

# **UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**Departamento de Medicina**

**Facultad de Medicina**



## **TESIS DOCTORAL**

**ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS IMPLICADOS EN LAS  
VÍAS DE APOPTOSIS Y AUTOFAGIA EN LA ENFERMEDAD DE  
CROHN**

**Alejandra Fernández Pordomingo**

Mayo 2014

**DR. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

**DR. ANTONIO RODRÍGUEZ PÉREZ, JEFE DE SERVICIO DE APARATO DIGESTIVO DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo titulado: “Análisis de polimorfismos genéticos implicados en las vías de apoptosis y autofagia en la Enfermedad de Crohn”, que presenta la Licenciada en Medicina y Cirugía, Dña. Alejandra Fernández Pordomingo, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Medicina y reúne, a nuestro juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al título de “Doctor” por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Salamanca a 30 de mayo de 2014.

**Fdo: Dr. D. Rogelio González Sarmiento**

**Dr. D. Antonio Rodríguez Pérez**

Este trabajo ha sido desarrollado en la Unidad de Medicina Molecular USAL-IBSAL y financiado por una ayuda de la Gerencia Regional de Salud de la Junta de Castilla y León, referencia GRS877/A/13.

## **AGRADECIMIENTOS**

A los Dres. D. Rogelio González Sarmiento y D. Antonio Rodríguez Pérez, por compartir conmigo muchas tardes de arduo trabajo y ofrecerme siempre apoyo y ayuda.

A Mercedes Sánchez Barba, del Departamento de Estadística de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, y en especial a Francisco Javier Martín Vallejo, por sus siempre brillantes ideas y su gran labor en cuanto al desarrollo del trabajo estadístico de la tesis.

A todo el personal del laboratorio de la Unidad de Genética y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca, por el gran trabajo que desempeñan, y en especial a Javier Fernández Mateos, sin cuya ayuda inestimable me hubiera resultado mucho más difícil llevar a cabo la parte experimental de este trabajo.

A mi familia, por quererme y acompañarme siempre en los momentos difíciles.

A Ernesto, por ser mi mayor fuente de motivación y mi alegría diaria.

## ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	6
2.	LA ENFERMEDAD DE CROHN	11
	2.1. Etiopatogenia	12
	2.2 Diagnóstico	13
	2.3 Clasificación	16
	2.4 Índices de actividad	17
	2.5 Tratamiento farmacológico	20
	2.6 Cirugía	21
3.	GENÉTICA Y EIIC	23
	3.1 Genética y etiopatogenia	24
	3.2 Genética y fenotipo	30
	3.3 Genética y comportamiento de la EIIC	32
	3.4 Genética y su influencia en los tratamientos	34
	3.5 Genética y aplicación en la clínica	36
4.	GENES IMPLICADOS EN EL ESTUDIO	37
	4.1 NOD2/CARD15	38
	4.2 ATG16L1	41
	4.3 p53	44
	4.4 Genes de la familia BCL-2 (BCL-2,BAX)	46
5.	HIPÓTESIS	52
6.	OBJETIVOS	54

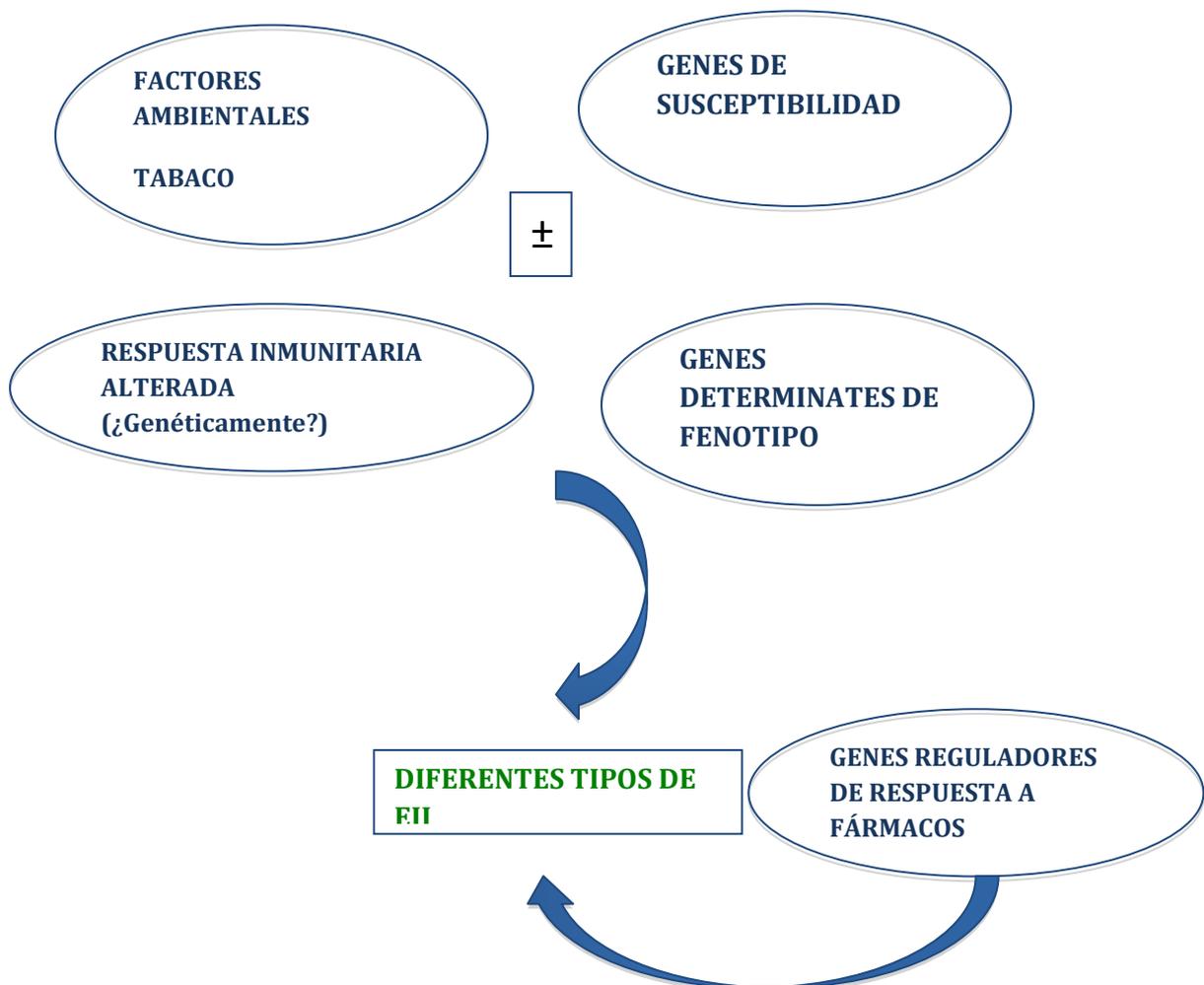
7.	MATERIAL Y MÉTODOS	56
	7.1 Población	57
	7.2 Recogida y procesado de muestras	58
	7.3 Recogida de datos clínicos	58
	7.4 Variables clínicas	58
	7.5 Metodología de los estudios genéticos	62
	7.6 Métodos estadísticos	67
8.	RESULTADOS	69
	8.1 Características clínicas de los pacientes	70
	8.2 Asociaciones entre variables clínicas	73
	8.3 Asociaciones de polimorfismos con grupo control	90
	8.4 Estudio de la interacción entre genes	97
	8.5 Interacción entre genes y comportamiento de la enfermedad	100
9.	DISCUSIÓN	101
	9.1 Aspectos clínicos	102
	9.2 Estudios de polimorfismos	102
	9.3 Interacciones gen-gen	109
	9.4 Estudio de variables clínicas y polimorfismos	111
10.	CONCLUSIONES	112
11.	BIBLIOGRAFÍA	114

# **1. INTRODUCCIÓN.**

Se conoce como Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) a un grupo heterogéneo de desórdenes del tracto gastrointestinal caracterizados por una inflamación crónica. Comprende tres entidades: Enfermedad de Crohn (EC), Colitis Ulcerosa (CU) y Colitis Indeterminada (CI). Se caracteriza por su curso crónico, con periodos de actividad o brotes y fases de remisión o quiescencia. La EC puede afectar a cualquier parte del tubo digestivo y la inflamación es típicamente transmural, lo que con frecuencia da lugar a la formación de estenosis y fístulas. La CU afecta únicamente al colon (aunque puede haber ileítis leve “por reflujo”) y está confinada a la mucosa y submucosa superficial (1). En la EC existe una gran heterogeneidad en cuanto a la forma de presentación, manifestaciones extraintestinales y localización, así como en el comportamiento y la respuesta a tratamientos de ambas entidades, EC y CU. Para establecer un diagnóstico diferencial entre CU y EC es necesario apoyarse en parámetros clínicos, endoscópicos, radiológicos, histológicos y serológicos. En muchas ocasiones, la evolución de la enfermedad a lo largo del tiempo nos va a permitir diferenciar ambas entidades. Hasta ahora, las clasificaciones de la EII se basaban fundamentalmente en aspectos clínicos y epidemiológicos, pero cada vez más se tiende a la utilización de marcadores serológicos y genéticos, y se está comenzando a aplicar la farmacogenética con el fin de monitorizar la respuesta terapéutica a los distintos fármacos utilizados en el control de la enfermedad.

La etiología de la EII se desconoce pero parece que todas las variantes están causadas por un mecanismo común. Es un trastorno de etiología multifactorial donde, en individuos genéticamente predispuestos, la exposición a ciertos factores ambientales (dieta, tabaco, flora intestinal, localización geográfica) da lugar a una respuesta alterada de la inmunidad innata y adaptativa, con liberación de moléculas proinflamatorias que producen lesiones intestinales por alteración de fenómenos de apoptosis y reparación (2) **(Fig.1)**. La enfermedad estaría causada por factores ambientales y mantenida por una respuesta inmune anómala a los mismos, genéticamente determinada. La flora entérica jugaría un papel esencial en su desarrollo (3). El proceso inflamatorio estaría perpetuado por la interacción entre las células del epitelio intestinal y las células competentes del sistema inmune (4). Entre

los distintos factores ambientales analizados sólo han mostrado una cierta relación con la EII el tabaco, como factor de mal pronóstico en la EC, y la apendicectomía y el tabaco, como factores protectores en la CU. Sin embargo, estos parámetros no explican la variabilidad en cuanto a la incidencia y prevalencia. Así, en los países desarrollados han disminuido las tasas de apendicectomía pero la incidencia de CU se ha mantenido, mientras que la incidencia de EC es baja en poblaciones con un consumo importante de tabaco como Asia y África, y alta en poblaciones donde el porcentaje de fumadores es bajo, como Suecia y Canadá (5).



**Figura 1.** Etiopatogenia de la EII.

Estudios recientes indican una tendencia a favor de factores ambientales frente a genéticos, al observarse un incremento de la enfermedad en poblaciones multirraciales y menor incidencia de la esperada entre miembros de la misma familia y en gemelos monocigotos (6). De la misma manera, la observación de que la enfermedad aparece en algunos individuos durante la infancia y en otros en la edad adulta sugiere una carga ambiental en cuanto al inicio de la enfermedad y en la progresión de la misma (7).

El aumento que la incidencia de la EIIC está experimentando en las últimas décadas y su comportamiento sugieren que al menos uno, sino más, de los elementos patogénicos probables (genético, bacteriano-ambiental o inmune) están cambiando. Una microflora alterada o una alteración en la interacción entre la microflora y la genética del huésped pueden contener la clave patogénica. El aumento de incidencia de la EIIC se ha atribuido durante mucho tiempo a la “teoría de la higiene”, más conocida actualmente como la “hipótesis de la microflora” (**Tabla 1**). Ambas hipótesis manejan la idea de que un ambiente excesivamente higiénico, probablemente influenciado también por el excesivo uso de antibióticos en las sociedades desarrolladas, ha disminuido la exposición de nuestro intestino a los antígenos bacterianos, de modo que nuestro sistema inmune sobrereactúa cuando se le expone a la flora comensal o a una disbiosis bacteriana.

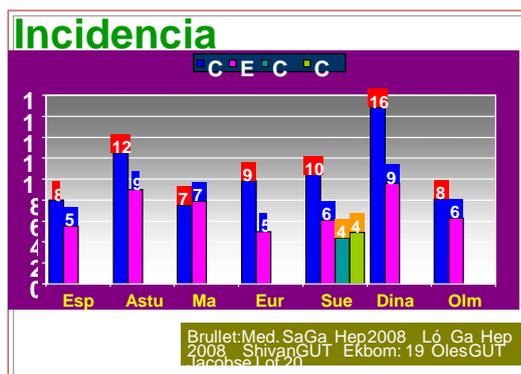
**Tabla 1.** Teoría de la higiene o hipótesis de la microflora.

<p><b>MICROFLORA Y AGENTES INFECCIOSOS</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <b>No hay evidencia de etiología infecciosa específica.</b></li> <li>➤ <b>La flora intestinal parece contribuir en el desarrollo de la EIIC.</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <b>Feller, M, et al. <i>Lancet Infect Dis</i> 2007; 7:607.</b></li> </ul> </li> <li>➤ <b>Estudios en animales revelan una interacción entre los mecanismos inmunitarios innatos, adaptativos y</b></li> </ul>
--	--

	<p><b>reguladores, del huésped con la microbiología intestinal.</b></p> <p>➤ <b>Elson CO, et al. <i>Immunol Rev</i> 2005; 206: 260–76.</b></p>
--	--

La mediana de edad de aparición de la EC se sitúa entre los 20-30 años y en el caso de la CU hay dos picos, entre los 30-40 y entre los 60-70 años. La EIIC pediátrica representa un 7%-20% de todos los casos (8). Se ha observado un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad entre los niños que migran a poblaciones más desarrolladas antes de los 15 años (9), y la apendicectomía antes de los 20 años parece disminuir el riesgo de CU. La CU aparece con una frecuencia ligeramente mayor entre los hombres y la EC entre las mujeres, particularmente en áreas de incidencia alta (10). Esta distribución es al contrario entre la población pediátrica, cambiando la balanza entre los 14 y los 17 años (11).

Los estudios de Europa Occidental y América del Norte de los últimos 20 años han observado un notable aumento en la incidencia de la enfermedad, que ha pasado de ser una entidad infrecuente a afectar del 0,5% al 1,0% de la población (**Fig.2**), con una incidencia en países occidentales de más de 200 casos por 100.000 habitantes (12.7 y 24.3 por 100.000 personas/año para la EC y CU, respectivamente) (12). Existe un gradiente Norte-Sur, pero se viene observando un aumento de la incidencia en países en los cuales era baja, así como en población migratoria de países en vías de desarrollo a sociedades más avanzadas (13). Además, la incidencia en la EC parece estar aumentando de una forma más acelerada que en la CU (14). Este aumento de incidencia, los nuevos tratamientos y la dependencia de atención hospitalaria hacen que esta enfermedad suponga una importante carga económica para los sistemas sanitarios.



**Figura 2.** Incidencia de la EIC en el mundo.

## **2. LA ENFERMEDAD DE CROHN.**

La EC se caracteriza por una afectación inflamatoria parcheada y transmural que puede afectar a cualquier parte del tubo digestivo. La presentación de la enfermedad es a menudo larvada, lo que puede conllevar retrasos en el diagnóstico. Los síntomas gastrointestinales dependen de la localización, extensión y gravedad del tramo afecto; algunos de los síntomas más frecuentes son la aparición de dolor abdominal, anorexia, diarrea, náuseas y pérdida de peso. La EC es un reto terapéutico que requiere tratamiento de forma continuada para aliviar los síntomas y evitar la recidiva; a menudo se comporta como refractaria y se hace persistente como una enfermedad activa crónica a pesar de las terapias antiinflamatorias.

