII.

Existe una gran dispersión en la edad a la que se diagnosticaron nuestros pacientes con EII, ya que hay tanto casos pediátricos como casos diagnosticados a

edad muy avanzada. Debido a esta gran dispersión, se decidió elegir la mediana en lugar de la media como medida de la centralidad de la distribución: la mediana en el caso de la CU fue de 34 años y de la EC de 28 años. Tal y como está descrito en la bibliografía (374, 376, 377), en nuestra población la edad de comienzo de la EC fue más temprana y se describieron más casos pediátricos que en el caso de la CU (8,9% y 6,5% de pacientes diagnosticados antes de los 17 años de EC y CU, respectivamente). En nuestro estudio detectamos diferencias entre hombres y mujeres en la edad a la que fueron diagnosticados: la edad de comienzo de la CU es menor en mujeres mientras que en la EC los hombres son diagnosticados a edades más tempranas. Tal y como se puede consultar en la revisión realizada por Molodecky *et al* (7), no existe un patrón claro que relacione la edad de comienzo de los síntomas con el sexo en los trabajos publicados hasta ahora. Con respecto a la evolución de la enfermedad, el 20,9% de los pacientes con CU y el 22,1% de los pacientes con EC evolucionaron de forma continua, con un periodo de tiempo entre brotes inferior a 6 meses. En este caso también se han observado diferencias entre poblaciones, ya que en el estudio llevado a cabo por Munkholm *et al* en 1995 (378), el porcentaje de pacientes con EC y evolución crónica continua fue bastante menor, oscilando entre el 10 y el 15%.

Todos nuestros pacientes con CU tenían afectado el recto, y ésta resultó ser la única región afectada en el 18,2% de los enfermos. Sin embargo, en el 42,4% de los pacientes la enfermedad se extendía por todo el colon y el 39,4% se catalogó dentro de colitis distal o colitis izquierda. Esta clasificación se hizo en base al último informe clínico, independientemente de cuál fuera la categoría en el momento del diagnóstico. Como se comentó en el apartado 3.1, todos los pacientes incluidos en nuestro estudio fueron diagnosticados y seguidos por el Servicio de Digestivo de nuestro hospital como mínimo un año antes de su inclusión en el estudio. Aún así, la comparación con otros trabajos es complicada porque la CU no se trata de una entidad estática, sino que va evolucionando a lo largo del curso de la enfermedad. Por regla general todos los pacientes comienzan con afectación del recto, pero tras 20 años de evolución aproximadamente el 50% de ellos es catalogado dentro de pancolitis (374).

Dentro de los pacientes con enfermedad de Crohn, la localización más frecuente fue la EC ileal (40,2%), seguida de EC ileocólica (36,4%) y de EC colónica (19,4%). Tan sólo el 4% de los enfermos tuvo afectación del TDS. En este caso también hay que tener en cuenta el carácter dinámico de la enfermedad; aun así estos resultados son muy similares a los publicados por Saro *et al* en una cohorte asturiana (370). En otras poblaciones la frecuencia de una EC exclusivamente colónica es mayor, rondando el 30% (28). Con respecto al patrón clínico, la mayoría de pacientes evolucionó con un patrón inflamatorio (51,5%), el 29,6% con un patrón fistulizante y el 18,9% con un patrón estenosante. Tal y como se establece en la clasificación de Montreal, los pacientes con Epa (19,4% en nuestro estudio) no se incluyeron dentro del grupo de pacientes con patrón fistulizante; precisamente por este motivo, es importante tener en cuenta los criterios clasificatorios del investigador a la hora de comparar estudios entre sí, ya que las proporciones pueden variar considerablemente. Nuestros resultados son bastante parecidos a los publicados previamente en la bibliografía (28), aunque en algunas

poblaciones se ha descrito un porcentaje de pacientes con Epa considerablemente mayor (374).

Coincidiendo en lo publicado en la bibliografía (11, 89, 374), la enfermedad de Crohn es más grave que la colitis ulcerosa en nuestra población, con una mayor aparición de complicaciones digestivas, mayor tasa de intervención quirúrgica y aumento de la necesidad de tratamiento inmunosupresor y/o terapia biológica. En el caso de los pacientes con CU, la pancolitis se asoció con la presencia de complicaciones digestivas, ya que éstas fueron mucho más frecuentes que en pacientes con colitis distal o proctitis. Por su parte, en todos los enfermos con EC, independientemente de la localización, la frecuencia de estas complicaciones fue similar, a excepción del caso de la Epa: más del 30% de pacientes con EC colónica sufrió enfermedad perianal mientras que ésta sólo se demostró en el 16% de los pacientes con EC ileal o ileocólica. Esta asociación ya se había descrito previamente en la bibliografía, como en el estudio de Kanaan *et al* (379).

La aparición de MED fue también más frecuente en EC que en CU: un 33,2% de pacientes con CU desarrolló MED, siendo las más frecuentes las MED articulares, seguidas de las hepatobiliares. Por su parte, casi la mitad de los pacientes con enfermedad de Crohn sufrió algún tipo de MED. Las más frecuentes fueron las hepatobiliares, articulares, dermatológicas, oculares y complicaciones tromboembólicas, en ese orden de importancia. La proporción de pacientes que desarrolla MED en nuestra población, así como el hecho de que sea mayor en pacientes con EC que con CU, es similar a la descrita por otros autores (380, 381). Sin embargo, se han descrito diferencias en la aparición de MED dependiendo del área geográfica (381). En nuestra población de pacientes la presencia de MED hepatobiliares no se relacionó con el tratamiento con tiopurinas, si bien en el caso de la EC las diferencias entre pacientes que recibieron este tratamiento y los que no estuvieron al borde de la significación.

5.2 HLA Y LA EII

La relación de la región *HLA* con la EII ha sido estudiada por múltiples autores, habiéndose publicado más de 150 trabajos de asociación hasta la fecha (192). El ligamiento de esta región del genoma con la CU y la EC ha sido recientemente demostrado una vez más por los estudios de asociación del genoma completo (101, 114, 116, 118). En el estudio a gran escala llevado a cabo por Jostins *et al* en 2012, la señal de asociación más fuerte para la CU se situó en el *rs6927022*, entre *HLA-DQB1* y *HLA-DRB1*, y para la EC en la región de *HLA-I* (123), lo que demuestra la importancia de los genes *HLA* en la EII. Por regla general, la asociación de *HLA* con la CU es más fuerte que con la EC, tal y como demuestran los estudios realizados en ambas enfermedades.

Además de en CPAs profesionales, como células dendríticas, macrófagos o células B, las moléculas *HLA-I* y *HLA-II* se pueden expresar en las CEI y sus niveles de expresión aumentan en condiciones inflamatorias, como por ejemplo en el caso de la EII. Las CEI también expresan moléculas coestimuladoras y presentan péptidos antigénicos a las células T. Tanto CPAs profesionales como CEIs

intervienen en el balance entre la tolerancia frente a la microbiota y el comienzo de una respuesta inmunitaria efectora (382). Dado que en la patogénesis de la EII interviene una respuesta inmunitaria adaptativa inadecuada frente a la flora comensal, es lógico pensar que las moléculas HLA intervengan en la inflamación intestinal, ya que la presentación de antígenos a células T CD4+ y CD8+ es la primera señal necesaria para la sinapsis inmunológica. Como ya se comentó en la introducción, el polimorfismo de las moléculas HLA se concentra sobre todo en los dominios que conforman el surco de unión al péptido, por lo que diferentes moléculas de HLA podrían unir diferentes péptidos o con diferente afinidad. En la EII se ha observado la presencia de linfocitos T autorreactivos, que reconocen antígenos propios y que responden frente a ellos como si de antígenos extraños se tratase (89). Esto puede ser debido en parte al fenómeno conocido como “mimetismo molecular” (o *molecular mimicry*, en inglés), por el cual un linfocito T específico para un epítipo concreto puede responder frente a otro molecularmente muy parecido, estableciéndose así algo parecido a una reacción cruzada. En la generación de linfocitos T autorreactivos y el mimetismo molecular en el intestino pueden desempeñar un papel muy importante las moléculas de HLA (383). Además, la asociación de determinados alelos *HLA* con una localización anatómica concreta de las lesiones puede estar relacionada con la diferente composición de la microflora en esas localizaciones.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo son una prueba más de la implicación de los genes *HLA* en la EII, así como de su utilidad en la práctica clínica con respecto al diagnóstico y al seguimiento del paciente gracias a su relación con el fenotipo. A continuación se discuten los resultados obtenidos en nuestro estudio y su comparación con lo previamente descrito por otros autores.

5.2.1 Relación de *HLA-DRB1*01:03* y *HLA-DQB1*05:01* con la EII

El alelo *HLA-DRB1*01:03* se asoció con un mayor riesgo de desarrollar CU y EC en nuestra población. La frecuencia de este alelo fue muy baja en controles sanos (1%) mientras que alcanzó el 4,1% en pacientes con CU y 3,3% en pacientes con EC. Teniendo en cuenta los valores de OR en ambos casos, la asociación de *DRB1*01:03* con CU es la más fuerte dentro de las descritas en este trabajo (OR=4,846), y la segunda más fuerte, después de *NOD2*, en el caso de la EC (OR=3,510). El haplotipo *DRB1*01:03/DQB1*05:01* se asoció en nuestra población con mayor riesgo de desarrollar tanto CU como EC; sin embargo, en ambos casos se confirmó que la asociación de *DRB1*01:03* no era secundaria al LD existente con *DQB1*05:01* ya que éste último se encuentra también en LD con otros alelos *HLA-DRB1* (como por ejemplo *DRB1*01:01*) que no se asociaron con ninguna de las dos enfermedades. Dentro de los trabajos publicados que han estudiado la relación entre los genes *HLA* y la EII, probablemente la asociación de *DRB1*01:03* con la CU sea una de las más consolidadas, ya que se ha descrito en poblaciones muy diferentes (83, 97, 98, 194-196, 198, 199). La relación de este alelo con la EC también ha sido altamente replicada en otras poblaciones caucásicas (195, 196, 199). En el reciente estudio llevado a cabo por Goyette y su equipo (100), en el que se incluyeron más de 32000 pacientes con EII y más de 34000 controles sanos, se demostró que la presencia de *HLA-DRB1*01:03* es un factor de riesgo para el

desarrollo de CU y de EC por separado, por lo que puede considerarse un alelo asociado con EII.

Aunque la detección de este alelo podría utilizarse en la práctica clínica para ayudar al diagnóstico diferencial entre la EII y otras patologías, al ser la frecuencia de este alelo tan baja en la población (menos del 2% en población europea (383), su utilidad clínica podría estar más relacionada con el fenotipo. En nuestra población de pacientes con CU, el alelo *DRB1*01:03* se asoció con la presencia de fístulas y, aunque no hubiera diferencias estadísticamente significativas, la frecuencia del alelo también fue mayor dentro del grupo de pacientes que han necesitado cirugía o que cursaron con evolución crónica continua. Por otro lado, el alelo *DQB1*05:01*, con el que se encuentra en LD, también se relacionó con la presencia de fístulas y la necesidad de colectomía; aunque estadísticamente no se haya podido demostrar cuál de los dos alelos estaba asociado realmente con la presencia de complicaciones digestivas, y por lo tanto con la necesidad de cirugía, el hecho de que el haplotipo *DRB1*01:03/DQB1*05:01* estuviera relacionado con este fenotipo, y no otros haplotipos de los que forma parte *DQB1*05:01*, hizo pensar que es realmente *DRB1*01:03* el responsable. Además, acorde con nuestros resultados, la relación de *DRB1*01:03* con una CU complicada y mayor necesidad de intervención quirúrgica ha sido descrita en la bibliografía (98, 194, 197). Por otro lado, el alelo *DRB1*01:03* se ha relacionado con pancolitis (84, 194, 197, 201), artritis periférica (384) o la aparición de MEDs en general (201, 202) en otras poblaciones. En nuestro estudio, no se ha asociado el alelo con la localización de la enfermedad pero sí que se ha observado un aumento de su frecuencia entre aquellos pacientes que han sufrido manifestaciones articulares en algún momento de la enfermedad, aunque las diferencias desaparecieron tras la corrección de Bonferroni. En resumen, en nuestra población de pacientes con CU el alelo *DRB1*01:03* se relaciona con la aparición de complicaciones, tanto digestivas como extradigestivas, brotes frecuentes y la necesidad de cirugía; el hecho de que tan sólo en el caso de la aparición de fístulas se observara significación estadística, puede ser debido a la disminución de la potencia estadística por la baja frecuencia del alelo incluso en pacientes.

Con respecto a la EC, se ha descrito en la bibliografía la asociación de *HLA-DRB1*01:03* con una localización exclusivamente colónica de las lesiones (88, 99, 196), con la aparición de Epa (211) o con el comienzo tardío de la enfermedad (88). En nuestra población, la frecuencia de este alelo fue más de tres veces superior en pacientes con EC colónica que con EC ileal o ileocólica, indicando la OR que el riesgo de evolucionar con afectación exclusivamente colónica es mucho mayor en presencia del alelo. El hecho de que este alelo se asocie con la CU y con localización colónica de la EC, hace pensar que pueda desempeñar un papel importante en la evolución de la enfermedad en el colon. El alelo *DRB1*01:03* se diferencia de otros alelos *HLA-DRB1* por el cambio **LLEQR** por **ILEDE** en los codones 67-71 del exón 2. Estos residuos se sitúan en el surco donde se une el péptido antigénico y pueden estar implicados en la unión de péptidos relacionados con la enfermedad (195). El hecho de que *DRB1*01:03* se asocie con CU y con EC colónica sugiere firmemente que este alelo esté implicado en la respuesta inmunitaria frente a la flora comensal en el colon (100). A diferencia de lo encontrado en el caso de la CU, no se ha asociado con la aparición de

complicaciones digestivas o la necesidad de cirugía. Tampoco se ha descrito en nuestra población la relación entre *DRB1*01:03* y la edad al diagnóstico.

5.2.2 Asociación de *HLA-C*12:02* y *HLA-DRB1*15:02* con la CU

En nuestra población, se observó una fuerte asociación del alelo *DRB1*15:02* con la colitis ulcerosa. La frecuencia de este alelo en pacientes fue más de cuatro veces superior que en controles, y, según el valor de OR, después de la asociación de *DRB1*01:03*, es la relación más fuerte descrita con la CU en nuestro estudio. La asociación de *DRB1*15:02* con la CU ya ha sido descrita en otras cohortes con origen étnico diferente, lo que sugiere que se trate de una variante que confiere susceptibilidad a CU real (98, 195, 197, 203-207), y son muchos los estudios que han confirmado la asociación de HLA-DR2 con la CU, antígeno que se corresponde con *DRB1*15* y *DRB1*16* por serología (206, 385, 386). En nuestra población, *DRB1*15:02* y *DQB1*06:01* están en LD, y el haplotipo que forman ambos se asoció con mayor riesgo de padecer CU. Ninguno de los dos alelos forma parte de otro haplotipo con una frecuencia superior al 1%, por lo que mediante el análisis de haplotipos no pudimos determinar si la asociación se debía a *HLA-DRB1*15:02*, a *HLA-DQB1*06:01* o a ambos. Sin embargo, tras la realización de un análisis multivariable incluyendo los dos alelos como variables independientes, la relación de *DQB1*06:01* con la CU desapareció, sugiriendo que es realmente *DRB1*15:02* el alelo de susceptibilidad. En el estudio realizado por Goyette y su equipo (100) también describieron la relación entre *DRB1*15:02* y la CU; no obstante, se afirmó que ésta era secundaria al LD con otros alelos *HLA*, mientras que el alelo *DRB1*15:01* sí que parecía estar asociado con mayor riesgo de desarrollar CU según estos autores. Por el contrario, en nuestro estudio, la frecuencia de *DRB1*15:01* fue muy similar en pacientes y en controles (10,2% y 9,5%, respectivamente). En cuanto a la estructura molecular de la proteína que codifican ambos alelos, la única diferencia entre *HLA-DRB1*15:01* y *DRB1*15:02* es la presencia en el residuo 86 de una valina o una glicina respectivamente; este residuo interviene en la estabilidad del dímero $\alpha\beta$ e influye en la selección del péptido antigénico. Otros alelos asociados con CU, como *DRB1*01:03*, también tienen una glicina en la posición 86 de la cadena β (195). Según Futami *et al*, (203) la presencia de 86-Gly aumenta la susceptibilidad a padecer CU, por lo que se explicarían las asociaciones de *DRB1*15:02* y *DRB1*01:03* con mayor riesgo de padecer CU descritas en este trabajo. En relación al fenotipo de la CU, Masuda *et al* (210) describieron asociación de *DRB1*15:02* con la gravedad de la enfermedad, reflejada en localización pancolónica o la falta de respuesta al tratamiento. Por el contrario, también se ha asociado este alelo con menor necesidad de colectomía (207). En nuestro caso no se ha relacionado ningún rasgo fenotípico con la presencia del alelo.

*HLA-DRB1*15:02* y *HLA-DQB1*06:01* forman parte del haplotipo extendido *B*52:01/C*12:02/DRB1*15:02/DQB1*06:01*, que se ha asociado con mayor riesgo de padecer CU en población japonesa (387, 388). A pesar de las notables diferencias entre población caucásica y asiática en cuanto a la frecuencia de estos alelos (205, 387), en nuestro estudio se han obtenido resultados bastante parecidos. Además de la asociación ya mencionada de *DRB1*15:02* y *DQB1*06:01*

con la CU, *C*12:02* es también un alelo de susceptibilidad. La frecuencia de *B*52:01* fue el doble en pacientes que en controles, pero la significación estadística desapareció tras la corrección de Bonferroni. *C*12:02* y *B*52:01* están en LD, pero el hecho de que no se haya podido demostrar estadísticamente la asociación de *B*52:01* con la CU y que el haplotipo formado por ambos tampoco estuviera asociado con la enfermedad, hace pensar que el alelo de susceptibilidad sea *C*12:02*; sin embargo, al tratarse de alelos con frecuencias bajas en la población control sería necesario aumentar el tamaño muestral para confirmar esta hipótesis. Son muchos los autores que han descrito la asociación de *B*52:01* y/o de *C*12:02* con colitis ulcerosa en diferentes poblaciones (98, 206, 258, 389-391). En el estudio de Goyette *et al* (100), afirmaron que la asociación de *DRB1*15:02* con la CU era, en parte, secundaria a la de *HLA-C*12:02*. Sin embargo, en nuestra población la asociación de *DRB1*15:02* con la CU resultó ser independiente de *HLA-B* y *HLA-C*, ya que la significación estadística continuó tras la realización de la regresión logística con el resto de alelos que conforman el haplotipo de riesgo descrito como covariables.

5.2.3 Otros alelos relacionados con la CU o con su fenotipo

*HLA-DRB1*11:01* es otro alelo de riesgo para el desarrollo de la CU en nuestra población, ya que la frecuencia de éste fue 1,5 veces mayor en pacientes que en controles. Dentro de las asociaciones que se han descrito en nuestra cohorte con mayor riesgo de desarrollar CU, la de *DRB1*11:01* es la más débil, de acuerdo con los valores de OR (OR=1,7); sin embargo, en el estudio llevado a cabo por Rioux y su equipo resultó ser la asociación más fuerte con la CU dentro de la región MHC (OR=4,6) (180). En otros trabajos, además de la relación de *DRB1*11:01*, se describió la asociación de *DRB1*12:01*, alelo incluido también dentro de la especificidad HLA-DR5 (83, 100). En nuestro estudio este alelo no se ha asociado con CU, aunque al ser la frecuencia tan baja en controles y pacientes (1% y 1,1% respectivamente) es muy difícil poder encontrar diferencias.

Nuestro grupo de investigación describió en 2007 la relación de *DRB1*03* con un menor riesgo de desarrollar CU (217). En el presente estudio no sólo se confirman estos resultados sino que se incluye además el tipaje *HLA* de cuatro dígitos, en lugar de dos, y el estudio de LD con otros alelos *HLA*. La frecuencia del alelo *DRB1*03:01* fue menor en pacientes con CU que en población control, y tras el análisis estadístico se confirmó el papel protector del mismo. *DQB1*02:01*, alelo con el que se encuentra en LD, también resultó ser protector frente a la enfermedad en nuestra población, así como el haplotipo que forman los dos alelos; sin embargo, tras la realización de la regresión logística incluyendo *DRB1*03:01* y *DQB1*02:01* como variables independientes, tan sólo *DRB1*03:01* continúa siendo protector frente a la enfermedad. El papel protector de *DRB1*03:01* (o HLA-DR3), así como el de *DQB1*02:01* secundario al LD existente, también ha sido descrito por otros autores (100, 198, 209, 392, 393). En otros estudios, sin embargo, no se ha encontrado protección de *DRB1*03:01*, como por ejemplo en el metanálisis llevado a cabo por Stokkers y su equipo en 1999 (97) o el trabajo de Ahmad *et al* en 2003 (98). La relación de protección entre el alelo *DRB1*04:01* y la CU probablemente sea una de las más replicadas en la bibliografía, ya que se ha

descrito en cohortes muy diferentes (82, 98, 100, 386). En nuestro estudio, la frecuencia de *DRB1*04:01* es menor en pacientes que en controles (1,5% y 2,8%, respectivamente) aunque las diferencias desaparecieron tras la corrección. Los resultados aparentemente contradictorios de un estudio a otro en cuanto al papel de *DRB1*03:01* y *DRB1*04:01*, podrían estar relacionados con el origen étnico de las cohortes o deberse a diferencias ambientales y, por tanto, en la composición de la microbiota.

A pesar de la de sobra demostrada asociación de *HLA-B*27* con espondilitis anquilosante (185), en nuestro estudio no se ha podido demostrar esta relación estadísticamente, debido probablemente a la baja frecuencia del alelo en los pacientes y la consiguiente disminución de la potencia estadística. Tampoco se ha descrito en nuestra población la asociación de *B*27* con uveítis, como previamente describieron Orchard y su equipo (202).

5.2.4 Otros alelos relacionados con la EC o con su fenotipo

Además de *DRB1*01:03*, en nuestro estudio se han encontrado otros alelos que aumentan la susceptibilidad a EC o relacionados con determinadas características clínicas. Además, también se ha descrito la presencia de alelos protectores frente a la misma.

La frecuencia del alelo *HLA-DRB1*01:01* fue prácticamente la mitad en pacientes que en controles, y se ha descrito su papel protector frente a la EC en nuestra población. El haplotipo que forma con *HLA-DQB1*05:01*, alelo con el que se encuentra en LD, también es protector frente a EC. Este alelo *HLA-DQB1* está en LD con *DRB1*01:03*, como se ha comentado en el Apartado 5.2.1; el hecho de que dos de los alelos asociados con *DQB1*05:01* muestren efectos opuestos sobre el riesgo de desarrollar EC, demuestra que el papel de este alelo *HLA-DQB1* sea secundario al de *HLA-DRB1*. El papel protector de *DRB1*01:01* se ha publicado en otros trabajos (100). En otras poblaciones también se ha descrito el papel protector de *DRB1*03* (100, 212, 213), y su relación con la presencia de MED y localización colónica (394), sin embargo en nuestro caso no se encontraron diferencias en comparación con la población control ni entre subgrupos clínicos. Por otro lado, se ha demostrado el papel protector de *DRB1*15:01* frente a EC en poblaciones muy diferentes, como la japonesa (216), la europea (208) o en el metanálisis realizado por Stokkers y su equipo en 1999 (papel protector de HLA-DR2) (97). En nuestra población de pacientes se observó una disminución de la frecuencia de *HLA-DRB1*15:01* en pacientes con EC con respecto a controles (5,9% vs. 9,5%), sin llegar a ser estas diferencias significativas. Ahmad y colaboradores (211) además de describir el papel protector de *DRB1*15:01* frente a EC, lo asocian con la presencia de Epa. No se ha encontrado relación del alelo con esta complicación en nuestro estudio.

Probablemente una de las asociaciones con la EC más replicadas en la bibliografía sea la de *DRB1*07:01* (88, 99, 100, 211). Además de con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, este alelo se ha relacionado con EC ileal (88, 99, 209, 211), o con un comienzo temprano de la enfermedad (213). En nuestra población también se observó un aumento de la frecuencia de este alelo en

pacientes con EC (20,8% vs. 16,4%), especialmente dentro de aquellos que tienen afectado el íleon, aunque las diferencias desaparecieron tras la corrección estadística. No observamos relación con la edad al diagnóstico ni ninguna otra característica fenotípica en este caso. Los alelos *DRB1*04:01* (97, 100, 205) y *DRB1*13:02* (97, 100, 205, 208, 209, 214, 215) también se han asociado con la EC en otras cohortes. En nuestra población de enfermos con EC, por el contrario, no se observaron diferencias en cuanto al alelo *DRB1*04:01* entre pacientes y controles; sin embargo sí que se detectó un aumento de la frecuencia del alelo *DRB1*13:02*, aunque no se consiguió demostrar la asociación estadísticamente.

Si bien la mayoría de asociaciones descritas de los genes *HLA* se refieren a *HLA-II*, los genes de *HLA-I* también se han relacionado con EC. Por ejemplo, *B*52:01* y *B*57:01* se han asociado con EC en el estudio multicéntrico llevado a cabo por Goyette y su equipo (100). En nuestro caso, la frecuencia de ambos alelos fue superior en pacientes con EC que en controles, pero en ninguno de los dos casos se demostraron diferencias estadísticamente significativas tras la corrección de Bonferroni. Tampoco hemos descrito asociación *HLA-B*52* con EC colónica, tal y como se describió en población japonesa (395). Los alelos *HLA-A*29:02* y *HLA-B*49:01* se han asociado con la EC en nuestra población. La frecuencia del alelo *A*29:02* llegó a 9,5% en pacientes mientras que no alcanzó el 6% en controles; por el contrario, el alelo *A*29:01* fue significativamente más frecuente en población sana que en enfermos (2,2% y 0,1%, respectivamente), ya que sólo un paciente con EC portaba este alelo. De estos resultados se podría interpretar que el alelo *A*29:02* está asociado con la enfermedad en nuestra población, y que los resultados obtenidos en *A*29:01* son consecuencia del aumento de frecuencia del otro alelo, o que *A*29:01* es protector frente a la enfermedad. Con los datos de nuestro estudio no se puede llegar a ninguna conclusión y sería necesario realizar nuevos trabajos ampliando el tamaño muestral o incluyendo otras cohortes. Por otro lado, la frecuencia del alelo *HLA-B*49:01* fue un poco más del doble en pacientes con EC que en controles, indicando el análisis estadístico que se trata de un alelo que confiere susceptibilidad a la enfermedad en nuestra población. Para confirmar esta asociación y descartar que fuera debida a los alelos con los que se encuentra en LD (*C*07:01* y *MICA*A6*) se realizó el análisis de haplotipos. Ni *C*07:01* ni *MICA*A6* se asociaron con EC por separado y, a pesar de que el haplotipo *B*49:01/MICA*A6* resultó ser un haplotipo de riesgo frente a EC, ningún otro haplotipo del que forma parte *MICA*A6* se asoció con la enfermedad, por lo que efectivamente se confirma la asociación de *B*49:01* con la EC en nuestra población. No hemos encontrado en la bibliografía que la relación de *A*29:02* y de *B*49:01* con la EC se haya descrito en otras cohortes (83, 100, 208, 391), por lo que éstos podrían ser alelos de susceptibilidad a la EC en nuestra región. Sería interesante ampliar el estudio aumentando el número de pacientes e incluir análisis paralelos en otras cohortes mediterráneas para confirmar estos resultados.

En nuestro estudio también hemos encontrado cierta relación de *HLA* con el fenotipo de la EC que merece la pena ser comentada. El alelo *HLA-A*11:01* resultó ser protector frente a la aparición de complicaciones digestivas, como fístulas o abscesos, en nuestra población de pacientes con EC. Esta relación no se ha observado en nuestros pacientes con CU ni en otras cohortes, según lo consultado

en la bibliografía. Por otro lado, los alelos *DRB1*14:01* y *DQB1*05:03* están relacionados con una mayor incidencia de MED hepatobiliares, concretamente esteatosis. Ambos alelos se encuentran en estrecho LD, por lo que en un principio no se pudo determinar si el efecto sobre el fenotipo se debía a uno o a otro. Tras la realización de un análisis multivariable incluyendo los dos alelos y otras posibles variables de confusión, como el tratamiento con tiopurinas, la edad o el sexo, se confirmó la asociación de *DQB1*05:03* con la presencia de MED hepatobiliares, pero no la de *DRB1*14:01*. Otros autores han sugerido el papel de la inmunidad adaptativa, y más concretamente de las moléculas de *HLA-DQB1*, en el desarrollo de la esteatosis, o hígado graso no alcohólico (396). En un estudio en población turca se relacionó directamente la presencia de la molécula HLA-DQ5 con un mayor riesgo de desarrollar esteatosis no alcohólica (397); este resultado apoyaría nuestra teoría de que sea el alelo *DQB1*05:03* el que está asociado con la aparición de MED hepatobiliares en nuestros pacientes con EC. Sería necesario realizar nuevos estudios con un mayor tamaño muestral y con nuevas variables que permitan monitorizar bien a los pacientes con MED hepatobiliares para confirmar este resultado, así como con pacientes con esteatosis no relacionada con la EII. De confirmarse este resultado, el tipaje *HLA* podría ser útil en la práctica clínica para vigilar la aparición de esta complicación en pacientes portadores de *HLA-DQB1*05:03*, especialmente en aquellos que tengan pautado un tratamiento con tiopurinas.