### **2.1. Etiopatogenia.**

Se postula que la EC es una consecuencia de una respuesta inmune excesiva y alterada de la mucosa intestinal a los componentes de la microflora (15). A esta alteración de la respuesta inmune se suma un flujo constante de leucocitos desde la circulación al epitelio intestinal, lo que perpetúa la inflamación (16). La migración y acumulación de un gran número de neutrófilos en la luz intestinal es evidente (17). De hecho, la EC se asocia a un defecto en la función de los neutrófilos (18), de forma que la persistencia del estado inflamatorio en el tracto gastrointestinal estaría causada por un retraso en la apoptosis de dichas células (19) (20). Los neutrófilos experimentan una apoptosis espontánea, lo cual constituye el mecanismo ideal para inducir una muerte celular controlada y prevenir la liberación de mediadores tóxicos, como sucede en la necrosis. Esta apoptosis facilita la resolución de la inflamación fagocitando y eliminando neutrófilos de los tejidos inflamados. Sin embargo, la apoptosis conlleva el cese de distintas actividades de los neutrófilos y, si no es adecuadamente regulada, puede dar lugar a la liberación de especies de oxígeno reactivas (ROS) y proteasas, promoviendo el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas (21).

## 2.2. Diagnóstico.

El diagnóstico de la EC se realiza por criterios clínicos, endoscópicos, radiológicos y anatómo-patológicos. Al afrontar pacientes con sospecha de EIIC es importante realizar un diagnóstico preciso del tipo de enfermedad y de su fenotipo, así como un diagnóstico diferencial con enfermedades autoinmunes o infecciosas de comportamiento clínico similar.

En la actualidad, en el momento del diagnóstico inicial de la EC es adecuado realizar un estudio de evaluación de factores predictores de su curso, de la proporción de daño intestinal irreparable o de la terapéutica más adecuada para cada paciente. Además de factores individuales, como la edad, sexo, hábito tabáquico y antecedentes familiares, es importante tener en cuenta los datos que nos aportan las pruebas diagnósticas endoscópicas y radiológicas: por ejemplo, la extensión y localización de la enfermedad, la afectación del intestino delgado o el tipo de patrón evolutivo desarrollado (inflamatorio, estenosante o penetrante), pudiendo coexistir en un paciente, y al mismo tiempo, lesiones en diferentes estadios. El curso de la EC se caracteriza por su dinamismo y progresión, evolucionando de patrones propiamente inflamatorios, característicos de estadios precoces, hacia formas estenóticas o penetrantes, más evolucionadas, relacionadas con daño intestinal irreversible y abocadas, con frecuencia, a la cirugía (22).

La positividad de los anticuerpos p-ANCA (anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos) es más frecuente en CU y la de los anticuerpos ASCA (anticuerpos Anti-*Saccharomyces cerevisiae*) en EC. Marcadores fecales que se correlacionan con la disrupción de la barrera intestinal, como lactoferrina y calprotectina fecal, son estables, fáciles de determinar y específicos, y se asocian con el grado de inflamación intestinal (23). La determinación de calprotectina fecal es más precisa que la de lactoferrina (24) y por eso ésta se ha propuesto desde hace ya algunos años como uno de los marcadores más adecuados de inflamación intestinal (25) y de particular utilidad como marcador de actividad de la EIIC y para el diagnóstico diferencial con trastornos digestivos funcionales.

El planteamiento terapéutico actual de la EC contempla la necesidad de una evaluación completa del intestino (colon e intestino delgado), con la finalidad de conocer la extensión y actividad, la presencia de complicaciones intestinales (fístulas, estenosis) y extraintestinales, la estimación del patrón evolutivo, del daño intestinal estructural y del daño inflamatorio recuperable que, junto con factores individuales, nos hagan prever el riesgo de progresión de la enfermedad y elegir el tratamiento más adecuado. Lo habitual es combinar técnicas endoscópicas (ileocolonoscopía y gastroscopia ante la sospecha de afectación alta) con una prueba de imagen radiológica seccional o de estudio de cortes transversales (ecografía, tomografía computarizada [TC] o resonancia magnética nuclear [RMN]) que evalúe adecuadamente la enfermedad localizada en el intestino delgado. Estas técnicas de imagen han desplazado a los estudios baritados por su mayor sensibilidad y capacidad de valoración global de la pared intestinal, eligiéndose en función de la accesibilidad a la técnica y de la experiencia en cada hospital (22)(26). Dados los frecuentes exámenes radiológicos necesarios en la monitorización y seguimiento de los pacientes con EC, el método de imagen ideal debería estar libre de radiaciones ionizantes, ser bien tolerado por los pacientes y debería ser reproducible. Por este motivo, la RMN se está convirtiendo en la exploración de “primera línea” para el estudio y seguimiento de los pacientes con EC (22).

Las principales diferencias diagnósticas entre CU y EC se resumen en la **tabla 2**. Cuando los aspectos son mixtos se clasifica de colitis indeterminada. El diagnóstico de CU y de EC se realiza siguiendo los criterios de Lennard-Jones (**tabla 3**).

**Tabla 2.** Diferencias diagnósticas entre CU y EC.

	<i>Colitis Ulcerosa</i>	<i>Enfermedad de Crohn</i>
<b>EXTENSIÓN</b>	Afectación de recto	Afectación recto con menos frecuencia
	Mayor o menor extensión de colon	Cualquier segmento de boca a ano
	Afectación continua y simétrica	Afectación segmentaria y asimétrica
<b>AFECTACIÓN DE LA PARED</b>	Afectación mucosa	Afectación transmural
	Engrosamiento capa muscular	“Envoltura grasa”
	No habitual estenosis, fístulas	Desarrollo de fístulas, estenosis
	Rara enfermedad perianal	Enfermedad perianal
	Raros abscesos	Abscesos intraabdominales
<b>ENDOSCOPIA</b>	Pérdida patrón vascular, edema, úlceras	Úlceras serpiginosas, “empedrado”

**Tabla 3.** Criterios diagnósticos de EC (Lennard Jones).

	<b>Clínica o endoscopia</b>	<b>Radiología</b>	<b>Biopsia</b>	<b>Pieza quirúrgica</b>
<b>Distribución</b>				
Lesión digestiva alta	+	+	+	+
Lesión anal	+	+		+
Distribución segmentaria	+	+	+	+
<b>Lesión transmural</b>				
Fisura	+	+		+
Absceso	+	+		+
Fístula	+	+		
<b>Estenosis</b>	+	+		+
<b>Hallazgos histológicos</b>				
Úlcera			+	+
Agregados linfoides			+	+
Retención de mucina			+	
Granulomas			+	+
Se considera enfermedad de Crohn <i>definida</i> la presencia de granulomas no caseificantes en el estudio anatomopatológico de las muestras de mucosa intestinal junto a otro criterio, o en ausencia de granulomas, la existencia de tres criterios. Se define como enfermedad de Crohn <i>probable</i> si existen dos criterios en ausencia de granulomas.				

### 2.3. Clasificación.

La EC es muy heterogénea, de forma que podría incluir diferentes entidades nosológicas. Por este motivo y fundamentalmente para estudios controlados, se hace necesario clasificar a los pacientes.

La clasificación actualmente utilizada es la *clasificación de Montreal*, derivada de la previa de Viena, que utiliza como criterios principales la edad de comienzo del cuadro, la localización, el patrón clínico y la presencia o no de enfermedad perianal (**tabla 4**).

**Tabla 4.** Clasificación de Montreal de la Enfermedad de Crohn.

<b>Edad al diagnóstico (A)</b>		
<b>A1</b>	≤16 años	
<b>A2</b>	17-40 años	
<b>A3</b>	>40 años	
<b>Localización (L)</b>		
<b>L1</b>	Íleon terminal	<b>L1+L4</b> (íleon terminal+tracto digestivo alto)
<b>L2</b>	Colon	<b>L2+L4</b> (colon+tracto digestivo alto)
<b>L3</b>	Ileocólica	<b>L3+L4</b> (ileocólica+tracto digestivo alto)
<b>L4</b>	Tracto digestivo alto	
<b>Patrón clínico (B)</b>		
<b>B1</b>	No estenosante, no fistulizante o inflamatorio	<b>B1p</b> (inflamatorio con afección perianal asociada)
<b>B2</b>	Estenosante	<b>B2p</b> (estenosante con afección perianal asociada)
<b>B3</b>	Fistulizante	<b>B3p</b> (fistulizante con afección perianal asociada)

#### 2.4. Índices de actividad.

La EIC cursa en brotes con periodos de inactividad que van a condicionar el tratamiento. No existe un parámetro único para medir este aspecto. Existen índices

clínicos, con ayuda del laboratorio y de la endoscopia, así como histológicos para esta finalidad. Se exponen algunos de los más utilizados en las tablas siguientes. Aunque su utilidad en la práctica clínica no está validada en todos los casos, son imprescindibles para la realización de ensayos clínicos (**tablas 5-9**).

**Tabla 5.** CDAI (*Crohn's disease activity index*): actividad clínica.

CALCULO DEL CDAI	Días / Semana	Suma	Factor	Subtotal
Número de deposiciones líquidas o blandas			x 2	
Dolor abdominal (0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = severo)			x 5	
Bienestar general (0 = en general bueno; 1 = leve compromiso; 2 = malo; 3 = muy malo; 4 = muy terrible)			x 7	
Contar entre las 6 categorías listadas, las presentes actualmente				
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Artritis / Artralgias</li> <li>• Iritis / Uveitis</li> <li>• Eritema nodoso, pioderma gangrenoso, estomatitis aftosa</li> <li>• Fisura, fistula o absceso anal</li> <li>• Otra fistula</li> <li>• Fiebre &gt; de 37,8° C durante la semana previa</li> </ul>			x 20	
Necesidad de lomotil u opiáceos por diarrea (0 = no; 1 = sí)			x 30	
Masa abdominal (0 = no; 2 = cuestionable; 5 = definida)			x 10	
Hematocrito (Hto)				
*Hombres = 47- Hto				
*Mujeres = 42- Hto			x 6	
Sumar o restar el porcentaje de peso ganado / perdido respectivamente, en relación a peso estándar			x 1	
<i>Adaptado de Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F Jr. 1976 (1)</i>			CDAI	

**Tabla 6.** Índice de Harvey- Bradshaw: actividad clínica.

<b>Bienestar General</b> (0 = en general bueno; 1 = leve compromiso; 2 = moderado; 3 = malo; 4 = terrible)
<b>Dolor abdominal</b> (0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = severo)
<b>Número de deposiciones blandas o líquidas por día</b>
<b>Masa abdominal</b> (0 = ausente; 1 = cuestionable; 2 = definida)
<b>Complicaciones (1 punto por ítem)</b> Artralgia, uveitis, eritema nodoso, úlceras aftoides, pioderma gangrenoso, fisura anal, fistula nueva, absceso
<i>Adaptado de Harvey RF; Bradshaw JM. 1980 (11)</i>

(leve <6; moderada 6-12; grave >12)

**Tabla 7. CDEIS (Crohn’s disease endoscopic index of severity): índice endoscópico.**

	Recto	Colon izquierdo	Colon transverso	Colon derecho	Ileon	Total
Ulceraciones profundas <sup>12</sup>	___+	___+	___+	___+	___+	Total 1 +
Ulceraciones superficiales <sup>6</sup>	___+	___+	___+	___+	___+	Total 1 +
Superficie con lesiones (cm)	___+	___+	___+	___+	___+	Total 1 +
Superficie con úlceras (cm)	___+	___+	___+	___+	___+	Total 1 +
Estenosis ulcerada: +3	TOTAL C				TOTAL A	
Estenosis ulcerada: +3	TOTAL D		CDEIS = TOTAL B+C+D (0-44)		TOTAL B = TOTAL A/n	

Nº segmentos explorados (total o parcialmente): n

**Tabla 8. SES-CD (simplified endoscopic activity score for Crohn’s disease): índice endoscópico.**

Variable	0	1	2	3
Tamaño úlcera	No	Úlcera aftosa (0,1-0,5 cm)	Úlceras grandes (0,5-2 cm)	Úlceras muy grandes (<2 cm)
Superficie ulcerada	No	<10%	10-30%	>30%
Superficie afectada	Ninguna	<50%	50-75%	>75%
Estenosis	No	Única con paso	Múltiple franqueable	Infranqueable

**SES-CD**: ILEON + C. DCHO + C. TRANSVERSO + C. IZQDO + RECTO (0-15)

**Tabla 9. Índice de Rutgeerts para la recurrencia (poscirugía) de la EC.**

Puntos	Lesiones
<b>i0</b>	no lesiones
<b>i1</b>	<5 aftas
<b>i2</b>	>5aftas o lesiones <1cm de la anastomosis o lesiones salteadas de mayor tamaño
<b>i3</b>	Ileitis difusa aftosa en mucosa inflamada
<b>i4</b>	Úlceras, nódulos o estenosis

(lesiones en el neóleon) Adaptado de Rutgeerts. Gastroenterology 1990

**0-1 bajo riesgo de recurrencia**  
**3-4 alto riesgo**  
**1/3 de los “4” nueva resección a los 3 años**

## **2.5. Tratamiento farmacológico.**

No existe en la actualidad un tratamiento curativo para la EC. El objetivo del tratamiento farmacológico es inducir y mantener la remisión clínica en un escenario libre de esteroides, proporcionar un alivio sintomático, controlar la actividad de la enfermedad, mantener un estado de nutrición apropiado y conseguir una calidad de vida lo más cercana posible a la de una persona sana y, finalmente, evitar cirugías innecesarias. Los fármacos más utilizados incluyen los agentes 5-ASA, antibióticos, corticoides, las terapias inmunomoduladoras y las terapias biológicas, de manera que el abordaje quirúrgico se reserva para casos mal controlados o recurrencias frecuentes.

En las últimas décadas se han producido avances significativos en cuanto al arsenal terapéutico con el que contamos en la EC, fundamentalmente con el uso de inmunosupresores y fármacos biológicos, anticuerpos monoclonales dirigidos contra el factor de necrosis tumoral (TNF).

La elección de una terapia u otra va a depender, en gran medida, de factores como el grado de actividad inflamatoria, la extensión y localización, el patrón evolutivo, las complicaciones locales o extraintestinales, la aparición de efectos adversos y la relación coste-efectividad. Así, a la estrategia clásica de ir adaptando el nivel de fármacos antiinflamatorios a la gravedad clínica e histológica de la enfermedad (“step-up”), se ha añadido la estrategia “top-down”, en un intento de modificar la historia natural de la enfermedad. Dicha estrategia se basa en el uso precoz de fármacos inmunomoduladores y biológicos con el fin de prevenir consecuencias irreversibles, reducir la necesidad de cirugía y mantener una calidad de vida aceptable desde el primer brote de la enfermedad. A pesar de que ésta sería la aproximación idónea en aquellos pacientes considerados de riesgo en cuanto a un peor curso de la enfermedad (menores de 40 años; enfermedad perianal al diagnóstico; necesidad de corticoides en el primer brote) (27), no podemos olvidar el coste y los riesgos potenciales que conlleva, como la aparición de linfomas con los inmunomoduladores (28)(29) o de infecciones graves con los fármacos biológicos (30).

Por tanto, se necesitan más datos en cuanto a la eficacia a corto y largo plazo, la seguridad y la relación coste-beneficio antes de inclinarnos por esta segunda vertiente.

A pesar de que clásicamente el propósito del tratamiento de mantenimiento ha sido la remisión clínica, las evidencias recientes apuntan a que estos tratamientos consiguen la desaparición de las lesiones mucosas. La llamada “cicatrización mucosa” es ahora uno de los objetivos primarios de los estudios terapéuticos y comienza a ser un objetivo en la práctica clínica debido a que se ha asociado al mantenimiento de la remisión clínica y a la reducción de tasas de hospitalización y de resección quirúrgica, tanto en CU como en EC, así como a la disminución en el consumo de recursos sanitarios.