5.3 MICA Y LA EII

Como parte de este trabajo se ha incluido el estudio de polimorfismos en el segmento TM de *MICA*. Dado que el mantenimiento de la integridad del epitelio es una de las condiciones indispensables para la homeostasis intestinal, el estudio de una molécula implicada en la señalización del daño nos ha parecido muy interesante. Como ya se ha comentado, la expresión de *MICA* es prácticamente indetectable en el epitelio intestinal en condiciones normales, pero aumenta en situaciones de estrés, tales como daño celular, shock térmico, infección, daño en el ADN o malignización celular (224). El reconocimiento de *MICA* a través de su receptor NKG2D, presente en células NK y LT citotóxicos, favorece la actividad citolítica y la eliminación de células dañadas, contribuyendo así a la renovación celular y el mantenimiento de la integridad del epitelio. Por este motivo, una disfunción en la expresión de *MICA* o en la unión a su receptor implicaría alteración en el control del daño del epitelio en el intestino y podría estar implicada en la patogénesis de la enfermedad así como en sus manifestaciones clínicas. En estudios previos, se ha demostrado la alteración de la expresión de *MICA* en el intestino de pacientes con EII. Mientras que en la CU se ha observado un defecto en la expresión de *MICA* y otras moléculas de MHC no clásicas (257), en la EC incluso se han llegado a observar niveles más elevados del transcrito primario y de la proteína (256). También se han realizado múltiples estudios genéticos de asociación con susceptibilidad a padecer EII y en relación con el fenotipo de la enfermedad en diferentes poblaciones. Los resultados obtenidos en estos trabajos a veces difieren de una población a otra y no existe un patrón claro de asociación. Por tanto, un estudio en una cohorte diferente está más que

justificado. A continuación se discuten los resultados obtenidos en nuestra población.

5.3.1 Papel protector de *MICA*A4* frente a la CU

En nuestra población de enfermos, el alelo *MICA*A4* es protector frente a la colitis ulcerosa. *MICA*A4* se encuentra en LD con *HLA-B*18:01* y *HLA-B*27:05*; la frecuencia de estos dos alelos fue menor en pacientes que en controles, aunque las diferencias no eran significativas. Sin embargo, los haplotipos que forman estos alelos *HLA-B* con *MICA*A4* son protectores frente a la enfermedad. El hecho de que disminuyan las frecuencias de ambos alelos *HLA-B* y de ambos haplotipos parece indicar que el papel protector lo desempeña *MICA*A4* y no los alelos *HLA-B* con los que se encuentra en LD. La OR en el caso de los haplotipos *B*18:01/MICA*A4* y *B*27:05/MICA*A4* es menor que teniendo sólo en cuenta a *MICA*A4*, y este descenso es especialmente llamativo en el caso de *B*27*, lo que podría sugerir que el efecto protector de *MICA*A4* es mayor cuando cosegrega con *HLA-B*27:05*. A pesar de que en otros estudios también se ha observado una menor frecuencia del alelo *MICA*A4* en pacientes con CU, como es el caso del llevado a cabo por Ding y su equipo en población china (222), no se había descrito hasta el momento en la bibliografía el papel protector de este alelo frente a la enfermedad; nuestro estudio es, por tanto, el primer trabajo en el que esta relación ha sido descrita y abre las puertas para futuras investigaciones.

Una explicación de por qué la variante *MICA*A4* desempeña un papel protector frente a la CU podría ser la relación con su receptor NKG2D. Los polimorfismos en el segmento TM no condicionan la afinidad de la unión de MICA con su receptor, pero sí que se ha descrito un SNP que produce un cambio de aminoácido en la posición 129 de la proteína que está directamente relacionado con la afinidad. La presencia de metionina en la posición 129 de MICA (*MICA-129^{met}*) da lugar a una unión de alta afinidad, mientras que con la presencia de valina (*MICA-129^{val}*) la unión es de baja afinidad (231). El polimorfismo *129^{met/val}* está en LD con el microsatélite en el dominio TM. Así, los alelos *MICA*A4* y *MICA*A9* están en LD con *MICA-129^{met}*, *MICA*A5* y *MICA*A5.1* con *MICA-129^{val}* mientras que *MICA*A6* segrega de forma independiente. Una unión débil entre MICA y su receptor conlleva una activación/coestimulación menos eficiente de NK y linfocitos T y la inclinación del balance Th1/Th2 hacia Th2 (398); en la colitis ulcerosa, la respuesta predominante es Th2, por lo que es lógico pensar que haya asociación con alelos de *MICA* que codifiquen para proteína que se una a NKG2D con baja afinidad, como por ejemplo la asociación de *MICA*A5.1* (en LD con *MICA-129^{val}*) y *MICA-129^{val}* en población china (222, 257, 399). Por tanto, tiene sentido que un alelo que codifica para proteína que se une con alta afinidad, como *MICA*A4*, sea protector frente a la enfermedad. Sin embargo, en otros estudios en población española (murciana) se ha encontrado asociación con el alelo de alta afinidad *MICA-129^{met}* con la CU. Según estos autores, el genotipo *MICA-Val/Met¹²⁹* es protector frente a la enfermedad, ya que es más frecuente en controles que en enfermos. En este estudio el tamaño muestral es muy reducido (59 pacientes con EC y 29 con CU) por lo que los resultados obtenidos hay que interpretarlos con cautela (225).

En nuestra población de enfermos tan sólo hay 8 pacientes que han desarrollado cáncer colorrectal. En este grupo, las frecuencias del alelo *MICA*A4* y del haplotipo *MICA*A4/MICA*A9* fueron mayores que en el resto de enfermos. Al tratarse de una subpoblación tan pequeña las diferencias desaparecieron tras la corrección de Bonferroni pero llama la atención la asociación de alelos que se encuentran en LD con *MICA-129^{met}* (condiciona unión de alta afinidad con NKG2D). A pesar de que a priori es lógico pensar que la unión de baja afinidad entre MICA y NKG2D es la que debería estar asociada con malignización y escape tumoral (398, 400), en otros estudios de asociación con cáncer colorrectal se obtuvieron resultados similares a los nuestros (401). Tanto en el estudio de Kopp *et al*, como en el nuestro, los tamaños muestrales deberían ser mayores para poder determinar exactamente si esta asociación es cierta o no.

5.3.2 Relación de otros alelos *MICA* y la EII

En nuestro estudio, el alelo más frecuente resultó ser *MICA*A6*, tanto en pacientes como en controles. Este resultado también se observa en otros estudios en población granadina (248, 253, 254), mientras que en otras poblaciones el más frecuente es *MICA*A5.1* (259, 402). El grupo de Sugimura (206, 258) describe la asociación del haplotipo *B*52/HLA-DR2/MICA*A6* con susceptibilidad a padecer CU. Estos autores encuentran LD de *MICA*A6* con *B*52*, *B*44* y *B*51* (al igual que en nuestro caso) y con DR2. Al analizar OR estratificadas y la asociación de haplotipos con CU, observaron que el haplotipo *B*52/MICA*A6* y el haplotipo DR2/*MICA*A6* estaban asociados con la enfermedad pero que otros haplotipos con *MICA*A6* no lo estaban, por lo que concluyeron que la asociación con *MICA*A6* se debía al LD existente con otros alelos *HLA-B* y *HLA-DR*. En nuestra población, se ha descrito la asociación del haplotipo *HLA-B*52:01/MICA*A6* con mayor riesgo de padecer CU; sin embargo, el hecho de que no se encuentren diferencias entre poblaciones en otros haplotipos de los que forma parte *MICA*A6*, y que *B*52:01* se encuentre a su vez en LD con *C*12:02*, hace pensar que la relación observada sea realmente secundaria a la asociación de *C*12:02* con la CU. Para confirmar estos resultados, se realizó un análisis multivariable incluyendo a los tres alelos en la ecuación y efectivamente se confirmó la asociación de *HLA-C*12:02*.

Otros autores han encontrado asociación del alelo *MICA*A5.1* con la colitis ulcerosa (199, 222, 223, 257). En nuestro estudio la frecuencia de este alelo en comparación con población control es ligeramente superior en pacientes con CU y prácticamente igual en pacientes con EC, pero no se encuentran diferencias significativas ni a nivel alélico ni genotípico. Sin embargo, en pacientes con CU sí que encontramos relación entre el alelo *MICA*A5.1* y la edad al diagnóstico: los pacientes con este alelo fueron diagnosticados más frecuentemente antes de los 17 o después de los 40 años. Sugimura *et al* (258) describieron en población japonesa asociación de *MICA*A6* con un comienzo temprano, siendo la mediana de edad de diagnóstico más de 10 años menor en homocigotos para *MICA*A6*. En nuestro caso no se observan diferencias al analizar media y mediana de edad al diagnóstico entre pacientes homocigotos para *MICA*A6* pero tampoco para *MICA*A5.1*. Por otro lado, *MICA*A5.1* también se asocia en nuestra población de pacientes con CU con la aparición de abscesos: más del 85% de los pacientes con abscesos fue

portador del alelo, ya sea en homocigosis o heterocigosis. La frecuencia del alelo también estaba aumentada entre los pacientes que han desarrollado fístulas, pero las diferencias no continuaron tras la corrección. La aparición de abscesos no es una complicación especialmente común entre los pacientes con CU; en nuestro caso, tan sólo un 4,1% (14 pacientes) desarrolló abscesos a lo largo de la enfermedad, por lo que el resultado debe ser interpretado con cuidado.

En el alelo *MICA*A5.1* se produce un cambio en el marco de lectura que tiene como consecuencia la aparición de un codón *stop* prematuro en el dominio transmembrana, lo que va a determinar ciertas diferencias con el resto de moléculas MICA. En primer lugar, *MICA*A5.1* es una proteína truncada que carece de tallo citoplasmático y, por lo tanto, de secuencia señal. En un principio se pensó que se trataba de una forma soluble que sería secretada por la célula (403), aunque posteriormente se demostró que *MICA*A5.1* puede encontrarse en la célula como proteína de membrana anclada a través de glucofosfatidilinositol o bien como proteína soluble en compartimentos intracelulares (251). En segundo lugar, gracias a la realización de estudios inmunohistoquímicos, se demostró que la localización subcelular de *MICA*A5.1* es aberrante, ya que, en lugar de ser basolateral como el resto de moléculas MICA, es apical. La localización basolateral de MICA tiene sentido ya que es ahí donde los enterocitos contactan de forma más estrecha con células NK y LIEs. La presencia de *MICA*A5.1* podría suponer una deficiencia funcional de MICA en cuanto a su papel en la inmunovigilancia frente a la aparición de tumores/malignizaciones epiteliales (241, 244). En tercer lugar, *MICA*A5.1* no es liberada de la célula como resultado de la acción de proteasas (proceso conocido como *shedding*), sino que es liberada como molécula completa formando parte de la membrana de exosomas (250, 404). Además, *MICA*A5.1* es liberada en forma de proteína multimérica, en vez de MICA soluble monomérica, por lo que es más potente que otras moléculas MICA a la hora de regular negativamente a su receptor NKG2D (251, 405). Por último, *MICA*A5.1* se encuentra en LD con la presencia de valina en la posición 129 (*MICA-129^{val}*), por lo que se trata de una molécula que se une al receptor con baja afinidad (231). Todas estas características de *MICA*A5.1* juntas podrían afectar a la respuesta inmunitaria en la mucosa intestinal y al diálogo con la flora comensal en pacientes portadores de *MICA*A5.1*; la presencia de este alelo podría favorecer la expansión bacteriana en una mucosa dañada y, por tanto, la formación de abscesos. Además, se ha visto que la composición de la microbiota es diferente dependiendo de la edad (60), por lo que la asociación de este alelo con la edad al diagnóstico también podría ser secundaria a la respuesta frente antígenos bacterianos en el lumen intestinal.

En nuestro caso no se ha observado ninguna asociación de *MICA* con la localización de la enfermedad. Sin embargo, en otro estudio en población del norte de España, se asoció el alelo *MICA*A5* con riesgo de padecer pancolitis y el alelo *MICA*A5.1* con colitis distal (260). Además, en población china, asociaron *MICA*A6* con pancolitis (258). Esta supuesta incongruencia de los resultados pueden deberse a: 1) diferencias étnicas y/o poblacionales, ya que aunque en el caso de Fdez-Morera *et al* también sea población española es sabido que hay muchas diferencias en el acervo genético entre el norte y el sur de España; 2) el trabajo de Fdez-Morera es previo a la clasificación de Montreal, por lo que utiliza criterios

clasificatorios de la EII diferentes; 3) el tamaño muestral en los estudios de Sugimura y de Fdez-Morera es mucho menor que el nuestro.

Otros autores no han encontrado ninguna asociación de *MICA* con susceptibilidad a padecer EII, ni CU ni EC (198, 225, 255, 259, 260). Los estudios que relacionan EC con *MICA* son muy escasos y en muy pocas ocasiones se ha conseguido describir asociación con la enfermedad. Un ejemplo es el caso de Kamoun y colaboradores, que describen un papel protector de *MICA**A5.1 en EC y asocian *MICA**A6 con una EC activa (261). En nuestra población no se observa ninguna diferencia en cuanto a frecuencias alélicas o genotípicas de *MICA-STR* entre pacientes y controles, ni tampoco asociación con el fenotipo de la enfermedad. El hecho de que haya tan pocos estudios con resultados que relacionen *MICA* y la EC en comparación con los resultados obtenidos para la CU, puede deberse a las diferencias de expresión de *MICA* observadas entre ambas enfermedades (257) o del papel que pueda desempeñar en el conjunto de la enfermedad. Por los hallazgos obtenidos hasta la fecha, y en relación con los últimos GWAS realizados para EII, muchos genes asociados con la EC están relacionados con el diálogo entre sistema inmunitario y especies bacterianas (reconocimiento antigénico, actividad antimicrobiana, presentación de antígenos) mientras que en la CU hay más genes relacionados con la alteración de la barrera epitelial, indicando que la ruptura de la tolerancia tiene orígenes diferentes en las dos enfermedades (406). En este contexto, se explica la relación de *MICA* como molécula importante en el mantenimiento de la salud del epitelio en mayor medida con la CU que con la EC.

5.4 *NOD2* Y LA EII

Desde que se describió la relación entre *NOD2* y la EII, muchos trabajos se han centrado en investigar el papel que desempeña este receptor en el intestino. El reconocimiento de su ligando, el MDP, no sólo interviene en la defensa frente a microorganismos, sino que también es crucial en el diálogo con la microbiota y en el mantenimiento del equilibrio entre flora comensal y patógena. *NOD2*, además, es clave en procesos como la autofagia, la integridad de la barrera epitelial o la regulación de la inmunidad innata y adaptativa (150). A pesar de que hay muchos trabajos publicados en la bibliografía que estudian la relación de *NOD2* con la EII, hemos decidido incluir este gen en nuestro estudio por varios motivos. En primer lugar, en los resultados publicados hasta la fecha existen diferencias entre poblaciones con respecto al riesgo que confiere cada variante frente a la enfermedad así como diferente relación con el fenotipo. En segundo lugar, dada la demostrada importancia de *NOD2* en la patogénesis de la EII, es interesante estudiar la posible relación con otros genes implicados en la inflamación de la mucosa intestinal. Por tanto, consideramos que el estudio de *NOD2* es fundamental en nuestro trabajo y que, sin duda, completa y enriquece el resto de resultados obtenidos. A continuación se comentan los resultados obtenidos en pacientes con CU y con EC en nuestra población.

5.4.1 *NOD2* y la CU

En nuestra población de pacientes con colitis ulcerosa no se ha relacionado ninguna de las tres variantes de *NOD2* con la susceptibilidad a la enfermedad ni con el fenotipo de la misma. Sin embargo, al comparar las dos poblaciones de pacientes entre sí, se encontró una frecuencia de la mutación en *NOD2* significativamente menor en pacientes con CU que en pacientes con EC (15,3% vs. 31%). A pesar de que en la mayoría de trabajos tampoco se haya relacionado *NOD2* con la CU, en algunos estudios sí que han encontrado asociación con la enfermedad: Gazouli *et al* describieron la asociación de *SNP8* y *SNP12* (280) mientras que Andriulli y su equipo lo hicieron con *SNP13* (279).

5.4.2 *NOD2* y la EC

5.4.2.1 *NOD2* y riesgo de desarrollar EC

Tras la descripción por primera vez de la asociación del gen *NOD2* con la enfermedad de Crohn en 2001, múltiples estudios han replicado este resultado en diferentes cohortes. En población europea, por ejemplo, entre un 30 y un 50% de los pacientes con EC portan alguna de las variantes minoritarias del gen (296). Sin embargo, se ha demostrado una falta de homogeneidad entre cohortes, ya que en algunas poblaciones, principalmente asiáticas, no se ha conseguido demostrar la asociación de *NOD2* con la enfermedad (298-300, 407). En el presente estudio, más del 30% de los pacientes con EC presentó alguna mutación en *NOD2*, indicando la OR que el riesgo de sufrir la enfermedad con *NOD2* mutado es 3 veces mayor que si no existe mutación. Muchos de los estudios de asociación realizados se pueden consultar en el metanálisis que llevado a cabo por Adler y colaboradores en el año 2011 (96).

Las tres variantes de *NOD2* se asociaron por separado con la EC en nuestro estudio. La diferencia más destacable la encontramos al analizar *SNP8*, donde la frecuencia de los genotipos mutados en pacientes fue casi el triple que en población sana (19,2% en EC y 7% en controles). Las frecuencias de las otras dos variantes en pacientes con EC y controles fueron 8,8% y 3,8% (*SNP12*) y 8% y 2,9% (*SNP13*) respectivamente. En la mayoría de estudios que relacionan *NOD2* con EC también se han asociado estas tres variantes con susceptibilidad a padecer la enfermedad, aunque la frecuencia de las mismas pueda variar ligeramente (211); sin embargo en algunos trabajos no se ha conseguido describir la asociación para todas las variantes, como es el caso de Rigoli *et al* en una cohorte italiana, Braat *et al* en población holandesa, Gearry *et al* en población neozelandesa (asociación con *SNP8* y *SNP13*) (292, 294, 296) o el de Arnott *et al* en población escocesa (asociación con *SNP12* y *SNP13*) (288). En nuestro estudio la presencia de *SNP8-T* incrementa el riesgo de desarrollar la enfermedad más que las otras dos variantes, tal y como reflejan los valores de OR en cada caso ($OR_{SNP8}=3,14$), mientras que en los trabajos de otros autores la variante que se asocia con más fuerza es *SNP13* ($OR_{SNP13}=6,5$) (211). La asociación de *SNP8-T* con la susceptibilidad a padecer EC es la más fuerte descrita en nuestro estudio. Se han encontrado diferencias en múltiples estudios en cuanto al riesgo de padecer la enfermedad y al fenotipo

cuando hay más de una mutación de *NOD2*, ya sea en homocigosis o heterocigosis (95, 96, 408, 409): por regla general, no existen diferencias entre homocigotos para un polimorfismo o heterocigotos compuestos para *SNP8*, *SNP12* o *SNP13*, lo que sugiere que el efecto funcional de las tres mutaciones es comparable (408). En nuestro estudio, la dosis mutacional tiene efecto en la asociación con la enfermedad, ya que la presencia de al menos dos mutaciones en el gen, ya sea en heterocigotos compuestos u homocigotos, eleva la OR hasta 10. Según otros autores, el riesgo de desarrollar EC portando al menos dos mutaciones en *NOD2* es aún mayor: 17 veces superior según un metanálisis realizado por Economou et al en 2005 (95) o de 20 a 40 veces mayor según Bonen & Cho (410).

SNP12 y *SNP13* se sitúan en la región LRR, mientras que *SNP8* lo hace en el dominio NBD; a pesar de que durante mucho tiempo se ha asumido que el ligando se unía a la región LRR sin que interviniera el resto de la proteína, hoy sabemos que el dominio NBD es fundamental para que NOD2 reconozca el MDP. A pesar de que la mayoría de estudios funcionales se han llevado a cabo para la variante *SNP13*, se ha demostrado defecto funcional de NOD2 con las tres variantes principales (91), por lo que todas ellas codifican para una proteína con un defecto en la activación de NFκB, entre otros (410). NOD2 desempeña un papel muy importante en la homeostasis intestinal, ya que gracias a su función como PRR y su expresión en diferentes tipos celulares en la mucosa sirve como mediador en el diálogo entre flora comensal, inmunidad innata e inmunidad adaptativa. Una de las funciones más importantes de NOD2 en el intestino, por tanto, al margen de la defensa frente a patógenos, es la protectora, ya que su estado de activación tónico y continuo contribuye a la regulación de otras vías de señalización intracelulares y finalmente a la tolerancia frente a la flora comensal. En presencia de una variante hipofuncional de NOD2, como las incluidas en este estudio, se ven alterados muchos procesos en la mucosa intestinal que contribuyen a la ruptura del equilibrio entre flora comensal y sistema inmunitario. Un fallo en el reconocimiento del PG por parte de NOD2 conlleva una alteración en la señalización a través del receptor. La activación de NOD2 recordemos que induce una respuesta Th2, que contrarresta en medida alguna la respuesta Th1 que induce la señalización a través de los TLRs al reconocer a la flora comensal; el fallo en NOD2 produce por tanto un aumento de la respuesta Th1 en la mucosa intestinal, tal y como se observa en pacientes con EC (91). Por otro lado, debido al defecto en cuanto a la localización dentro de la célula de NOD2 en presencia de determinadas mutaciones, también se ve alterado el proceso de autofagia, clave, entre otros, para la respuesta inmunitaria (149, 272). La mutación en *NOD2* también va a afectar al reclutamiento de células de la inmunidad innata y a la diferenciación Th17, ya que también regula la producción de IL-23 (91).

5.4.2.2 *NOD2 y fenotipo de la EC*

En relación al fenotipo, los metanálisis llevados a cabo por Economou *et al* en 2005 (95) y Adler *et al* en 2011 (96), así como el estudio multicéntrico con más de 1000 pacientes con EC elaborado por Cleynen y su equipo en 2012 (305), reflejan una tendencia fenotípica bastante bien definida en pacientes portadores de variantes minoritarias de *NOD2*.

En nuestra población, se ha observado la asociación de la mutación en *NOD2*, así como de las variantes *SNP8-T* y *SNP13-insC* por separado, con una EC ileal, ya sea con afectación exclusivamente del ileon o ileon y colon. Jung y colaboradores (409) ya describieron en su estudio la asociación de *SNP8* y *SNP13*, pero no de *SNP12*, con EC ileal. Además, hay publicados otros muchos trabajos que relacionan *NOD2* con la afectación del ileon (211, 285, 291, 294, 304, 411-413). En la mayoría de estos estudios, la presencia de dos mutaciones en *NOD2* aumenta el riesgo de padecer EC ileal; por ejemplo, en población alemana se describió la asociación del genotipo homocigoto mutante para *SNP13* con EC ileal, estenosante y de comienzo temprano (413). En nuestro caso, la presencia de homocigotos mutantes para cada una de las variantes es tan reducida que no se pudo llegar a resultados concluyentes; sin embargo, ninguno de los pacientes con dos mutaciones en *NOD2* evoluciona con localización exclusivamente colónica, aunque debido al pequeño tamaño muestral del subgrupo no se ha podido demostrar estadísticamente esta asociación. La expresión de *NOD2* en el epitelio intestinal es especialmente importante en las células de Paneth (268), y la presencia de variantes hipofuncionales del receptor se ha relacionado con un mal funcionamiento de estas células, tanto a nivel de diferenciación como en la producción y liberación de productos antimicrobianos al lumen intestinal (132). El hecho de que en nuestro caso, y en otros muchos, se haya encontrado asociación de *NOD2* con EC ileal y no con EC colónica o colitis ulcerosa podría estar relacionado con que la localización de las células de Paneth es ileal y no colónica.

Al relacionar la presencia/ausencia de mutación en *NOD2* con el comportamiento de la enfermedad, se observó que dentro de los pacientes con *NOD2* mutado era más frecuente un patrón no inflamatorio, ya que se encontró una proporción mayor de casos de EC fistulizante y EC estenosante que en pacientes sin mutación. Sin embargo, hasta analizar las variantes por separado no se demostraron diferencias estadísticamente significativas. En nuestra población, la única diferencia significativa es la asociación de *SNP12-C* con un patrón fistulizante, ya que, aunque *SNP13-insC* se asocia en principio con un patrón no inflamatorio, tras la realización del análisis multivariable, con la localización ileal como covariable, esta asociación desaparece. Es decir, *SNP12-C* se asocia con patrón fistulizante, mientras que *SNP13-insC* se asocia en realidad con una EC ileal, que a su vez está asociada con patrón no inflamatorio. La asociación de *NOD2* con el comportamiento de la enfermedad es controvertida, ya que mientras que algunos autores han asociado la presencia de mutaciones puntuales en *NOD2* con estenosis en el ileon (211, 285, 291, 408, 413, 414), con un patrón fistulizante (294) o con un patrón no inflamatorio (305, 409), otros no encontraron asociación (408, 415, 416). Por otro lado, también se ha descrito la asociación de *SNP12-C* con un patrón fistulizante, tal y como ocurre en nuestro caso (288, 417). En el metanálisis realizado por Adler y colaboradores, en el que se incluyeron 49 trabajos con un total de más de 8893 pacientes con EC, se observó que la presencia de al menos una mutación en *NOD2* está asociada con la EC complicada pero con un valor predictivo bajo (96). Sin embargo, la presencia de dos mutaciones en el gen sí que parece estar claramente asociada con una enfermedad complicada, ya que cuando hay dos mutaciones en el gen la probabilidad de desarrollar una EC complicada es bastante alta. En nuestro caso en pacientes con dos mutaciones en *NOD2* el patrón es preferentemente no inflamatorio aunque no se haya podido

demostrar estadísticamente. El hecho de que se encuentren resultados aparentemente dispares en cuanto a la asociación de *NOD2* con el comportamiento de la enfermedad puede deberse a diferencias poblacionales, pero también a interferencia con otras variables, tal y como también describieron Cleynen *et al* al introducir la localización ileal como covariable (418).

En nuestra población de pacientes con EC, el alelo *SNP8-T* se asocia con un diagnóstico temprano de la enfermedad, siendo la mediana de la edad al diagnóstico 4 años menor en pacientes portadores del alelo minoritario. Nuestros pacientes con *SNP8-T* son diagnosticados preferentemente antes de los 40 años, es decir dentro del grupo 1 o 2 según la clasificación de Montreal. Otros trabajos también han relacionado *SNP8* (293, 304) o la presencia de al menos una mutación en *NOD2*, independientemente de cuál, con un comienzo temprano de la enfermedad (211, 285, 288, 291, 413). Esta asociación parece ser dependiente de la dosis mutacional de *NOD2*, siendo más fuerte en pacientes portadores de más de una mutación en el gen (294, 304); en nuestro caso, la edad al diagnóstico en pacientes dobles mutantes es menor que en el resto pero, una vez más, no se obtienen diferencias significativas probablemente debido al reducido tamaño de este subgrupo.

En resumen, la presencia de mutación en *NOD2* está relacionada con múltiples alteraciones a nivel de la mucosa intestinal que van a contribuir a la ruptura de la homeostasis y a desencadenar la enfermedad. Parece ser que la mutación en este gen no causa la enfermedad, sino que ante la disbiosis presente intestino, el fallo en la señalización a través de *NOD2* favorece una respuesta inadecuada, contribuye a la ruptura de la tolerancia e induce una respuesta inflamatoria como mecanismo compensatorio. La incorporación del genotipado del gen *NOD2* como una de las pruebas a realizar dentro del diagnóstico diferencial de un paciente, no sólo puede ayudar al clínico a decantarse por un diagnóstico de EC sino que podría ayudar a predecir el comportamiento de la enfermedad y así adecuar la monitorización del enfermo. A pesar de que la presencia de una mutación en el gen *NOD2* no implique necesariamente el desarrollo de la EC, la caracterización del gen en los familiares del paciente, al menos en los de primer grado, podría facilitar el diagnóstico temprano de la enfermedad.

5.5 TLRs Y LA EII

Los TLRs, son claves en el diálogo entre flora comensal y células de la mucosa intestinal, pertenecientes al sistema inmunitario y células no inmunitarias, sirviendo como nexo de unión entre ambiente, inmunidad innata e inmunidad adaptativa. La activación basal de los TLRs tras el reconocimiento de ligandos procedentes de la flora comensal favorece la liberación de una serie de factores que contribuyen al mantenimiento de la integridad de la mucosa, reparación del daño y, en definitiva, a la homeostasis intestinal (151, 326). La presencia de flora intestinal, así como su reconocimiento por parte de TLRs, es fundamental para el desarrollo de la EII, como se demostró, por ejemplo, en modelos murinos de colitis en los que no se desarrollaba la EII espontánea en ratones *knockout* para *Myd88*, que codifica para una molécula clave en la señalización de los TLRs (419). Por otro

lado, se ha demostrado que la desregulación de la señal a través de los TLRs favorece la inflamación crónica que caracteriza a la EII (331, 344), por lo que algunos autores han investigado de qué manera los TLRs pueden contribuir a los mecanismos patogénicos que desencadenan y perpetúan la enfermedad (151). Actualmente todavía no se conoce con exactitud qué TLRs están relacionados con el desarrollo de la CU y/o de la EC y en qué medida. El hecho de que en los GWAS realizados hasta el momento en EII no se haya encontrado señal de asociación en los *TLRs* no hace menos interesante el estudio de cómo variantes de estos genes pueden contribuir a la susceptibilidad a padecer la enfermedad o al fenotipo de la misma (123).

En este trabajo se llevó a cabo en primer lugar un estudio de asociación caso-control de una serie de SNPs situados en los genes que codifican para los TLRs; la selección de los polimorfismos se llevó a cabo tal y como se explica en el apartado de Metodología (Apartado 3.4.2). Posteriormente se estratificaron los pacientes en base a una serie de características fenotípicas y se compararon de nuevo las frecuencias alélicas y genotípicas entre los subgrupos clínicos formados. En el caso de la enfermedad de Crohn, los pacientes también fueron estratificados en base a las variantes de *NOD2*. Los resultados obtenidos al respecto se discuten a continuación.