## **2.6. Cirugía.**

La propia enfermedad desde su inicio o la progresión del daño estructural pueden dar lugar a la aparición de complicaciones que en ocasiones son refractarias al tratamiento farmacológico y requieren cirugía. Cada año, el 3%-5% de pacientes con EC precisa intervención quirúrgica. A los 20 años del diagnóstico, el 70%-80% de pacientes con EC va a necesitar una resección intestinal, de los cuales el 30% va a necesitar una segunda cirugía en los siguientes 10 años (31) (32).

Los pacientes con EC tienen también un riesgo aumentado de necesitar un estoma permanente. La proctocolectomía por colitis refractarias se lleva a cabo con menor frecuencia que en el pasado, pero no protege de la recurrencia a nivel de intestino delgado (33). Las resecciones colónicas segmentarias son un tratamiento adecuado para las estenosis y fístulas (34). Sin embargo, hasta el 10% de pacientes con enfermedad perianal crónica refractaria a otros tratamientos puede precisar una derivación fecal permanente (35), siendo el grupo de mayor riesgo aquellos con afectación colorrectal y estenosis anal.

Los fármacos inmunosupresores y los biológicos pueden modificar el curso de la enfermedad (36), disminuir la necesidad de corticoides, de ingresos y de cirugía en

estos pacientes si se introducen de forma precoz durante la progresión de la enfermedad, antes de que se hayan desarrollado lesiones anatómicas irreversibles (37). En cuanto a los fármacos anti-TNF, no se ha determinado si reducen el riesgo de necesitar un estoma permanente.

### **3. GENÉTICA Y EIIC.**

Se han implicado variaciones genéticas en la etiopatogenia de la enfermedad, fenotipo, complicaciones, evolución y respuesta a los distintos tratamientos. Se han identificado mutaciones con una posible influencia sobre la forma de presentación de la EIIC en más de la mitad de los cromosomas, incluido el cromosoma X (38). Los últimos avances en tecnología de genotipado y bioinformática han jugado un papel esencial en el gran número de estudios que han aparecido en el campo de la Genética en la EIIC. Estos estudios se basan en tres pilares fundamentales: la agregación familiar, los genes candidatos y los estudios de asociación genética (GWAs) (39).

### **3.1. Genética y etiopatogenia.**

La sospecha de que los factores genéticos desempeñan algún papel en la etiopatogenia de la EIIC proviene de estudios donde se demostró una mayor prevalencia de la enfermedad entre la población caucásica y judía (40), así como una cierta agregación familiar y mayor incidencia de la enfermedad en gemelos homocigotos. En este sentido, la prevalencia de la EIIC entre la población judía es de 2 a 4 veces mayor que en cualquier otro grupo étnico, siendo mayor en los judíos Askenazi que en los Sefardíes o judíos orientales, sin que influya su localización geográfica (2) (41). El riesgo de padecer la enfermedad en gemelos monocigóticos es de un 20%-50% en la EC y 14%-19% en la CU, mientras que dicho riesgo se reduce en gemelos dicigóticos al 0%-7% en ambas enfermedades (42). El principal factor de riesgo para desarrollar EIIC es tener un familiar con la misma enfermedad: el riesgo de desarrollar CU y EC en familiares de primer grado de pacientes con EIIC es de 1,6% y 5,2%, respectivamente. Esto es, un riesgo de 12 a 15 veces mayor de desarrollar EC en comparación con la población general de una franja de edad comparable (43).

La edad media al diagnóstico es de 22 y 23,3 años dentro de los casos familiares de EC y CU respectivamente, y de 27 y 28,6 años para los casos esporádicos (44) (45). A pesar de todos estos datos, no se dispone de la suficiente evidencia para hablar de la EIIC familiar como una entidad independiente frente a los casos esporádicos de la enfermedad (46) (47).

La EIIC es una enfermedad poligénica que no sigue un patrón de herencia mendeliano, lo que hace difícil encontrar genes de susceptibilidad específicos, no pudiendo explicar su origen en mutaciones con una alta penetrancia, sino por una variedad de mutaciones, algunas raras y otras comunes, que influyen sutilmente en el riesgo de desarrollar la enfermedad. Los estudios con genes candidatos, realizados en cohortes de casos-contróles o tríos de descendencia afectada y ambos progenitores, estudian un gen específico con interés potencial. Se analizan las frecuencias alélicas (en el caso de casos y controles) o la transmisión de un polimorfismo de nucleótido único (SNP) a la descendencia (en el caso de tríos), de forma que, las diferencias entre pacientes y controles o en la transmisión a los hijos afectados ponen de relieve la implicación del gen investigado en la patogénesis de la enfermedad (48).

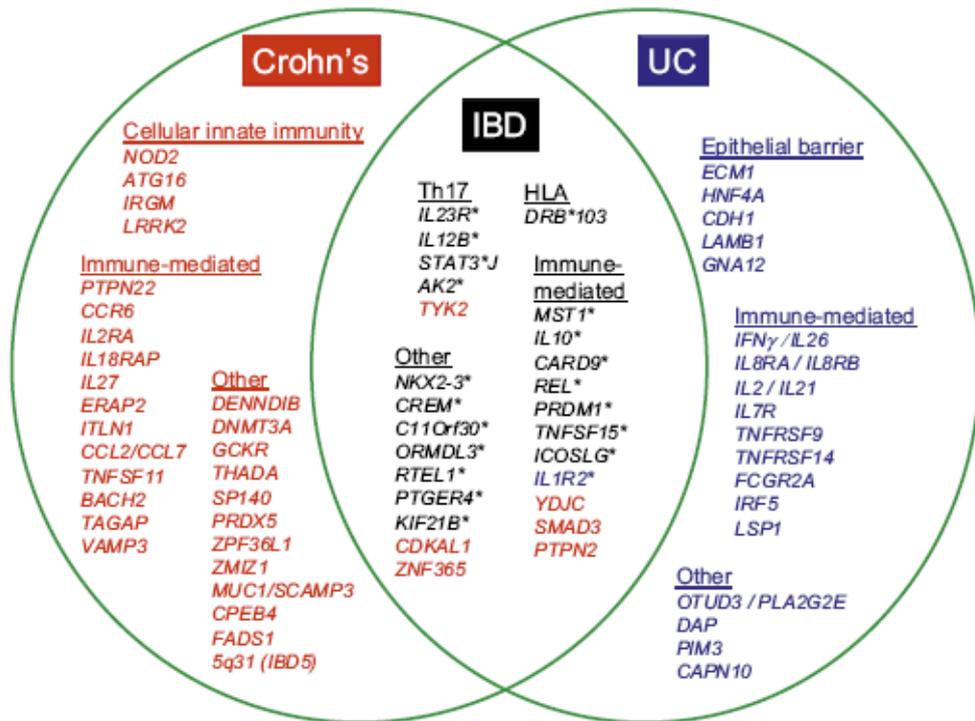
En los últimos años, gracias a la secuenciación del genoma humano y a la creación de fuentes de SNPs con acceso público, se han producido grandes avances en este grupo de enfermedades gracias al diseño de estudios de asociación del genoma (GWAs), basados en grandes poblaciones. La ventaja de este tipo de estudios frente a los previos con genes candidatos es que están “libres de hipótesis”.

En contraste con dichos estudios, un sólido análisis estadístico precede a los supuestos biológicos con los que más tarde se analizan los hallazgos en los distintos *loci*. Los datos más recientes proceden de un metaanálisis de 15 GWAs y datos del ImmunoChip (Illumina, Inc, San Diego, CA), desarrollado mediante GWAs de EIIC y otras enfermedades autoinmunes y que contiene 200.000 SNPs relevantes en estos procesos. Los objetivos de este ImmunoChip son identificar y replicar los distintos *loci* de susceptibilidad conocidos en la EIIC e identificar vías comunes con otros desórdenes de carácter inmune.

El meta-análisis incluyó más de 75.000 casos y controles y más de 1,23 millones de SNPs, identificándose 71 nuevos *loci*/genes de susceptibilidad de un total de 163, que supone una cifra significativamente mayor que en otras enfermedades complejas. De los 163 *loci* identificados, 110 confieren susceptibilidad para ambas entidades, 30 son específicos para la EC y 23 para la CU, lo que demuestra una proporción cada vez

mayor de *loci* comunes a ambas entidades y menos *loci* específicos para cada una de ellas (49).

En la **figura 3** se recogen estos datos.



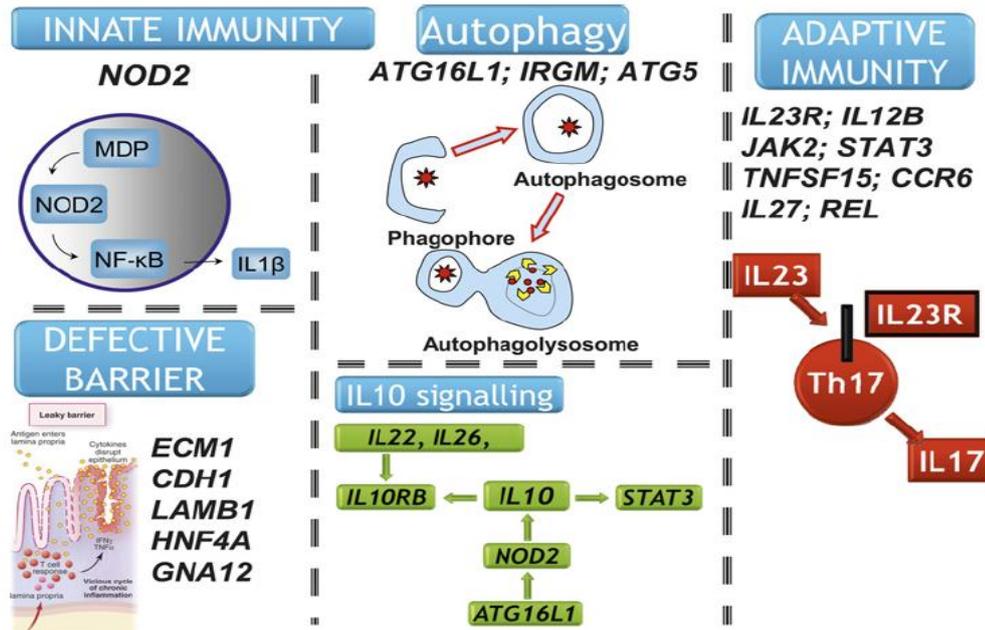
**Figura 3.** *Loci* (representados por el nombre de los genes) de susceptibilidad en la EIIC. EC (rojo), CU (azul) y EIIC (negro cuando  $p < 5 \times 10^{-8}$  en EC y CU; rojo cuando  $p < 5 \times 10^{-8}$  en EC y  $p < 5 \times 10^{-4}$  en CU; azul cuando  $p < 5 \times 10^{-8}$  en CU y  $p < 5 \times 10^{-4}$  en EC) (50).

Sin embargo, el riesgo de susceptibilidad genética que explicarían los distintos *loci* identificados en los estudios de asociación genética (GWAs) supondría sólo el 20% frente al 40% estimado según los resultados de estudios previos realizados en gemelos (51) (52). De todos estos genes de susceptibilidad, el más relevante son las tres mutaciones del dominio LRR de *NOD2* (50). Aún así, todos los genes identificados hasta el momento suponen sólo un pequeño porcentaje en cuanto a la variabilidad de esta enfermedad: 13.6% en la EC y 7.5% en la CU, lo que indica la importancia de los factores ambientales en la patogenia de la EIIC, así como del papel que posiblemente

juegue la epigenética en esa “heredabilidad oculta” (53). Gracias a los GWAs se han conseguido identificar variantes genéticas de riesgo moderado, con una prevalencia de al menos el 5% entre la población.

Se necesitan nuevas estrategias para identificar variantes con una prevalencia menor pero mayor efecto. Así, la secuenciación del exoma completo, que comprende sólo las áreas codificantes del genoma, es menos costosa que la secuenciación del genoma completo y tiende a una mayor cobertura, lo que se traduce en una mayor certeza en cuanto a nuevos descubrimientos. Se ha utilizado con éxito para identificar mutaciones únicas en EIIC en estadios muy precoces (54), así como en pacientes con una carga familiar importante o una edad precoz de comienzo de la enfermedad. Sin embargo, muchos polimorfismos que afectan a la susceptibilidad de padecer la enfermedad se localizan en áreas no codificantes del genoma: en este sentido, el proyecto ENCODE ha destacado la importancia del estudio de estas regiones no codificantes en la EIIC (54).

La EC tiene un componente genético mayor que la CU. Los genes específicos de la EC se relacionan con la respuesta inmune innata, los mecanismos de homeostasis e integridad de la barrera epitelial, la autofagia o la diferenciación linfocitaria. De todos ellos, los que con más frecuencia se han implicado en la etiopatogenia de la enfermedad son *NOD2/CARD15*, *IL23R* y *ATG16L1* (**Fig. 4**).



**Figura 4.** Vías en la etiopatogenia de la EIIc.

Los estudios más recientes sobre genética en la EIIc destacan la relación entre la respuesta inmune innata del huésped y la microbiota intestinal en la EC (53). La respuesta inmune innata constituye la primera línea de defensa frente a las infecciones. Se han identificado factores de las bacterias y virus capaces de manipular distintas vías que forman parte de dicha respuesta inmune a través de lo que se conoce como “mimetismo molecular”. Estas proteínas microbianas contienen dominios que comparten similitudes en secuencia y estructura con proteínas diana del huésped, saboteando así distintas vías de señalización de la respuesta inmune innata y rompiendo la secuencia “activación de receptor-inducción de efector”.

Distintas familias de proteínas desempeñan funciones de receptores/sensores de patógenos, existiendo dos clases de dominios que actúan como receptores: el dominio TIR para los TLRs y el dominio Pyrin o CARD para los receptores NOD-like (NLRs) y los RLRs/RLHs (genes ácido retinoico inducibles o helicinas) (48).

El “mimetismo molecular” se ha propuesto como uno de los mecanismos responsables de la activación de células auto-reactivas a través de péptidos microbianos con similitudes estructurales con péptidos del huésped, pero también hay

evidencia de infecciones sin relación antigénica o señales inflamatorias específicas que dan lugar a auto-agresividad e inducción de autoinmunidad órgano-específica, incluido el tubo digestivo. Esta pérdida de tolerancia, que es bien conocida en la EIIC, no es exclusiva para los antígenos bacterianos y se ha demostrado también con la administración de proteínas solubles (55). El concepto de “mimetismo molecular” nos ayuda a comprender la asociación entre la EC y los genes asociados a los mecanismos de autofagia, apoyando la hipótesis de que una respuesta inmune alterada frente a patógenos intracelulares contribuye a la patogenia de esta enfermedad.

Conocíamos la relación entre la CU y la enfermedad celiaca pero, aparte del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC), no se habían descrito otras regiones de susceptibilidad compartida. Gracias a los estudios de asociación (GWAs) hemos sabido del solapamiento entre la EIIC y otras enfermedades complejas poligénicas (56)(57), incluidas la espondilitis anquilopoyética (EA), psoriasis, lupus eritematoso sistémico (LES) y diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), así como la relación con algunas enfermedades de etiología no inmune, incluida la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). Además, parece existir también solapamiento con otras enfermedades gastrointestinales, incluido el cáncer colorrectal (CCR).

Se calcula que la EIIC comparte unos 51 *loci* de susceptibilidad con otras 23 enfermedades, algunas de carácter autoinmune y otras no. Además de identificar genes de susceptibilidad, los GWAs han identificado nuevos mecanismos patogénicos de la EIIC, siendo de destacar los procesos de autofagia y la inmunidad innata (50). El reto está en determinar cómo la variabilidad genética es capaz de precipitar y mantener una respuesta inflamatoria inadecuada a la flora comensal, como ocurre en la EIIC (**Fig. 5**).

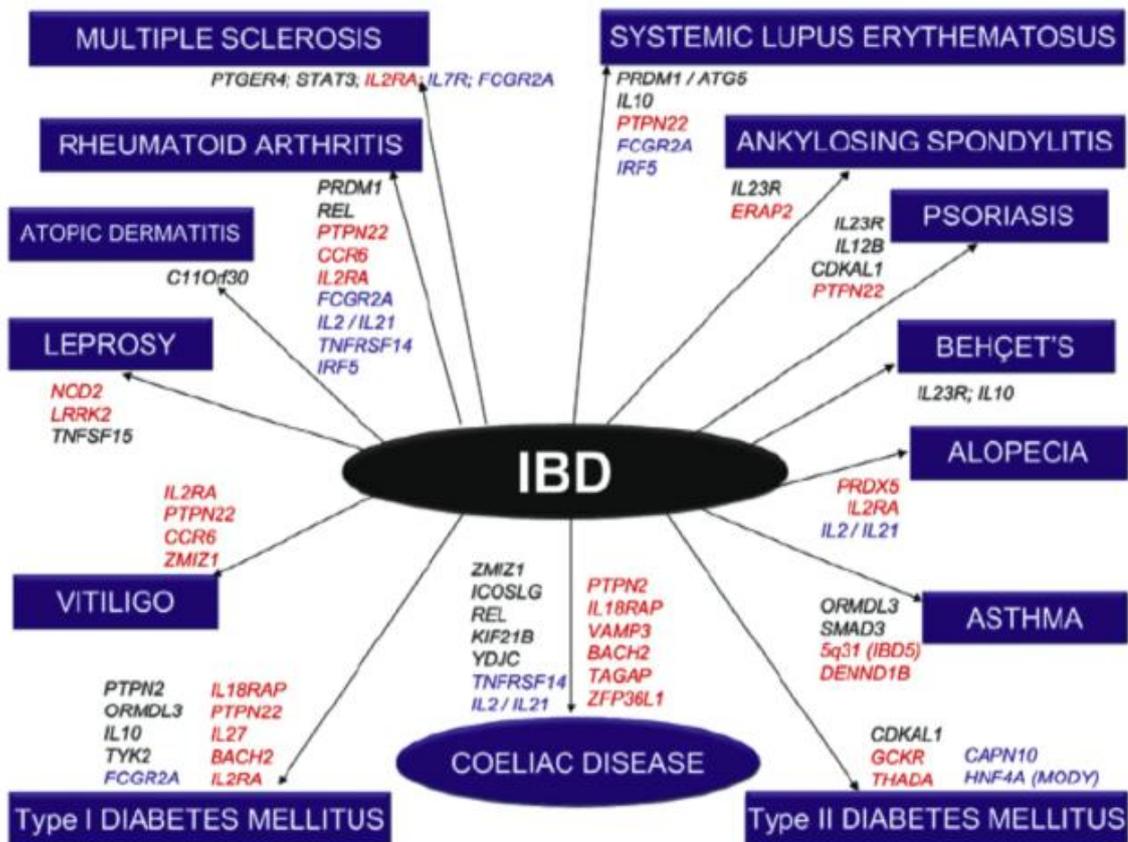


Figura 5. EIIC comparte unos 51 loci de susceptibilidad con otras 23 enfermedades: en negro EC y CU; en rojo sólo EC; en azul sólo CU.

### 3.2. Genética y fenotipo.

En la EC, *NOD2* se asocia con un fenotipo estenosante/penetrante de localización ileal (58). En la CU, el complejo *HLA DRB1\*0103* se asocia con una forma extensa y grave de la enfermedad. Salvo estas asociaciones aisladas, los intentos por relacionar fenotipo y genotipo no han tenido demasiado éxito. Se han descrito algunas asociaciones en pequeñas cohortes de pacientes, sin haberse podido reproducir dichos resultados de forma consistente. En este sentido, el estudio europeo IBDchip se ideó con el objeto de elaborar modelos matemáticos basados en la combinación de factores genéticos y datos clínicos para predecir el curso clínico y la respuesta a fármacos en los pacientes con EIIC. Para ello se analizaron alrededor de 100 mutaciones en un total de

1528 pacientes de etnia caucásica con EC durante un periodo de seguimiento superior a 10 años desde el diagnóstico.

El estudio describe, en primer lugar, mediante un análisis univariante, la asociación entre variables genéticas y determinantes clínicos: así, la presencia de mutaciones de riesgo en el gen *NOD2* mostró la asociación más potente con los determinantes clínicos más relevantes (riesgo de enfermedad ileal, protección frente a enfermedad cólica, riesgo de estenosis intestinal e intervención quirúrgica y riesgo de enfermedad complicada). La variable clínica más potentemente asociada al pronóstico de la enfermedad resultó ser el empleo precoz (en los 3 primeros años) de inmunomoduladores. En el análisis multivariante posterior se establecieron varias asociaciones, como fueron la edad de comienzo de la enfermedad y el hábito tabáquico. Con la localización de la EC: variantes en los genes *NOD2* y *SBNO2* (implicado en la vía de señalización de IL-10), así como la no utilización de inmunomoduladores durante los primeros 3 años de la enfermedad, resultaron factores predictivos independientes de localización ileal de la enfermedad, mientras que las mutaciones de *NOD2* resultaron protectoras frente al desarrollo de enfermedad de colon.

En el mismo sentido, variantes de los genes *ZPBP* (*Zona Pellucida Binding protein*, que también se ha asociado recientemente al lupus eritematoso sistémico) y *JAK2* (que codifica una tirosin-cinasa implicada en la señalización de muchas citocinas proinflamatorias por la vía JAK-STAT) resultaron factores de riesgo y protector, respectivamente, frente al desarrollo de enfermedad cólica; variantes de *IL23R*, *JAK2* y *PTGER4*, así como la no utilización de inmunomoduladores de forma precoz, se asociaron de forma independiente a la localización ileocólica.

En cuanto al comportamiento de la enfermedad, el uso de inmunomoduladores durante los 3 primeros años fue el factor predictivo independiente, en este caso de protección, que con más potencia se asoció al fenotipo estenosante (B2) de la EC en esta cohorte de pacientes. Las mutaciones de *NOD2* y *JAK2* también resultaron factores de riesgo independientes de desarrollo del fenotipo B2 (estenosante), así

como la localización ileocólica. En el caso de comportamiento perforante (B3), 3 variantes genéticas -*PRDM1*, *NOD2* (riesgo) e *IL23R* (protección)- resultaron variables predictivas independientes. Por último, la presencia de una determinada mutación de *PUS10* fue una variable protectora independiente del desarrollo de enfermedad perianal. Finalmente, los autores desarrollan una interesante escala de puntuación de riesgo genético aplicable a cada paciente individual mediante una aplicación informática, en la que se tiene en cuenta el número total de alelos de riesgo que resultaron significativos en el estudio univariante para cada uno de los principales determinantes clínicos de la EC, atendiendo a: comportamiento penetrante (*IL23R*, *LOC441108*, *PRDM1*, *NOD2*); comportamiento estenosante (*NOD2*, *JAK2*, *ATG16L1*); enfermedad perianal (*LOC441108*, *LOC449915*, *FGFR10P*); enfermedad complicada (*LOC441108*, *SLC22A23*, *TAB2*, *NOD2*); y resección intestinal (*IRGM*, *TNFSF15*, *C13ORF31*, *NOD2*).

De esta forma, los investigadores demostraron una amplia y significativa diferencia en la probabilidad de desarrollar una enfermedad penetrante o necesitar cirugía, entre aquellos pacientes con valores mínimos y aquellos casos con valores máximos en la escala de puntuación (59).

A pesar de estos avances, no se han obtenido por el momento modelos de predicción lo suficientemente precisos para ser trasladados a la práctica clínica. Distintas asociaciones están descritas en la literatura en estudios de cohortes, pero ninguna se ha conseguido replicar de forma consistente. La creación en un futuro de modelos multivariantes que integren genética, epigenética (ej. perfiles de microRNAs) y datos clínicos, resultará probablemente más útil en predecir el curso de la enfermedad.

### 3.3. Genética y comportamiento de la EIIC.

En este sentido destacan los siguientes hallazgos:

- Se han implicado varios genes relacionados con la **edad de comienzo**, especialmente con la EC de inicio precoz: *TNFRSF6B*, *CXCL9* (60), *IL23R* (61)

(62), *NOD2* (62), *ATG16L1 rs2241880* (63), *CNR1* (64), *IL-10* (65), *MDR1*. *DLG5* parece ejercer un papel protector en las niñas (66). Algunos estudios no encuentran influencia genética en la EC de inicio precoz (67) y otros encuentran relación entre *IL-10* e *IRGM* con la EC en adultos (68).

- En cuanto al **comportamiento**, algunos genes se han relacionado con un comportamiento estenosante de la enfermedad: *NOD2/CARD15* (69) (70), *TLR4* (70), *IL-12B* (71) y *CX3CR1* (72). *IL-10* e *IL-6* se han relacionado también con este fenotipo, mientras que existen variantes genéticas de distintas metaloproteinasas que serían unos excelentes genes candidatos, dado que estas moléculas juegan un papel esencial en la alteración de los mecanismos de la fibrogénesis que dan lugar al desarrollo de estenosis en la EC. Otros genes se relacionan con un comportamiento fistulizante: *NOD2*, *IRGM*, *TNF* (73), *HLADRB1* (74). El comportamiento inflamatorio se ha relacionado con variantes del *HLA* (75).
- En lo referente a la **localización**, la afectación del tracto gastrointestinal alto se ha relacionado con variantes de *NOD2* (76) y *MIF* (77). La EC ileal se ha relacionado con: *IL-10* (61), *CRP* (78), *NOD2*, *ZNF365* y *STAT3* (79). Los genes asociados a la localización ileocolónica son *3p21*, *ATG16L1*(79)y *TCF4* (*TCF7L2*). La EC colónica se ha relacionado con los genes siguientes: la región *HLA* se ha asociado con el fenotipo colónico inflamatorio, así como *TLR4* (80), *TLR1,-2,-6* (81).
- El alelo C del SNP rs6908425 de *CDKAL1* se asocia con la **enfermedad perianal** en pacientes *NOD2* (-), mientras que *OCTN* e *IL-12B* rs12704036 tienen relación con **fístulas no perianales** (82).
- *NOD2* se ha relacionado con la **cirugía** precoz en la edad pediátrica (14), estenosis y necesidad de cirugía (83), cirugías previas (69) y mayor número de cirugías (84). *HLA-G* se ha asociado con mayor riesgo de resección ileocolónica (85)

### 3.4. Genética y su influencia en los tratamientos

Es posible que en el futuro la aplicación de la genética a los tratamientos de la EIIC (farmacogenética) permita a los clínicos predecir la respuesta al fármaco y prevenir la toxicidad del mismo antes de iniciarlo. Algunos genes se han implicado en la eficacia y efectos secundarios de ciertos fármacos, aunque en este sentido son necesarios estudios amplios y prospectivos con criterios uniformes en cuanto al fenotipo de los pacientes y que correlacionen estos hallazgos con la práctica clínica.

Hasta ahora, el grado de predicción proporcionado mediante el estudio de estos factores es discreto. Carecemos también de información en cuanto a si la respuesta a determinados fármacos en la EIIC nos orientaría hacia la etiología de la enfermedad o sobre si los genes que controlan la respuesta al fármaco son los mismos que los implicados en la enfermedad. Destacamos en este aspecto los siguientes puntos:

- Los estudios sobre farmacogenética realizados hasta el momento no han encontrado asociación entre los polimorfismos del gen *CARD15* y la respuesta a distintos fármacos (corticoides, azatioprina, infliximab) utilizados en la EIIC (86). Sin embargo, sí se han relacionado con la falta de respuesta a antibióticos (87).
- En cuanto a mesalazina, se ha relacionado la variabilidad en cuanto a la acetilación del fármaco con los polimorfismos de los genes que codifican para la N-acetiltransferasa (*NAT*), dividiendo los pacientes en acetiladores lentos y rápidos. Se han identificado dos isoenzimas, *NAT1* y *NAT2*, de forma que mesalazina es acetilada en el hígado por *NAT1* transformándose en N-acetil-5 aminosalicilatos y excretada en la orina (88). Más del 50% de la raza caucásica son acetiladores lentos, en los que la transformación es mediada por *NAT2*.
- La variante G2677T del gen *MDR1* se ha implicado en la intolerancia gastrointestinal a azatioprina y metotrexato en la EIIC. Estos hallazgos sugieren un papel del gen sobre el mecanismo de acción de dichos fármacos (89) (90).

- Estudios realizados en gemelos han relacionado los polimorfismos del gen del receptor de la vitamina D (*VDR*), que está adquiriendo un papel cada vez más relevante en cuanto al tratamiento de la enfermedad, con la densidad mineral ósea en mujeres sanas y parece que cumple cierto papel en cuanto a la absorción del calcio a nivel de la barrera intestinal. Polimorfismos de este gen se han relacionado con una mayor susceptibilidad para la EC (91).
- En cuanto a la respuesta a corticoides, se ha relacionado la región *HLA-DR* con la falta de respuesta a budesonida (92), mientras que el alelo *DLG5R30Q* predice la respuesta a esteroides (93). Los genes *MIF* (inhibidor de la migración de macrófagos) (94) y *MDR* se han relacionado con la terapia esteroidea (95). El genotipo de la *IL-10* 1082 AA se asoció a corticodependencia en pacientes españoles con EIIC, mientras que el alelo 113 bis del gen *DLG5* con corticorresistencia (90) (96).
- En cuanto a la respuesta a infliximab y los genes que codifican el *TNF*, los datos no son concluyentes, como se demostró en el estudio ACCENT I. La respuesta a infliximab no se relaciona con  $TNF\alpha$ -308 (97), *TNFR1* y *TNFR2* (98), *NOD2* (81) o *CRP* (69). Los polimorfismos en el FasL/Fas y caspasa 9 pueden influir en la respuesta a infliximab en la EC luminal y fistulizante. La observación más relevante parece la asociación entre el genotipo Fas ligand-843 TT y la falta de respuesta al fármaco (99).
- La respuesta a adalimumab no se ha relacionado con las mutaciones de *NOD2*, *TLR4* 896 y *CD 14-260* (100). Se están desarrollando agentes capaces de alterar la actividad de genes y vías de señalización identificadas a través de los GWAs con el objetivo de desarrollar terapias dirigidas específicamente a la EIIC, siendo la vía de IL-12/IL-23 una de las que parecen más prometedoras. Ustekinumab, un anticuerpo monoclonal que se une a la subunidad p40 codificada por *IL12B*, se ha aprobado como tratamiento de inducción y mantenimiento en pacientes con EC refractaria a otros tratamientos inmunomoduladores y biológicos (101). Otros fármacos que actúan también

sobre componentes de la vía IL-12/IL-23 como apilimod mesilato, briakinumab (ABT-874) y SCH-900222, están siendo evaluados (102).