5.5.1 *TLR1, TLR2, TLR6 y TLR10* en la EII

Como ya se comentó en la introducción (Apartado 1.4.3.2), los TLRs se han agrupado en diferentes familias en base a su homología. Dentro de la familia del *TLR2* se engloban *TLR1, TLR2, TLR6* y *TLR10*, debido a la similitud de su secuencia de aminoácidos. A continuación se discuten los resultados obtenidos para cada uno de ellos por separado.

5.5.1.1 *TLR2*

Los dos polimorfismos estudiados en el gen del *TLR2* en este trabajo producen un cambio en el marco de lectura, y, por tanto, un cambio de aminoácido: R753Q (*rs5743708*) y P631H (*rs5743708*), y se sitúan en el dominio TIR y el tallo citoplasmático de *TLR2*, respectivamente (420, 421). Hay estudios que describen la asociación de determinadas variantes de *TLR2* con shock séptico estafilocócico, tuberculosis o fiebre reumática aguda (328, 422). En ausencia de enfermedad, los niveles de expresión de *TLR2* son muy bajos en la mucosa intestinal, contribuyendo así a la tolerancia frente a la flora comensal. Sin embargo, se ha demostrado un aumento considerable de expresión en macrófagos y células dendríticas de la lámina propia en la mucosa inflamada de pacientes con EII (334). La señal a través de *TLR2* contribuye a la tolerancia frente a la flora comensal, la defensa frente a patógenos y el mantenimiento de la homeostasis intestinal, pero, según los resultados obtenidos por Boulard y su equipo (423), este receptor no es indispensable para el desarrollo de la EII. No se ha descrito la asociación de los SNPs en *TLR2* que hemos incluido en nuestro trabajo con un mayor riesgo de desarrollar EII, tal y como se recoge en el metanálisis realizado por Cheng *et al* en 2015 (339). A pesar de esto, incluimos el estudio de polimorfismos de *TLR2* en

nuestro trabajo, con el fin de replicar estos resultados y analizar posibles asociaciones con el fenotipo. Nuestros resultados concuerdan con lo previamente publicado y apoyan la idea de que TLR2 no se relaciona con la patogénesis de la EII, ya que tampoco hemos encontrado relación entre este gen y la enfermedad. Pierik y su equipo (346) describieron la asociación de TLR2-753Q con pancolitis en pacientes con CU. En ningún otro estudio, y tampoco en el nuestro, se ha replicado esta relación.

5.5.1.2 *TLR1*

El hecho de que, en principio, *TLR2* no esté relacionado con EII, no resta importancia al estudio de *TLR1* o *TLR6* (419). El polimorfismo que hemos estudiado en el gen del *TLR1* (*rs5743611*) conlleva la sustitución de una arginina por una treonina en la posición 80 de la proteína (R80T), situado dentro de la LRR2 (319). No se ha descrito en la bibliografía la relación de esta variante con el riesgo de desarrollar EII (295, 346, 424); sin embargo sí que se ha asociado con localización pancolónica en pacientes con CU (346). En nuestra población de enfermos, tanto en el caso de la CU como en el de la EC, se observó el papel protector del polimorfismo *TLR1 rs5743611* frente a la enfermedad: en ambos casos la frecuencia del alelo *rs5743611-C* y del genotipo heterocigoto mutante *rs5743611-CG* es significativamente menor en pacientes que en controles, no existiendo ningún homocigoto mutante *rs5743611-CC* en ninguno de los dos grupos de pacientes. En nuestro caso, la presencia del alelo mutado no condiciona la localización de las lesiones en la CU, ni tampoco en el caso de la EC, ya que la frecuencia del alelo en los diferentes subgrupos clínicos es muy similar.

Por otro lado, en nuestro estudio hemos descrito la asociación de la variante TLR1-R80T con una mayor incidencia de cáncer colorrectal y de MED articulares en el caso de CU y con la afectación del TDS en el caso de la EC. De los 7 pacientes con CU que desarrollaron cáncer colorrectal, 4 portaban el alelo *TLR1 rs5743611-C*, indicando la OR que dentro del grupo de pacientes el hecho de portar el genotipo mutado aumenta hasta 14 veces el riesgo de desarrollar cáncer. Sin embargo, el subgrupo de pacientes con cáncer es tan reducido que, aunque la OR sea muy elevada, los límites superior e inferior del IC están muy alejados y la potencia estadística disminuye. A pesar de que hay ciertas evidencias de la relación entre la composición de la microbiota (66) y el cáncer de colon y de la implicación de los TLRs en el desarrollo de este tipo de neoplasia (425), no está claro el papel que desempeñan. Por otro lado, cerca del 40% de los pacientes portadores del genotipo *rs5743611-CG* ha desarrollado MED articulares a lo largo de su enfermedad, mientras que en los homocigotos *rs5743611-GG* la frecuencia de aparición de estas complicaciones es mucho menor. En pacientes con EC, el polimorfismo *TLR1 rs5743611* se asocia con la afectación del TDS: hasta el 12,3% de los pacientes portadores del alelo minoritario presentó afectación del TDS, mientras que en el resto de pacientes esto se observó sólo en el 2,3%. Dentro de nuestro grupo de pacientes, solamente 11 tienen afectado el TDS, por lo que con un tamaño muestral tan pequeño la potencia estadística disminuye considerablemente y obliga a interpretar los resultados con cautela.

No se ha descrito hasta la fecha qué implicación pudiera tener la presencia de este polimorfismo en la patogénesis de la EII. La variante TLR1-80T se ha asociado con una disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias, como IL-1 β , IL-6 o IL-8 (426), lo que podría estar relacionado con el papel protector que desempeña este polimorfismo frente a la EII en nuestra población. En cuanto a los resultados obtenidos con el fenotipo de la EC y de la CU es difícil sacar conclusiones, ya que los subgrupos clínicos que se forman tras la estratificación de pacientes son de un tamaño muy reducido y la potencia estadística disminuye considerablemente. Son necesarias más investigaciones para esclarecer qué papel desempeña este TLR en la patogénesis y el fenotipo de la EII.

5.5.1.3 *TLR6*

Hay pocos estudios sobre cómo los polimorfismos del *TLR6* afectan a la función de la proteína. Variantes de este gen se han relacionado con mayor susceptibilidad a aspergilosis invasiva tras trasplante de médula ósea y asma (421, 422). A pesar de no haberse descrito la asociación de polimorfismos en *TLR6* con EII, parece que este receptor sí que interviene en la inflamación que ocurre en el intestino, ya que se ha observado un aumento de su expresión en el colon inflamado (427), aunque los resultados en cuanto a qué papel desempeña son algo contradictorios: mientras que un grupo de investigadores afirma que la estimulación del TLR2/TLR6 conduce a la formación de células dendríticas tolerogénicas, células Treg y disminuye la respuesta Th1 y Th17 (428), otro equipo afirma que TLR6 contribuye al inicio de la respuesta Th17 e interviene en la inflamación intestinal tras la unión de su ligando en modelos de colitis con ratones *tlr6*^{-/-} (429). En nuestro caso tampoco hemos encontrado un mayor riesgo de CU o de EC en portadores de estos polimorfismos (*rs5743795* situado en región intrónica y S249P o *rs5743810* en la LRR9) (319). Sin embargo, la variante S249P se ha relacionado con necesidad de colectomía en nuestra población de pacientes con CU: el 8,3% de los pacientes portadores del alelo *rs5743810-T* se ha tenido que someter a colectomía mientras que sólo un 2,6% de los homocigotos *rs5743810-CC* lo ha necesitado. Al comprobar si este alelo se asocia con la presencia de complicaciones digestivas, tales como fístulas o abscesos, no se observaron diferencias significativas, si bien el porcentaje de pacientes con CU que sufren estas complicaciones es muy pequeño (al menos en comparación con la EC) y la potencia estadística disminuye. Pierik *et al* (346) asociaron negativamente el polimorfismo *TLR6-S249P* con proctitis en pacientes con CU; en nuestro estudio no se encontró la relación entre *TLR6* y la localización de las lesiones en pacientes con CU.

Dentro de los pacientes con EC, el SNP *TLR6 rs5743810* sí que se ha asociado con la presencia de complicaciones digestivas, principalmente abscesos, ya que el 34,5% de los pacientes portadores de genotipos *rs5743810-CT* o *rs5743810-TT* han desarrollado abscesos mientras que sólo un 24,3% de los pacientes portadores de *rs5743810-CC* lo ha hecho. Esta asociación con la aparición de complicaciones digestivas se relaciona con el aumento de casos de resección intestinal observado entre los pacientes portadores del alelo minoritario. El hecho de que en ambos grupos de pacientes la variante TLR6-249P se relacione con la necesidad de cirugía y/o la presencia de complicaciones digestivas, sugiere que este receptor esté implicado en la gravedad de la EII, probablemente debido al

papel que TLR6 desempeña en la inducción de la respuesta inmunitaria en la mucosa intestinal. Sin duda más estudios son necesarios para determinar de qué manera TLR6 está implicado en la patogénesis de la EII o cómo se relaciona con el fenotipo de la EC y de la CU.

5.5.1.4 *TLR10*

El TLR10 es el único TLR humano para el que no se conoce su ligando todavía. El gen *TLR10* se sitúa en el cromosoma 4 junto con *TLR1* y *TLR6*, con los que comparte gran homología (422). La gran similitud entre la secuencia de aminoácidos de TLR10 con TLR1 y TLR6 hace pensar que su función biológica es similar (421). TLR10 se expresa en la membrana plasmática formando un homodímero, heterodímero con TLR2 o, probablemente, heterodímero con TLR1 o TLR6 (430). En un trabajo previo en nuestra población, se relacionó un haplotipo de cuatro polimorfismos del *TLR10* con mayor riesgo de desarrollar EC (348). En nuestro estudio se incluyeron dos SNPs diferentes, que suponen un cambio en el marco de lectura: I775V (*rs4129009*) situado en el dominio TIR y I369L en el dominio extracelular (*rs11096955*). El SNP *TLR10 rs4129009* se asocia en nuestro estudio con EC colónica y con diagnóstico tardío de la enfermedad. En este caso en concreto, el efecto sobre el fenotipo tan sólo se observa en presencia de dos copias del alelo mutado, ya que las diferencias estadísticamente significativas se observan con el genotipo homocigoto para el alelo minoritario *rs4129009-G*, pero no con el genotipo heterocigoto. Casi el 40% de los pacientes portadores del genotipo *rs4129009-GG* fueron diagnosticados dentro del grupo 3 según la clasificación de Montreal (con más de 40 años) y evolucionaron con localización colónica de las lesiones. En nuestros pacientes con EC la localización colónica es más frecuente entre aquellos que han sido diagnosticados con más de 40 años, por lo que las variables “localización” y “edad al diagnóstico” están relacionadas. Tras la realización de la regresión logística se confirmó la asociación de *TLR10 rs4129009* con ambas variables; sin embargo, al estar éstas relacionadas entre sí es difícil determinar si realmente *TLR10* se asocia con ambas o existe una relación secundaria que no hemos sido capaces de demostrar estadísticamente. En el estudio de Abad y su equipo (348), el aumento de susceptibilidad a desarrollar EC se producía cuando el haplotipo de riesgo se encontraba en homocigosis: tanto el estudio de Abad *et al* como el nuestro sugieren que *TLR10* se relaciona con EII pero que su efecto sólo se observa cuando ambos alelos están mutados.

Recientes estudios sugieren que el TLR10 es el único receptor de esta familia con una función antiinflamatoria o inhibidora. Al contrario que el resto de TLRs, la estimulación de TLR10 no conduce a la producción de citoquinas proinflamatorias, como IL-1 o IL-6. Este efecto inhibitorio podría deberse a la modulación de la señal de otros TLRs al formar heterodímero con ellos, a la competencia por el ligando con TLRs estimuladores o a través de una señal inhibitoria directa (430). Esa función antiinflamatoria del TLR10 explicaría por qué una alteración de su función podría estar relacionada con el riesgo de padecer EII, tal y como afirman Abad y su equipo (348), o con su fenotipo, como hemos encontrado en nuestro trabajo.

5.5.2 *TLR3* en la EII

TLR3 se sitúa en la membrana de endosomas y tras la unión de su ligando (ARNds) dimeriza y recluta a la proteína adaptadora, que en este caso es TRIF en lugar de MyD88. La vía de señalización termina en la producción de IFN- γ y otras citoquinas proinflamatorias (431). *TLR3* se expresa de forma constitutiva en las CEI de la mucosa intestinal en ausencia de enfermedad; no se han observado diferencias en la expresión de *TLR3* en pacientes con CU mientras que en pacientes con EC se han descrito unos niveles de expresión más bajos que en población control (327). En este trabajo se ha incluido un polimorfismo situado en la región promotora (*rs5743305*) y otro en la LRR15 del ectodominio de *TLR3* (L412F o *rs3775291*) (432, 433). Acorde con los resultados publicados, no se ha encontrado asociación de ninguno de estos SNPs con un mayor riesgo de desarrollar EII.

Sin embargo, sí que se ha encontrado relación con el fenotipo: en ambos grupos de pacientes se observó una menor frecuencia del alelo mutado *TLR3 rs5743305-A* en enfermos que desarrollaron MED oculares, sugiriendo el papel protector de este polimorfismo frente a este tipo de complicaciones. En el caso de la CU, las diferencias en cuanto a la frecuencia en este polimorfismo se observaron tanto a nivel alélico como genotípico. Además, aunque no llegó a observarse significación estadística, había menos casos de MED oculares entre los pacientes portadores de *TLR3-412F*. En pacientes con EC sólo se observó la protección frente a MED oculares de *TLR3 rs5743305-A* a nivel alélico. La relación entre *TLR3* y las alteraciones oculares ya ha sido descrita en otros trabajos, tanto en modelos animales como en pacientes con diversas patologías (434, 435). Varios estudios afirman el papel activo que desempeña *TLR3* en la inflamación ocular a través de la liberación de citoquinas y la regulación de la expresión de moléculas de adhesión en células vasculares y epiteliales del ojo (436-438). Las dos variantes incluidas en nuestro estudio están relacionadas con una señalización alterada del receptor: *TLR3-412F* se asocia con una señalización disminuida, probablemente en relación con un defecto en la glicosilación del residuo 413 (asparagina), que es clave para el reconocimiento del ligando (432, 439), mientras que la localización cercana a regiones reguladoras de *rs5743305* podrían modular la actividad promotora de *TLR3* (433). El hecho de que en nuestro estudio hayamos descrito el papel protector de la variante *rs5743305-A* frente a MED oculares en ambas enfermedades, apoya la teoría de que *TLR3* interviene en el desarrollo de uveítis y otras alteraciones oculares. El número de pacientes de nuestro estudio que desarrolla MED oculares es muy bajo, por lo que la potencia estadística disminuye y sería recomendable aumentar la población para poder confirmar este resultado.

5.5.3 *TLR4* en la EII

La relación entre *TLR4* y la EII probablemente sea una de las más estudiadas dentro de la familia de TLRs. Este receptor prácticamente no se detecta en el epitelio intestinal en ausencia de enfermedad (327), sin embargo, sus niveles aumentan considerablemente en la mucosa de pacientes con EII (151). Este hecho, unido a los resultados obtenidos en modelos animales de colitis en ratones *tlr4*^{-/-} (331), centra la atención en el papel que puede desempeñar *TLR4* en la

patogénesis de la enfermedad. En nuestro estudio se han incluido las dos variantes más comunes de *TLR4*, *rs4986790* (D299G) y *rs4986791* (T399I); ambos polimorfismos se encuentran en estrecho LD en nuestra población, como ya había sido descrito previamente por otros autores (344, 440, 441). No se ha observado asociación con la enfermedad en ninguno de los casos, aunque la frecuencia de ambos alelos mutados sea ligeramente superior en pacientes con CU y EC que en controles. Desde que se describió por primera vez la asociación de D299G con EC (442), se han llevado a cabo múltiples estudios en diferentes poblaciones tratando de determinar la relación entre *TLR4* y la EII, con resultados variados. En algunos casos se ha descrito la asociación de *TLR4+* tanto con EC como con CU, como por ejemplo en el estudio llevado a cabo por Franchimont *et al* en población belga (443): en ese trabajo la frecuencia de *rs4986790-G* es bastante mayor que en nuestro caso tanto en pacientes con CU, EC o controles (10%, 11% y 5%, respectivamente). También se ha descrito asociación de la mutación en *TLR4* con EC (280, 292, 304, 340, 341, 344, 346, 441) o CU (444, 445) por separado o, como es nuestro caso, con ninguna de las dos (288, 296, 299, 342, 424, 446-449).

Los dos polimorfismos estudiados en el *TLR4* (D299G y T399I) se sitúan en los motivos LRR a través de los cuales se reconoce al ligando (264). Las implicaciones estructurales en *TLR4* fueron estudiadas tras la cristalización de la molécula junto con el correceptor MD2 y el ligando LPS (450) ID PBD= 4G8A). Como puede apreciarse en la Figura 24, las dos mutaciones no se sitúan en regiones que interacciones directamente con LPS o MD2 y la estructura de *TLR4* prácticamente no varía en presencia o ausencia de mutación. Sin embargo, la sustitución de D299 por 299G induce un ligero cambio estructural en la región LRR10-12, que produce una alteración en las propiedades de la molécula, como la unión al ligando así como la eficiencia del plegamiento, expresión en superficie o estabilidad de la proteína. El impacto de T399I, situada en LRR15, en la proteína es menor, aunque la introducción de más residuos hidrofóbicos en presencia de mutación podría influir en la eficiencia del plegamiento de la proteína, expresión en superficie y estabilidad de *TLR4* (450). Por lo tanto, aunque estas variantes no afecten directamente a la unión del ligando, sí que están relacionadas con una menor respuesta frente al LPS.

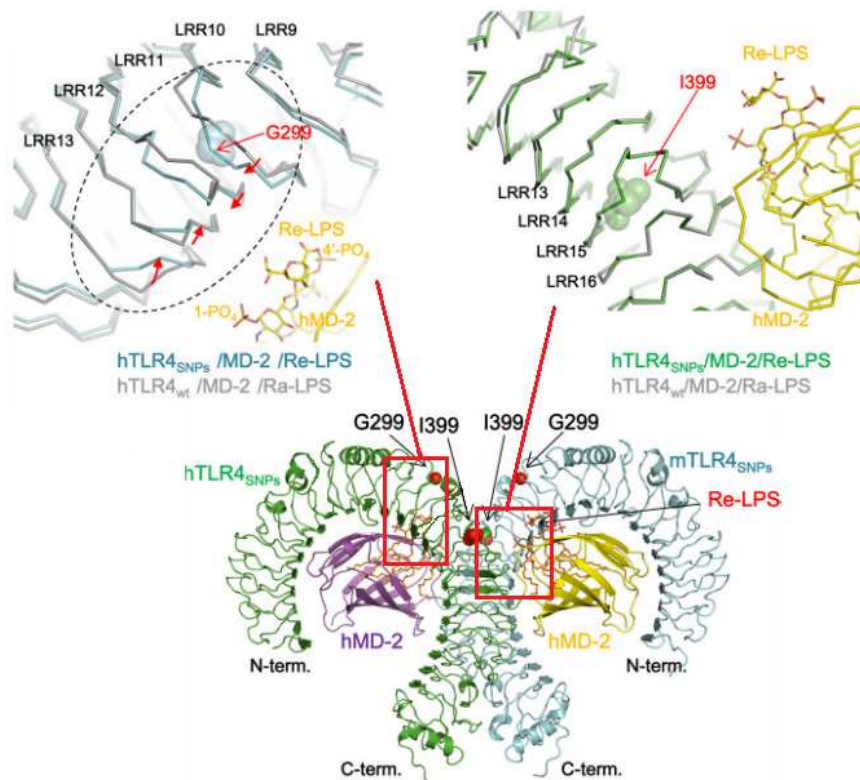


Figura 24. Esquema de la estructura obtenida por cristalografía de rayos X del TLR4. En la parte inferior de la imagen se muestra el receptor TLR4 formando un homodímero y la molécula correceptora MD2 tras la unión del LPS (representado en naranja). En la parte superior izquierda de la imagen se muestra ampliada la zona donde se encuentra el polimorfismo D299G: se superponen la estructura del receptor con D299 (gris) y con G299 (azul). En la parte superior derecha se muestra ampliada la zona donde se encuentra el polimorfismo T399I: en este caso el receptor con la variante mutada I399 se representa en verde. Figura modificada a partir Ohto *et al*, 2012 (450).

La variante TLR4-299G se ha asociado con baja respuesta al LPS inhalado en humanos (440) por lo que cabría esperar que la presencia de esta variante previniera una respuesta frente a bacterias Gram (-); sin embargo, TLR4-299G se asocia con hipersensibilidad frente a *Escherichia* y otras bacterias Gram (-) de la flora comensal y patógenas, causando una inflamación no deseada en el intestino (264). Estos polimorfismos también se han asociado con mayor susceptibilidad frente a diversas infecciones como sepsis por Gram (-), paludismo, virus respiratorio sincitial o aspergilosis, así como con resistencia frente a *Legionella pneumophila* o a una menor mortalidad debido a paludismo cerebral por *Plasmodium falciparum* (422, 451). Otros autores, sin embargo, han puesto en entredicho que estas variantes realmente afectaran a la respuesta al LPS: Erridge y su equipo (452) afirmaron que en monocitos portadores de la mutación en TLR4 en heterocigosis no se observaba una respuesta de citoquinas alterada a bacterias Gram (-). La señalización a través de TLR4 no sólo finaliza en la producción de citoquinas tras la activación de NFκB, sino que también se activan otras vías, como la de IRF a través de las proteínas STAT, por lo que las variantes D299G y T399I podrían afectar a otro nivel (344). En ratones *knockout* o con deficiencia en *TLR4*

se ha observado una mayor gravedad en el modelo de colitis inducida por DSS (*Dextran Sulfate Sodium*) y predisposición a la infección por bacterias Gram (-) (331, 453). Por otro lado, TLR4 no sólo interviene en el reconocimiento de bacterias patógenas y la defensa frente a ellas, sino que es muy importante en funciones no meramente inmunológicas, como el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal o la reparación del tejido tras el daño tisular. La deficiencia en *TLR4*, por tanto, contribuye al mantenimiento de la inflamación en la mucosa de pacientes, ya que la alteración de la permeabilidad del epitelio facilita la entrada de bacterias procedentes del lumen (326).

En nuestro grupo de pacientes con EC detectamos una relación epistática entre *TLR4* y *NOD2*, ya que tras estratificar los pacientes según la presencia o ausencia de mutación en *NOD2* sí que se observan diferencias en cuanto a la asociación de *TLR4* con la EC: dentro de los pacientes con *NOD2* mutado la frecuencia de los genotipos mutantes de *TLR4* es del 13% mientras que tan sólo un 5,9% de los pacientes con *NOD2* salvaje portan algún alelo mutado. No existen diferencias en cuanto a la frecuencia de la mutación del *TLR4* entre pacientes con *NOD2* salvaje y controles. El haplotipo *NOD2+*/*TLR4+* se asocia con la enfermedad, ya que cuando se compara la frecuencia de éste en pacientes y en controles las diferencias son significativas; sin embargo, la OR no es superior que si consideramos la presencia de mutación en *NOD2* solamente ($OR_{NOD2}=3,214$; $OR_{NOD2+}/TLR4+ =1,924$). Al estudiar las tres variantes de *NOD2* por separado y estratificar los pacientes con EC según la presencia de mutación en cada una de ellas, se puede observar que únicamente en el caso de *SNP13* (1007insC) se encuentran diferencias significativas: la frecuencia de mutación en *TLR4* dentro de los pacientes portadores de la variante mutante *SNP13-insC* es de 27,6% mientras que en pacientes sin ésta es de 6,6%. En este caso, en presencia de *SNP13-insC* y *TLR4+* sí que se observa un aumento de la OR considerable cuando comparamos con población control, en relación a los resultados obtenidos cuando sólo se tiene en cuenta *SNP13-insC* ($OR_{SNP13-insC}/TLR4+=4,886$). Es decir, el haplotipo *SNP13-insC/TLR4+* confiere más riesgo de desarrollar EC que la sola presencia de mutación en *SNP13-insC*, por lo que la mutación en *TLR4* es un factor de riesgo adicional en pacientes portadores de mutación en *NOD2*. La mutación en cada uno de los genes en nuestros pacientes no se distribuye de forma independiente tal y como cabría esperar únicamente debido al azar, por lo que existe una relación epistática entre *TLR4* y *NOD2* en nuestra población de pacientes con EC que no se observa ni en CU ni en controles sanos.

Dado que tanto TLR4 como NOD2 son receptores que desempeñan un papel importante en la patogénesis de la EII, otros autores también han estudiado la relación genética entre ambos. En algunos estudios no se han encontrado diferencias en la frecuencia de mutación en *TLR4* dependiendo de la mutación en *NOD2* (304, 330, 342, 346, 443) mientras que en otros sí que obtuvieron resultados parecidos a los nuestros. Gazouli y colaboradores (280) también observaron una frecuencia mayor de *TLR4+* en pacientes con *NOD2+*, sin embargo no encontraron asociación estadística del haplotipo con la enfermedad. Por otro lado, también en población italiana, Guagnozzi y su equipo (454) describieron una asociación entre *TLR4* y *NOD2* similar a la nuestra: *TLR4* se asocia con EC en pacientes con *NOD2* mutado, e incrementa el riesgo de desarrollar la enfermedad.

Las evidencias aportadas hasta ahora sugieren que NOD2 y TLR4 están estrechamente relacionados, existiendo una regulación cruzada de ambas vías de señalización; sin embargo, el papel que desempeña NOD2 en la producción de citoquinas tras la estimulación de TLR4 no se conoce del todo todavía (91). A pesar de que exista cierto sinergismo entre las vías de señalización de NOD2 y de TLRs, potenciándose la respuesta Th1 de estos últimos, se ha demostrado una respuesta frente al LPS alterada en pacientes portadores de mutaciones en *NOD2* (269, 410). En la investigación llevada a cabo por Kim y su equipo en 2015 (325), se describe la relación entre NOD2 y TLR4, y cómo la presencia de variantes hipofuncionales de *NOD2* afectaba a la respuesta frente al LPS. Según los resultados obtenidos, las variantes de *NOD2*, especialmente la variante *SNP13*, presentan una ganancia de función en cuanto a la inhibición de la producción de IL-12 en respuesta a la estimulación del TLR4 con LPS; es decir actúan como “dominantes negativos”. Esta alteración en la función del TLR4 en presencia de mutación en NOD2 explicaría los resultados de nuestro estudio: cuando ambas mutaciones están presentes, la vía de señalización a través de TLR4 se ve seriamente alterada y, por lo tanto, todos los mecanismos en los que interviene este receptor para el mantenimiento de la homeostasis intestinal se ven comprometidos. De esta manera, cuando coexisten mutación en *TLR4* y *NOD2*, especialmente *SNP13-insC*, el riesgo de desarrollar la enfermedad aumenta.

En relación al fenotipo, en nuestro estudio se observó asociación de ambos polimorfismos en el *TLR4* con una enfermedad complicada, concretamente con un patrón evolutivo estenosante, ya que cerca del 40% de los pacientes que portaba alguno de los alelos minoritarios en *TLR4* evolucionó con este tipo de patrón, mientras que en pacientes con el genotipo salvaje la proporción de pacientes con este fenotipo no llega al 20%. En otros estudios se ha relacionado este gen con el patrón clínico de la enfermedad, como la asociación con patrón estenosante en población alemana (330) o con patrón fistulizante en población holandesa (292), aunque en ambos casos utilizan la clasificación de Viena en lugar de la de Montreal y hay que interpretar los resultados con cautela. Hume *et al* (341), por el contrario, afirmaron que las variantes TLR4-299G y TLR4-399I eran protectoras frente al patrón estenosante en pacientes con EC en población australiana. La relación encontrada en nuestra población entre mutación en *TLR4* y patrón estenosante es independiente de *NOD2*, hecho que se confirma tras la realización de un análisis multivariable incluyendo las variantes de *NOD2* como variables independientes. Este resultado es esperable teniendo en cuenta que la mutación en *NOD2* no se asocia con este tipo de patrón en nuestra población. Sin embargo, dada la relación descrita entre *NOD2* y *TLR4* en nuestra población se decidió estratificar a los pacientes según la mutación o no en estos dos genes y su relación con comportamiento de la EC. Pudimos observar que en aquellos pacientes con el genotipo *NOD2+/TLR4+* o *NOD2-/TLR4+* la proporción de pacientes que evolucionaban con patrón estenosante era superior que en el resto de pacientes (46,7% y 26,7% respectivamente); sin embargo, al realizar el análisis estadístico el patrón estenosante tan sólo fue significativamente más frecuente en pacientes portadores de mutaciones en ambos genes (*NOD2+/TLR4+*) y la OR portando este haplotipo es superior que si tan sólo se tiene en cuenta la mutación en *TLR4* (4,097 vs. 2,391). Podría decirse que *TLR4+* está asociado con patrón estenosante y que esta asociación es más fuerte en pacientes con mutación también en *NOD2*. En un

estudio llevado a cabo por Brand y su equipo, el 34,5% de los pacientes con mutación en *TLR4* evolucionó con este tipo de patrón mientras que tan sólo el 17,1% de los pacientes con el genotipo salvaje lo hizo (330); estos resultados son muy similares a los obtenidos en nuestro estudio (36,7% vs. 17,3%). Sin embargo, Brand y su equipo no encontraron diferencias en la frecuencia de *TLR4+* entre pacientes con *NOD2+* y *NOD2-*; por otro lado describieron asociación del haplotipo *NOD2-/TLR4+* con patrón estenosante y cierta tendencia del haplotipo *NOD2+/TLR4-* hacia patrón fistulizante. Como ya hemos comentado, *NOD2-/TLR4+* también es más frecuente en pacientes con patrón estenosante que en pacientes sin mutación en *TLR4*, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas y la asociación más fuerte en nuestro estudio es cuando ambos genes están mutados. En cuanto a la asociación con patrón fistulizante, en nuestro estudio no encontramos asociación del haplotipo con este tipo de patrón; sin embargo, sí que hemos descrito asociación de *SNP12-C* con patrón fistulizante, precisamente la única variante que no se asocia con mutación en *TLR4*. A la hora de comparar resultados con respecto al patrón fistulizante hay que tener precaución, ya que Brand y colaboradores emplean la clasificación de Viena y nosotros la de Montreal, en la que la presencia de fístulas anales no se engloban dentro del patrón fistulizante.

Además, *TLR4+* también se ha relacionado en nuestra población de pacientes con perforación intestinal, ya que la frecuencia de aparición de esta complicación es casi tres veces superior en pacientes portadores de alguno de los alelos minoritarios (*rs4986790-G* y *rs4986791-T*). En este caso, la asociación resultó ser independiente de *NOD2*, ya que no se pudo demostrar estadísticamente que en pacientes con mutación en ambos genes la probabilidad de perforación en el intestino fuera mayor.

En el metanálisis realizado por Browning y su equipo (447) no se detectó asociación de *TLR4* con el fenotipo de la EC; sin embargo, Oostenbrug *et al* (342) y Hume *et al* (341) asociaron estos polimorfismos en *TLR4* con localización colónica de las lesiones en pacientes con EC. Por el contrario, en nuestra población, *TLR4* no se asocia con la localización, aunque en pacientes con EC ileal la frecuencia de *TLR4+* es algo superior que en el resto. Teniendo en cuenta la mutación en *NOD2*, y analizando conjuntamente estos genes, nuevamente volvemos a encontrar diferencias destacables. En pacientes portadores de mutación en ambos genes (*NOD2+/TLR4+*) la evolución hacia EC ileal fue significativamente más frecuente que en el resto, ya que hasta el 80% de estos pacientes podría englobarse dentro de esta localización. *NOD2*, como se ha comentado previamente, se asoció con EC ileal en nuestra población (OR=3,838), y la presencia de mutación también en *TLR4* aumenta el riesgo de afectación del ileon (OR=6,028). Como se ha comentado previamente, la relación de *NOD2* con EC ileal podría ser debida a la función que desempeña este receptor en las células de Paneth presentes en el ileon. Aunque no se ha demostrado la expresión de *TLR4* en este tipo celular (341), nuestros resultados parecen indicar que una respuesta alterada al LPS predispone a la afectación del ileon en pacientes con EC. Lakatos y colaboradores (455) también identificaron *TLR4* como factor de riesgo adicional para EC ileal en población centroeuropea.

5.5.4 *TLR5* en la EII

En suero de pacientes con EII se ha observado hiperreactividad frente a la flagelina, principal ligando del *TLR5*, por lo que este antígeno se ha considerado epítipo dominante en la enfermedad (151, 263). La deficiencia de *TLR5* se ha relacionado con una respuesta defectuosa frente a la flagelina, una disminución de la producción de anticuerpos anti-flagelina y la desestabilización del microbioma (456). Se ha descrito una variante funcional de *TLR5* en la que el cambio de un solo nucleótido provoca la aparición de un codón stop prematuro (Arg392STOP); la respuesta frente a flagelina de este receptor mutado se reduce hasta un 75% y actúa como dominante negativo con respecto a la proteína normal. Esta variante se ha asociado con mayor susceptibilidad a infección por *Legionella pneumophila* pero no se relaciona con riesgo de infección por otras bacterias flageladas como *Salmonella* (151, 328, 422). La variante *TLR5*-392STOP se ha asociado en algunas poblaciones con protección frente a enfermedades inflamatorias no infecciosas, como LES (328) o EC, debido probablemente a la disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias y de anticuerpos anti-flagelina en presencia de esta variante (151, 328, 351).

En este estudio se han incluido dos variantes hipofuncionales diferentes a *TLR5*-Arg392STOP con el fin de comprobar si éstas están relacionadas con el riesgo o con el fenotipo de la EII. Los dos SNPs de *TLR5* incluidos en este estudio producen un cambio de aminoácido en el dominio extracelular de la proteína: *rs2072493* (N592S) y *rs5744174* (F616L). A pesar que no interfieren directamente en la unión de la flagelina, en ambos casos se ha observado una disminución en la producción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas en respuesta al ligando con estas variantes, probablemente por la alteración en la dimerización del receptor (457). En la bibliografía hay pocas evidencias de asociación de estas variantes de *TLR5* con EII: se ha descrito una débil asociación de *TLR5*-616L pero no de *TLR5*-592S con la EC en varias poblaciones (350, 458), y de *TLR5*-592S con la CU en una cohorte asiática (459). Acorde con la mayoría de trabajos, en nuestro estudio no se ha encontrado asociación de ninguno de los dos polimorfismos con la EII. No obstante, en nuestro estudio hemos encontrado relación entre la presencia de estas variantes de *TLR5* y el fenotipo de la EC.

En pacientes con EC, el polimorfismo *TLR5 rs5744174* se asocia con la aparición de MED, ya que el 73% de pacientes con EC de nuestro estudio portadores del alelo *rs5744174-C* sufrió alguna de estas manifestaciones en algún momento de la enfermedad. En este grupo de pacientes se observaron más casos de MED articulares, MED dermatológicas, MED hepatobiliares y CTE, pero no de MED oculares; sin embargo, las diferencias tan sólo fueron estadísticamente significativas al considerar todas las MED en conjunto. Esta asociación se confirmó tras la realización de un análisis multivariable. La información disponible en la bibliografía con respecto a la relación de *TLR5* con el fenotipo de la EII es muy escasa, por lo que es complicado contrastar nuestros resultados con los obtenidos en otras poblaciones. Por qué la respuesta disminuida frente a la flagelina en presencia de la variante *TLR5*-616L puede afectar al fenotipo de la EII, como la aparición de MED en la EC, no está claro; para confirmar estos resultados sería

conveniente el aumento del tamaño muestral, la replicación en otras cohortes así como estudios funcionales de este receptor.

5.5.5 *TLR7* y *TLR8* y *TLR9* en la EII

TLR7 y *TLR8* pertenecen, junto con *TLR9*, a la misma subfamilia dentro de los TLRs. La identidad de los genes de estos dos receptores es del 42,3%, mientras que la homología de su secuencia de aminoácidos es de 72,7% (308). Estos tres receptores reconocen ácidos nucleicos y se encuentran de forma mayoritaria en la membrana de endosomas.

5.5.5.1 *TLR7* y *TLR8*

TLR7 y *TLR8* reconocen ARN de cadena sencilla (ARNss) además de otros compuestos sintéticos, tras cuya unión se activan una serie de cascadas de señalización que conducen a la producción y liberación de citoquinas proinflamatorias e IFN de tipo I (a través de las vías de NFκB, IRF3 e IRF7 principalmente). Ambos receptores se sitúan en la membrana de endosomas de diferentes tipos celulares: *TLR7* sobre todo en células dendríticas plasmocitoides y células B y *TLR8* en células dendríticas mieloides, monocitos, macrófagos y neutrófilos (460). Los genes que codifican para estos receptores se sitúan en el cromosoma X, por lo que para el estudio de asociación, tanto con enfermedad como con el fenotipo de la misma, es necesario hacerlo en hombres y mujeres por separado, tanto en pacientes como en población control. Ambos genes se han relacionado en otros estudios con enfermedades víricas, como la infección por VIH o la hepatitis causada por virus C (VHC) (422), y con otras enfermedades como la enfermedad celíaca (461) o LES (462); sin embargo, a pesar de que estos genes se sitúan flanqueando la región de susceptibilidad a EII Xq21-22.3 (463) y que hay una mayor incidencia de la enfermedad en presencia de alteraciones cromosómicas en el cromosoma X (352, 464), apenas hay evidencias en la bibliografía de asociación con mayor susceptibilidad a padecer EII. La relación de *TLR7* con la EII se intentó demostrar en modelos murinos de colitis inducida por DSS: tras la administración de un agonista sintético de este receptor (imiquimod) se observó un aumento de la producción de IFN de tipo I por parte de las células dendríticas plasmocitoides además de la liberación de productos antimicrobianos por las CEI, las células de Paneth y las propias células dendríticas. Tras la administración de imiquimod, la inflamación en estos ratones se reducía en comparación con los sujetos control, lo que sugiere el papel del *TLR7* y el IFN de tipo I no sólo en la defensa frente a virus patógenos sino también en la regulación de la respuesta inmunitaria en la mucosa intestinal (465). En la mucosa de pacientes con EC predomina una respuesta inmunitaria Th1, con altos niveles de IFN de tipo I entre otras citoquinas; es probable que la estimulación de *TLR7* presente en las células dendríticas plasmocitoides, que son las principales productoras de IFN, sea uno de los mecanismos que intervienen en la patogénesis de la EC.

En este trabajo se ha elegido un SNP en *TLR7* (*rs179008*) y otro en *TLR8* (*rs3764880*) en base a la frecuencia del alelo menor. No se ha descrito asociación

de ninguno de estos dos polimorfismos con mayor riesgo de desarrollar EII. El polimorfismo *TLR7 rs179008* (Q11L) se sitúa en la secuencia señal de TLR7; la modificación de un aminoácido en esta región podría conllevar una alteración en el procesamiento postranscripcional o en la concentración, localización y, en definitiva, funcionalidad de la proteína (466). En un estudio llevado a cabo por Oh y su equipo (467), que consistió en estimulación de células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) con imiquimod, se observó una disminución de producción de IFN en portadores de la variante mutada TLR7-11L, mientras que Clifford y colaboradores observaron menor producción de TNF- α en portadores de la variante salvaje (468). En nuestra población, el alelo minoritario de este polimorfismo (*rs179008-T*) se asoció con localización ileocólica en varones, mientras que en mujeres no se apreciaron diferencias. Cerca del 62% de los varones con el genotipo *rs179008-T0* sufrió afectación de colon e ileon mientras que sólo el 36% de los *rs179008-A0* evolucionó con este tipo de localización. Más investigaciones son necesarias para determinar de qué manera la presencia de una variante hipofuncional de *TLR7* en cuanto a la producción de IFN de tipo I puede afectar a la localización de las lesiones en EC. El hecho de que la asociación con el fenotipo sólo se observe en varones y no en mujeres, puede estar relacionado con la producción diferencial de IFN observada dependiendo del sexo (469). Sin embargo, la razón más probable es que se trate de una cuestión meramente estadística, ya que cabría esperar que si una característica clínica se asocia en varones con la presencia del alelo mutado, en mujeres homocigotas mutantes se observara el mismo resultado al carecer de una copia del alelo normal; en este caso ni agrupando los genotipos mutados ni considerando por separado únicamente las homocigotas para el alelo *rs179008-T* se observó asociación de este SNP con la localización de la enfermedad. El número de pacientes homocigotas para el alelo *rs179008-T* en nuestra población es muy reducido, por lo que sería necesario aumentar el tamaño muestral para comprobar realmente el comportamiento de este polimorfismo con respecto al fenotipo de la enfermedad. No se ha descrito asociación de TLR7 Q11L con la localización de las lesiones en EC en la bibliografía.

En el polimorfismo estudiado en el gen *TLR8* (*rs3764880*) se produce un cambio de nucleótido en el codón de inicio y se sustituye una metionina por una valina en el primer aminoácido de la proteína (M1V). Dado que el codón de inicio para la transcripción del ARNm siempre es una metionina, en la proteína mutada se retrasa el inicio hasta el cuarto codón (metionina en la posición 4), dando lugar a una proteína truncada con tres aminoácidos menos en la secuencia señal. No está claro qué implicación tiene esto en la funcionalidad de la proteína, pero en presencia de la variante TLR8-1V se ha demostrado una menor capacidad de activación de NF κ B en respuesta al ligando y una alteración en el perfil de citoquinas producido (por ejemplo, una disminución de la producción de IL-10 y un aumento de TNF- α) (467). Hay muchos menos estudios para TLR8 que para otros TLRs, debido sobre todo a que este receptor no es funcional en ratón. Estudios *in vitro* afirman que la estimulación de TLR8 induce la producción de citoquinas proinflamatorias, IFN de tipo I e inhibe la supresión de las células T reguladoras, aunque por otro lado también es capaz de inducir citoquinas antiinflamatorias como IL-10 en PBMC (321). Saruta y colaboradores (352), describieron un haplotipo de SNPs en *TLR8* protector frente a EC y CU tanto en hombres como en mujeres y otro haplotipo, mucho menos frecuente, asociado con

EC en mujeres, indicando la posibilidad de que TLR8 participara activamente en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. A pesar de no haber encontrado asociación de TLR8-1V con mayor riesgo de padecer EII, sí que hemos encontrado relación con el fenotipo de la EC. En mujeres con EC, el alelo *rs3764880-G* en homocigosis se asoció con la aparición de abscesos y MED oculares. Estos resultados no se observaron al considerar el conjunto de mujeres portadoras del alelo *rs3764880-G* (*rs3764880-AG* y *rs3764880-GG*) ni en heterocigotas por separado. Estas asociaciones no se han encontrado en la bibliografía consultada. Por otro lado, la presencia en homocigosis del alelo *rs3764880-G* también se ha asociado en nuestra población de enfermas con complicaciones tromboembólicas (CTE). La aparición de este tipo de complicaciones asociada a EII se ha intentado relacionar, además de con otros factores, con la alteración de la permeabilidad de la barrera epitelial en el intestino: una de las hipótesis barajada afirma que la entrada de microorganismos a través de la mucosa intestinal permite la llegada de antígenos a la sangre, y su reconocimiento a través de TLRs expresados en plaquetas, células endoteliales así como TLRs solubles, puede contribuir a la aparición de tromboembolismos (470). Los estudios realizados hasta ahora se han centrado en TLR2 y TLR4 por lo que, dados los resultados obtenidos en nuestro trabajo, sería interesante investigar qué papel pudieran desempeñar otros TLRs, como el TLR8, en este mecanismo. En varones el genotipo *rs3764880-G0* no se asoció con el fenotipo, sin embargo sí que se observó cierta tendencia, como por ejemplo el aumento de casos de CTE dentro de este grupo de pacientes.

De los resultados obtenidos en nuestro trabajo con respecto a la asociación de *TLR8* con el fenotipo de la EC se puede interpretar que en el caso del *TLR8 rs3764880* es necesaria la ausencia del alelo normal para que se expresen los rasgos fenotípicos y que el hecho de que no se observen diferencias en varones *G0* se deba a un pequeño tamaño muestral; también podría ser que no bastara con la presencia de un alelo mutado o la ausencia del alelo normal sino que para que se produjera el efecto fenotípico fuera necesaria la doble dosis del alelo mutado. Nuevamente sería necesario aumentar el tamaño muestral para conseguir llegar a una conclusión.

5.5.5.2 *TLR9*

TLR9 reconoce dinucleótidos CpG sin metilar en ADN de origen vírico o bacteriano (471). La expresión de este receptor en el intestino humano se ha detectado en endosomas de células del sistema inmunitario, células de Paneth así como en superficie apical y basolateral de CEI de forma constitutiva. En las CEI de la mucosa intestinal se ha encontrado una diferenciación de la respuesta frente a CpG ADN dependiendo de la polarización del receptor (326): mientras que la activación de TLR9 apical contribuye a la homeostasis intestinal, por ejemplo mediante la inducción de la liberación de defensinas por parte de las células de Paneth o el balance hacia una respuesta T reguladora (472-474), la activación basolateral induce la liberación de citoquinas proinflamatorias (475, 476). Además, se ha demostrado el papel de este receptor en la prevención del daño y la reparación de las lesiones en el intestino, contribuyendo al mantenimiento de la integridad del epitelio (477). El papel de este receptor en el mantenimiento de la homeostasis se demostró también en ratones *tlr9^{-/-}*, en los que se observó una

mayor gravedad de la colitis inducida tras la administración de DSS (472, 477). De todos estos estudios se puede concluir que TLR9 interviene tanto en la tolerancia frente a la flora comensal como en la iniciación y el mantenimiento de la inflamación.

Se ha descrito la asociación de un polimorfismo en el promotor del *TLR9* (-1237C) con la EII (478) así como su papel como factor de riesgo adicional en pacientes con EC portadores de mutación en *NOD2* (479), lo cual, junto con el demostrado sinergismo entre las vías de señalización de ambos receptores (269), es una prueba más de la relación existente entre diferentes PRRs en la mucosa intestinal. En este trabajo, se decidió incluir un polimorfismo en el gen del *TLR9* situado en el exón 2 (*rs352140*) que produce una mutación silenciosa, ya que independientemente del nucleótido que se encuentre en esa posición (C o T), el residuo 545 de la proteína continúa siendo una prolina (P545P). A pesar de que según la dbSNP el alelo ancestral es C y T es el alelo menor, la frecuencia de los alelos en este SNP son muy similares y la frecuencia de T puede llegar a ser mayor que la de C en algunas poblaciones (480), como es el caso de nuestro estudio. *TLR9 rs352140* no se asocia en nuestra población con mayor riesgo de sufrir ninguna de las dos enfermedades en un primer análisis, tal y como han publicado otros autores previamente (448, 479). Por el contrario, TLR9-545P se ha asociado con mayor riesgo de CU en población japonesa (481) y de EII en población brasileña (482).

Sin embargo, tras la estratificación de pacientes dependiendo del sexo se encontraron ciertas diferencias en nuestro trabajo que merece la pena destacar. En la población de pacientes con EC se ha observado una disminución de la frecuencia del alelo *rs352140-T* en mujeres, siendo el genotipo *rs352140-TT* significativamente menor en enfermas cuando comparamos con población control. Por lo tanto, en nuestra población la presencia del alelo *rs352140-T* es protectora frente a la EC en mujeres, y estas diferencias sólo se observan en homocigosis. Este resultado también podría interpretarse justo al revés, y considerar que el alelo *rs352140-T* se asocia con la EC en varones de nuestra población. No se observa relación de este polimorfismo con mutación en *NOD2* en nuestras poblaciones de pacientes. Con respecto al fenotipo, en nuestro estudio se ha descrito asociación del *TLR9 rs352140* con la aparición de complicaciones digestivas en pacientes con EC. Sin embargo, tras la realización del análisis multivariable, e introducir el sexo como covariable, desaparece esta asociación. Esto se puede explicar ya que previamente se ha demostrado en nuestra población que las complicaciones digestivas son más frecuentes en hombres que en mujeres y el alelo *TLR9 rs352140-T* es más frecuente en hombres. La asociación descrita entre complicaciones digestivas y *TLR9* es secundaria por tanto a su asociación con el sexo masculino.

Se desconoce de qué manera la presencia de una mutación silenciosa, como es el caso de este polimorfismo, puede estar implicada en la patogénesis de la EII, ni cómo se puede explicar su asociación con mayor riesgo de padecer la enfermedad o con el fenotipo. Una posible explicación podría ser el LD con otros polimorfismos (480): *TLR9 rs352140* se encuentra en LD con otro SNP situado en

el intrón 1 (+1174A/G). En presencia de +1174G se ha observado una disminución de la expresión del gen (483). En pacientes portadores del alelo *rs352140-T* en homocigosis (*TLR9 rs352140-TT*), por tanto, cabría esperar una menor expresión de *TLR9* en el intestino, lo cual contribuiría a la alteración del equilibrio entre respuesta reguladora y efectora, de la permeabilidad del epitelio y la ruptura de la tolerancia frente a la flora comensal. Por qué *rs352140-T* es protector frente a EC en mujeres o está asociado a la enfermedad en varones podría explicarse por asociaciones con otros genes, dada la base genética compleja de la enfermedad de Crohn. Más estudios son necesarios para determinar cuál es el papel que desempeña este polimorfismo en la patogénesis de la EII.

6 CONCLUSIONES

Gracias a las investigaciones llevadas a cabo en este trabajo, se han llegado a una serie de conclusiones que se detallan a continuación:

- ✓ El alelo *HLA-DRB1*01:03* confiere susceptibilidad a ambas formas de enfermedad inflamatoria intestinal y, además, se relaciona con la presencia de complicaciones digestivas en pacientes con colitis ulcerosa y con una enfermedad de Crohn colónica.
- ✓ Los alelos *HLA-C*12:02* y *HLA-DRB1*15:02* se asocian con la colitis ulcerosa contribuyendo de forma independiente al riesgo de desarrollar la enfermedad. Se describe la asociación de *HLA-DRB1*11:01* con la colitis ulcerosa y se confirma el papel protector del alelo *HLA-DRB1*03:01* en nuestra población.
- ✓ El alelo *HLA-DRB1*01:01* es protector frente a la enfermedad de Crohn mientras que los alelos *HLA-A*29:02* y de *HLA-B*49:01* se han identificado como alelos de susceptibilidad a la misma por primera vez en nuestra población. Con respecto al fenotipo de la enfermedad de Crohn, el alelo *HLA-DQB1*05:03* se relaciona en nuestra población con el desarrollo de manifestaciones extradigestivas hepatobiliares, mientras que el alelo *HLA-A*11:01* es protector frente a la aparición de complicaciones digestivas.
- ✓ El alelo *MICA*A4* es protector frente a la colitis ulcerosa y el alelo *MICA*A5.1* se asocia con la aparición de abscesos y con un diagnóstico antes de los 17 o después de los 40 en nuestra población de pacientes con colitis ulcerosa.
- ✓ Se confirma la asociación de las tres variantes comunes de *NOD2* con un mayor riesgo de padecer enfermedad de Crohn. Existe una relación entre la dosis mutacional y el riesgo de padecer la enfermedad. Por otro lado, *NOD2* se relaciona con el fenotipo de la enfermedad de Crohn en nuestra población, principalmente con una EC ileal de comienzo temprano, que evoluciona con un patrón fistulizante o estenosante y a la que se asocia la aparición de MED, como por ejemplo esteatosis.
- ✓ El alelo *TLR1 rs5743611-C* es protector frente a la enfermedad inflamatoria intestinal en nuestra población.
- ✓ Los alelos *TLR4 rs4986790-G* y *TLR4 rs4986791-T* son un factor de riesgo adicional frente a la enfermedad de Crohn en pacientes con variantes mutadas de *NOD2*. Además, *TLR4* se relaciona con un patrón evolutivo estenosante, siendo esta relación más fuerte en presencia de mutación de *NOD2*. Por otro lado, el alelo *TLR9 rs352140-T* es protector frente a la enfermedad de Crohn en mujeres de nuestra población.
- ✓ *TLR6 rs5743810-T* se asocia con una enfermedad inflamatoria intestinal complicada mientras que *TRL3 rs5743305-A* es protector frente a la aparición de manifestaciones oculares
- ✓ El alelo *TLR5 rs5744174-C* se asocia con la aparición de manifestaciones extradigestivas en pacientes con enfermedad de Crohn. En cuanto a la localización, el genotipo homocigoto *TLR10 rs4129009-GG* se asocia con una enfermedad de Crohn colónica, mientras que *TLR7 rs179008* lo hace con enfermedad de Crohn ileocólica en pacientes varones en nuestra población. Mujeres con enfermedad de Crohn y portadoras del alelo *TLR8 rs376880-G*

CONCLUSIONES

desarrollan con más frecuencia abscesos, uveítis y complicaciones tromboembólicas.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *The New England Journal of Medicine*. 1991;325(13):928-37.
2. Hampe J, Shaw SH, Saiz R, Leysens N, Lantermann A, Mascheretti S, et al. Linkage of Inflammatory Bowel Disease to Human Chromosome 6p. *The American Journal of Human Genetics*. 1999;65(6).
3. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2015;12(4):205-17.
4. Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1504-17.
5. Hou JK, El-Serag H, Thirumurthi S. Distribution and manifestations of inflammatory bowel disease in Asians, Hispanics, and African Americans: a systematic review. *American Journal of Gastroenterology*. 2009;104:2100-9.
6. García-Paredes J, Mendoza JL. Epidemiología descriptiva de la enfermedad inflamatoria intestinal en España. *Anales de Medicina Interna*. 2003;20(1):7-8.
7. Molodecky NA, Soon I, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology*. 2012;142(1):46-54.
8. Goyette P, Labbé C, Trinh TT, Xavier RJ, Rioux JD. Molecular pathogenesis of inflammatory bowel disease: Genotypes, phenotypes and personalized medicine. *Annals of Medicine*. 2007;39(3):177-99.
9. Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(6):458-66.
10. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine*. 2002;347(6):417-29.
11. Mowat C, Cole A, Windsor A, Ahmad T, Arnott I, Driscoll R, et al. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*. 2011;60(5):571-607.
12. Silverberg, Satsangi J, Ahmad T. ... , molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *The Canadian Journal of Gastroenterology*. 2005;19(A):5A-36A.
13. Spekhorst LM, Visschedijk MC, Alberts R, Festen EA, van der Wouden E-JJ, Dijkstra G, et al. Performance of the Montreal classification for inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology* 2014;20(41):15374-81.
14. Satsangi J, Silverberg, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*. 2006;55(6):749-53.
15. 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 Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflammatory bowel diseases*. 2000;6(1):8-15.
16. Gupta N, Bostrom AG, Kirschner BS, Cohen SA, Abramson O, Ferry GD, et al. Presentation and Disease Course in Early- Compared to Later-Onset Pediatric Crohn's Disease. *The American Journal of Gastroenterology*. 2008;103(8):2092-8.
17. Cooney RM, Warren BF, Altman DG, Abreu MT, Travis SPL. Outcome measurement in clinical trials for ulcerative colitis: towards standardisation. *Trials*. 2007;8(1):17.
18. Jenkins D, Balsitis M, Gallivan S, Dixon MF, Gilmour HM, Shepherd NA, et al. Guidelines for the initial biopsy diagnosis of suspected chronic idiopathic inflammatory bowel disease. *The British Society of Gastroenterology Initiative. Journal of clinical pathology*. 1997;50(2):93-105.
19. Guagnozzi D, Lucendo AJ. Anemia in inflammatory bowel disease: a neglected issue with relevant effects. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(13):3542-51.
20. Røseth AG, Schmidt PN, Fagerhol MK. Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 1999;34(1):50-4.
21. Vilela EG, Torres HO, Martins FP, Ferrari MdL, Andrade MM, Cunha ASS. Evaluation of inflammatory activity in Crohn's disease and ulcerative colitis. *World journal of gastroenterology*. 2012;18(9):872-81.
22. Ferrante M, Henckaerts L, Joossens M, Pierik M, Joossens S, Dotan N, et al. New serological markers in inflammatory bowel disease are associated with complicated disease behaviour. *Gut*. 2007;56(10):1394-403.
23. Gómez-García M, Cabello-Tapia MJ, Sánchez-Capilla AD, De Teresa-Galván J, Redondo-Cerezo E. Thiopurines related malignancies in inflammatory bowel disease: local experience in Granada, Spain. *World journal of gastroenterology*. 2013;19(30):4877-86.

24. Alcaín G, Andrade RJJ, Queipo de Llano MPP, Moreno MJJ, García-Cortés M, Franquelo E. Acute leukemia after infliximab therapy. *The American journal of gastroenterology*. 2003;98(11):2577.
25. Annese V, Beaugerie L, Egan L, Biancone L, Bolling C, Brandts C, et al. European Evidence-based Consensus: Inflammatory Bowel Disease and Malignancies. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2015;9(11):945-65.
26. Probert CS, Jayanthi V, Pinder D, Wicks AC, Mayberry JF. Epidemiological study of ulcerative proctocolitis in Indian migrants and the indigenous population of Leicestershire. *Gut*. 1992;33(5):687-93.
27. Joossens M, Simoens M, Vermeire S, Bossuyt X, Geboes K, Rutgeerts P. Contribution of genetic and environmental factors in the pathogenesis of Crohn's disease in a large family with multiple cases. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2007;13(5):580-4.
28. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *The Lancet*. 2012;380(9853):1590-605.
29. Harries AD, Baird A, Rhodes J. Non-smoking: a feature of ulcerative colitis. *British medical journal (Clinical research ed)*. 1982;284(6317):706.
30. Jick H, Walker AM. Cigarette Smoking and Ulcerative Colitis. *The New England Journal of Medicine*. 1983;308(5):261-3.
31. Boyko EJ, Koepsell TD, Perera DR, Inui TS. Risk of Ulcerative Colitis among Former and Current Cigarette Smokers. *The New England Journal of Medicine*. 1987;316(12):707-10.
32. Merrett MN, Mortensen N, Kettlewell M, Jewell DO. Smoking may prevent pouchitis in patients with restorative proctocolectomy for ulcerative colitis. *Gut*. 1996;38(3):362-4.
33. Tuvlin JA, Raza SS, Bracamonte S, Julian C, Hanauer SB, Nicolae DL, et al. Smoking and inflammatory bowel disease: trends in familial and sporadic cohorts. *Inflammatory bowel diseases*. 2007;13(5):573-9.
34. Lindberg E, Järnerot G, Huitfeldt B. Smoking in Crohn's disease: effect on localisation and clinical course. *Gut*. 1992;33(6):779-82.
35. Naganuma M, Iizuka B, Torii A, Ogihara T, Kawamura Y, Ichinose M, et al. Appendectomy protects against the development of ulcerative colitis and reduces its recurrence: results of a multicenter case-controlled study in Japan. *The American Journal of Gastroenterology*. 2001;96(4):1123-6.
36. Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, Blain A, Reijasse D, Gendre JP. Effects of appendectomy on the course of ulcerative colitis. *Gut*. 2002;51(6):803-7.
37. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2003;124(1):40-6.
38. Sahami S, Kooij IA, Meijer SL, den Brink VGR, Buskens CJ, te Velde AA. The Link between the Appendix and Ulcerative Colitis: Clinical Relevance and Potential Immunological Mechanisms. *The American Journal of Gastroenterology*. 2016;111(2):163-9.
39. Wakefield AJ, Sawyerr AM, Hudson M, Dhillon AP, Pounder RE. Smoking, the oral contraceptive pill, and Crohn's disease. *Digestive diseases and sciences*. 1991;36(8):1147-50.
40. Hildebrand H, Malmberg P, Askling J, Ekblom A, Montgomery SM. Early-life exposures associated with antibiotic use and risk of subsequent Crohn's disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2008;43(8):961-6.
41. Hviid A, Svanström H, Frisch M. Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood. *Gut*. 2011;60(1):49-54.
42. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association Between the Use of Antibiotics and New Diagnoses of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *The American Journal of Gastroenterology*. 2011;106(12):2133-42.
43. Russel MG, Engels LG, Muris JW, Limonard CB, Volovics A, Brummer RJ, et al. Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 1998;10(3):243-9.
44. Geerling BJ, Dagnelie PC, Badart-Smook A, Russel MG, Stockbrügger RW, Brummer JR. Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. *The American Journal of Gastroenterology*. 2000;95(4):1008-13.
45. Hou JK, Abraham B, El-Serag H. Dietary Intake and Risk of Developing Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review of the Literature. *The American Journal of Gastroenterology*. 2011;106(4):563-73.
46. Amre DK, D'Souza S, Morgan K, Seidman G, Lambrette P, Grimard G, et al. Imbalances in Dietary Consumption of Fatty Acids, Vegetables, and Fruits Are Associated With Risk for Crohn's Disease in Children. *The American Journal of Gastroenterology*. 2007;102(9):2016-25.