### 3.5. Genética y aplicación en la clínica

Hasta el momento, sólo podemos hablar de aplicabilidad clínica al campo de la farmacogenética en cuanto al mecanismo de acción de la azatioprina. El gen *TPMT*, formado por 10 exones, se localiza en el cromosoma 6p22.3 y codifica para una enzima, la tiopurina-metil-transferasa (TPMT), que metaboliza el paso de azatioprina a 6-metilmercaptopurina, que es necesario para activar el fármaco y que éste pueda ejercer su acción inmunomoduladora. Esta enzima limita la producción de nucleótidos derivados de la 6-tioguanina (6-TGNs), responsables de la toxicidad del fármaco, mediante la conversión de 6-mercaptopurina (6-MP) en ácido tioúrico y 6-metilmercaptopurina. Así, entre la población general, el 90% presenta una actividad alta para dicha enzima, el 10% intermedia y tan sólo el 0,3% presenta una actividad lenta o incluso indetectable, constituyendo éste el grupo de riesgo en cuanto a la aparición de efectos indeseables del fármaco, fundamentalmente la mielosupresión, que es dosis-dependiente (103) (104) (105). Se han identificado fundamentalmente tres alelos de la enzima: *TPMT\*2*, *TPMT\*3A* y *TPMT\*3C*, que se correlacionan con la actividad de la misma, constituyendo el 80%-95% de los casos de actividad media o baja de la enzima. Sin embargo, parecen existir otros factores que contribuyen a la mielotoxicidad, como la edad del paciente, la función renal, excipientes del fármaco o la administración concomitante con mesalazina (inhibidor reversible de la TPMT) o con alopurinol (inhibidor de la xantina oxidasa, XO) (106) , de forma que no sólo debemos tener en cuenta la actividad de la TPMT a la hora de determinar qué pacientes van a tolerar o no el fármaco. La prevalencia de ser portador de la mutación en los dos alelos es de 1/300 y, por otro lado, el no tenerla no exime de realizar los consiguientes controles analíticos rutinarios por lo que su determinación es recomendable pero no imprescindible.

## **4. GENES IMPLICADOS EN EL ESTUDIO.**

#### 4.1. NOD2/CARD15

*NOD2/CARD15* se describió en 2001 como el primer gen asociado a susceptibilidad específica para la EC (107). Forma parte de la familia de genes relacionados con la respuesta inmune innata, que constituye la primera línea de defensa de nuestro organismo. Como hemos mencionado anteriormente (3.1. Genética y etiopatogenia, p.24 y ss.), algunos microorganismos son capaces de manipular las vías de señalización del sistema inmune innato del huésped diana mediante lo que podemos denominar “mimetismo molecular”, ya que algunas de estas proteínas microbianas contienen dominios similares a las del huésped, dando lugar a que la secuencia activación del receptor-inducción de la respuesta inmune se rompa.

Entre las distintas familias de proteínas que funcionan como sensores de patógenos existen dos tipos de dominios de señalización: el dominio TIR para los *toll-like receptors* (TLRs) y el dominio Pyrin o CARD para los *NOD-like receptors* (NLRs) (108). Este “mimetismo molecular” se ha considerado como uno de los mecanismos responsables de que aparezcan células autorreactivas, pero también hay evidencia de que infecciones no mediadas por antígenos son capaces de inducir una autoinmunidad específica del órgano en cuestión, en este caso el tubo digestivo. Todavía se sigue investigando acerca de esta pérdida de tolerancia en la EIIC, ya que se ha visto que no se produce únicamente ante antígenos bacterianos, sino también con proteínas solubles administradas oralmente (48).

El gen *NOD2/CARD15* comparte similitudes con los genes “R” de las plantas que confieren resistencia a las infecciones (55). Se identificó en el *locus* IBD1 del cromosoma 16 (16q12-13) (109) y se asocia únicamente a la EC, no a la CU. Se conocen 30 polimorfismos del gen asociados a la EC, pero los más frecuentes son R702W (rs2066844), G908R (rs2066845) y 1007InsC (rs2066847), que suponen más de un 82% de los alelos mutados (110). Aunque la prevalencia varía según los estudios, alrededor del 25%-45% de los paciente con EC tiene al menos una variante del *NOD2* en comparación con la población general (15%-20%), pero esta prevalencia es mucho menor en países como Escandinavia, Irlanda y Escocia y no existe en las poblaciones

china, japonesa y afro-americana (111). *NOD2/CARD15* explica alrededor de un 20% de la predisposición genética para la EC (112).

*NOD2/CARD15* es miembro de una superfamilia de genes (Ced4-APAF1) que codifica las proteínas *nucleotide-binding site and leucine-reach repeat* (NBS-LRR), altamente implicadas en el reconocimiento intracelular de microorganismos o sus productos, y que se expresa en monocitos, macrófagos, células dendríticas, células epiteliales, células de Paneth y, según un estudio reciente, a nivel de los linfocitos B (113). Esta proteína es un receptor intracelular que reconoce un componente de los peptidoglicanos bacterianos, el N-acetil muramil dipéptido, a través de la región LRR (114). La interacción de éste con la proteína *NOD2* estimula la secreción de péptidos antimicrobianos como las alfa-defensinas (115) mediante la activación del factor nuclear de transcripción  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), fundamentalmente a nivel de las células de Paneth, donde predomina la expresión de *NOD2*. Las células de Paneth juegan un papel esencial en los mecanismos de defensa innata del huésped gracias a su capacidad de secretar péptidos antimicrobianos y proteínas.

Así, las mutaciones de este gen se han relacionado con una disminución en la expresión de péptidos antimicrobianos, las  $\alpha$ -defensinas, a nivel de dichas células, lo que disminuye la capacidad del individuo de eliminar patógenos. Las defensinas son un grupo de péptidos catiónicos antimicrobianos, de pequeño peso molecular, que poseen capacidad antibiótica frente a organismos gram-negativos, gram-positivos, hongos, virus y protozoos. Estos péptidos se liberan a la luz intestinal por estímulo de productos bacterianos, tales como el lipopolisacárido (LPS) y el muramil-dipéptido (MDP), y contribuyen a regular el número y composición de la flora colonizante, consiguiendo su efecto antimicrobiano al actuar como detergente que fragmenta la doble capa de fosfolípidos de los agentes microbianos. Sin embargo, también hay estudios que indican que participan en la educación del sistema inmune humano a través de múltiples y variados mecanismos, además de tener función de quimiotaxis y capacidad para unirse a receptores e inducir la secreción de citoquinas (116).

Actualmente se piensa que la EC es consecuencia de una invasión lenta de bacterias residentes secundaria a una producción defectuosa de los péptidos antimicrobianos, entre los que se encuentran las defensinas. Además, las diferentes localizaciones de la EC se asocian a diferentes deficiencias en la producción de defensinas epiteliales o de las derivadas de los leucocitos (117). Así, un polimorfismo que da lugar a una disminución en el número de copias del gen-2 $\beta$ -defensina se ha asociado a una mayor predisposición a la localización colónica de la enfermedad. Estos defectos se explicarían por defectos genéticos directos o indirectos y serían primarios para la patogenia de la EC, debido a que se evidencian permanentemente en la enfermedad, independientemente de la actividad clínica de la misma. Además, *NOD2* juega un importante papel en promover células T-helper-17 (Th-17) en la vía mediada por *IL-23/IL-17* (118).

La evidencia científica, en cuanto a la interacción gen-gen en la EIIC (**epistasis**), es también muy escasa. Dos estudios recientes han descrito una interacción entre *NOD2/CARD9* y *REL* en la CU (48), así como entre dichas mutaciones con otros tres genes asociados a la EIIC (*IL23R*, *DLG5*, y *OCTN1*) (119).

Aunque no existe una clara predisposición familiar, se ha observado una mayor tasa de polimorfismos de *NOD2/CARD15* entre familiares frente a controles, aunque no existen datos acerca del riesgo que tienen los primeros de desarrollar síntomas (114) (120). Se sabe que la transmisión materna de variantes de *NOD2/CARD15* tiene un efecto protector comparada a la paterna, con un índice menor de hijos afectados (121) (122). Sin embargo, con los datos de los que disponemos hasta el momento, no podemos realizar consejo genético acerca de la edad de comienzo o curso de la enfermedad entre los miembros de estas familias. En cuanto a manifestaciones extraintestinales, *NOD2/CARD15* se ha relacionado con espondiloartropatía y uveítis (123), pero no con sacroileítis (124).

*NOD2/CARD15* parece no ser únicamente un gen de susceptibilidad, sino modificador de la enfermedad (125). De entre todos los estudios publicados acerca de la relevancia clínica de las mutaciones de *NOD2/CARD15*, algunos proporcionan

información acerca de la localización de la enfermedad, en concreto la asociación con la localización ileal y del tracto intestinal superior (48), pero algunos no los asocian con localización colónica.

En otros estudios, los datos relacionan las variantes de *NOD2/CARD15* con las formas estenosantes o penetrantes de la enfermedad, así como con una edad de comienzo más temprana y una mayor necesidad de cirugía. Estas variantes se asocian no solamente a una primera resección intestinal, sino también a la necesidad de nuevos procedimientos quirúrgicos en los pacientes con EC (76). Los heterocigotos y homocigotos mutados de las distintas variables de *NOD2* presentan un riesgo aumentado de un curso de la enfermedad más agresivo (58). Incluso se ha relacionado *NOD2/CARD15* con cuadros de obstrucción intestinal aguda (126). Estas diferencias son difíciles de explicar; probablemente se deben al pequeño tamaño muestral de algunos de los estudios, a la variabilidad de la enfermedad entre poblaciones e incluso a diferencias interobservador. Está por discutir si verdaderamente existe relación entre algunas variantes del gen, las formas estenosantes y una mayor necesidad de cirugía, o si los resultados de estas investigaciones tan sólo reflejan el alto porcentaje de pacientes con EC ileal que desarrollan estenosis y requieren por tanto intervención quirúrgica.

Se han relacionado también mutaciones de *NOD2* con el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (CCR), en concreto la mutación SNP13 en pacientes con una edad por encima de los 50 años en el momento del diagnóstico de CCR (127), aunque estos hallazgos no se han confirmado en otros estudios (128).

#### **4.2. ATG16L1**

Los fenómenos de autofagia juegan un importante papel en mantener la homeostasis celular mediante la degradación de organelas celulares dañadas o disfuncionales. La degradación y *turnover* de estos componentes celulares es esencial para un correcto crecimiento, desarrollo y función celular, constituyendo un

mecanismo de supervivencia celular bajo condiciones de inanición y estrés. Durante este proceso, que es ubicuo en las células eucariotas, las organelas, proteínas y los sustratos utilizados para la generación de ATP, son englobadas en una vesícula de doble membrana (autofagosoma) que es transportada hacia los lisosomas, que puede reciclarse para la síntesis de nuevas proteínas, fosfatos de alta energía y otros componentes celulares.

El gen *ATG16L1* codifica la proteína Atg16 implicada en el aislamiento de la membrana celular para la formación del autofagosoma y en otros procesos celulares inmunológicos, como la regulación del inflamosoma y la función de las células de Paneth, células con gran formación de gránulos para procesos secretores reguladores (129). Los mecanismos de autofagia en la respuesta inmune innata frente a patógenos intracelulares parecen estar alterados en la EC (130) (131), por lo que la EC podría ser el resultado de una respuesta alterada frente a infecciones bacterianas, con un control ineficaz de la infección, disbiosis de la microbiota intestinal y, finalmente, inflamación crónica.

De entre los genes que en la EIIC se han relacionado con los mecanismos de autofagia, del que más evidencia científica disponemos es *ATG16L1*, que codifica una proteína que funciona como parte de un complejo con las proteínas de autofagia Atg5 y Atg12 (132). *ATG16L1* se expresa en muchas células del organismo, incluidas las células de Paneth (133), mediando en la exocitosis de gránulos que contienen péptidos antimicrobianos. En 2007, gracias a los GWAs, se identificó un SNP de *ATG16L1* asociado con un mayor riesgo de desarrollar EC: rs2241880 (134) (135). Dicho polimorfismo resulta en el cambio del alelo A por el alelo G en la posición 300, siendo el genotipo GG el que se asocia con la enfermedad, especialmente con la localización ileal de la misma. La prevalencia de este SNP es relativamente frecuente en la población general: 58.1% en EC frente a 51.3% en población control.

Sin embargo, aunque en las células deficitarias de *ATG16L1* se produce un deterioro generalizado de las funciones de autofagia secundario a un reclutamiento ineficaz del complejo Atg5-Atg12, el dominio afecto en la EC por el polimorfismo de

*ATG16L1* (*ATG16L1 T300A*) no es indispensable para el reclutamiento de dicho complejo. Existe no obstante evidencia de que *ATG16L1 T300A* se traduce en un manejo defectuoso de las bacterias intracelulares, como ocurre en la infección por *S.entérica ser.Typhimurium* o por cepas de *E. Coli* enteroinvasivas, que sabemos son capaces de colonizar lesiones ileales en la EC a diferencia de otras cepas de *E. Coli* (51) (136).

Otros polimorfismos de *ATG16L1* se han relacionado también con mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad, aunque de forma más débil que rs2241879 (rs13412102, rs12471449, rs6431660, rs1441090, rs2289472, rs2241879, rs3792106, rs4663396), con p valores entre  $4.1 \times 10^{-2}$  y  $3.6 \times 10^{-6}$ . De todos ellos, sólo rs6431660 mostró una débil asociación con la CU (137). En un estudio británico con una población más amplia se demostró una débil asociación entre rs2241880 y la CU (138).

En todos los estudios recientes se menciona una asociación entre *NOD2* y los mecanismos de autofagia, lo que refuerza el concepto de que la susceptibilidad de padecer la enfermedad no es consecuencia de la disfunción de un gen específico, sino de una vía común. Así, *NOD2* iniciaría dicho mecanismo reclutando *ATG16L1* hacia la membrana celular en el sitio de entrada de las bacterias, un proceso que requiere RIPK2, ATG5 y ATG7. Jugaría también un papel en la presentación de antígenos MHC clase II a las células T y contribuiría a la activación de señales proinflamatorias. Así, las células dendríticas de enfermos de Crohn que presentan mutaciones para *NOD2* o *ATG16L1* resultarían defectuosas en cuanto a los procesos de autofagia, procesamiento de bacterias y presentación de antígenos (79) (131). Además, se ha detectado una asociación estadísticamente significativa entre las variantes de *ATG16L1* y las de *NOD2/CARD15* para la EC (132).

En cuanto a la relación genotipo/fenotipo, el polimorfismo rs2241880 se ha relacionado con la localización ileocolónica de la enfermedad y con un comienzo a edades más tempranas, incluso en la infancia (139).

La mTOR kinasa es responsable de la principal señal inhibitoria que interrumpe los mecanismos de autofagia, en presencia de gran número de factores de crecimiento y

nutrientes (63) (140), por lo cual podría elegirse como diana terapéutica. Inhibidores específicos de mTOR como rapamicina (sirolimus) o everolimus actúan sobre esta señal inhibitoria induciendo la formación de gran número de proteínas ATG que resultan en la formación de un autofagosoma (141). Sin embargo, los estudios con rapamicina, un fármaco aprobado junto a otros inmunosupresores en el trasplante de órganos sólidos para evitar el rechazo del injerto (142), sólo han funcionado parcialmente en la EC refractaria a otros fármacos ahorradores de corticoides como azatioprina, metotrexato o infliximab (143). Tampoco un ensayo clínico con everolimus encontró diferencias frente a azatioprina y placebo en mantener la remisión inducida con esteroides (144).

### 4.3. p53

*p53* es un gen supresor de tumores localizado en el cromosoma 17p13 y uno de los principales reguladores de la integridad del genoma, del ciclo celular y de los mecanismos de apoptosis. En el exón 4 de *p53* existe un polimorfismo ampliamente estudiado que consiste en el cambio de una Citosina (C) por una Guanina (G), que a su vez produce un cambio de Prolina (Pro) por Arginina (Arg) en el codón 72 de la proteína, siendo este dominio esencial en la respuesta apoptótica y en la inhibición de la carcinogénesis (145). En este sentido, el alelo arginina del codón 72 es un inductor de apoptosis más potente que el alelo prolina (146). Muchos estudios han relacionado los polimorfismos de *p53* con un riesgo aumentado de desarrollar distintos tipos de cáncer. El alelo R27 se ha relacionado con un mayor riesgo de padecer cáncer gástrico y de vejiga (147) (148). El alelo 72P se ha asociado con una mayor incidencia de cáncer de pulmón (149), carcinoma escamocelular de cabeza y cuello (150) y cáncer de tiroides (151). Polimorfismos de *p53* se han asociado también a enfermedades cardiovasculares (152), abortos recurrentes (153) e ictus (154).

El epitelio intestinal juega un papel esencial en los mecanismos de defensa y homeostasis, participando en las funciones de barrera y de respuesta inmune de la mucosa (155). Una de las vías de mantenimiento de la homeostasis es a través de la regulación de los mecanismos de apoptosis de las células epiteliales del intestino. La

proliferación celular está positivamente regulada por factores de crecimiento y proto-oncogenes que estimulan la progresión del ciclo celular y controlada negativamente por genes supresores de tumores. De forma similar, la muerte celular está regulada por una serie de eventos bioquímicos intracelulares que constituyen los mecanismos de apoptosis, a través de los cuales la célula activa una maquinaria intrínseca de suicidio (156). Durante la apoptosis, las células presentan de forma característica una contracción y condensación de su citoplasma, aumento de la permeabilidad mitocondrial, condensación de la cromatina en capas al borde del núcleo, fragmentación del DNA, y la aparición de unas membranas plasmáticas que se conocen como “cuerpos apoptóticos” (157). A diferencia de la necrosis, un proceso pasivo de muerte celular que resulta en la rotura de la célula e inicio de la inflamación, los mecanismos que llevan a la apoptosis celular están controlados a través de la expresión de numerosos genes que funcionan como activadores, inhibidores, moduladores y efectores del proceso de muerte celular.

En la EIIC hay evidencia de apoptosis en las zonas de inflamación aguda (158) (159). Los fármacos anti-TNF favorecen la reparación mucosa a través de mecanismos en parte desconocidos, pero sobre todo porque incrementan la apoptosis de células mononucleares en la lámina propia (160) (161). Estudios recientes indican que *p53* es el mediador principal en estos mecanismos de apoptosis en la EIIC (162) (163). Dado que en varios estudios no se ha encontrado relación entre *p53* y el grado de inflamación mucosa, se postula que el efecto principal de *p53* en cuanto a la apoptosis de las células epiteliales del intestino es en el desarrollo de displasia (164). La colitis crónica inducida en ratones es capaz de iniciar el proceso neoplásico, lo que sugiere que la inflamación juega un papel esencial en el desarrollo de cáncer asociado a colitis (165) (166). La mutación del gen supresor de tumores *p53* es un evento temprano en esta secuencia colitis-cáncer (167) (168) mediante un fallo en la apoptosis de las células epiteliales del intestino.

A pesar de que conocemos muchos de los efectos de este SNP en cuanto a las funciones de la proteína y que parece que puede influir en el pronóstico y en la respuesta a tratamientos de distintos tipos de cáncer (169) (170), poco se sabe de su

relación con la EIIC, en cuanto a efectos clínicos y al desarrollo de CCR, datos que proceden en su mayoría de estudios realizados en CU. Algunos estudios han encontrado que el ser portador del alelo Pro multiplica por 3 el riesgo de desarrollar CCR, observando también una frecuencia aumentada de este alelo y del genotipo Pro/Pro en pacientes con CU frente a la población sana (171).

Como marcador pronóstico, el genotipo R72P de *p53* se ha relacionado con el curso clínico, duración y extensión de la EIIC, así como con antecedentes familiares de CCR (172). Se ha encontrado una mayor prevalencia del genotipo Pro/Pro en pacientes con historia familiar de EIIC, y el genotipo Arg/Pro se ha identificado como predictor de enfermedad extensa y refractaria, relacionándose con un mayor riesgo de colectomía y resistencia a corticoides en CU (173).

#### **4.4. GENES DE LA FAMILIA BCL-2 (BCL-2, BAX)**

Como ya se ha comentado, la apoptosis es un proceso fisiológico de muerte celular programada, crítica para el desarrollo de los órganos, la homeostasis de los tejidos y la eliminación de células anormales o peligrosas (174). Constituye una herramienta fundamental, junto con el sistema linfóide, para mantener la homeostasis del sistema inmune (175). En respuesta a las distintas toxinas, bacterias, virus y antígenos presentes en la luz intestinal, se han desarrollado una serie de complejos sistemas en la pared intestinal con el fin de eliminar las células dañadas y minimizar una respuesta inmune inapropiada a la microbiota no patógena. Dicha homeostasis del sistema inmune se mantiene gracias a un equilibrio entre proliferación y muerte celular, de forma que la pérdida de este equilibrio juega un papel fundamental en la patogenia de distintas enfermedades (176). Existe evidencia acerca de que la alteración en los mecanismos de apoptosis da lugar a la aparición de enfermedad, incluido el cáncer, infecciones virales, desórdenes neurodegenerativos y síndromes de inmunodeficiencia adquirida (157).

El desarrollo de autoinmunidad se piensa que es debido a un defecto en la apoptosis de los linfocitos T, un fenómeno descrito en distintas enfermedades de etiología inmune como la dermatitis atópica crónica, síndromes congénitos linfoproliferativos, artritis reumatoide y asma (175). Este mecanismo parece estar también implicado en enfermedades inflamatorias crónicas de etiología incierta como la EIIc. Durante la respuesta inmune, las células T reconocen péptidos antigénicos extraños presentados en el complejo mayor de histocompatibilidad, estimulándose a proliferar, madurar y diferenciarse en células efectoras. Sin embargo, este proceso de expansión clonal es autolimitado y las células T activadas son retiradas de la circulación y de los tejidos a través de los mecanismos de apoptosis mediados por el receptor Fas o por el TNF- $\alpha$  (177) (178), mecanismos que se conocen como la vía extrínseca. Mientras que las células T *naïve* en general no expresan el receptor Fas y son, por tanto, resistentes a la apoptosis mediada por este receptor, las células T de memoria, que son las que predominan en la mucosa intestinal normal, expresan niveles elevados de Fas (179). Las células T derivadas de segmentos de mucosa inflamada exhiben una sensibilidad disminuida a los mecanismos de apoptosis en relación con las células T procedentes de mucosa sana. En la EC pero no en la CU, las células T derivadas de la mucosa se muestran resistentes a distintas vías de señalización de apoptosis como son la privación de factor de crecimiento, interacción con los receptores Fas y CD2 y el óxido nítrico (180) (181).

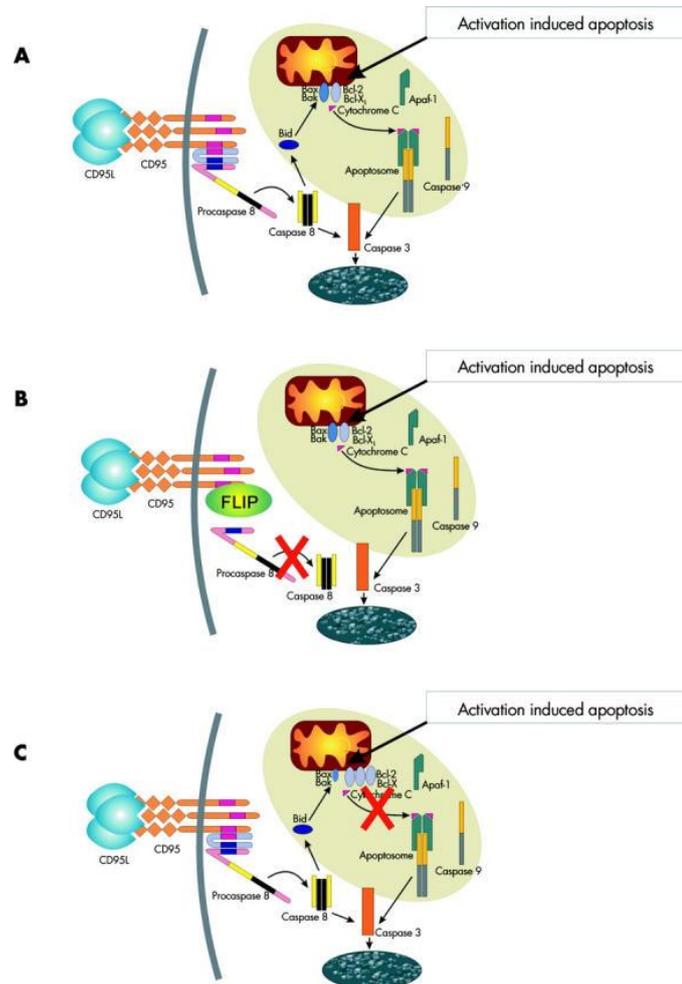
Las proteínas de la familia Bcl-2 juegan un papel esencial en regular los mecanismos de apoptosis de las células T, que es lo que se conoce como la vía intrínseca. En algunos casos, ambas vías de la apoptosis, intrínseca y extrínseca, cooperan, influyendo la una en la otra (**Fig.6**). La fase final de los mecanismos de apoptosis es inducir la cascada de caspasas con la activación de la caspasa 3, que es crucial para provocar la fragmentación y finalmente la muerte celular (182) (183). Esta familia contiene distintas proteínas con actividad antagónica: Bcl-2 y Bcl-xL son capaces de inhibir la apoptosis inducida por la activación de caspasas y promover la supervivencia celular (184), mientras que Bax es capaz de inducir apoptosis actuando sobre las mitocondrias y regulando la actividad de las caspasas (185). La alteración en

estos mecanismos de apoptosis parece jugar un papel crucial en la patogénesis de la EC, de forma que las células mononucleares de la lámina propia (LPMC) presentan resistencia a los distintos estímulos pro-apoptóticos. En este sentido, lo que marca la relativa sensibilidad o resistencia a la apoptosis entre los distintos órganos, o entre tejidos inflamados y sanos, no es el nivel absoluto de estas proteínas sino el balance entre la concentración de las mismas (186). Así, en la EC, la expresión de Bax está disminuida a nivel de las células T de la lámina propia, existiendo una *ratio* Bcl-xL/Bax aumentada, lo que favorece la resistencia a los mecanismos de apoptosis y contribuye a perpetuar la cronicidad de la inflamación (187). Al no tener lugar los mecanismos naturales que conllevan la eliminación de células inmunoreactivas, las células mononucleares de la lámina propia se acumulan en los tejidos inflamados.

Restaurar los mecanismos de apoptosis en el compartimento de las células T de la mucosa contribuye de forma esencial al tratamiento de la EC, de forma que las drogas más eficaces para el tratamiento de la enfermedad (sulfasalazina, esteroides, azatioprina, infliximab y adalimumab) son inductores potentes de apoptosis de las células T de la lámina propia, e infliximab se ha demostrado también ser capaz de inducir la apoptosis de las células T en sangre periférica (182). Así, la falta de eficacia de etanercept en el tratamiento de la EC se atribuyó a la incapacidad del fármaco de inducir apoptosis en estas células (188). Hasta ahora se creía que otra molécula anti-TNF- $\alpha$ , certolizumab pegol, que ha demostrado ser capaz de inducir y mantener la remisión en la EC, no era capaz de inducir la apoptosis de las células que expresan TNF- $\alpha$  debido a que carecía del fragmento Fc (189); sin embargo, en un estudio reciente (190) se ha demostrado también su efecto pro-apoptótico en los linfocitos T de la lámina propia en pacientes con EC.

Todo ello sugiere que la resistencia a la apoptosis de los linfocitos T de la mucosa en la EC se puede atribuir a un incremento relativo de las proteínas Bcl-2 a favor de un fenotipo antiapoptótico. Esto no ocurre en la CU, lo que sugiere que los mecanismos moleculares que regulan la muerte y supervivencia de las células T del intestino son distintos en la EC y en la CU, apoyado por el hecho de que en la CU existe una sobreexpresión del ligando Fas de las células T de la mucosa, hecho que no ocurre en

la EC (191). Estas diferencias entre las dos entidades no pueden atribuirse únicamente a la inflamación intestinal, sino probablemente a una propiedad intrínseca de las células T en la EC. Otro fenómeno descrito en la EC es un aumento de los mecanismos de apoptosis a nivel del enterocito, lo que conlleva un alteración en cuanto a su función de barrera (192).



**Figura 6.** Dos de las principales vías intracelulares que causan apoptosis. (A) La unión de FasL a CD95 (receptor Fas) conduce al reclutamiento y la activación de procaspasa 8, que posteriormente activa la caspasa 3. Una vez activada, la caspasa 3 es responsable de inducir varios eventos que conducen a la apoptosis. Una segunda vía de apoptosis se inicia por la salida del citocromo C de la mitocondria, que junto con la caspasa 9 y APAF1 forma el apoptosoma, capaz de activar la caspasa 3. La integridad de la membrana mitocondrial está regulada por las proteínas de la familia Bcl - 2: Bax y Bak como pro-apoptóticas , Bcl - 2 y Bcl - XL como antiapoptóticas . (B ) En la Colitis Ulcerosa, la resistencia a la apoptosis es consecuencia de la sobreexpresión de FLIP, que conlleva un deterioro de la vía de apoptosis mediada por la caspasa. La vía mitocondrial queda intacta. (C) Por el contrario, en la enfermedad de Crohn, la apoptosis inducida por Fas es normal, pero la vía mitocondrial se ve afectada por un desequilibrio entre factores pro- y antiapoptóticos de la familia Bcl - 2. Como consecuencia , la activación inducida por la apoptosis de las células T se deteriora.

La inflamación crónica de la mucosa intestinal en la EC se ha atribuido también a un desequilibrio en la regulación de la apoptosis de muchos otros tipos de células. Así, en la EC, la migración y acumulación de un gran número de neutrófilos (PMN) en la luz intestinal es evidente y podría estar implicada en su patogénesis (193). De hecho, esta patología se asocia a un defecto en la función de los neutrófilos (17), de forma que la persistencia del estado inflamatorio en el tracto gastrointestinal estaría causada por un retraso en la apoptosis de dichas células (18) (19). Cuando los neutrófilos son reclutados a la zona infectada o inflamada sobreviven más tiempo y así, la inducción o prevención de la apoptosis de estas células por mediadores locales de inflamación podría ser importante para controlar dicha inflamación (20) (194). Miembros de la familia de proteínas Bcl-2, incluyendo factores antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1) y proapoptóticos (Bax, Bad), están implicados en regular los mecanismos de apoptosis de los neutrófilos (195) y pueden contribuir, por tanto, a la patogenia de esta enfermedad. De hecho, cambios en el equilibrio entre factores que suprimen o activan la apoptosis pueden promover o impedir la apoptosis de neutrófilos en humanos (196).

## **5. HIPÓTESIS.**

Se han implicado en la EII, y particularmente en la EC, alteraciones de genes que influyen en el reconocimiento de bacterias de la luz intestinal (*NOD2/CARD15*), en el microbioma y en los mecanismos de la respuesta inmune, entre los que juegan un papel muy importante los fenómenos de autofagia (*ATG16L1*) y de apoptosis (*p53*, *Bcl2*, *BAX*), cuya función es primordial para el mantenimiento de la homeostasis de la “barrera intestinal”.

Estas alteraciones genéticas influyen no sólo en la aparición de la enfermedad , sino también en las diferentes formas de manifestarse.

Por otra parte, existen alteraciones genéticas, algunas no bien identificadas, que regulan la respuesta a los diferentes tratamientos que se utilizan en esta enfermedad.

No se han llevado a cabo estudios en este sentido en nuestra población, por lo que consideramos justificado realizar ensayos casos-contróles de los genes que regulan estos aspectos en nuestros pacientes.

## **6.OBJETIVOS.**

**Estudiar polimorfismos seleccionados de *NOD2*, *ATG16L1*, *p53*, *BCL2*, *BAX*, relacionados con la respuesta inmune innata, procesos de autofagia y muerte celular (apoptosis) en una muestra de pacientes con Enfermedad de Crohn de nuestra población.**

- **Analizar si existe alguna relación entre dichas variantes y una mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad, el comportamiento de la misma, la necesidad de cirugía y la respuesta a fármacos.**
  
- **Estudiar si la asociación de diferentes alelos mutados se relaciona con una mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad .**
  
- **Estudiar si la asociación de diferentes alelos mutados se relaciona con el curso de la misma.**

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS.**

## **Tipo de estudio**

Estudio observacional casos-controles.