47. Bonaz BL, Bernstein CN. Brain-Gut Interactions in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2013;144(1):36-49.
48. Khalili H, Ananthakrishnan AN, Konijeti GG, Liao X, Higuchi LM, Fuchs CS, et al. Physical activity and risk of inflammatory bowel disease: prospective study from the Nurses' Health Study cohorts. *BMJ*. 2013;347.
49. Ali T, Madhoun MF, Orr WC, Rubin DT. Assessment of the Relationship Between Quality of Sleep and Disease Activity in Inflammatory Bowel Disease Patients. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2013;19(11):2440-3.
50. García Rodríguez LA, Ruigómez A, Panés J. Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2006;130(6):1588-94.
51. Sartor RB. Does *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease? *Gut*. 2005;54(7):896-8.
52. Bull TJ, McMinn EJ, Sidi-Boumedine K, Skull A, Durkin D, Neild P, et al. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(7):2915-23.
53. Naser SA, Ghobrial G, Romero C, Valentine JF. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease. *The Lancet*. 2004;364(9439):1039-44.
54. Romero C, Hamdi A, Valentine JF, Naser SA. Evaluation of surgical tissue from patients with Crohn's disease for the presence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis DNA by in situ hybridization and nested polymerase chain reaction. *Inflammatory bowel diseases*. 2005;11(2):116-25.
55. Gradel KO, Nielsen HL, Schönheyder HC, Ejlersen T, Kristensen B, Nielsen H. Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis. *Gastroenterology*. 2009;137(2):495-501.
56. Ananthakrishnan AN, Issa M, Binion DG. *Clostridium difficile* and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology clinics of North America*. 2009;38(4):711-28.
57. Cadwell K, Patel KK, Maloney NS, Liu T-CC, Ng AC, Storer CE, et al. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell*. 2010;141(7):1135-45.
58. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. 2007;449(7164):804-10.
59. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65.
60. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Current Status and the Future Ahead. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1489-99.
61. Rosenbaum JT, Lin P, Asquith M, Costello M-E, Kenna TJ, Brown MA. Does the microbiome play a causal role in spondyloarthritis? *Clinical Rheumatology*. 2014;33(6):763-7.
62. Alkanani AK, Hara N, Lien E, Ir D, Kotter CV, Robertson CE, et al. Induction of diabetes in the RIP-B7.1 mouse model is critically dependent on TLR3 and MyD88 pathways and is associated with alterations in the intestinal microbiome. *Diabetes*. 2014;63(2):619-31.
63. Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, Peterlin Z, Sipos A, Han J, et al. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(11):4410-5.
64. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. 2012;482(7384):179-85.
65. Wu H-JJ, Ivanov II, Darce J, Hattori K, Shima T, Umesaki Y, et al. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity*. 2010;32(6):815-27.
66. Kostic AD, Gevers D, Pedomallu CS, Michaud M, Duke F, Earl AM, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome research*. 2012;22(2):292-8.
67. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2009;9(5):313-23.
68. Hold GL, Smith M, Grange C, Watt E, El-Omar EM, Mukhopadhyaya I. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years? *World journal of gastroenterology*. 2014;20(5):1192-210.

69. Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflammatory bowel diseases*. 2009;15(8):1183-9.
70. Frank DN, Amand ALS, Feldman RA. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(34):13780-5.
71. Walker AW, Sanderson JD, Churcher C, Parkes GC, Hudspith BN, Rayment N, et al. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC microbiology*. 2011;11:7.
72. Mukhopadhyay I, Hansen R, El-Omar EM, Hold GL. IBD-what role do Proteobacteria play? *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2012;9(4):219-30.
73. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser A-L, Barnich N, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004;127(2):412-21.
74. Ott SJ, Kühbacher T, Musfeldt M, Rosenstiel P, Hellmig S, Rehman A, et al. Fungi and inflammatory bowel diseases: Alterations of composition and diversity. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2015;43(7):831-41.
75. Sokol H, Seksik P, Rigottier-Gois L, Lay C, Lepage P, Podglajen I, et al. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2006;12(2):106-11.
76. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux J-J, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(43):16731-6.
77. Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, Andersson AF, Lucio M, Zheng Z, et al. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology*. 2010;139(6):1844-18540.
78. Bloom SM, Bijanki VN, Nava GM, Sun L, Malvin NP, Donermeyer DL, et al. Commensal *Bacteroides* species induce colitis in host-genotype-specific fashion in a mouse model of inflammatory bowel disease. *Cell host & microbe*. 2011;9(5):390-403.
79. Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, Lepage P, Raedler A, Schreiber S. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflammatory bowel diseases*. 2008;14(7):968-76.
80. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*. 2006;12(23):3668-72.
81. Binder V. Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases* 1998;16(6):351-5.
82. Toyoda H, Wang SJ, Yang HY, Redford A, Magalong D, Tyan D, et al. Distinct associations of HLA class II genes with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1993;104(3):741-8.
83. Satsangi J, Grootsholten C, Holt H, Jewell DP. Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease. *Gut*. 1996;38(5):738-41.
84. Annese V, Andreoli A, Astegiano M, Campieri M, Caprilli R, Cucchiara S, et al. Clinical features in familial cases of Crohn's disease and ulcerative colitis in Italy: a GISC* study. *The American Journal of Gastroenterology*. 2001;96(10):2939-45.
85. Glocker E-O, Kotlarz D, Boztug K, Gertz ME, Schäffer AA, Noyan F, et al. Inflammatory Bowel Disease and Mutations Affecting the Interleukin-10 Receptor. *The New England Journal of Medicine*. 2009;361(21):2033-45.
86. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory Bowel Disease. *Annual Review of Immunology*. 2010;28(1):573-621.
87. Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhardt HA, McLeod RS, Griffiths AM, et al. Genomewide Search in Canadian Families with Inflammatory Bowel Disease Reveals Two Novel Susceptibility Loci. *The American Journal of Human Genetics*. 2000;66(6):1863-70.
88. Newman B, Siminovitch KA. Recent advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Current opinion in gastroenterology*. 2005;21(4):401-7.
89. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *The Lancet*. 2007;369(9573):1627-40.
90. Limbergen J, Radford-Smith G, Satsangi J. Advances in IBD genetics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2014;11(6):372-85.

91. Philpott DJ, Sorbara MT, Robertson SJ, Croitoru K, Girardin SE. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2014;14(1):9-23.
92. Hugot J-P, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard J-P, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):599-603.
93. 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.
94. Cavanaugh J, Consortium T. International Collaboration Provides Convincing Linkage Replication in Complex Disease through Analysis of a Large Pooled Data Set: Crohn Disease and Chromosome 16. *The American Journal of Human Genetics*. 2001;68(5):1165-71.
95. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JPA. Differential Effects of NOD2 Variants on Crohn's Disease Risk and Phenotype in Diverse Populations: A Metaanalysis. *The American Journal of Gastroenterology*. 2004;99(12):2393-404.
96. Adler J, Rangwala SC, Dwamena BA, Higgins PDR. The Prognostic Power of the NOD2 Genotype for Complicated Crohn's Disease: A Meta-Analysis. *The American Journal of Gastroenterology*. 2011;106(4):699-712.
97. Stokkers PC, Reitsma, Tytgat GN, van Deventer SJ. HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut*. 1999;45(3):395-401.
98. Ahmad T, Armuzzi A, Neville M, Bunce M, Ling KLL, Welsh KI, et al. The contribution of human leucocyte antigen complex genes to disease phenotype in ulcerative colitis. *Tissue antigens*. 2003;62(6):527-35.
99. Fernandez L, Mendoza JL, Martinez A, Urcelay E, Fernandez-Arquero M, Garcia-Paredes J, et al. IBD1 and IBD3 determine location of Crohn's disease in the Spanish population. *Inflammatory bowel diseases*. 2004;10(6):715-22.
100. Goyette P, Boucher G, Mallon D, Ellinghaus E, Jostins L, Huang H, et al. High-density mapping of the MHC identifies a shared role for HLA-DRB1*01:03 in inflammatory bowel diseases and heterozygous advantage in ulcerative colitis. *Nature Genetics*. 2015;47(2):172-9.
101. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature Genetics*. 2008;40(8):955-62.
102. 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. *Nature Genetics*. 2001;29(2):223-8.
103. 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. *Nature Genetics*. 2004;36(5):471-5.
104. Limbergen J, Wilson DC, Satsangi J. The Genetics of Crohn's Disease. *Annual review of genomics and human genetics*. 2009;10(1):89-116.
105. Consortium WTCC. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;447(7145):661-78.
106. Xavier RJ, Rioux JD. Genome-wide association studies: a new window into immune-mediated diseases. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(8):631-43.
107. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nature Genetics*. 2007;39(5):596-604.
108. 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(5804):1461-3.
109. Libioulle C, Louis E, Hansoul S, Sandor C, Farnir F, Franchimont D, et al. Novel Crohn Disease Locus Identified by Genome-Wide Association Maps to a Gene Desert on 5p13.1 and Modulates Expression of PTGER4. *PLoS Genetics*. 2007;3(4):e58.
110. Franke A, Hampe J, Rosenstiel P, Becker C, Wagner F, Häslér R, et al. Systematic Association Mapping Identifies NELL1 as a Novel IBD Disease Gene. *PLoS ONE*. 2007;2(8):e691.
111. Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, Lau KF, Bridger S, Macpherson A, et al. A Genomewide Analysis Provides Evidence for Novel Linkages in Inflammatory Bowel Disease in a Large European Cohort. *The American Journal of Human Genetics*. 2007;64(3):808-16.
112. Raelson JV, Little RD, Ruether A, Fournier H, Paquin B, Eerdewegh P, et al. Genome-wide association study for Crohn's disease in the Quebec Founder Population identifies multiple validated disease loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(37):14747-52.

113. Franke A, Fischer A, Nothnagel M, Becker C, Grabe N, Till A, et al. Genome-Wide Association Analysis in Sarcoidosis and Crohn's Disease Unravels a Common Susceptibility Locus on 10p12.2. *Gastroenterology*. 2008;135(4):1207-15.
114. Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, Nikolaus S, Mayr G, et al. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nature Genetics*. 2008;40(11):1319-23.
115. Asano K, Matsushita T, Umeno J, Hosono N, Takahashi A, Kawaguchi T, et al. A genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for ulcerative colitis in the Japanese population. *Nature Genetics*. 2009;41(12):1325-9.
116. Silverberg MS, Cho JH, Rioux JD, McGovern DPB, Wu J, Annese V, et al. Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. *Nature Genetics*. 2009;41(2):216-20.
117. Franke A, Balschun T, Sina C, Ellinghaus D, Häslner R, Mayr G, et al. Genome-wide association study for ulcerative colitis identifies risk loci at 7q22 and 22q13 (IL17REL). *Nature Genetics*. 2010;42(4):292-4.
118. Fisher SA, Tremelling M, Anderson CA, Gwilliam R, Bumpstead S, Prescott NJ, et al. Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nature Genetics*. 2008;40(6):710-2.
119. Kugathasan S, Baldassano RN, Bradfield JP, Sleiman PMA, Imielinski M, Guthery SL, et al. Loci on 20q13 and 21q22 are associated with pediatric-onset inflammatory bowel disease. *Nature Genetics*. 2008;40(10):1211-5.
120. Imielinski M, Baldassano RN, Griffiths A, Russell RK, Annese V, Dubinsky M, et al. Common variants at five new loci associated with early-onset inflammatory bowel disease. *Nature Genetics*. 2009;41(12):1335-40.
121. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nature Genetics*. 2011;43(3):246-52.
122. McGovern DPB, Gardet A, Törkvist L, Goyette P, Essers J, Taylor KD, et al. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nature Genetics*. 2011;42(4):332-7.
123. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2012;491(7422):119-24.
124. Liu JZ, van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R, Takahashi A, et al. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nature genetics*. 2015;47(9):979-86.
125. Diaz-Gallo L-MM, Espino-Paisán L, Fransen K, Gómez-García M, van Sommeren S, Cardeña C, et al. Differential association of two PTPN22 coding variants with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2011;17(11):2287-94.
126. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474(7351):307-17.
127. Kaser A, Lee A-HH, Franke A, Glickman JN, Zeissig S, Tilg H, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell*. 2008;134(5):743-56.
128. McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, Chilewski SD, Landry A, Goyette P, et al. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nature Genetics*. 2008;40(9):1107-12.
129. Tremelling M, Cummings F, Fisher SA, Mansfield J, Gwilliam R, Keniry A, et al. IL23R Variation Determines Susceptibility But Not Disease Phenotype in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2007;132(5):1657-64.
130. Zhang Y-Z, Li Y-Y. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20(1):91-9.
131. Zuk O, Hechter E, Sunyaev SR, Lander ES. The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(4):1193-8.
132. Cader ZM, Kaser A. Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. *Gut*. 2013;62(11):1653-64.

133. Johansson ME, Ambort D, Pelaseyed T, Schütte A, Gustafsson JK, Ermund A, et al. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS. 2011;68(22):3635-41.
134. Mowat A, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunological Reviews*. 1997;156(1):145-66.
135. Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ. El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 2008;100(1):29-34.
136. Magalhaes JG, Tattoli I, Girardin SE. The intestinal epithelial barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Seminars in Immunology*. 2007;19(2):106-15.
137. de Mattos B, Garcia M, Nogueira J, Paiatto L, Albuquerque C, Souza C, et al. Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments. *Mediators of Inflammation*. 2015;2015:493012.
138. Denning TL, Wang Y-cC, Patel SR, Williams IR, Pulendran B. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nature immunology*. 2007;8(10):1086-94.
139. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(2):145-9.
140. Spits H, Cupedo T. Innate Lymphoid Cells: Emerging Insights in Development, Lineage Relationships, and Function. *Immunology*. 2012;30(1):647-75.
141. Walker JA, Barlow JL, McKenzie ANJ. Innate lymphoid cells — how did we miss them? *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(2):75-87.
142. Zhang Y, Stastny P. MICA Antigens Stimulate T Cell Proliferation and Cell-Mediated Cytotoxicity. *Human Immunology*. 2006;67(3):215-22.
143. Fries W, Renda MC, Presti MA, Raso A, Orlando A, Oliva L, et al. Intestinal Permeability and Genetic Determinants in Patients, First-Degree Relatives, and Controls in a High-Incidence Area of Crohn's Disease in Southern Italy. *The American Journal of Gastroenterology*. 2005;100(12):2730-6.
144. Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*. 2007;56(1):61-72.
145. Schulzke JD, Ploeger S, Amasheh M, Fromm A, Zeissig S, Troeger H, et al. Epithelial Tight Junctions in Intestinal Inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1165(1):294-300.
146. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K, et al. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2003;9(4):215-23.
147. Ramasundara M, Leach ST, Lemberg DA, Day AS. Defensins and inflammation: The role of defensins in inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2009;24(2):202-8.
148. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(10):722-37.
149. Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim Y-GG, Magalhães JGG, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nature immunology*. 2010;11(1):55-62.
150. Fritz T, Niederreiter L, Adolph T, Blumberg RS, Kaser A. Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. *Gut*. 2011;60(11):1580-8.
151. Cario E. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflammatory bowel diseases*. 2010;16(9):1583-97.
152. Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, et al. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(6):2269-80.
153. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *The Lancet*. 2012;380(9853):1606-19.
154. Siddiqui KRR, Laffont S, Powrie F. E-cadherin marks a subset of inflammatory dendritic cells that promote T cell-mediated colitis. *Immunity*. 2010;32(4):557-67.
155. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . *Molecular Cell*. 2002;10(2):417-26.
156. Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J. The inflammasome: an integrated view. *Immunological Reviews*. 2011;243(1):136-51.

157. Ting J, Willingham SB, Bergstralh DT. NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(5):372-9.
158. Stutz A, Golenbock DT, Latz E. Inflammasomes: too big to miss. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(12):3502-11.
159. Lamkanfi M, Kanneganti T-DD. Nlrp3: an immune sensor of cellular stress and infection. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2010;42(6):792-5.
160. Schoultz I, Verma D, Halfvarsson J, Törkvist L, Fredrikson M, Sjöqvist U, et al. Combined Polymorphisms in Genes Encoding the Inflammasome Components NALP3 and CARD8 Confer Susceptibility to Crohn's Disease in Swedish Men. *The American Journal of Gastroenterology*. 2009;104(5):1180-8.
161. Villani A-C, Lemire M, Fortin G, Louis E, Silverberg MS, Collette C, et al. Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nature Genetics*. 2009;41(1):71-6.
162. Lewis GJ, Massey D, Zhang H, Bredin F, Tremelling M, Lee JC, et al. Genetic association between NLRP3 variants and Crohn's disease does not replicate in a large UK panel. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2011;17(6):1387-91.
163. Buonocore S, Ahern PP, Uhlig HH, Ivanov II, Littman DR, Maloy KJ, et al. Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature*. 2010;464(7293):1371-5.
164. Becker C, Wirtz S, Blessing M, Pirhonen J, Strand D, Bechthold O, et al. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(5):693-706.
165. Lavelle EC, Murphy C, O'Neill LAJ, Creagh EM. The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. *Mucosal Immunology*. 2009;3(1):17-28.
166. Sawa S, Lochner M, Satoh-Takayama N, Dulauroy S, Bérard M, Kleinschek M, et al. RORγt+ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nature Immunology*. 2011;12(4):320-6.
167. Vonarbourg C, Mortha A, Bui VL, Hernandez PP, Kiss EA, Hoyler T, et al. Regulated expression of nuclear receptor RORγt confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing RORγt(+) innate lymphocytes. *Immunity*. 2010;33(5):736-51.
168. Weaver CT, Hatton RD. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nature Reviews Immunology*. 2009;9(12):883-9.
169. Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORγt function. *Nature*. 2008;453(7192):236-40.
170. Ghoreschi K, Laurence A, Yang X-PP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-β signalling. *Nature*. 2010;467(7318):967-71.
171. Blanco-Kelly F, Matesanz F, Alcina A, Teruel M, Díaz-Gallo LM, Gómez-García M, et al. CD40: novel association with Crohn's disease and replication in multiple sclerosis susceptibility. *PloS one*. 2010;5(7):e11520.
172. Diaz-Gallo LM, Palomino-Morales RJ, Gómez-García M, Cardeña C, Rodrigo L, Nieto A, et al. STAT4 gene influences genetic predisposition to ulcerative colitis but not Crohn's disease in the Spanish population: a replication study. *Human immunology*. 2010;71(5):515-9.
173. Franke A, McGovern DPB, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nature Genetics*. 2010;42(12):1118-25.
174. Himmel ME, Hardenberg G, Piccirillo CA, Steiner TS, Levings MK. The role of T-regulatory cells and Toll-like receptors in the pathogenesis of human inflammatory bowel disease. *Immunology*. 2008;125(2):145-53.
175. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*. 2005;129(2):550-64.
176. Heller F, Fromm A, Gitter AH, Mankertz J. Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-inflammatory interleukin-13 on epithelial *Mucosal Immunology*. 2008;Suppl 1:S58-61.
177. Ferreira RC, Pan-Hammarström Q, Graham RR, Gateva V, Fontán G, Lee AT, et al. Association of IFIH1 and other autoimmunity risk alleles with selective IgA deficiency. *Nature Genetics*. 2010;42(9):777-80.
178. Brandtzaeg P, Carlsen HS, Halstensen TS. The B-cell system in inflammatory bowel disease. *Advances in experimental medicine and biology*. 2006;579:149-67.

179. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature*. 1999;401(6756):921-3.
180. International MHC and Autoimmunity Genetics Network1 RJ, Goyette P, Vyse TJ, Hammarström L, Fernando MM, Green T, De Jager PL, Foisy S, Wang J, de Bakker PI, Leslie S, McVean G, Padyukov L, Alfredsson L, Annesse V, Hafler DA, Pan-Hammarström Q, Matell R, Sawcer SJ, Compston AD, Cree BA, Mirel DB, Daly MJ, Behrens TW, Klareskog L, Gregersen PK, Oksenberg JR, Hauser SL. Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(44):18680-5.
181. Yap L, Ahmad T, Jewell DP. The contribution of HLA genes to IBD susceptibility and phenotype. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2004;18(3):577-96.
182. Ahmad T, Neville M, Marshall SE, Armuzzi A, Mulcahy-Hawes K, Crawshaw J, et al. Haplotype-specific linkage disequilibrium patterns define the genetic topography of the human MHC. *Human Molecular Genetics*. 2003;12(6):647-56.
183. Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway's Immunobiology*. 7th ed: Garland Science; 2008.
184. Wolters VM, Wijmenga C. Genetic Background of Celiac Disease and Its Clinical Implications. *The American Journal of Gastroenterology*. 2008;103(1):190-5.
185. Brown MA, Kennedy LG, MacGregor AJ, Darke C, Duncan E, Shatford JL, et al. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis and rheumatism*. 1997;40(10):1823-8.
186. Wallace GR. HLA-B*51 the primary risk in Behçet disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(24):8706-7.
187. Noble JA, Valdes AM, Cook M, Klitz W, Thomson G, Erlich HA. The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. *American journal of human genetics*. 1996;59(5):1134-48.
188. Gleeson MH, Walker JS, Wentzel J, Chapman JA, Harris R. Human leucocyte antigens in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut*. 1972;13(6):438-40.
189. Ma Y, Ohmen JD, Li Z, Bentley GL, McElree C, Pressman S, et al. A genome-wide search identifies potential new susceptibility loci for Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 1999;5(4):271-8.
190. Dechairo B, Dimon C, van Heel D, Mackay I, Edwards M, Scambler P, et al. Replication and extension studies of inflammatory bowel disease susceptibility regions confirm linkage to chromosome 6p (IBD3). *European Journal of Human Genetics*. 2001;9(8):627-33.
191. van Heel DA, Fisher SA, Kirby A, Daly MJ, Rioux JD, Lewis CM, et al. Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Human Molecular Genetics*. 2004;13(7):763-70.
192. Muro M, López-Hernández R, Mrowiec A. Immunogenetic biomarkers in inflammatory bowel diseases: role of the IBD3 region. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(41):15037-48.
193. Mahdi B. Role of HLA typing on Crohn's disease pathogenesis. *Annals of Medicine and Surgery*. 2015;4(3):248-53.
194. Bouma G, Crusius JBA, GarcÍA-GonzÁlez MA, Meijer B, Hellemans HPR, Hakvoort RJ, et al. Genetic markers in clinically well defined patients with ulcerative colitis (UC). *Clinical & Experimental Immunology*. 1999;115(2):294-300.
195. Trachtenberg EA, Yang H, Hayes E, Vinson M, Lin C, Targan SR, et al. HLA class II haplotype associations with inflammatory bowel disease in Jewish (Ashkenazi) and non-Jewish Caucasian populations. *Human Immunology*. 2000;61(3):326-33.
196. Silverberg MS, Mirea L, Bull SB, Murphy JE, Steinhart HA, Greenberg GR, et al. A Population- and Family-Based Study of Canadian Families Reveals Association of HLA DRB1*0103 With Colonic Involvement in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2003;9(1):1-9.
197. Yamamoto-Furusho JK, Uscanga LF, Vargas-Alarcón G, Ruiz-Morales JA, Higuera L, Cutiño T, et al. Clinical and genetic heterogeneity in Mexican patients with ulcerative colitis. *Human immunology*. 2003;64(1):119-23.
198. Fernández L, Núñez C, Mendoza J, Urcelay E, Fernández-Arquero M, Taxonera C, et al. A recombined haplotype in the major histocompatibility region contains a cluster of genes conferring high susceptibility to ulcerative colitis in the Spanish population. *Inflammatory bowel diseases*. 2005;11(9):785-91.
199. Fernando MMA, Stevens CR, Walsh EC, Jager PL, Goyette P, Plenge RM, et al. Defining the Role of the MHC in Autoimmunity: A Review and Pooled Analysis. *PLoS Genetics*. 2008;4(4):e1000024.

200. Lappalainen M, Halme L, Turunen U, Saavalainen P, Einarsdottir E, Färkkilä M, et al. Association of IL23R, TNFRSF1A, and HLA-DRB1*0103 allele variants with inflammatory bowel disease phenotypes in the Finnish population. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2008;14(8):1118-24.
201. Roussomoustakaki M, Satsangi J, Welsh K, Louis E, Fanning G, Targan S, et al. Genetic markers may predict disease behavior in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1997;112(6):1845-53.
202. Orchard TR, Satsangi J, Van Heel D, Jewell DP. Genetics of inflammatory bowel disease: a reappraisal. *Scandinavian journal of immunology*. 2000;51(1):10-7.
203. Futami S, Aoyama N, Honsako Y, Tamura T, Morimoto S, Nakashima T, et al. HLA-DRB1*1502 allele, subtype of DR15, is associated with susceptibility to ulcerative colitis and its progression. *Digestive Diseases and Sciences*. 1995;40(4):814-8.
204. Uyar FA, İmeryüz N, Saruhan-Direskeneli G, Çeken H, Özdoğan Ö, ahin SS, et al. The distribution of HLA-DRB alleles in ulcerative colitis patients in Turkey. *European Journal of Immunogenetics*. 1998;25(4):293-6.
205. 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(4):350-8.
206. 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.
207. Myung S-J, Yang S-K, Jung H-Y, Chang H-S, Park J, Hong W-S, et al. HLA-DRB1*1502 confers susceptibility to ulcerative colitis, but is negatively associated with its intractability: a Korean study. *International Journal of Colorectal Disease*. 2002;17(4):233-7.
208. Muro M, López-Hernández R, Campillo JA, Salama H. The Role of Human Leukocyte Antigen (HLA) Complex in IBD: Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Advanced Studies in Biology*. 2009;1(1):37-41.
209. 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? *Journal of Autoimmunity*. 1996;9(6):777-84.
210. Masuda H, Nakamura Y, Tanaka T, Hayakawa S. Distinct relationship between HLA-DR genes and intractability of ulcerative colitis. *The American journal of gastroenterology*. 1994;89(11):1957-62.
211. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, et al. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;122(4):854-66.
212. Danzé PM, Colombel JF, Jacquot S, Loste MN, Heresbach D, Ategbo S, et al. Association of HLA class II genes with susceptibility to Crohn's disease. *Gut*. 1996;39(1):69-72.
213. Reinshagen M, Loeliger C, Kuehnl P, Weiss U, Manfras BJ, Adler G, et al. HLA class II gene frequencies in Crohn's disease: a population based analysis in Germany. *Gut*. 1996;38(4):538-42.
214. Forcione DG, Sands B, Isselbacher KJ, Rustgi A, Podolsky DK, Pillai S. An increased risk of Crohn's disease in individuals who inherit the HLA class II DRB3*0301 allele. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(10):5094-8.
215. Cariappa A, Sands B, Forcione D, Finkelstein D, Podolsky DK, Pillai S. Analysis of MHC class II DP, DQ and DR alleles in Crohn's disease. *Gut*. 1998;43(2):210-5.
216. Nakajima A, Matsubashi N, Kodama T, Yazaki Y, Takazoe M, Kimura A. HLA-linked susceptibility and resistance genes in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1995;109(5):1462-7.
217. Gómez-García M, Oliver J, Márquez A, Mendoza JL, López-Nevot MA, Fernández-Arquero M, et al. Strong protective effect of DR3 against ulcerative colitis in the Spanish population. *The American journal of gastroenterology*. 2007;102(12):2762-6.
218. Ng SC, Tsoi K, Kamm MA, Xia B, Wu J, Chan F, et al. Genetics of inflammatory bowel disease in Asia: Systematic review and meta-analysis. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2012;18(6):1164-76.
219. Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(14):6259-63.
220. Leelayuwat C, Townend DC, Degli-Esposti MA, Abraham LJ, Dawkins RL. A new polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I. *Immunogenetics*. 1994;40(5):339-51.
221. Hughes AL, Yeager M, Elshof A, Chorney MJ. A new taxonomy of mammalian MHC class I molecules. *Immunology Today*. 1999;20(1):22-6.

222. Ding Y, Xia B, Lü M, Zhang Y, Li J, Ye M, et al. MHC class I chain-related gene A-A5-1 allele is associated with ulcerative colitis in Chinese population. *Clinical & Experimental Immunology*. 2005;142(1):193-8.
223. Orchard TR, Dhar A, Simmons JD, Vaughan R, Welsh KI, Jewell DP. MHC class I chain-like gene A (MICA) and its associations with inflammatory bowel disease and peripheral arthropathy. *Clinical and experimental immunology*. 2001;126(3):437-40.
224. Perera L, Shao L, Patel A, Evans K, Meresse B, Blumberg R, et al. Expression of nonclassical class I molecules by intestinal epithelial cells. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2007;13(3):298-307.
225. López-Hernández R, Valdés M, Lucas D, Campillo J, Martínez-García P, Salama H, et al. Association analysis of MICA gene polymorphism and MICA-129 dimorphism with inflammatory bowel disease susceptibility in a Spanish population. *Human Immunology*. 2010;71(5):512-4.
226. Deng L, Mariuzza RA. Structural basis for recognition of MHC and MHC-like ligands by natural killer cell receptors. *Seminars in Immunology*. 2006;18(3):159-66.
227. Li P, Willie ST, Bauer S, Morris DL, Spies T, Strong RK. Crystal Structure of the MHC Class I Homolog MIC-A, a $\gamma\delta$ T Cell Ligand. *Immunity*. 1999;10(5):577-84.
228. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science (New York, NY)*. 1999;285(5428):727-9.
229. Groh V, Brühl A, El-Gabalawy H, Nelson LJ, Spies T. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(16):9452-7.
230. Bahram S, Inoko H, Shiina T, Radosavljevic M. MIC and other NKG2D ligands: from none to too many. *Current Opinion in Immunology*. 2005;17(5):505-9.
231. Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK, et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics*. 2001;53(4):279-87.
232. González S, López-Soto A, Suarez-Alvarez B, López-Vázquez A, López-Larrea C. NKG2D ligands: key targets of the immune response. *Trends in Immunology*. 2008;29(8):397-403.
233. Zompi S, Hamerman JA, Ogasawara K, Schweighoffer E, Tybulewicz VLJ, Santo JP, et al. NKG2D triggers cytotoxicity in mouse NK cells lacking DAP12 or Syk family kinases. *Nature Immunology*. 2003;4(6):565-72.
234. Wu J, Cherwinski H, Spies T, Phillips JH. DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2000;192(7):1059-67.
235. Schrambach S, Ardizzone M, Leymarie V, Sibilía J, Bahram S. In Vivo Expression Pattern of MICA and MICB and Its Relevance to Auto-Immunity and Cancer. *PLoS ONE*. 2007;2(6):e518.
236. Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells. *Science (New York, NY)*. 1998;279(5357):1737-40.
237. Li J, Cui L, He W. Distinct pattern of human Vdelta1 $\gamma\delta$ T cells recognizing MICA. *Cellular & molecular immunology*. 2005;2(4):253-8.
238. Fukushima K MT, Ohtani H, Sasaki I, Funayama Y, Matsuno S, Nagura H. Immunohistochemical characterization, distribution, and ultrastructure of lymphocytes bearing T-cell receptor γ/δ in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1991;101(3):670-8.
239. Landau SB, Probert CS, Stevens CA, Balk SP, Blumberg RS. Over-utilization of the J delta 3 gene-segment in Crohn's disease. *Journal of clinical & laboratory immunology*. 1996;48(1):33-44.
240. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(22):12445-50.
241. Moenkemeyer M, Heiken H, Schmidt RE, Witte T. Higher risk of cytomegalovirus reactivation in human immunodeficiency virus-1-infected patients homozygous for MICA5.1. *Human Immunology*. 2009;70(3):175-8.
242. Samuels S, Ferns DM, Meijer D, van Straalen JP, Buist MR, Zijlmans HJ, et al. High levels of soluble MICA are significantly related to increased disease-free and disease-specific survival in patients with cervical adenocarcinoma. *Tissue Antigens*. 2015;85(6):476-83.
243. Kaiser BK, Yim D, Chow IT, Gonzalez S, Dai Z, Mann HH, et al. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature*. 2007;447(7143):482-6.
244. Suemizu H, Radosavljevic M, Kimura M, Sadahiro S, Yoshimura S, Bahram S, et al. A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(5):2971-6.

245. Rueda B, Pascual M, López-Nevot MA, González E, Martín J. A new allele within the transmembrane region of the human MICA gene with seven GCT repeats. *Tissue Antigens*. 2002;60(6):526-8.
246. Gambelunghe G, Brozzetti A, Ghaderi M, Tortoioli C, Falorni A. MICA A8: a New Allele Within MHC Class I Chain-Related A Transmembrane Region With Eight GCT Repeats. *Human Immunology*. 2006;67(12):1005-7.
247. Glas J, Maier K, Wetzke M, Henninger M, Weiss EH, Folwaczny M. MICA*055: a new allele with eight GCT repeats in the exon 5 microsatellite. *Tissue Antigens*. 2008;72(4):410-1.
248. Gonzalez-Gay MA, Rueda B, Vilchez JR, Lopez-Nevot MA, Robledo G, Ruiz MP, et al. Contribution of MHC class I region to genetic susceptibility for giant cell arteritis. *Rheumatology*. 2007;46(3):431-4.
249. Collins RWM. Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. *European Journal of Immunogenetics*. 2004;31(3):105-14.
250. Ashiru O, Boutet P, Fernández-Messina L, Agüera-González S, Skepper JN, Valés-Gómez M, et al. Natural Killer Cell Cytotoxicity Is Suppressed by Exposure to the Human NKG2D Ligand MICA*008 That Is Shed by Tumor Cells in Exosomes. *Cancer Research*. 2010;70(2):481-9.
251. Ashiru O, López-Cobo S, Fernández-Messina L, Pontes-Quero S, Pandolfi R, Reyburn HT, et al. A GPI anchor explains the unique biological features of the common NKG2D-ligand allele MICA*008. *Biochemical Journal*. 2013;454(2):295-302.
252. Møllergaard M, Skovbakke S, Schneider CL, Lauridsen F, Andresen L, Jensen H, et al. N-glycosylation of asparagine N8 regulates surface expression of MHC class I chain-related protein A (MICA) alleles dependent on threonine T24. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(29).
253. Sánchez E, Torres B, Vilches JR, López-Nevot MA, Ortego-Centeno N, Jiménez-Alonso J, et al. No primary association of MICA polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*. 2006;45(9):1096-100.
254. Gazquez I, Moreno A, Aran I, Soto-Varela A, Santos S, Perez-Garrigues H, et al. MICA-STR A.4 is associated with slower hearing loss progression in patients with Ménière's disease. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*. 2012;33(2):223-9.
255. Ahmad T, Marshall SE, Mulcahy-Hawes K, Orchard T, Crawshaw J, Armuzzi A, et al. High resolution MIC genotyping: Design and application to the investigation of inflammatory bowel disease susceptibility. *Tissue Antigens*. 2002;60(2):164-79.
256. Tieng V, Bouguéneq C, du Merle L, Bertheau P, Desreumaux P, Janin A, et al. Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(5):2977-82.
257. Lü M, Xia B, Ge L, Li Y, Zhao J, Chen F, et al. Role of major histocompatibility complex class I-related molecules A*A5.1 allele in ulcerative colitis in Chinese patients. *Immunology*. 2009;128(1Suppl):e230-6.
258. Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, Katsuyama Y, Ishizuka K, Mochizuki T, et al. A close relationship of triplet repeat polymorphism in MHC class I chain-related gene A (MICA) to the disease susceptibility and behavior in ulcerative colitis. *Tissue Antigens*. 2001;57(1):9-14.
259. Glas J, Martin K, Brünnler G, Kopp R, Folwaczny C, Weiss EH, et al. MICA, MICB and C1_4_1 polymorphism in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Tissue Antigens*. 2001;58(4):243-9.
260. Fdez-Morera J, Rodrigo L, López-Vázquez A, Rodero SR, Martínez-Borra J, Niño P, et al. MHC class I chain-related gene A transmembrane polymorphism modulates the extension of ulcerative colitis. *Human Immunology*. 2003;64(8):816-22.
261. Kamoun A, Bouzid D, Mahfoudh N, Amouri A, Gaddour L, Hakim F, et al. Association study of MICA-TM polymorphism with inflammatory bowel disease in the South Tunisian population. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2013;17(8):615-9.
262. Allez M, Tieng V, Nakazawa A, Treton X, Pacault V, Dulphy N, et al. CD4+NKG2D+ T Cells in Crohn's Disease Mediate Inflammatory and Cytotoxic Responses Through MICA Interactions. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2346-58.
263. Elia P, Tolentino YM, Bernardazzi C, de Souza H. The Role of Innate Immunity Receptors in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Mediators of Inflammation*. 2015;2015:1-10.
264. Cario E. BACTERIAL INTERACTIONS WITH CELLS OF THE INTESTINAL MUCOSA: TOLL-LIKE RECEPTORS AND NOD2. *Gut*. 2005;54(8):1182-93.
265. Mo J, Boyle JP, Howard CB, Monie TP, Davis BK, Duncan JA. Pathogen Sensing by Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing Protein 2 (NOD2) Is Mediated by Direct

- Binding to Muramyl Dipeptide and ATP*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(27):23057-67.
266. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nature Immunology*. 2004;5(11):1166-74.
267. Hasegawa M, Yang K, Hashimoto M, Park J-HH, Kim Y-GG, Fujimoto Y, et al. Differential release and distribution of Nod1 and Nod2 immunostimulatory molecules among bacterial species and environments. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(39):29054-63.
268. Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor S, Bromfield A, Davies S, et al. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology*. 2003;125(1):47-57.
269. van Heel DA, Ghosh S, Butler M, Hunt KA, Lundberg AMC, Ahmad T, et al. Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *The Lancet*. 2005;365(9473):1794-6.
270. Noguchi E, Homma Y, Kang X, Netea MG, Ma X. A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of the nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1. *Nature Immunology*. 2009;10(5):471-9.
271. Lee K-H, Biswas A, Liu Y-J, Kobayashi KS. Proteasomal Degradation of Nod2 Protein Mediates Tolerance to Bacterial Cell Wall Components. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(47):39800-11.
272. Stevens C, Henderson P, Nimmo ER, Soares DC, Dogan B, Simpson KW, et al. The intermediate filament protein, vimentin, is a regulator of NOD2 activity. *Gut*. 2012;62(5):695-707.
273. Watanabe T, Asano N, Murray PJ, Ozato K, Taylor P, Fuss IJ, et al. Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis. *Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(2):545-59.
274. Li E, Hamm CM, Gulati AS, Sartor BR, Chen H, Wu X, et al. Inflammatory Bowel Diseases Phenotype, *C. difficile* and NOD2 Genotype Are Associated with Shifts in Human Ileum Associated Microbial Composition. *PLoS ONE*. 2012;7(6):e26284.
275. Liu M, Haenssler E, Uehara T, Losick VP, Park JT, Isberg RR. The *Legionella pneumophila* EnhC Protein Interferes with Immunostimulatory Muramyl Peptide Production to Evade Innate Immunity. *Cell Host & Microbe*. 2012;12(2):166-76.
276. Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, Huang N, Fowler EV, Radford-Smith GL. Reduced α -defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut*. 2008;57(7):903-10.
277. Yun J, Xu C-T, Pan B-R. Epidemiology and gene markers of ulcerative colitis in the Chinese. *World journal of gastroenterology*. 2009;15(7):788-803.
278. 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. *European Journal of Human Genetics*. 1999;7(5):567-73.
279. Andriulli A, Annese V, Latiano A, Palmieri O, Fortina P, Ardizzone S, et al. The frame-shift mutation of the NOD2/CARD15 gene is significantly increased in ulcerative colitis: an *IG-IBD study. *Gastroenterology*. 2004;126(2):625-7.
280. Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, et al. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World journal of gastroenterology*. 2005;11(5):681-5.
281. Tyler AD, Milgrom R, Stempak JM, Xu W, Brumell J, Muise AM, et al. The NOD2insC polymorphism is associated with worse outcome following ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis. *Gut*. 2012;62(10):1433-9.
282. Miceli-Richard C, Lesage S, Rybojad M, Prieur A-M, Manouvrier-Hanu S, Häfner R, et al. CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nature Genetics*. 2001;29(1):19-20.
283. Rivas MA, Beaudoin M, Gardet A, Stevens C, Sharma Y, Zhang CK, et al. Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. *Nature Genetics*. 2011;43(11):1066-73.
284. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJP, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *The Lancet*. 2001;357(9272):1925-8.
285. Brant SR, Picco MF, Achkar J-P, Bayless TM, Kane SV, Brzezinski A, et al. Defining complex contributions of NOD2/CARD15 gene mutations, age at onset, and tobacco use on Crohn's disease phenotypes. *Inflammatory bowel diseases*. 2003;9(5):281-9.

286. 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. *Annals of human genetics*. 2003;67(Pt 1):35-41.
287. 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. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2003;38(12):1235-40.
288. Arnott IDR, Nimmo ER, Drummond HE, Fennell J, Smith BRK, MacKinlay E, et al. NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes and Immunity*. 2004;5(5):417-25.
289. Esters N, Pierik M, van Steen K, Vermeire S, Claessens G, Joossens S, et al. Transmission of CARD15 (NOD2) variants within families of patients with inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology*. 2004;99(2):299-305.
290. Karban A, Waterman M, Panhuysen CI, Pollak R, Neshet S, Datta L, et al. NOD2/CARD15 Genotype and Phenotype Differences between Ashkenazi and Sephardic Jews with Crohn's Disease. *The American Journal of Gastroenterology*. 2004;99(6):1134-40.
291. Annese V, Lombardi G, Perri F, D'Incà 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. *The American Journal of Gastroenterology*. 2005;100(1):84-92.
292. Braat H, Stokkers P, Hommes T, Cohn D, Vogels E, Pronk I, et al. Consequence of functional Nod2 and Tlr4 mutations on gene transcription in Crohn's disease patients. *Journal of Molecular Medicine*. 2005;83(8):601-9.
293. Diego C, Alcántara M, Valle J, Pérez-Grueso M, Muñoz-Rosas C, Carroles J, et al. Frequency of CARD15 Polymorphisms in Patients with Crohn's Disease from Toledo, Spain: Genotype–Phenotype Correlation. *Genetic Testing*. 2006;10(3):178-85.
294. Gearry RB, Roberts RL, Burt MJ, Frampton C, Chapman BA, Collett JA, et al. Effect of inflammatory bowel disease classification changes on NOD2 genotype–phenotype associations in a population-based cohort. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2007;13(10):1220-7.
295. Henckaerts L, Pierik M, Joossens M, Ferrante M, Rutgeerts P, Vermeire S. Mutations in pattern recognition receptor genes modulate seroreactivity to microbial antigens in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2007;56(11):1536-42.
296. Rigoli L, Romano C, Caruso R, Presti MA, Bella C, Procopio V, et al. Clinical significance of NOD2/CARD15 and Toll-like receptor 4 gene single nucleotide polymorphisms in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*. 2008;14(28):4454-61.
297. Queiroz D, Oliveira A, Saraiva I, Rocha G, Rocha A, das Sanna M, et al. Immune response and gene polymorphism profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2009;15(3):353-8.
298. Gao M, Cao Q, Luo L-h, Wu M-l, Hu W-l, Si J-m. [NOD2/CARD15 gene polymorphisms and susceptibility to Crohn's disease in Chinese Han population]. *Zhonghua nei ke za zhi*. 2005;44(3):210-2.
299. Guo QS, Xia B, Jiang Y, Morrè SA, Cheng L, Li J, et al. Polymorphisms of CD14 gene and TLR4 gene are not associated with ulcerative colitis in Chinese patients. *Postgraduate Medical Journal*. 2005;81(958):526-9.
300. Li M, Gao X, Guo C-C, Wu K-C, Zhang X, Hu P-J. OCTN and CARD15 gene polymorphism in Chinese patients with inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*. 2008;14(31):4923-7.
301. Hama I, Ratbi I, Reggoug S, Elkerch F, Kharrasse G, Errabih I, et al. Non-association of Crohn's disease with NOD2 gene variants in Moroccan patients. *Gene*. 2012;499(1):121-3.
302. Chua K, Hilmi I, Ching CNG, Eng T, Palaniappan S, Lee W, et al. Identification of NOD2/CARD15 mutations in Malaysian patients with Crohn's disease. *Journal of Digestive Diseases*. 2009;10(2):124-30.
303. Long W-Y, Chen L, Zhang C-L, Nong R-M, Lin M-J, Zhan L-L, et al. Association between NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in Chinese Zhuang patients. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20(16):4737-44.
304. de Ridder L, Weersma RK, Dijkstra G, van der Steege G, Benninga MA, Nolte IM, et al. Genetic susceptibility has a more important role in pediatric-onset Crohn's disease than in adult-onset Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2007;13(9):1083-92.
305. Cleyne I, González JR, Figueroa C, Franke A, McGovern D, Bortlík M, et al. Genetic factors conferring an increased susceptibility to develop Crohn's disease also influence disease phenotype: results from the IBDchip European Project. *Gut*. 2012;62(11):1556-65.

306. Schnitzler F, Friedrich M, Wolf C, Angelberger M, Diegelmann J, Olszak T, et al. The NOD2 p.Leu1007fsX1008 Mutation (rs2066847) Is a Stronger Predictor of the Clinical Course of Crohn's Disease than the FOXO3A Intron Variant rs12212067. *PLoS ONE*. 2014;9(11):e108503.
307. Jeong E, Lee J. Intrinsic and Extrinsic Regulation of Innate Immune Receptors. *Yonsei Medical Journal*. 2011;52(3):379-92.
308. Takeda K, Kaisho T, Akira S. TOLL-LIKE RECEPTORS. *Annual review of immunology*. 2003;21(1):335-76.
309. Armant MA, Fenton MJ. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome biology*. 2002;3(8).
310. Wells JM, Rossi O, Meijerink M, van Baarlen P. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(Supplement 1):4607-14.
311. Tapping RI, Omueti KO, Johnson CM. Genetic polymorphisms within the human Toll-like receptor 2 subfamily. *Biochemical Society Transactions*. 2007;35(6):1445-8.
312. Xu Y, Tao X, Shen B, Horng T, Medzhitov R, Manley JL, et al. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature*. 2000;408(6808):111-5.
313. Bell JK, Mullen G, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, Segal DM. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends in Immunology*. 2003;24(10):528-33.
314. Song D, Lee JO. Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors. *Immunological Reviews*. 2012;250(1):216-29.
315. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4(7):499-511.
316. Ioannou S, Voulgarelis M. Toll-Like Receptors, Tissue Injury, and Tumorigenesis. *Mediators of Inflammation*. 2010;2010:1-9.
317. Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, et al. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science (New York, NY)*. 2004;303(5663):1522-6.
318. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009;388(4):621-5.
319. Jin M, Kim S, Heo J, Lee M, Kim H, Paik S-G, et al. Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide. *Cell*. 2007;130(6):1071-82.
320. Beutler B, Jiang Z, Georgel P, Crozat K, Croker B, Rutschmann S, et al. GENETIC ANALYSIS OF HOST RESISTANCE: Toll-Like Receptor Signaling and Immunity at Large. *Annual review of immunology*. 2006;24(1):353-89.
321. Ghosh TK, Mickelson DJ, Fink J, Solberg JC, Inglefield JR, Hook D, et al. Toll-like receptor (TLR) 2-9 agonists-induced cytokines and chemokines: I. Comparison with T cell receptor-induced responses. *Cellular immunology*. 2006;243(1):48-57.
322. Abbott DW, Yang Y, Hutti JE, Madhavarapu S, Kelliher MA, Cantley LC. Coordinated Regulation of Toll-Like Receptor and NOD2 Signaling by K63-Linked Polyubiquitin Chains. *Molecular and Cellular Biology*. 2007;27(17):6012-25.
323. Magalhaes J, Fritz JH, Bourhis L, Sellge G, Travassos LH, Selvanantham T, et al. Nod2-dependent Th2 polarization of antigen-specific immunity. *Journal of immunology*. 2008;181(11):7925-35.
324. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nature Immunology*. 2004;5(8):800-8.
325. Kim H, Zhao Q, Zheng H, Li X, Zhang T, Ma X. A novel crosstalk between TLR4- and NOD2-mediated signaling in the regulation of intestinal inflammation. *Scientific Reports*. 2015;5:12018.
326. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10(2):131-44.
327. Cario E, Podolsky DK. Differential Alteration in Intestinal Epithelial Cell Expression of Toll-Like Receptor 3 (TLR3) and TLR4 in Inflammatory Bowel Disease. *Infection and Immunity*. 2000;68(12):7010-7.
328. Misch AE, Hawn TR. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clinical Science*. 2008;114(5):347-60.
329. Shibolet O, Podolsky DK. TLRs in the Gut.IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2007;292(6):G1469-73.

330. Brand S, Staudinger T, Schnitzler F, Pfennig S, Hofbauer K, Dambacher J, et al. The Role of Toll-like Receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile Polymorphisms and CARD15/NOD2 Mutations in the Susceptibility and Phenotype of Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2005;11(7):645-52.
331. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. *Cell*. 2004;118(2):229-41.
332. Fukata M, Abreu MT. What are toll-like receptors and what role may they have in IBD? *Inflammatory Bowel Diseases*. 2008;14(S2):S90-2.
333. Brown M, Hughes KR, Moossavi S, Robins A, Mahida YR. Toll-like receptor expression in crypt epithelial cells, putative stem cells and intestinal myofibroblasts isolated from controls and patients with inflammatory bowel disease. *Clinical & Experimental Immunology*. 2014;178(1):28-39.
334. Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spöttl T, Andus T, et al. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2002;122(7):1987-2000.
335. Østvik AE, Granlund vAB, Torp SH, Flatberg A, Beisvåg V, Waldum HL, et al. Expression of Toll-like receptor-3 is enhanced in active inflammatory bowel disease and mediates the excessive release of lipocalin 2. *Clinical & Experimental Immunology*. 2013;173(3):502-11.
336. Steenholdt C, Andresen L, Pedersen G, Hansen A, Brynskov J. Expression and function of toll-like receptor 8 and Tollip in colonic epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2009;44(2):195-204.
337. Shen X, Shi R, Zhang H, Li K, Zhao Y, Zhang R. The Toll-Like Receptor 4 D299G and T399I Polymorphisms Are Associated with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: A Meta-Analysis. *Digestion*. 2010;81(2):69-77.
338. Senhaji N, Diakité B, Serbati N, Zaid Y, Badre W, Nadifi S. Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms: New data and a meta-analysis. *BMC Gastroenterology*. 2014;14(1):206.
339. Cheng Y, Zhu Y, Huang X, Zhang W, Han Z, Liu S. Association between TLR2 and TLR4 Gene Polymorphisms and the Susceptibility to Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. *PLOS ONE*. 2015;10(5):e0126803.
340. Ouburg S, Mallant-Hent R, Crusius JBA, van Bodegraven AA, Mulder CJJ, 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.
341. Hume GE, Fowler EV, Doecke J, Simms LA, Huang N, Palmieri O, et al. Novel NOD2 haplotype strengthens the association between TLR4 Asp299gly and Crohn's disease in an Australian population. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2008;14(5):585-90.
342. Oostenbrug LE, Drenth JPH, de Jong DJ, Nolte IM, Oosterom E, van Dullemen HM, et al. Association Between Toll-like Receptor 4 and Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2005;11(6):567-75.
343. Klein W, Tromm A, Griga T, Fricke H, Folwaczny C, Hocke M, et al. A polymorphism in the CD14 gene is associated with Crohn disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2002;37(2):189-91.
344. De Jager PL, Franchimont D, Waliszewska A, Bitton A, Cohen A, Langelier D, et al. The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes and immunity*. 2007;8(5):387-97.
345. Bank S, Andersen P, Burisch J, Pedersen N, Roug S, Galsgaard J, et al. Polymorphisms in the Inflammatory Pathway Genes TLR2, TLR4, TLR9, LY96, NFKBIA, NFKB1, TNFA, TNFRSF1A, IL6R, IL10, IL23R, PTPN22, and PPARG Are Associated with Susceptibility of Inflammatory Bowel Disease in a Danish Cohort. *PLoS ONE*. 2014;9(6):e98815.
346. Pierik M, Joossens S, Steen K, Schuerbeek N, Vlietinck R, Rutgeerts P, et al. Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2006;12(1):1-8.
347. Shang J, Wang X, Wang W, Pan H, Liu S, Li L, et al. Association between Toll-Like Receptor 9-1237T/C Polymorphism and the Susceptibility of Inflammatory Bowel Diseases: A Meta-Analysis. *Yonsei Medical Journal*. 2016;57(1):153-64.
348. Abad C, González-Escribano MF, Diaz-Gallo LM, Lucena-Soto JM, Márquez JL, Leo E, et al. Association of Toll-like receptor 10 and susceptibility to Crohn's disease independent of NOD2. *Genes and Immunity*. 2011;12(8):635-42.

349. Morgan AR, Lam W-J, Han D-Y, Fraser AG, Ferguson LR. Genetic variation within TLR10 is associated with Crohn's disease in a New Zealand population. *Human Immunology*. 2012;73(4):416-20.
350. Sheridan J, Mack DR, Amre DK, Israel DM, Cherkasov A, Li H, et al. A Non-Synonymous Coding Variant (L616F) in the TLR5 Gene Is Potentially Associated with Crohn's Disease and Influences Responses to Bacterial Flagellin. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e61326.
351. Gewirtz AT, Vijay-Kumar M, Brant SR, Duerr RH, Nicolae DL, Cho JH. Dominant-negative TLR5 polymorphism reduces adaptive immune response to flagellin and negatively associates with Crohn's disease. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2006;290(6):G1157-63.
352. Saruta M, Targan SR, Mei L, Ippoliti AF, Taylor KD, Rotter JI. High-frequency Haplotypes in the X Chromosome Locus TLR8 Are Associated With Both CD and UC in Females. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2009;15(3):321-7.
353. Ortiz-Fernández L, García-Lozano J-RR, Montes-Cano M-AA, Conde-Jaldón M, Leo E, Ortego-Centeno N, et al. Association of haplotypes of the TLR8 locus with susceptibility to Crohn's and Behçet's diseases. *Clinical and experimental rheumatology*. 2015;33(6 Suppl 94):S117-22.
354. Lennard-Jones JE. Classification of Inflammatory Bowel Disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1989;24(sup170):2-6.
355. Lewis CM. Genetic association studies: design, analysis and interpretation. *Briefings in bioinformatics*. 2002;3(2):146-53.
356. Campbell NA, Reece JB. *Biología*. 7 ed. Madrid: Médica Panamericana; 2007 2007.
357. Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR. A Note on Exact Tests of Hardy-Weinberg Equilibrium. *The American Journal of Human Genetics*. 2005;76(5):887-93.
358. Hosking L, Lumsden S, Lewis K, Yeo A, McCarthy L, Bansal A, et al. Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. *European Journal of Human Genetics*. 2004;12(5):395-9.
359. Salanti G, Amountza G, Ntzani EE, Ioannidis JPA. Hardy-Weinberg equilibrium in genetic association studies: an empirical evaluation of reporting, deviations, and power. *European Journal of Human Genetics*. 2005;13(7):840-8.
360. Montana G. Statistical methods in genetics. *Briefings in Bioinformatics*. 2006;7(3):297-308.
361. Lewontin RC. The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. *Genetics*. 1964;49(1):49-67.
362. Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Molecular biology and evolution*. 1995;12(5):921-7.
363. Slatkin M, Excoffier L. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. *Heredity*. 1996;76 (Pt 4):377-83.
364. Excoffier L, Laval G, Balding D. Gametic phase estimation over large genomic regions using an adaptive window approach. *Human Genomics*. 2003;1(1):7-19.
365. Perneger TV. What's wrong with Bonferroni adjustments. *BMJ (Clinical research ed)*. 1998;316(7139):1236-8.
366. Bland JM, Altman DG. Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ (Clinical research ed)*. 1995;310(6973):170.
367. Yang S-KK, Hong M, Zhao W, Jung Y, Tayebi N, Ye BD, et al. Genome-wide association study of ulcerative colitis in Koreans suggests extensive overlapping of genetic susceptibility with Caucasians. *Inflammatory bowel diseases*. 2013;19(5):954-66.
368. Juyal G, Negi S, Sood A, Gupta A, Prasad P, Senapati S, et al. Genome-wide association scan in north Indians reveals three novel HLA-independent risk loci for ulcerative colitis. *Gut*. 2014;64(4):571-9.
369. Silverberg, Daly MJ, Moskovitz DN, Rioux JD, McLeod RS, Cohen Z, et al. Diagnostic misclassification reduces the ability to detect linkage in inflammatory bowel disease genetic studies. *Gut*. 2001;49(6):773-6.
370. Saro Gismera C, Lacort Fernández M, Argüelles Fernández G, Antón Magarzo J, Navascues CA, Garcia López R, et al. [Epidemiology of chronic inflammatory bowel disease in Gijón, Asturias]. *Gastroenterología y hepatología*. 2001;24(5):228-35.
371. Garrido A, Martínez MJ, Ortega JA, Lobato A, Rodríguez MJ, Guerrero FJ. Epidemiology of chronic inflammatory bowel disease in the Northern area of Huelva. *Revista española de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva*. 2004;96(10):687-91.