### **7.1. Población:**

#### **7.1.1. Pacientes**

Se incluyeron 102 pacientes con Enfermedad de Crohn, seleccionados de forma aleatoria, seguidos en nuestra consulta de EIIC.

En todos ellos, el diagnóstico de EC se estableció mediante criterios clínicos, radiológicos, histológicos, y endoscópicos (criterios de Lennard-Jones). La extensión y comportamiento de la enfermedad se definieron mediante exámen endoscópico (ileocolonoscopia con gastroscopia en algunos casos) y técnicas radiológicas (entero-RM, tránsito intestinal, ecografía, TAC, cápsula endoscópica), y se clasificaron según los criterios de Montreal 2005.

#### **7.1.2. Controles**

101 sujetos sin EIIC de la población de Salamanca en los que se habían estudiado los polimorfismos de los genes implicados en este estudio, cuyos datos constaban en los archivos de la Unidad de Genética y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

## 7.2. Recogida y procesado de las muestras

A todos se les recogió una muestra de sangre periférica, previo consentimiento informado.

Las muestras de DNA se obtuvieron a partir de células mononucleadas de sangre periférica. Todos los pacientes y controles firmaron un consentimiento informado previo a la recogida de la muestra (ver **ANEXO I**).

## 7.3. Recogida de datos clínicos

Se revisaron las historias de todos los pacientes y se completaron mediante entrevista presencial o telefónica en aquellos casos en los que la información era incompleta. Los datos se incluyeron en una tabla de Excell para posterior tratamiento estadístico.

## 7.4. Variables clínicas

- **EDAD:** Se recogió la edad de cada paciente de la muestra en el momento del diagnóstico. Para los cálculos estadísticos se estratificaron en 3 grupos, de acuerdo con la edad al diagnóstico, según la clasificación de Montreal: A1  $\leq 16$  años, A2  $> 16$  y  $\leq 40$ , A3  $> 40$ .
  
- **GÉNERO:** Hombre o mujer.

- **ANTECEDENTES FAMILIARES DE EIIC:** Se tuvo en cuenta si los pacientes tenían familiares de primer o de segundo grado con antecedentes de EIIC .
  
- **HÁBITO TABÁQUICO:** Se definieron dos categorías, fumador y no fumador. Entre los primeros se incluyeron a todos aquellos que en algún momento habían fumado, aunque no fuesen fumadores activos cuando se diagnosticó la enfermedad, sin entrar en otras consideraciones dado el tamaño de la muestra.
  
- **FENOTIPO DE LA ENFERMEDAD:** Se agruparon los pacientes siguiendo la clasificación de Montreal, descrita previamente.
  
- **MANIFESTACIONES EXTRAINTESTINALES:** Se diferenciaron entre los que las tenían y no. Se tuvieron en cuenta la artropatía, eritema nodoso, pioderma gangrenoso o uveítis.
  
- **ENFERMEDAD PERIANAL AL DIAGNÓSTICO Y/O EN LA EVOLUCIÓN:** La enfermedad perianal (EPA) se consideró como una entidad independiente de las formas fistulizantes, valorando la presencia de fisuras, fístulas o abscesos. La evaluación de la enfermedad perianal se realizó mediante exploración bajo anestesia (EBA), ecografía endoanal (EE) y resonancia (RM) pélvica.
  
- **INGRESOS POR BROTE DE LA ENFERMEDAD O POR PROBLEMAS ASOCIADOS A LA MISMA:** Se analizó si el paciente había requerido ingreso hospitalario en el transcurso de su enfermedad, así como el número de ingresos. Asimismo se tuvo en cuenta si alguno de esos ingresos fueron debidos a la aparición de

alguna de las complicaciones siguientes: megacolon, hemorragia digestiva, perforación o absceso intraabdominal.

➤ **USO DE CORTICOIDES EN EL PRIMER BROTE, DESARROLLO DE CORTICODEPENDENCIA O CORTICORRESISTENCIA:**

- a. Utilización de tratamiento esteroideo en el primer brote de la enfermedad.
- b. Aparición de corticodependencia, definida como la reaparición de la sintomatología al reducir la dosis o la necesidad de dos ciclos de corticoides en un periodo de seis meses o de tres ciclos en un año.
- c. Corticorresistencia: se definió como la ausencia de respuesta a tratamiento con corticoides a dosis adecuadas durante un periodo de tiempo preestablecido antes de iniciar el tratamiento, entre una y dos semanas en función de la gravedad del cuadro.

➤ **UTILIZACIÓN DE INMUNOSUPRESORES O DE BIOLÓGICOS:**

Se analizó si el paciente, durante el curso de la enfermedad, había recibido tratamiento con fármacos inmunomoduladores: azatioprina, 6-mercaptopurina o metotrexato, o con fármacos biológicos: infliximab o adalimumab.

Para cada uno de ellos se tuvo en cuenta:

- Fecha de inicio del fármaco.
- Dosis recibida.
- Indicación: inducción de la remisión; mantenimiento; profilaxis de la recurrencia post-quirúrgica; enfermedad fistulizante; manifestaciones extra-intestinales.

- Respuesta clínica: Mejoría de la sintomatología o cierre de menos del 50% de las fístulas sin/con otro tratamiento concomitante.
- Remisión clínica: Desaparición de la sintomatología o cierre de al menos el 50% de las fístulas en ausencia de otro tratamiento concomitante.
- Aparición de efectos adversos y si su aparición obligó a la retirada del fármaco.

➤ **CIRUGÍAS:**

- a. Se evaluó si el paciente había requerido cirugía o no en relación con la EIIC.
- b. Si se había procedido a
  - i. resección intestinal.
  - ii. en el caso de la EPA, resección de fístulas y/o drenaje de abscesos con colocación de sedales.
- c. Se analizó también si el paciente había recibido más de una intervención quirúrgica.

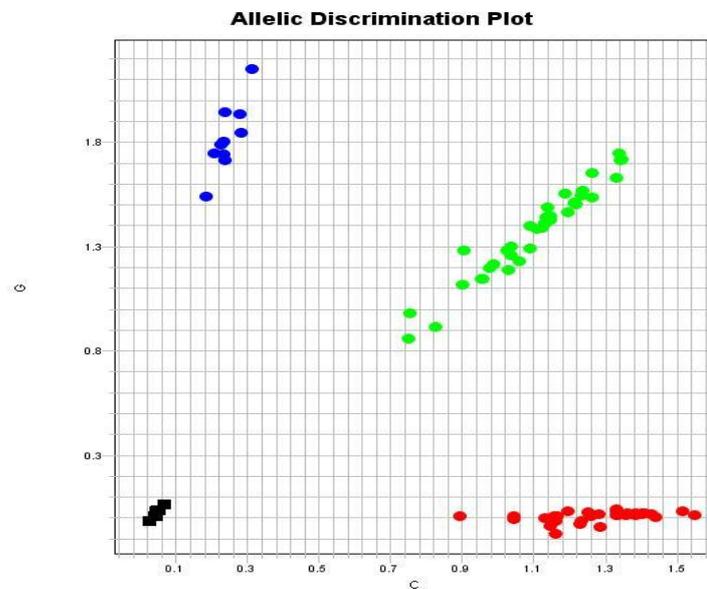
## **7.5. Metodología de los estudios genéticos**

### **7.5.1. Metodología de análisis de polimorfismos**

Los siguientes polimorfismos se analizaron mediante sondas TaqMan en un termociclador StepOne Plus de Applied Biosystems, previa amplificación de las

secuencias específicas de los genes por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) (Fig.7).

GEN	SNP
<b>NOD2/CARD15</b>	rs2066844
<b>ATG16L1</b>	rs2241880
<b>BAX</b>	rs4645878
<b>BCL-2</b>	rs2279115
<b>P53</b>	rs1042522



**Figura 7.** Placa de genotipado de ATG16L1: en azul los homocigotos AA; en rojo los homocigotos GG; en verde los heterocigotos AG; en negro los alelos indeterminados.

El estudio del polimorfismo del gen p53 (rs1042522) se realizó mediante PCR-RFLP. Para ello se amplificó por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) un fragmento de 291 pb del exón 4 y posteriormente se digirió con endonucleasa de restricción, **tablas 10-11**.

Las reacciones de amplificación se realizaron con el producto comercial PCR Master Mix (*Promega*) (DNA Taq polimerasa; dATP, dGTP, dCTP, dTTP; MgCl<sub>2</sub>). Se llevaron a cabo en un volumen de 25 µL:

- 12.5 µL de Master Mix
- 10.5 µL de agua libre de nucleasas
- 0.5 µL de cada oligo cebador (sentido=*forward* y anti-sentido=*reverse*)
- 1 µL de DNA

Como control negativo, para asegurar que no existía contaminación y que las reacciones eran específicas para cada muestra de partida, se preparó un tubo de reacción con todos los componentes antes citados excepto el DNA molde.

**Tabla 10.** *Secuencia de los oligonucleótidos forward y reverse en dirección (5'-3') utilizados para la amplificación del codón 72 del gen P53.*

	Secuencia de los oligonucleótidos (5'-3')
P53 Codón 72 forward	5'-TCTACAGTCCCCCTTGCCGT-3'
P53 Codón 72 reverse	5'-CTGACCGTGCAAGTACAGA-3'

Para amplificar el codón 72 del gen *p53* se utilizó el programa que se muestra en la tabla 11:

**Tabla 11.** Programa utilizado para la amplificación por PCR del codón 72 del gen *p53*.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95°C	5 min.	1
Desnaturalización	95°C	30 seg.	40
Anillamiento	58°C	30 seg.	40
Extensión	72°C	30 seg.	40
Extensión final	72°C	10 min.	1

Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador automático.

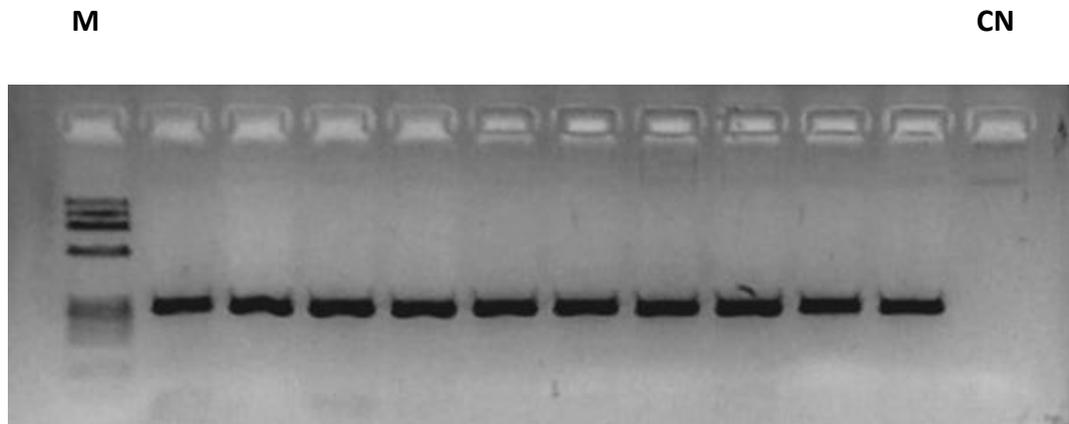
### Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos amplificados mediante PCR se separaron por su tamaño mediante electroforesis en gel horizontal de agarosa al 2% preparado con tampón TBE. El primer pocillo del gel se reservó para el marcador de tamaño. En cada pocillo se echaron 4  $\mu$ L de DNA, mientras que en el primer pocillo para el marcador se echaron 8  $\mu$ L.

La electroforesis se llevó a cabo con una diferencia de potencial constante de 120 voltios durante 15-20 minutos.

Tras la electroforesis, los fragmentos amplificados se visualizaron en el gel de agarosa utilizando *SYBR®Safe DNA Gel Stain*, que actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del DNA, emitiendo fluorescencia al ser expuesto a la luz UV (254 nm), **Fig.8**. Los resultados obtenidos se observaron mediante un

sistema de fotografía digital (*Kodak DC40*) acoplado a un programa informático de tratamiento de imágenes (*Kodak Digital Science 1D*).



**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa. M: Marcador. CN: Control negativo que indica que la muestra no está contaminada.

#### Digestión con endonucleasa

El producto de PCR se digirió con la enzima de restricción BstUI (*Bsh12361*, *Fermentasas*), que reconoce el sitio de corte generado en la secuencia por el cambio de Citosina por Guanina (Fig.9). Para llevar a cabo la digestión, se mezclaron 12  $\mu\text{L}$  del producto de PCR con 10 unidades de la enzima de restricción (1  $\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de su tampón correspondiente y 7  $\mu\text{L}$  de agua. Todo ello se incubó durante 4-6 horas a 37°C.

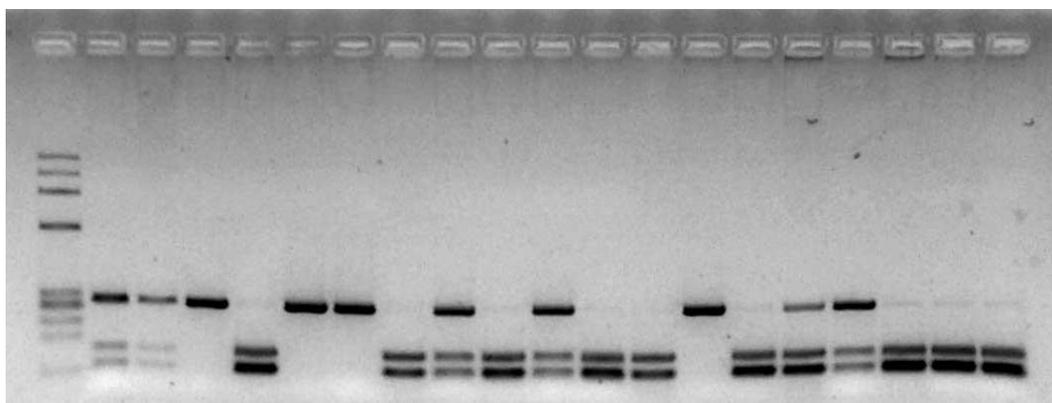


**Figura 9.** Sitio de reconocimiento de la enzima BstUI en la secuencia del exón 4 amplificada para el estudio del polimorfismo del codón 72. Cuando la Guanina es sustituida por Citosina desaparece el punto de corte.

Los fragmentos generados tras la digestión se separaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 3%, generando tres patrones de bandas diferentes correspondientes a los tres genotipados posibles (**Fig.10**):

- Genotipo C/C (Homocigoto Prolina): un fragmento de 291 pb.
- Genotipo G/G (Homocigoto Arginina): un fragmento de 165 pb y otro de 126 pb.
- Genotipo C/G (Heterocigoto Arginina/Prolina): un fragmento de 291 pb, otro de 165 pb y otro de 126 pb.

**M 1 2 3 4 5 6 7**



**Figura 10.** *Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los fragmentos amplificados por PCR para el estudio del polimorfismo del codón 72, donde se observan los tres genotipados posibles: los pacientes 3, 5 y 6 son homocigotos para el alelo Prolina (homocigotos normales), los pacientes 4 y 7 son homocigotos para el alelo Arginina (homocigotos mutados) y los pacientes 1 y 2 son heterocigotos. M: Marcador.*

## 7.6. Métodos estadísticos

La descripción de las variables cualitativas se realizó mediante porcentajes y las continuas con los descriptivos básicos de media y desviación típica. Para analizar la asociación entre genes y los casos y controles, así como la asociación entre las variables clínicas, se utilizó el test chi-cuadrado para tablas de contingencia. Se aplicó la regresión logística para el análisis del riesgo del polimorfismo, estimando los odds-ratio y sus intervalos de confianza al 95%.