372. Devlin HB, Datta D, Dellipiani AW. The incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in North Tees Health District. *World Journal of surgery*. 1980;4:183-93.
373. Bernstein CN, Nabalamba A. Hospitalization, surgery, and readmission rates of IBD in Canada: a population-based study. *American Journal of Gastroenterology*. 2006;101(1):110-8.
374. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1785-94.
375. Jussila A, Virta LJ, Kautiainen H, Rekiaro M, Nieminen U, Färkkilä MA. Increasing incidence of inflammatory bowel diseases between 2000 and 2007: a nationwide register study in Finland. *Inflammatory bowel diseases*. 2012;18(3):555-61.
376. Gismera SC, Menéndez RS, Crespo MA, Fernández SR, Fernández LM, Fernández AG, et al. Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Asturias (Spain). *Anales de Medicina Interna*. 2003;20(1):9-17.
377. Auvin S, Molinié F, Gower-Rousseau C, Brazier F, Merle V, Grandbastien B, et al. Incidence, clinical presentation and location at diagnosis of pediatric inflammatory bowel disease: a prospective population-based study in northern France (1988-1999). *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2005;41(1):49-55.
378. Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, Binder V. Disease Activity Courses in a Regional Cohort of Crohn's Disease Patients. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1995;30(7):699-706.
379. Kanaan Z, Ahmad S, Bilchuk N, Vahrenhold C, Pan J, Galandiuk S. Perianal Crohn's Disease: Predictive Factors and Genotype-Phenotype Correlations. *Digestive Surgery*. 2012;29(2):107-14.
380. Veloso FT, Carvalho J, Magro F. Immune-related systemic manifestations of inflammatory bowel disease. A prospective study of 792 patients. *Journal of clinical gastroenterology*. 1996;23(1):29-34.
381. Vavricka SR, Brun L, Ballabeni P, Pittet V. Frequency and risk factors for extraintestinal manifestations in the Swiss inflammatory bowel disease cohort. *American Journal of Gastroenterology*. 2011;106(1):110-9.
382. Westendorf AM, Fleissner D, Hansen W, Buer J. T cells, dendritic cells and epithelial cells in intestinal homeostasis. *International Journal of Medical Microbiology*. 2010;300(1):11-8.
383. Ahmad T, Marshall S-E, Jewell D. Genetics of inflammatory bowel disease: The role of the HLA complex. *World Journal of Gastroenterology*. 2006;12(23):3628-35.
384. Orchard TR, Chua CN, Ahmad T, Cheng H, Welsh KI, Jewell DP. Uveitis and erythema nodosum in inflammatory bowel disease: Clinical features and the role of HLA genes. *Gastroenterology*. 2002;123(3):714-8.
385. Asakura H, Tsuchiya M, Aiso S, Watanabe M, Kobayashi K, Hibi T, et al. Association of the human lymphocyte-DR2 antigen with Japanese ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1982;82(3):413-8.
386. Kobayashi K, Atoh M, Konoeda Y, Yagita A, Inoko H, Sekiguchi S. HLA-DR, DQ and T cell antigen receptor constant beta genes in Japanese patients with ulcerative colitis. *Clinical and experimental immunology*. 1990;80(3):400-3.
387. Okada Y, Yamazaki K, Umeno J, Takahashi A, Kumasaka N, Ashikawa K, et al. HLA-Cw*1202-B*5201-DRB1*1502 Haplotype Increases Risk for Ulcerative Colitis but Reduces Risk for Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 2011;141(3):864-71.
388. Asakura H. HLA-Cw*1202-B*5201-DRB1*1502 Haplotype Increases Risk for Ulcerative Colitis but Reduces Risk for Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 2012;142(3):e27-8.
389. Sugimura K, Asakura H, Mizuki N, Inoue M, Hibi T, Yagita A, et al. Analysis of genes within the HLA region affecting susceptibility to ulcerative colitis. *Human Immunology*. 1993;36(2):112-8.
390. Aizawa H, Kinouchi Y, Negoro K, Nomura E, Imai G, Takahashi S, et al. HLA-B is the best candidate of susceptibility genes in HLA for Japanese ulcerative colitis. *Tissue Antigens*. 2009;73(6):569-74.
391. Arimura Y, Isshiki H, Onodera K, Nagaishi K, Yamashita K, Sonoda T, et al. Characteristics of Japanese inflammatory bowel disease susceptibility loci. *Journal of Gastroenterology*. 2014;49(8):1217-30.
392. Caruso C, Palmeri P, Oliva L, Orlando A, Cottone M. HLA antigens in ulcerative colitis: a study in the Sicilian population. *Tissue antigens*. 1985;25(1):47-9.
393. Concha E, Feandez-Arquero M, Santa-Cruz S, Lopez-Nava G, Figueredo MA, Diaz-Rubio M, et al. Positive and negative associations of distinct HLA-DR2 subtypes with ulcerative colitis (UC). *Clinical & Experimental Immunology*. 1997;108(3):392-5.

394. Annese V, Piepoli A, Latiano A, Lombardi G, Napolitano G, Caruso N, et al. HLA-DRB1 Alleles May Influence Disease Phenotype in Patients With Inflammatory Bowel Disease: A Critical Reappraisal With Review of the Literature. *Diseases of the Colon & Rectum*. 2005;48(1):57-65.
395. Kinouchi Y, Matsumoto K, Negoro K, Takagi S, Takahashi S, Hiwatashi N, et al. Hla-B genotype in Japanese patients with Crohn's disease. *Diseases of the colon and rectum*. 2003;46(10 Suppl):S10-4.
396. Doganay L, Katrinli S, Colak Y, Senates E, Zemheri E, Ozturk O, et al. HLA DQB1 alleles are related with nonalcoholic fatty liver disease. *Molecular biology reports*. 2014;41(12):7937-43.
397. Celikbilek M, Selçuk H, Yilmaz U. A new risk factor for the development of non-alcoholic fatty liver disease: HLA complex genes. *The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turkish Society of Gastroenterology*. 2011;22(4):395-9.
398. Boukouaci W, Busson M, de Latour R, Rocha V, Suberbielle C, Bengoufa D, et al. MICA-129 genotype, soluble MICA, and anti-MICA antibodies as biomarkers of chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2009;114(25):5216-24.
399. Zhao J, Jiang Y, Lei Y, Zou K, Wang C, Huang S, et al. Functional MICA-129 polymorphism and serum levels of soluble MICA are correlated with ulcerative colitis in Chinese patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2011;26(3):593-8.
400. Douik H, Chaaben A, Romdhane N, Romdhane H, Mamoghli T, Fortier C, et al. Association of MICA-129 polymorphism with nasopharyngeal cancer risk in a Tunisian population. *Human Immunology*. 2009;70(1):45-8.
401. Kopp R, Glas J, Lau-Werner U, Albert ED, Weiss EH. Association of MICA-TM and MICB C1_2_A Microsatellite Polymorphisms with Tumor Progression in Patients with Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Immunology*. 2009;29(4):545-54.
402. Bolognesi E, D'Alfonso S, Rolando V, Fasano ME, Praticò L, Momigliano-Richiardi P. MICA and MICB microsatellite alleles in HLA extended haplotypes. *European Journal of Immunogenetics*. 2001;28(5):523-30.
403. Mizuki N, Ota M, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsuyama Y, et al. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: A strong association of six GCT repetitions with Behçet disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(4):1298-303.
404. Chen D, Gyllensten U. MICA polymorphism: biology and importance in cancer. *Carcinogenesis*. 2014;35(12):2633-42.
405. Valés-Gómez M. The Impact of Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol Anchored MICA Alleles on Novel NKG2D-Based Therapies. *Frontiers in Immunology*. 2015;6.
406. Matsuoka K, Kanai T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Seminars in Immunopathology*. 2015;37(1):47-55.
407. Pugazhendhi S, Santhanam S, Venkataraman J, Creveaux I, Ramakrishna BS. NOD2 gene mutations associate weakly with ulcerative colitis but not with Crohn's disease in Indian patients with inflammatory bowel disease. *Gene*. 2013;512(2):309-13.
408. Lesage S, Zouali H, Cézard J-P, Colombel J-F, Belaiche J, Almer S, et al. CARD15/NOD2 Mutational Analysis and Genotype-Phenotype Correlation in 612 Patients with Inflammatory Bowel Disease. *The American Journal of Human Genetics*. 2007;70(4):845-57.
409. Jung C, Colombel J-F, Lemann M, Beaugerie L, Allez M, Cosnes J, et al. Genotype/Phenotype Analyses for 53 Crohn's Disease Associated Genetic Polymorphisms. *PLoS ONE*. 2012;7(12):e52223.
410. Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tanabe T, et al. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology*. 2003;124(1):140-6.
411. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Solberg C, Croucher PJP, Mascheretti S, et al. Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *The Lancet*. 2002;359(9318):1661-5.
412. Radford-Smith G, Pandeya N. Associations between NOD2/CARD15 genotype and phenotype in Crohn's disease-Are we there yet? *World journal of gastroenterology*. 2006;12(44):7097-103.
413. Seiderer J, Schnitzler F, Brand S, Staudinger T, Pfennig S, Herrmann K, et al. Homozygosity for the CARD15 frameshift mutation 1007fs is predictive of early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2006;41(12):1421-32.

414. Abreu MT, Taylor KD, Lin Y-C, 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.
415. Louis E, Michel V, Hugot JP, Reenaers C, Fontaine F, Delforge M, et al. Early development of stricturing or penetrating pattern in Crohn's disease is influenced by disease location, number of flares, and smoking but not by NOD2/CARD15 genotype. *Gut*. 2003;52(4):552-7.
416. Baptista M, Amarante H, Picheth G, Sdepanian V, Peterson N, Babasukumar U, et al. CARD15 and IL23R influences Crohn's disease susceptibility but not disease phenotype in a Brazilian population. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2008;14(5):674-9.
417. Linskens RK, Mallant-Hent RC, Murillo LS, von Blomberg BME, Alizadeh BZ, Peña AS. Genetic and serological markers to identify phenotypic subgroups in a Dutch Crohn's disease population. *Digestive and Liver Disease*. 2004;36(1):29-34.
418. Cleynen I, Boucher G, Jostins L, Schumm LP, Zeissig S, Ahmad T, et al. Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *The Lancet*. 2016;387(10014):156-67.
419. Mowat A. Does TLR2 regulate intestinal inflammation? *European Journal of Immunology*. 2010;40(2):318-20.
420. Smirnova I, Mann N, Dols A, Derkx HH, Hibberd ML, Levin M, et al. Assay of locus-specific genetic load implicates rare Toll-like receptor 4 mutations in meningococcal susceptibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(10):6075-80.
421. Schröder NWJ, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *The Lancet Infectious Diseases*. 2005;5(3):156-64.
422. Skevaki C, Pararas M, Kostelidou K, Tsakris A, Routsias JG. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious diseases. *Clinical & Experimental Immunology*. 2015;180(2):165-77.
423. Boulard O, Asquith MJ, Powrie F, Maloy KJ. TLR2-independent induction and regulation of chronic intestinal inflammation. *European Journal of Immunology*. 2010;40(2):516-24.
424. Kim E, Chung W, Lee K-M, Paik C, Jung S, Lee B, et al. Association Between Toll-Like Receptors/CD14 Gene Polymorphisms and Inflammatory Bowel Disease in Korean Population. *Journal of Korean Medical Science*. 2012;27(1):72-7.
425. Sipos F, Fúri I, Constantinovits M, Tulassay Z, Múzes G. Contribution of TLR signaling to the pathogenesis of colitis-associated cancer in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20(36):12713-21.
426. Plantinga TS, Johnson MD, Scott WK, van de Vosse E, Edwards DR, Smith BP, et al. Toll-like Receptor 1 Polymorphisms Increase Susceptibility to Candidemia. *Journal of Infectious Diseases*. 2012;205(6):934-43.
427. Zheng B, Morgan ME, van de Kant HJ, Garssen J, Folkerts G, Kraneveld AD. Transcriptional modulation of pattern recognition receptors in acute colitis in mice. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1832(12):2162-72.
428. Depaolo RW, Tang F, Kim I, Han M, Levin N, Ciletti N, et al. Toll-like receptor 6 drives differentiation of tolerogenic dendritic cells and contributes to LcrV-mediated plague pathogenesis. *Cell host & microbe*. 2008;4(4):350-61.
429. Morgan ME, Koelink PJ, Zheng B, den Brok M, van de Kant HJG, Verspaget HW, et al. Toll-like receptor 6 stimulation promotes T-helper 1 and 17 responses in gastrointestinal-associated lymphoid tissue and modulates murine experimental colitis. *Mucosal Immunology*. 2014;7(5):1266-77.
430. Oosting M, Cheng S-C, Bolscher JM, Vestering-Stenger R, Plantinga TS, Verschuere IC, et al. Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(42):E4478-84.
431. Liu L, Botos I, Wang Y, Leonard JN, Shiloach J, Segal DM, et al. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science (New York, NY)*. 2008;320(5874):379-81.
432. Bell JK, Botos I, Hall PR, Askins J, Shiloach J, Segal DM, et al. The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(31):10976-80.
433. Dhiman N, Ovsyannikova IG, Vierkant RA, Ryan JE, Pankratz VS, Jacobson RM, et al. Associations between SNPs in toll-like receptors and related intracellular signaling molecules and immune responses to measles vaccine: preliminary results. *Vaccine*. 2008;26(14):1731-6.

434. Allensworth JJ, Planck SR, Rosenbaum JT, Rosenzweig HL. Investigation of the differential potentials of TLR agonists to elicit uveitis in mice. *Journal of leukocyte biology*. 2011;90(6):1159-66.
435. Ma L, Tang FY, Chu WK, Young AL, Brelen ME, Pang CP, et al. Association of toll-like receptor 3 polymorphism rs3775291 with age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*. 2016;6:19718.
436. Lee MT, Hooper LC, Kump L, Hayashi K, Nussenblatt R, Hooks JJ, et al. Interferon- γ and adhesion molecules (E-selectin and s-intracellular adhesion molecule-1) are detected in sera from patients with retinal vasculitis and are induced in retinal vascular endothelial cells by Toll-like receptor 3 signalling. *Clinical and Experimental Immunology*. 2006;147(1):71-80.
437. Ren X, Zhou H, Li B, Su S. Toll-like receptor 3 ligand polyinosinic:polycytidylic acid enhances autoimmune disease in a retinal autoimmunity model. *International Immunopharmacology*. 2011;11(6):769-73.
438. Wei J, Jiang H, Gao H, Wang G. Activation of toll like receptor-3 induces corneal epithelial barrier dysfunction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015;461(3):555-9.
439. Gorbea C, Makar KA, Pauschinger M, Pratt G, Bersola JL, Varela J, et al. A role for Toll-like receptor 3 variants in host susceptibility to enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(30):23208-23.
440. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nature Genetics*. 2000;25(2):187-91.
441. Török H-P, Glas J, Tonenchi L, Mussack T, Folwaczny C. Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clinical Immunology*. 2004;112(1):85-91.
442. Braat H, Dijkgraaf M, Curvers W, Vogels E, Bodegraven VA, Stokkers P, et al. A functional single nucleotide polymorphism of the Tlr4 gene is correlated with Crohn's disease but not with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2003;124(4):A367-8.
443. Franchimont D, Vermeire S, Housni EH, Pierik M, Steen VK, 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.
444. Sivaram G, Tiwari SK, Bardia A, Anjum F, Vishnupriya S, Habeeb A, et al. Macrophage migration inhibitory factor, Toll-like receptor 4, and CD14 polymorphisms with altered expression levels in patients with ulcerative colitis. *Human Immunology*. 2012;73(2):201-5.
445. Meena NK, Verma R, Verma N, Ahuja V, Paul J. TLR4 D299G Polymorphism Modulates Cytokine Expression in Ulcerative Colitis. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2013;47(9):773-80.
446. Baumgart DC, Büning C, Geerdts L, Schmidt HH, Genschel J, Fiedler T, et al. The c.1-260C>T Promoter Variant of CD14 but Not the c.896A>G (p.D299G) Variant of Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Genes Is Associated with Inflammatory Bowel Disease. *Digestion*. 2007;76(3-4):196-202.
447. Browning BL, Huebner C, Petermann I, Gearry RB, Barclay ML, Shelling AN, et al. Has Toll-Like Receptor 4 Been Prematurely Dismissed as an Inflammatory Bowel Disease Gene? Association Study Combined With Meta-Analysis Shows Strong Evidence for Association. *The American Journal of Gastroenterology*. 2007;102(11):2504-12.
448. Hong J, Leung E, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Krissansen GW. TLR2, TLR4 and TLR9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2007;22(11):1760-6.
449. Riis L, Vind I, Vermeire S, Wolters F, Katsanos K, Politi P, et al. The prevalence of genetic and serologic markers in an unselected European population-based cohort of IBD patients. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2007;13(1):24-32.
450. Ohto U, Yamakawa N, Akashi-Takamura S, Miyake K, Shimizu T. Structural Analyses of Human Toll-like Receptor 4 Polymorphisms D299G and T399I. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(48):40611-7.
451. Netea MG, Wijmenga C, O'Neill LAJ. Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. *Nature Immunology*. 2012;13(6):535-42.
452. Erridge C, Stewart J, Poxton IR. Monocytes Heterozygous for the Asp299Gly and Thr399Ile Mutations in the Toll-like Receptor 4 Gene Show No Deficit in Lipopolysaccharide Signalling. *The Journal of Experimental Medicine*. 2003;197(12):1787-91.
453. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu M-Y, Huffel C, Du X, et al. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science*. 1998;282(5396):2085-8.
454. Guagnozzi D, Pagnini C, Fave G, Corleto V. CARD15 and Toll-like receptor 4 mutations in Italian patients with inflammatory bowel disease. *Digestive and Liver Disease*. 2012;44(9):800-1.

455. Lakatos P, Lakatos L, Szalay F, Willheim-Polli C, Osterreicher C, Tulassay Z, et al. Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World journal of gastroenterology*. 2005;11(10):1489-95.
456. Leifer CA, McConkey C, Li S, Chassaing B, Gewirtz AT, Ley RE. Linking genetic variation in human Toll-like receptor 5 genes to the gut microbiome's potential to cause inflammation. *Immunology Letters*. 2014;162(2):3-9.
457. Klimosch SN, Försti A, Eckert J, Knezevic J, Bevier M, von Schönfels W, et al. Functional TLR5 genetic variants affect human colorectal cancer survival. *Cancer research*. 2013;73(24):7232-42.
458. Bank S, Andersen P, Burisch J, Pedersen N, Roug S, Galsgaard J, et al. Polymorphisms in the Toll-Like Receptor and the IL-23/IL-17 Pathways Were Associated with Susceptibility to Inflammatory Bowel Disease in a Danish Cohort. *PLOS ONE*. 2015;10(12):e0145302.
459. Meena N, Ahuja V, Meena K, Paul J. Association of TLR5 Gene Polymorphisms in Ulcerative Colitis Patients of North India and Their Role in Cytokine Homeostasis. *PLOS ONE*. 2015;10(3):e0120697.
460. Yoo E, Salunke DB, Sil D, Guo X, Salyer ACD, Hermanson AR, et al. Determinants of Activity at Human Toll-like Receptors 7 and 8: Quantitative Structure–Activity Relationship (QSAR) of Diverse Heterocyclic Scaffolds. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2014;57(19):7955-70.
461. Dubois PC, Trynka G, Franke L, Hunt KA, Romanos J, Curtotti A, et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nature genetics*. 2010;42(4):295-302.
462. Enevold C, Nielsen CH, Jacobsen RS, Hermansen MLF, Molbo D, Avlund K, et al. Single nucleotide polymorphisms in genes encoding toll-like receptors 7, 8 and 9 in Danish patients with systemic lupus erythematosus. *Molecular Biology Reports*. 2014;41(9):5755-63.
463. Vermeire S, Rutgeerts P, Van Steen K, Joossens S, Claessens G, Pierik M, et al. Genome wide scan in a Flemish inflammatory bowel disease population: support for the IBD4 locus, population heterogeneity, and epistasis. *Gut*. 2004;53(7):980-6.
464. Lleo A, Moroni L, Caliarì L, Invernizzi P. Autoimmunity and Turner's syndrome. *Autoimmunity Reviews*. 2012;11(6-7):A538-43.
465. Sainathan SK, Bishnupuri KS, Aden K, Luo Q, Houchen CW, Anant S, et al. Toll-like receptor-7 ligand imiquimod induces type I interferon and antimicrobial peptides to ameliorate dextran sodium sulfate-induced acute colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2012;18(5):955-67.
466. Hegde RS, Bernstein HD. The surprising complexity of signal sequences. *Trends in biochemical sciences*. 2006;31(10):563-71.
467. Oh DYY, Taube S, Hamouda O, Kücherer C, Poggensee G, Jessen H, et al. A functional toll-like receptor 8 variant is associated with HIV disease restriction. *The Journal of infectious diseases*. 2008;198(5):701-9.
468. Clifford HD, Yerkovich ST, Khoo S-K, Zhang G, Upham J, Souëf PN, et al. Toll-like receptor 7 and 8 polymorphisms: associations with functional effects and cellular and antibody responses to measles virus and vaccine. *Immunogenetics*. 2012;64(3):219-28.
469. Berghöfer B, Frommer T, Haley G, Fink L, Bein G, Hackstein H. TLR7 ligands induce higher IFN-alpha production in females. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;177(4):2088-96.
470. Pastorelli L, Dozio E, Pisani L, Boscolo-Anzoletti M, Vianello E, Munizio N, et al. Procoagulatory State in Inflammatory Bowel Diseases Is Promoted by Impaired Intestinal Barrier Function. *Gastroenterology Research and Practice*. 2015;2015:1-10.
471. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000;408(6813):740-5.
472. Obermeier F, Strauch UG, Dunger N, Grunwald N, Rath HC, Herfarth H, et al. In vivo CpG DNA/toll-like receptor 9 interaction induces regulatory properties in CD4+CD62L+ T cells which prevent intestinal inflammation in the SCID transfer model of colitis. *Gut*. 2005;54(10):1428-36.
473. Lee J, Rachmilewitz D, Raz E. Homeostatic Effects of TLR9 Signaling in Experimental Colitis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1072(1):351-5.
474. Hofmann C, Dunger N, Doser K, Lippert E, Siller S, Edinger M, et al. Physiologic TLR9-CpG-DNA Interaction Is Essential for the Homeostasis of the Intestinal Immune System. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2014;20(1):136-43.
475. Obermeier F, Dunger N, Strauch UG, Hofmann C, Bleich A, Grunwald N, et al. CpG motifs of bacterial DNA essentially contribute to the perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2005;129(3):913-27.

476. Lee J, Mo J-HH, Katakura K, Alkalay I, Rucker AN, Liu Y-TT, et al. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nature cell biology*. 2006;8(12):1327-36.
477. William A, II, Sakamoto K, Leifer C. TLR9 is important for protection against intestinal damage and for intestinal repair. *Scientific Reports*. 2012;2:574.
478. Shang J, Wang X, Wang W, Pan H, Liu S, Li L, et al. Association between Toll-Like Receptor 9-1237T/C Polymorphism and the Susceptibility of Inflammatory Bowel Diseases: A Meta-Analysis. *Yonsei Medical Journal*. 2015;57(1):153-64.
479. Török HP, Glas J, Endres I, Tonenchi L, Teshome MY, Wetzke M, et al. Epistasis between Toll-like receptor-9 polymorphisms and variants in NOD2 and IL23R modulates susceptibility to Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology*. 2009;104(7):1723-33.
480. Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA, Vercelli D, Palmer LJ, Kwiatkowski DJ, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics*. 2003;81(1):85-91.
481. Fuse K, Katakura K, Sakamoto N, Ohira H. Toll-like receptor 9 gene mutations and polymorphisms in Japanese ulcerative colitis patients. *World Journal of Gastroenterology*. 2010;16(46):5815-21.
482. Valverde-Villegas JM, dos Santos BP, Machado, Jobim M, Jobim LF, Flores C, et al. G2848A and T-1237C polymorphisms of the TLR9 gene and susceptibility to inflammatory bowel disease in patients from southern Brazil. *Tissue Antigens*. 2014;83(3):190-2.
483. Piotrowski P, Lianeri M, Wudarski M, Olesińska M, Jagodziński PP. Contribution of toll-like receptor 9 gene single-nucleotide polymorphism to systemic lupus erythematosus. *Rheumatology International*. 2013;33(5):1121-5.

8 ANEXO

8.1 GENES ASOCIADOS CON ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Tabla suplementaria 1. Genes candidatos más relevantes situados en *loci* de susceptibilidad a padecer enfermedad inflamatoria intestinal

Genes que confieren susceptibilidad a enfermedad inflamatoria intestinal	<i>TNFRSF18, TNFRSF4, TNFRSF9, IL23R, IL12RB2, RORC, UBQLN4, RIT1, MSTO1, CD48, SLAMF1, ITLN1, CD244, F11R, USF1, FCGR2A, FCGR2B, FCGR3A, FCGR3B, HSPA6, FCGR2A, C1orf53, IL24, PIGR, IL20, IL19, MAPKAPK2, IL10, FAIM3, ADCY3, FOSL2, BRE, REL, FOSL1, REL, C2orf74, KIAA1841, AHS2, SPRED2, IL18RAP, IL1R2, IL18R1, IL1R1, IL1RL1, IL1RL2, IFIH1, STAT1, STAT4, SLC11A1, CXCR1, CXCR2, PNKD, ARPC2, SLC11A1, TM6IM1, GPR35, MST1R, UCN2, GPX1, PFKFB4, IP6K2, BSN, MST1, IP6K1, USP4, IL8, CXCL1, PHACTR2, CCR6, RPS6KA2, ZPBP, SMURF1, EPO, TRIB1, JAK2, NFIL3, TNFSF8, TNFSF15, CARD9, PMPCA, SDCCAG3, INPP5E, IL2RA, IL15RA, MAP3K8, CREM, CISD1, IPMK, TSPAN14, C10orf58, NKX2-3, LSP1, TNNT2, CNTF, CD6, CD5, PTGDR2, RPS6KA4, TRPT1, CCDC88B, FLRT1, REL, FOSL1, CTSW, SNX32, CXCR5, LOH12CR1, MUC19, IFNG, IL26, IL22, IFNG, GPR183, ZFP36L1, FOS, MLH3, GALC, GPR65, SMAD3, CRT3, LITAF, SOCS1, RMI2, PRKCB, RABEP2, IL27, EIF3C, SULT1A1, SULT1A2, NUPR1, IRF8, CCL13, CCL11, CCL2, IKZF3, ZPBP2, GSDMB, ORMDL3, GSDMA, STAT5B, STAT3, STAT5A, TUBD1, RPS6KB1, SMAD7CXCL6, CXCL3, PF4, CXCL5, CXCL2, PF4AV1, IL2, IL21, DAP, PTGER4, ERAP2, ERAP1, LNPEP, IL13, CSF2, IRF1, IL4, IL5, IL3, SLC22A4, PDLIM4, SLC22A5, SPRY4, NDFIP1, TNIP1, IRGM, ZNF300P1, IL12B, DOK3, TRAF3IP2, FYN, REV3L, TNFAIP3, CD226, TYK2, PPAN-P2RY11, ICAM1, CEBPG, NLRP7, NLRP2, KIR2DL1, DNMT3B, MMP9, CD40, CEBPB, ZNF831, TNFRSF6B, LIME1, SLC2A4RG, ZGPAT, ICOSLG, MAPK1, YDJC, UBE2L3, RIMBP3, CCDC116, LIF, OSM, MTMR3, ATF4, TAB1</i>
Genes que confieren susceptibilidad a enfermedad de Crohn	<i>PTPN22, ADAM30, TNFSF18, FASLG, UCN, SP140, ATG16L1, TXK, TEC, SLC10A4, IL31RA, IL6ST, CPEB4m HLA-C, PSORS1C1, CREB5, JAZF1, RIPK2, LACC1, SPRED1, RASGRP1, NOD2, LGALS9, NOS2, GPx4, DBP, SPHK2, IZUMO1, FUT2, IFNGR2, IFNAR2, IL10RB, IFNAR1, GART, TMEM50B</i>
Genes que confieren susceptibilidad a colitis ulcerosa	<i>TNFRSF14, MMEL1, RFTN2, PLC1, PRKCD, ITIH4, NFKB1, MANBA, SLC9A3, HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, CARD11, GNA12, DLD, IRF5, TNPO3, JRKL, MAML2, FAM55A, FAM55D, ITPKA, NDUFAF1, ITGAL, ZFP90, CALM3, PROCR, UQCC, CEP250, ADA, HNF4A</i>

Tabla obtenida de la revisión de Limbergen *et al*, 2014 (90), basada en los resultados de Jostins *et al* en el estudio de 2012 (123).

8.2 TIPAJE HLA Y MICA

8.2.1 Tipaje HLA-A

Tabla suplementaria 2. Comparación de frecuencias alélicas de HLA-A entre pacientes con Colitis Ulcerosa (CU) y Enfermedad de Crohn (EC) y población control

Alelo	Control n (%)	CU n (%)	CU vs. Control <i>P</i> _c	EC n (%)	EC vs. Control <i>P</i> _c
A*01:01	127 (10,0)	62 (9,1)	NS	72 (9,8)	NS
A*02:01	312 (24,5)	172 (25,4)	NS	153 (20,8)	NS
A*02:05	14 (1,1)	11 (1,6)	NS	10 (1,4)	NS
A*03:01	121 (9,5)	67 (9,9)	NS	76 (10,4)	NS
A*11:01	94 (7,4)	34 (5,0)	NS	42 (5,7)	NS
A*23:01	41 (3,2)	19 (2,8)	NS	29 (4,0)	NS
A*24:02	135 (10,6)	61 (9,0)	NS	59 (8,0)	NS
A*25:01	22 (1,7)	11 (1,6)	NS	13 (1,8)	NS
A*26:01	45 (3,5)	34 (5,0)	NS	29 (4,0)	NS
A*29:01	28 (2,2)	4 (0,6)	NS	1 (0,1)	0,003 ^a
A*29:02	73 (5,7)	47 (6,9)	NS	70 (9,5)	0,016 ^b
A*30:01	32 (2,5)	20 (2,9)	NS	20 (2,7)	NS
A*30:02	42 (3,3)	9 (2,8)	NS	30 (4,1)	NS
A*31:01	25 (2,0)	13 (1,9)	NS	8 (1,1)	NS
A*32:01	42 (3,3)	25 (3,7)	NS	22 (3,0)	NS
A*33:01	29 (2,3)	20 (2,9)	NS	22 (3,0)	NS
A*68:01	35 (2,8)	14 (2,1)	NS	13 (1,8)	NS

Se realiza test de χ^2 y se considera que existen diferencias significativas cuando $P < 0,05$. Se han eliminado los alelos con frecuencias inferiores al 1% en población control. $P_c = P$ tras la corrección de Bonferroni para 17 comparaciones; NS=No significativo.

^a OR (IC95%)=0,061 (0,008-0,446)

^b OR (IC95%)=1,732 (1,231-2,436)

8.2.2 Tipaje *HLA-B*

Tabla suplementaria 3. Comparación de frecuencias alélicas de *HLA-B* entre pacientes con Colitis Ulcerosa (CU) y Enfermedad de Crohn (EC) y población control

Alelo	Control n (%)	CU n (%)	CU vs. Control <i>P</i> _c	EC n (%)	EC vs. Control <i>P</i> _c
<i>B*07:02</i>	117 (9,2)	73 (10,7)	NS	43 (5,9)	NS
<i>B*08:01</i>	64 (5,0)	21 (3,1)	NS	42 (5,7)	NS
<i>B*13:02</i>	19 (1,5)	21 (3,1)	NS	16 (2,2)	NS
<i>B*14:01</i>	21 (1,7)	19 (2,8)	NS	15 (2,0)	NS
<i>B*14:02</i>	46 (3,6)	37 (5,4)	NS	38 (5,2)	NS
<i>B*15:01</i>	39 (3,1)	18 (2,6)	NS	18 (2,5)	NS
<i>B*18:01</i>	131 (10,3)	3 (6,3)	NS	53 (7,2)	NS
<i>B*27:05</i>	30 (2,4)	6 (0,9)	NS	10 (1,4)	NS
<i>B*35:01</i>	86 (6,8)	34 (5,0)	NS	29 (4,0)	NS
<i>B*35:02</i>	15 (1,2)	14 (2,1)	NS	12 (1,6)	NS
<i>B*35:03</i>	19 (1,5)	11 (1,6)	NS	7 (1,0)	NS
<i>B*38:01</i>	32 (2,5)	25 (3,7)	NS	27 (3,7)	NS
<i>B*39:01</i>	13 (1,0)	8 (1,2)	NS	18 (2,4)	NS
<i>B*40:01</i>	21 (1,7)	7 (1,0)	NS	9 (1,2)	NS
<i>B*44:02</i>	70 (5,5)	32 (4,7)	NS	44 (6,0)	NS
<i>B*44:03</i>	123 (9,7)	55 (8,1)	NS	65 (8,9)	NS
<i>B*49:01</i>	33 (2,6)	26 (3,8)	NS	40 (5,4)	0,021 ^a
<i>B*50:01</i>	36 (2,8)	12 (1,8)	NS	22 (3,0)	NS
<i>B*51:01</i>	111 (8,7)	65 (9,6)	NS	57 (7,8)	NS
<i>B*52:01</i>	19 (1,5)	21 (3,1)	NS	21 (2,8)	NS
<i>B*57:01</i>	28 (2,2)	23 (3,4)	NS	29 (4,0)	NS

Se realiza test de χ^2 y se considera que existen diferencias significativas cuando $P < 0,05$. Se han eliminado del análisis los alelos con frecuencias inferiores al 1% en población control. $P_c = P$ tras la corrección de Bonferroni para 21 comparaciones; NS=No significativo.

^a OR (IC95%)=2,164 (1,352-3,463)

8.2.3 Tipaje HLA-C

Tabla suplementaria 4. Comparación de frecuencias alélicas de HLA-C entre pacientes con Colitis Ulcerosa (CU) y Enfermedad de Crohn (EC) y población control

Alelo	Control n (%)	CU n (%)	CU vs. Control <i>P_c</i>	EC n (%)	EC vs. Control <i>P_c</i>
<i>C*01:02</i>	41 (3,2)	13 (1,9)	NS	16 (2,2)	NS
<i>C*02:02</i>	62 (4,9)	24 (3,6)	NS	36 (5,0)	NS
<i>C*03:03</i>	30 (2,4)	24 (3,6)	NS	18 (2,5)	NS
<i>C*03:04</i>	22 (1,7)	9 (1,3)	NS	8 (1,1)	NS
<i>C*04:01</i>	183 (14,4)	77 (11,5)	NS	74 (10,2)	NS
<i>C*05:01</i>	142 (11,2)	58 (8,6)	NS	76 (10,5)	NS
<i>C*06:02</i>	102 (8)	64 (9,5)	NS	74 (10,2)	NS
<i>C*07:01</i>	158 (12,4)	73 (10,9)	NS	99 (13,7)	NS
<i>C*07:02</i>	131 (10,3)	69 (10,3)	NS	49 (6,8)	NS
<i>C*08:02</i>	66 (5,2)	56 (8,3)	NS	49 (6,8)	NS
<i>C*12:02</i>	23 (1,8)	30 (4,5)	0,016 ^a	19 (2,6)	NS
<i>C*12:03</i>	76 (6)	45 (6,7)	NS	57 (7,9)	NS
<i>C*14:02</i>	19 (1,5)	10 (1,5)	NS	18 (2,5)	NS
<i>C*15:02</i>	47 (3,7)	24 (3,6)	NS	23 (3,2)	NS
<i>C*16:01</i>	95 (7,5)	35 (5,2)	NS	60 (8,3)	NS
<i>C*16:02</i>	19 (1,5)	9 (1,3)	NS	7 (1,0)	NS

Se realiza test de χ^2 y se considera que existen diferencias significativas cuando $P < 0,05$. Se han eliminado del análisis los alelos con frecuencias inferiores al 1% en población control. $P_c = P$ tras la corrección de Bonferroni para 16 comparaciones; NS=No significativo.

^a OR (IC95%)=2,538 (1,462-4,405)

8.2.4 Tipaje *HLA-DRB1*

Tabla suplementaria 5. Comparación de frecuencias alélicas de *HLA-DRB1* entre pacientes con Colitis Ulcerosa (CU) y población control

Alelo	Control n (%)	CU n (%)	<i>P</i>	<i>P_c</i>	<i>Odds ratio</i> (IC 95%)
<i>DRB1*01:01</i>	103 (8,1)	39 (5,4)	0,041		
<i>DRB1*01:02</i>	41 (3,2)	27 (3,7)	NS		
<i>DRB1*01:03</i>	12 (1,0)	30 (4,1)	<0,001	<0,001	4,846 (2,465-9,529)
<i>DRB1*03:01</i>	147 (11,6)	50 (6,9)	0,002	0,044	0,581 (0,414-0,817)
<i>DRB1*04:01</i>	36 (2,8)	11 (1,5)	0,035	0,770	
<i>DRB1*04:02</i>	24 (1,9)	12 (1,7)	NS		
<i>DRB1*04:03</i>	37 (2,9)	21 (2,9)	NS		
<i>DRB1*04:04</i>	32 (2,5)	11 (1,5)	NS		
<i>DRB1*04:05</i>	15 (1,2)	17 (2,3)	0,048	1	
<i>DRB1*07:01</i>	209 (16,4)	110 (15,2)	NS		
<i>DRB1*08:01</i>	28 (2,2)	19 (2,6)	NS		
<i>DRB1*11:01</i>	86 (6,8)	74 (10,2)	0,002	0,044	1,659 (1,196-2,300)
<i>DRB1*11:02</i>	16 (1,3)	11 (1,5)	NS		
<i>DRB1*11:04</i>	39 (3,1)	7 (1,0)	0,005	NS	
<i>DRB1*12:01</i>	13 (1,0)	8 (1,1)	NS		
<i>DRB1*13:01</i>	94 (7,4)	45 (6,2)	NS		
<i>DRB1*13:02</i>	49 (3,9)	23 (3,2)	NS		
<i>DRB1*13:03</i>	21 (1,7)	10 (1,4)	NS		
<i>DRB1*14:01</i>	32 (2,5)	29 (4,0)	NS		
<i>DRB1*15:01</i>	121 (9,5)	74 (10,2)	NS		
<i>DRB1*15:02</i>	16 (1,3)	41 (5,7)	<0,001	<0,001	3,246 (1,736-6,067)
<i>DRB1*16:01</i>	13 (1,0)	17 (2,3)	0,011	0,242	

Se realiza test de χ^2 y se considera que existen diferencias significativas cuando $P < 0,05$. Se han excluido los alelos con frecuencias inferiores al 1% en población control. $P_c = P$ tras la corrección de Bonferroni para 22 comparaciones; IC=Intervalo de Confianza; NS=No significativo.

Tabla suplementaria 6. Comparación de frecuencias alélicas de *HLA-DRB1* entre pacientes con Enfermedad de Crohn (EC) y población control

Alelo	Control n (%)	EC n (%)	P	P_c	Odds ratio (IC 95%)
<i>DRB1*01:01</i>	103 (8,1)	33 (4,2)	0,002	0,044	0,528 (0,353-0,790)
<i>DRB1*01:02</i>	41 (3,2)	25 (3,2)	NS		
<i>DRB1*01:03</i>	12 (0,9)	26 (3,3)	<0,001	<0,001	3,510 (1,745-7,061)
<i>DRB1*03:01</i>	147 (11,6)	81 (10,4)	NS		
<i>DRB1*04:01</i>	36 (2,8)	12 (1,5)	NS		
<i>DRB1*04:02</i>	24 (1,9)	26 (3,3)	NS		
<i>DRB1*04:03</i>	37 (2,9)	18 (2,3)	NS		
<i>DRB1*04:04</i>	32 (2,5)	25 (3,2)	NS		
<i>DRB1*04:05</i>	15 (1,2)	21 (2,7)	0,012	NS	
<i>DRB1*07:01</i>	209 (16,4)	162 (20,8)	0,005	NS	
<i>DRB1*08:01</i>	28 (2,2)	14 (1,8)	NS		
<i>DRB1*11:01</i>	86 (6,8)	63 (8,1)	NS		
<i>DRB1*11:02</i>	16 (1,3)	14 (1,8)	NS		
<i>DRB1*11:04</i>	39 (3,1)	9 (1,2)	0,004	NS	
<i>DRB1*12:01</i>	13 (1)	8 (1,0)	NS		
<i>DRB1*13:01</i>	94 (7,4)	57 (7,3)	NS		
<i>DRB1*13:02</i>	49 (3,9)	16 (2,1)	0,024	NS	
<i>DRB1*13:03</i>	21 (1,7)	10 (1,3)	NS		
<i>DRB1*14:01</i>	32 (2,5)	27 (3,5)	NS		
<i>DRB1*15:01</i>	121 (9,5)	46 (5,9)	0,003	NS	
<i>DRB1*15:02</i>	16 (1,3)	22 (2,8)	NS		
<i>DRB1*16:01</i>	13 (1,0)	11 (1,4)	NS		

Se realiza test de χ^2 y se considera que existen diferencias significativas cuando $P < 0,05$. Se han excluido los alelos con frecuencias inferiores al 1% en población control. $P_c = P$ tras la corrección de Bonferroni para 22 comparaciones; IC=Intervalo de Confianza; NS=No significativo.

8.2.5 Tipaje *HLA-DQB1*

Tabla suplementaria 7. Comparación de frecuencias alélicas de *HLA-DQB1* entre pacientes con Colitis Ulcerosa (CU) y población control

Alelo	Control n (%)	CU n (%)	<i>P</i>	<i>P_c</i>	<i>Odds ratio</i> (IC 95%)
<i>DQB1*02:01</i>	149 (11,7)	50 (7,4)	0,002	0,026	0,598 (0,428-0,836)
<i>DQB1*02:02</i>	176 (13,8)	91 (13,4)	NS		
<i>DQB1*03:01</i>	228 (17,9)	128 (18,8)	NS		
<i>DQB1*03:02</i>	117 (9,2)	53 (7,8)	NS		
<i>DQB1*03:03</i>	43 (3,4)	12 (1,8)	0,040	NS	
<i>DQB1*04:02</i>	37 (2,9)	24 (3,5)	NS		
<i>DQB1*05:01</i>	188 (14,8)	106 (15,6)	NS		
<i>DQB1*05:02</i>	20 (1,6)	23 (3,4)	0,009	NS	
<i>DQB1*05:03</i>	36 (2,8)	29 (4,3)	NS		
<i>DQB1*06:01</i>	14 (1,1)	24 (3,5)	<0,001	<0,001	3,287 (1,689-6,398)
<i>DQB1*06:02</i>	116 (9,1)	69 (10,1)	NS		
<i>DQB1*06:03</i>	92 (7,2)	49 (7,2)	NS		
<i>DQB1*06:04</i>	36 (2,8)	16 (2,4)	NS		

Se realiza test de χ^2 y se considera que existen diferencias significativas cuando $P < 0,05$. Se han excluido los alelos con frecuencias inferiores al 1% en población control. $P_c = P$ tras la corrección de Bonferroni para 13 comparaciones; IC=Intervalo de Confianza; NS=No significativo.

Tabla suplementaria 8. Comparación de frecuencias alélicas de *HLA-DQB1* entre pacientes con Enfermedad de Crohn (EC) y población control

Alelo	Control n (%)	EC n (%)	<i>P</i>	<i>P_c</i>
<i>DQB1*02:01</i>	149 (11,7)	78 (10,5)	NS	
<i>DQB1*02:02</i>	176 (13,8)	139 (18,7)	0,004	NS
<i>DQB1*03:01</i>	228 (17,9)	127 (17,1)	NS	
<i>DQB1*03:02</i>	117 (9,2)	77 (10,4)	NS	
<i>DQB1*03:03</i>	43 (3,4)	25 (3,4)	NS	
<i>DQB1*04:02</i>	37 (2,9)	21 (2,8)	NS	
<i>DQB1*05:01</i>	188 (14,8)	87 (11,7)	NS	
<i>DQB1*05:02</i>	20 (1,6)	18 (2,4)	NS	
<i>DQB1*05:03</i>	36 (2,8)	33 (4,4)	NS	
<i>DQB1*06:01</i>	14 (1,1)	17 (2,3)	0,036	NS
<i>DQB1*06:02</i>	116 (9,1)	44 (5,9)	0,011	NS
<i>DQB1*06:03</i>	92 (7,2)	53 (7,1)	NS	
<i>DQB1*06:04</i>	36 (2,8)	16 (2,2)	NS	

Se realiza test de χ^2 y se considera que existen diferencias significativas cuando $P < 0,05$. Se han excluido los alelos con frecuencias inferiores al 1% en población control. $P_c = P$ tras la corrección de Bonferroni para 13 comparaciones; IC=Intervalo de Confianza; NS=No significativo.

8.2.6 Tipaje de MICA

Tabla suplementaria 9. Frecuencias alélicas y genotípicas de MICA en población control y en pacientes con Colitis Ulcerosa (CU)

Alelo	Control n (%)	CU n (%)	Genotipo	Control n (%)	CU n (%)
<i>MICA</i> *A4	192 (15,6)	72 (10,6) ^a	<i>A4/A4</i>	12 (1,9)	2 (0,6)
			<i>A4/A5</i>	18 (2,9)	5 (1,5)
			<i>A4/A5.1</i>	58 (9,4)	21 (6,2)
			<i>A4/A6</i>	67 (10,9)	29 (8,5)
			<i>A4/A9</i>	26 (4,2)	14 (4,1)
<i>MICA</i> *A5	140 (11,3)	67 (9,9)	<i>A5/A5</i>	16 (2,6)	4 (1,2)
			<i>A5/A5.1</i>	22 (3,6)	18 (5,3)
			<i>A5/A6</i>	43 (7,0)	25 (7,4)
			<i>A5/A9</i>	23 (3,7)	9 (2,6)
<i>MICA</i> *A5.1	310 (25,1)	192 (28,2)	<i>A5.1/A5.1</i>	41 (6,6)	30 (8,8)
			<i>A5.1/A6</i>	107 (17,3)	64 (18,8)
			<i>A5.1/A9</i>	41 (6,6)	29 (8,5)
<i>MICA</i> *A6	423 (34,3)	244 (35,9)	<i>A6/A6</i>	77 (12,5)	45 (13,2)
			<i>A6/A9</i>	52 (8,4)	36 (10,6)
<i>MICA</i> *A9	169 (13,7)	105 (15,4)	<i>A9/A9</i>	14 (2,3)	9 (2,6)

Se realiza test de χ^2 , o el Test exacto de Fisher cuando fue necesario, y se considera que existen diferencias significativas cuando $P < 0,050$.

^a *MICA**A4 vs. Resto de alelos, CU vs. Control: $P_c = 0,015$, OR (IC 95%) = 0,643 (0,482-0,858)

Tabla suplementaria 10. Frecuencias alélicas y genotípicas de MICA en población control y pacientes con Enfermedad de Crohn (EC)

Alelo	CONTROL n (%)	EC n (%)	Genotipo	Control n (%)	EC n (%)
<i>MICA*</i> A4	192 (15,6)	89 (12,1)	<i>A4/A4</i>	12 (1,9)	9 (2,5)
			<i>A4/A5</i>	18 (2,9)	8 (2,2)
			<i>A4/A5.1</i>	58 (9,4)	17 (4,6)
			<i>A4/A6</i>	67 (10,9)	26 (7,1)
			<i>A4/A9</i>	26 (4,2)	20 (5,4)
<i>MICA*</i> A5	140 (11,3)	76 (10,4)	<i>A5/A5</i>	16 (2,6)	5 (1,4)
			<i>A5/A5.1</i>	22 (3,6)	9 (2,5)
			<i>A5/A6</i>	43 (7,0)	36 (9,8)
			<i>A5/A9</i>	23 (3,7)	13 (3,5)
<i>MICA*</i> A5.1	310 (25,1)	184 (25,1)	<i>A5.1/A5.1</i>	41 (6,4)	33 (9,0)
			<i>A5.1/A6</i>	107 (17,3)	64 (17,4)
			<i>A5.1/A9</i>	41 (6,6)	28 (7,6)
<i>MICA*</i> A6	423 (34,3)	261 (35,6)	<i>A6/A6</i>	77 (12,5)	41 (11,2)
			<i>A6/A9</i>	52 (8,4)	52 (14,2)
<i>MICA*</i> A9	169 (13,7)	124 (16,9)	<i>A9/A9</i>	14 (2,3)	6 (1,6)

Se realiza test de χ^2 , o el Test exacto de Fisher cuando fue necesario, y se considera que existen diferencias significativas cuando $P < 0,05$.

8.3 CONSTRUCCIÓN DE HAPLOTIPOS Y ESTUDIO DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

8.3.1 HLA-B/HLA-C

Tabla suplementaria 11. Haplotipos *HLA-B/HLA-C* estimados en controles sanos, Colitis Ulcerosa (CU) y Enfermedad de Crohn (EC)

Haplotipos	Control		CU		EC	
	FH	D'/r ²	FH	D'/r ²	FH	D'/r ²
<i>B*07:02/C*07:02</i>	0,091	0,990/0,866	0,085	0,806/0,629	0,049	0,826/0,606
<i>B*08:01/C*07:01</i>	0,046	0,911/0,310	0,026	0,840/0,187	0,048	0,830/0,261
<i>B*13:02/C*06:02</i>	0,015	1,000/0,174	0,028	0,895/0,250	0,020	0,930/0,172
<i>B*14:01/C*08:02</i>	0,017	1,000/0,307	0,025	0,885/0,256	0,019	0,929/0,257
<i>B*14:02/C*08:02</i>	0,033	0,908/0,566	0,046	0,849/0,457	0,038	0,718/0,402
<i>B*15:01/C*03:03</i>	0,020	0,828/0,524	0,018	0,654/0,318	0,015	0,601/0,341
<i>B*18:01/C*05:01</i>	0,055	0,476/0,207	0,029	0,415/0,124	0,037	0,432/0,127
<i>B*18:01/C*07:01</i>	0,022	0,094/0,007	0,015	0,139/0,011	0,009	-0,037/0
<i>B*18:01/C*12:03</i>	0,024	0,325/0,059	0,012	0,128/0,016	0,019	0,203/0,040
<i>B*27:05/C*01:02</i>	0,014	0,587/0,250	0,001	0,235/0,017	0,005	0,795/0,195
<i>B*35:01/C*04:01</i>	0,067	0,984/0,420	0,043	0,834/0,291	0,037	0,923/0,312
<i>B*35:02/C*04:01</i>	0,011	0,922/0,060	0,021	1,000/0,167	0,015	0,907/0,122
<i>B*37:01/C*06:02</i>	0,011	1,000/0,128	0,013	1,000/0,131	0,007	1,000/0,061
<i>B*38:01/C*12:03</i>	0,024	0,967/0,380	0,026	0,732/0,277	0,029	0,759/0,272
<i>B*40:01/C*03:04</i>	0,013	0,806/0,620	0,009	0,855/0,567	0,007	0,711/0,442
<i>B*44:02/C*05:01</i>	0,047	0,839/0,326	0,034	0,718/0,264	0,046	0,766/0,321
<i>B*44:03/C*04:01</i>	0,020	0,079/0,004	0,018	0,118/0,010	0,012	0,048/0,002
<i>B*44:03/C*16:01</i>	0,062	0,814/0,499	0,040	0,751/0,348	0,061	0,740/0,519
<i>B*49:01/C*07:01</i>	0,021	0,792/0,118	0,031	0,784/0,203	0,038	0,681/0,171
<i>B*50:01/C*06:02</i>	0,020	0,698/0,163	0,013	0,724/0,092	0,020	0,645/0,115
<i>B*51:01/C*02:02</i>	0,012	0,169/0,015	0,003	0,171/0,010	0,014	0,217/0,029
<i>B*51:01/C*14:02</i>	0,013	0,885/0,124	0,013	0,889/0,114	0,019	0,759/0,175
<i>B*51:01/C*15:02</i>	0,031	0,837/0,281	0,025	0,678/0,162	0,020	0,623/0,152
<i>B*52:01/C*12:02</i>	0,014	0,946/0,738	0,028	0,948/0,590	0,020	0,743/0,552
<i>B*53:01/C*04:01</i>	0,012	1,000/0,071	0,003	0,624/0,014	0,018	1,000/0,161
<i>B*57:01/C*07:01</i>	0,012	0,470/0,035	0,012	0,286/0,023	0,008	0,081/0,002
<i>B*58:01/C*07:01</i>	0,010	0,786/0,055	0,004	0,551/0,019	0,004	0,536/0,013

El cálculo de haplotipos se ha realizado implementando el algoritmo EM. El cálculo de D, D' y r² se ha realizado estimando previamente la fase gamética mediante el algoritmo ELB. Se muestran únicamente los haplotipos con una frecuencia mayor al 1% en población control. FH=Frecuencia haplotípica; D'=D estandarizado; r²= Coeficiente de correlación.

8.3.2 HLA-B/MICA

Tabla suplementaria 12. Haplotipos HLA-B/MICA estimados en controles sanos, Colitis Ulcerosa (CU) y Enfermedad de Crohn (EC)

Haplotipos	Control		CU		EC	
	FH	D'/r ²	FH	D'/r ²	FH	D'/r ²
<i>B*07:02/MICA*A5.1</i>	0,078	0,824/0,206	0,101	0,924/0,261	0,056	0,938/0,163
<i>B*08:01/MICA*A5.1</i>	0,042	0,847/0,111	0,029	0,934/0,071	0,056	0,968/0,170
<i>B*13:02/MICA*A5.1</i>	0,012	0,719/0,024	0,029	0,934/0,071	0,019	0,833/0,046
<i>B*14:01/MICA*A5</i>	0,011	0,605/0,047	0,022	-0,441/0,002	0,016	0,777/0,112
<i>B*14:02/MICA*A6</i>	0,036	0,967/0,069	0,054	1,000/0,103	0,045	0,911/0,076
<i>B*15:01/MICA*A5</i>	0,023	0,781/0,143	0,022	0,815/0,165	0,020	0,815/0,149
<i>B*18:01/MICA*A4</i>	0,098	0,954/0,582	0,060	0,948/0,512	0,069	0,957/0,516
<i>B*27:05/MICA*A4</i>	0,022	0,921/0,115	0,006	1,000/0,050	0,007	1,000/0,050
<i>B*35:01/MICA*A5</i>	0,015	0,157/0,014	0,007	0,054/0,001*	0,003	-0,320/<0,001
<i>B*35:01/MICA*A6</i>	0,010	-0,613/0,014	0,001	-0,918/0,025	0,001	-0,903/0,019
<i>B*35:01/MICA*A9</i>	0,037	0,497/0,112	0,037	0,687/0,136	0,034	0,834/0,003
<i>B*38:01/MICA*A9</i>	0,022	0,888/0,128	0,018	0,842/0,136	0,034	0,954/0,164
<i>B*40:01/MICA*A5.1</i>	0,014	0,041/0,031	0,032	0,858/0,154	0,009	0,703/0,018
<i>B*40:02/MICA*A5</i>	0,011	1000/0,09	0,001	-0,292/<0,001	0,011	0,777/<0,001
<i>B*44:02/MICA*A5.1</i>	0,045	0,784/0,107	0,046	0,956/0,115	0,056	0,909/0,033
<i>B*44:03/MICA*A6</i>	0,090	0,937/0,181	0,076	0,915/0,132	0,087	0,976/0,169
<i>B*49:01/MICA*A6</i>	0,024	0,951/0,045	0,038	1,000/0,071	0,054	1,000/0,105
<i>B*50:01/MICA*A6</i>	0,027	0,957/0,051	0,016	0,870/0,024	0,030	1,000/0,057
<i>B*51:01/MICA*A6</i>	0,077	0,872/0,138	0,094	0,976/0,180	0,075	0,947/0,141
<i>B*52:01/MICA*A6</i>	0,011	0,746/0,016	0,032	1,000/0,057	0,019	0,483/0,013
<i>B*53:01/MICA*A9</i>	0,012	1000/0,078	0,004	1,000/0,024	0,016	0,828/0,065
<i>B*57:01/MICA*A9</i>	0,019	0,954/0,119	0,029	0,846/0,137	0,034	0,834/0,141
<i>B*58:01/MICA*A9</i>	0,013	1000/0,083	0,007	1,000/0,041	0,005	0,759/0,019

El cálculo de haplotipos se ha realizado implementando el algoritmo EM. El cálculo de D, D' y r² se ha realizado estimando previamente la fase gamética mediante el algoritmo ELB. Se muestran únicamente los haplotipos con una frecuencia mayor al 1% en población control. FH=Frecuencia haplotípica; D'=D estandarizado; r²= Coeficiente de correlación.

8.3.3 HLA-DRB1/HLA-DQB1

Tabla suplementaria 13. Haplotipos *HLA-DRB1/HLA-DQB1* estimados en controles, Colitis Ulcerosa (CU) y Enfermedad de Crohn (EC)

Haplotipos	Control		CU		EC	
	FH	D'/r ²	FH	D'/r ²	FH	D'/r ²
<i>DRB1*01:01/DQB1*05:01</i>	0,080	0,989/0,497	0,056	1,000/0,321	0,044	1,000/0,350
<i>DRB1*01:02/DQB1*05:01</i>	0,032	1,000/0,192	0,040	1,000/0,224	0,032	1,000/0,252
<i>DRB1*01:03/DQB1*05:01</i>	0,010	1,000/0,055	0,043	0,961/0,231	0,028	0,858/0,185
<i>DRB1*03:01/DQB1*02:01</i>	0,114	0,985/0,955	0,071	1,000/0,957	0,098	0,956/0,888
<i>DRB1*04:01/DQB1*03:01</i>	0,012	0,289/0,011	0,010	0,726/0,031	0,009	0,497/0,020
<i>DRB1*04:01/DQB1*03:02</i>	0,016	0,511/0,075	0,003 [‡]	0,156/0,004	0,007	0,349/0,017
<i>DRB1*04:02/DQB1*03:02</i>	0,019	1,000/0,190	0,018	1,000/0,213	0,031	0,954/0,262
<i>DRB1*04:03/DQB1*03:02</i>	0,023	0,792/0,185	0,023	0,783/0,22	0,016	0,721/0,099
<i>DRB1*04:04/DQB1*03:02</i>	0,021	0,794/0,160	0,012	0,783/0,001	0,026	0,768/0,170
<i>DRB1*04:05/DQB1*03:02</i>	0,012	1,000/0,118	0,019	0,797/0,181	0,023	0,833/0,166
<i>DRB1*04:07/DQB1*03:01</i>	0,016	1,000/0,073	0,001	1,000/0,006	0,007	1,000/0,033
<i>DRB1*07:01/DQB1*02:02</i>	0,138	0,993/0,806	0,132	0,987/0,853	0,179	0,945/0,761
<i>DRB1*07:01/DQB1*03:03</i>	0,024	0,638/0,072	0,013	0,706/0,051	0,026	0,695/0,062
<i>DRB1*08:01/DQB1*04:02</i>	0,020	0,926/0,645	0,028	1,000/0,786	0,018	0,926/0,567
<i>DRB1*10:01/DQB1*05:01</i>	0,020	1,000/0,116	0,013	1,000/0,073	0,007	1,000/0,051
<i>DRB1*11:01/DQB1*03:01</i>	0,066	0,972/0,313	0,106	0,983/0,501	0,078	0,941/0,384
<i>DRB1*11:02/DQB1*03:01</i>	0,011	0,848/0,042	0,016	1,000/0,071	0,015	0,741/0,051
<i>DRB1*11:04/DQB1*03:01</i>	0,028	0,906/0,119	0,009	0,824/0,03	0,010	0,849/0,038
<i>DRB1*13:01/DQB1*06:03</i>	0,067	0,918/0,823	0,059	0,925/0,76	0,069	0,959/0,850
<i>DRB1*13:02/DQB1*06:04</i>	0,028	1,000/0,727	0,022	0,935/0,602	0,015	0,727/0,495
<i>DRB1*13:03/DQB1*03:01</i>	0,017	1,000/0,077	0,013	1,000/0,058	0,013	1,000/0,066
<i>DRB1*14:01/DQB1*05:03</i>	0,023	0,904/0,723	0,035	1,000/0,821	0,032	0,884/0,634
<i>DRB1*15:01/DQB1*06:02</i>	0,086	0,943/0,849	0,094	0,919/0,805	0,051	0,876/0,750
<i>DRB1*15:02/DQB1*06:01</i>	0,011	1,000/0,874	0,034	0,917/0,776	0,020	0,880/0,774
<i>DRB1*16:01/DQB1*05:02</i>	0,010	1,000/0,646	0,024	0,939/0,646	0,015	1,000/0,605

El cálculo de haplotipos se ha realizado implementando el algoritmo EM. El cálculo de D, D' y r² se ha realizado estimando previamente la fase gamética mediante el algoritmo ELB. Se muestran únicamente los haplotipos con una frecuencia mayor al 1% en población control. FH=Frecuencia haplotípica; D'=D estandarizado; r²= Coeficiente de correlación.

[‡] No están en LD en esta población (P>0,05)