La interacción gen-gen se analizó mediante los árboles de Clasificación y Regresión (CART, *Classification And Regression Tree*). Este análisis es un proceso iterativo de partición de la muestra total en base a las asociaciones de los predictores con la variable respuesta. La división se considera siempre binaria. El mejor predictor en cada segmentación se elige de entre todos el que presenta mayor valor del test del *ratio* de verosimilitud o p-valor asociado al mismo. El proceso de partición finaliza cuando no se detecta asociación entre las predictoras y la variable de interés, o bien el tamaño de muestra es muy pequeño. El tamaño muestral máximo elegido para finalizar el proceso de segmentación fue de 20 individuos. Para evitar el incremento de error tipo I debido a la gran cantidad de comparaciones que se realizan en este análisis se ha utilizado la penalización descrita en Sall (197), que no es tan restrictiva como la propuesta por Bonferroni y usualmente utilizada en estos procedimientos. Para la valoración del ajuste del modelo se utilizó el pseudo  $R^2$  de McFadden y la *deviance*. La validación de los árboles de clasificación se realizó mediante dos procedimientos: el *5-fold cross validation*, donde la muestra original se divide en cinco submuestras y se utiliza para validar el ajuste del árbol obtenido; el segundo procedimiento se utiliza para validar el poder de predicción del modelo. Este método consiste en la división al azar de la muestra en dos submuestras, la primera se utiliza para la elaboración del árbol (muestra de entrenamiento) y la segunda para la validación del poder de clasificación del mismo (muestra de validación). La submuestra de validación se generó al azar y está constituida por el 25% de las observaciones. Este análisis también se utilizó para

investigar las interacciones genes-ambiente en la explicación de la estructura de las variables clínicas que determinan la enfermedad como son: edad al diagnóstico; manifestaciones extraintestinales; localización y fenotipo; la presencia de enfermedad perianal; necesidad de cirugía; necesidad de corticoides en el primer brote; necesidad de azatioprina; necesidad de anti-TNF y necesidad de infliximab. Como variable ambiental se consideró el tabaco.

El software utilizado para la realización de los análisis descriptivos, regresión logística y tablas de contingencia fue: *IBM SPSS versión 19*. Para el análisis de los árboles de clasificación se utilizó el algoritmo implementado en *SAS JMP versión 7*.

Los niveles de significación utilizados para todos los análisis fueron los habituales de 0,05 y 0,01.

## **8. RESULTADOS.**

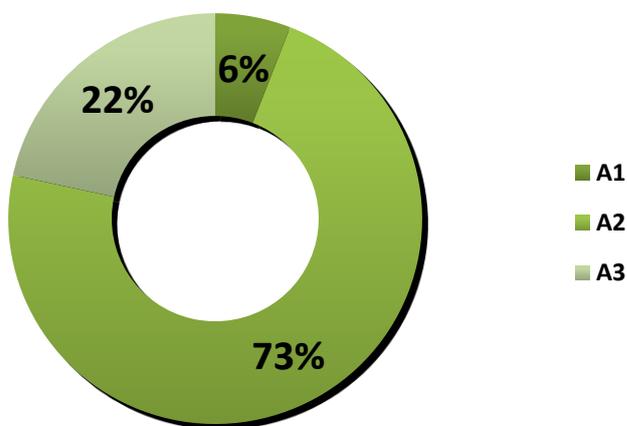
### 8.1. Características clínicas de los pacientes.

En cuanto a la edad al diagnóstico, la muestra está compuesta por pacientes relativamente jóvenes, con predominio de los diagnosticados entre 16 y 40 años (A2 de la clasificación de Montreal, 72.5%). Los porcentajes de los distintos grupos de edad (A1, A2, A3) se muestran en la **tabla 12**.

**Tabla 12.** Grupos por edad al diagnóstico.

EDAD	MEDIA	MEDIANA	RANGO:
	31,69 ±14.024	28	9 - 81
<b>Por grupos de edad (MONTREAL 2005)</b>			
A1	6	5,9%	
A2	74	72,5%	
A3	22	21,6%	

### Grupos por edad al diagnóstico



En la **tabla 13** se describen (en número y porcentaje) el resto de las variables analizadas. En cuanto al sexo, la relación varón/mujer muestra un ligero predominio del sexo femenino (56,9%), sin diferencias significativas. Fumaban o habían fumado el 51,96%. El 13,6% refería tener familiares de primer grado con EIIC.

La localización (ileal-L1, colónica-L2, ileocolónica-L3) de la enfermedad más frecuente fue la ileocolónica (41,2%), y sólo en dos pacientes se detectó afectación del tracto digestivo alto (L4). El fenotipo (inflamatorio-B1, estenosante-B2, fistulizante-B3) inflamatorio fue el más prevalente al diagnóstico (54,9%) y un porcentaje significativo presentaba enfermedad perianal (n=37; 36,3%).

En el 41,2% se asoció la presencia de manifestaciones extraintestinales, con predominio de la afectación articular.

Se describe la utilización de corticoides: en el primer brote los recibieron el 38,2% y en el curso de la enfermedad casi todos fueron tratados con estos fármacos (91,2%). Azatioprina se utilizó en el 65,7% y el 74,6% de los tratados presentó respuesta, aunque sólo se alcanzó remisión en el 32,8%.

Se administraron fármacos biológicos anti-TNF al 33,3%. Se pautó infliximab al 29,4% y respondieron, con descenso de la actividad, el 73,3% de los tratados. Como sucedió con azatioprina, sólo presentaron remisión menos de la mitad (36,7%) con infliximab. A 12 pacientes de esta muestra se les administró adalimumab y por su escaso número se ha desestimado el análisis estadístico de este aspecto.

Fueron sometidos a cirugía el 52%, de los cuales necesitaron resección intestinal el 39,2%, generalmente por estenosis o subsidiaria de estricturoplastia.

**TABLA 13.** Variables clínicas (n y %) analizadas en el estudio.

	<b>N</b>	<b>%</b>
Sexo	V 44	43,1%
	M 58	56,9%
Tabaco	<b>53</b>	<b>51,96%</b>
AF EIIC (I grado)	<b>14</b>	<b>13,6 %</b>
L1	<b>40</b>	<b>39,2%</b>
L2	<b>18</b>	<b>17,6%</b>
L3	<b>42</b>	<b>41,2%</b>
± L4	<b>2</b>	<b>2%</b>
B1	<b>56</b>	<b>54,9%</b>
B2	<b>25</b>	<b>24,5%</b>
B3	<b>21</b>	<b>20,6%</b>
M. Extraintestinales	<b>42</b>	<b>41,2%</b>
Perianal (EPA)	<b>37</b>	<b>36,3%</b>
GCS 1º brote	<b>39</b>	<b>38,2%</b>
GCs	<b>93</b>	<b>91,2%</b>
AZA	<b>67</b>	<b>65,7%</b>
Respuesta a AZA	<b>50</b>	<b>49%</b>
Remisión con AZA	<b>22</b>	<b>21,6%</b>

---

*Variables clínicas (n y %) analizadas en el estudio. (Cont.)*

Anti-TNF	<b>34</b>	<b>33,3%</b>
IFX	<b>30</b>	<b>29,4%</b>
Respuesta a IFX	<b>22</b>	<b>21.5%</b>
Remisión con IFX	<b>11</b>	<b>10,8%</b>
Cirugía	<b>53</b>	<b>52%</b>
Resección intestinal	<b>40</b>	<b>39,2%</b>

---

## 8.2. Asociaciones entre variables clínicas.

Se procedió a realizar estudios de asociación entre las distintas variables clínicas. No hemos encontrado relación entre el sexo, el tabaco o el tener antecedentes familiares de EIC con la necesidad de diferentes tratamientos, ni con la respuesta a los mismos o con la necesidad de intervención quirúrgica. Esta ausencia de significación estadística entre las variables clínicas analizadas puede ser debida al tamaño muestral de nuestro estudio.

En algunas de estas asociaciones, como reflejo de tendencias, cuando hemos encontrado una diferencia absoluta entre los porcentajes de al menos un 20%, hemos resaltado dicho resultado por haberlo considerado clínicamente relevante, aunque no hubiera significación estadística. También en el caso contrario, que haya una asociación estadísticamente significativa no quiere decir que exista una asociación experimentalmente significativa.

Por este motivo hemos incluido en esta descripción únicamente las tablas de aquellos resultados que han resultado estadísticamente significativos. Para ver el resto de las tablas de contingencia, remitimos a **ANEXO II**.

### 8.2.1. EDAD AL DIAGNÓSTICO (Clasificados en A1-A2-A3):

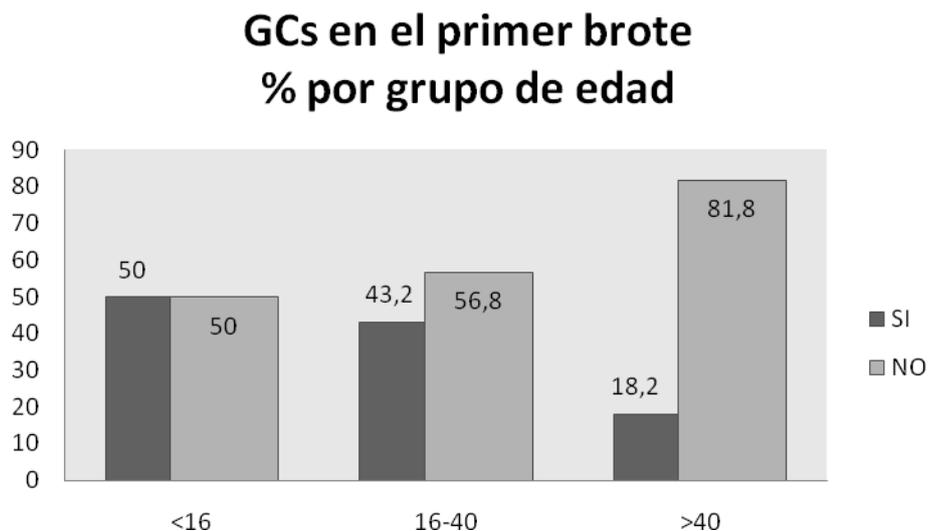
El hecho de pertenecer a un grupo familiar con otros sujetos afectos de EIIC no se asoció con la edad al diagnóstico ( $p=0,271$ ). No obstante, hay una diferencia importante entre los porcentajes correspondientes al grupo de edad por encima de 40 años, de manera que este grupo representa el 35,7% entre los que tienen familiares con EIIC, y en la muestra representa el 21,8%. Este hecho no contradice el fenómeno de la anticipación genética que suele ocurrir en las enfermedades con componente hereditario, ya que no se ha analizado si estos familiares son antecedentes o sucesores.

No se detectó asociación entre la localización y la edad al diagnóstico ( $p=0,574$ ), aunque hay grupos con frecuencias bajas, lo que impide sacar conclusiones.

Dentro de cada fenotipo de enfermedad, en el caso de los más jóvenes el mayor porcentaje es fistulizante (50%), en la franja de edad entre 16 y 40 años es inflamatorio (59,5%), y en mayores de 40 años es estenosante (36,4%). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas ( $p=0,147$ ), probablemente por el tamaño de la muestra, con pocos sujetos en el grupo A1 (menores de 16 años).

Los porcentajes más altos dentro de los que precisaron intervención quirúrgica correspondieron a los diagnosticados antes de los 16 años (66,7%) y los que lo fueron por encima de 40 (59%), mientras que el grupo que ha requerido menos cirugías ha sido el A2, entre 16-40 años (51,4%). Sin embargo no se detectó significación estadística entre esta necesidad de cirugía y la edad al diagnóstico ( $p=0,524$ ), siendo los perfiles similares.

En cuanto a los fármacos, se utilizaron corticoides en el primer brote en el 38,2% del total. Existió una tendencia a la significación ( $p=0,087$ ), dado que fue menos frecuente su utilización en el grupo de mayores de 40 años, como se muestra en la **figura 11**.



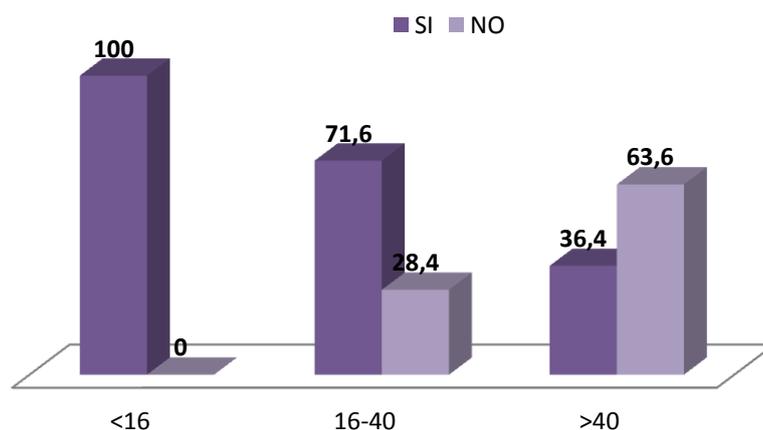
**Figura 11.** % de pacientes que precisaron GCs en el primer brote según el grupo de edad.

Se ha detectado asociación entre la necesidad de AZA y la edad al diagnóstico ( $p=0,002$ ). 67 (65,7%) pacientes del total de la muestra recibieron azatioprina: dentro de los que precisaron azatioprina se incluyen el 100% de los menores de 16 ( $n=6$ ), el 71,6% de 16-40 ( $n=53$ ) y el 36,4% de los >40 ( $n=8$ ). Los resultados se muestran en la **tabla 14**.

**Tabla 14.** Necesidad de AZA según el grupo de edad al diagnóstico.

			< 16 AÑOS	16-40 AÑOS	> 40 AÑOS	total
AZATIOPRINA	NO	Recuento	0	21	14	35
		% dentro de edad	0,0%	28,4%	63,6%	34,3%
	SI	Recuento	6	53	8	67
		% dentro de edad	100%	71,6%	36,4%	65,7%

### Uso de AZA % por grupo de edad



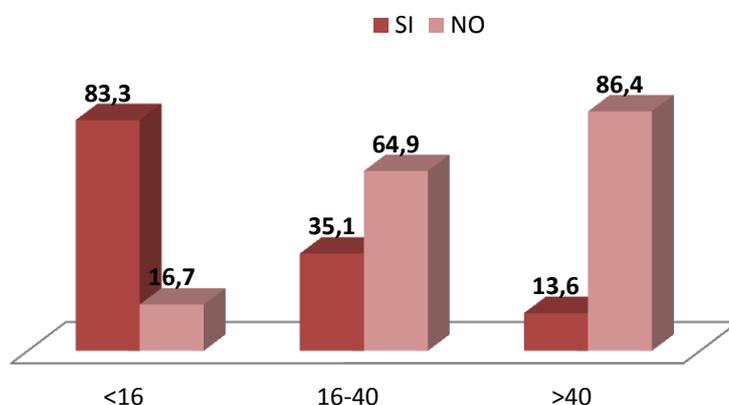
Sin embargo, no se ha detectado asociación entre la edad al diagnóstico y la respuesta ( $p=0,554$ ) o remisión con AZA ( $p=0,158$ ). De los 67 pacientes que recibieron azatioprina, 50 (74,6%) respondieron al fármaco, sin diferencias significativas entre los tres grupos de edad (A1 83,3%; A2 71,7%; A3 87,5%). Sólo 22 de los 67 (32,8%) pacientes que recibieron azatioprina alcanzaron la remisión, aunque el grupo mayor de 40 años alcanzó la remisión en un porcentaje superior (A1=33,3%; A2= 28,3%; A3= 62,5%). Al representar este último grupo una “n” muy pequeña, es lógico que esta tendencia no se refleje en la significación.

Se ha detectado asociación muy potente entre la administración de anti-TNF y la edad al diagnóstico ( $p=0,005$ ). De los 34 pacientes que necesitaron anti-TNF (33,3%), 5 de 6 pacientes (83,3%) del grupo A1 recibieron anti-TNF frente a 26 de 74 (35,1%) de A2 y 3 de 22 (13,6%) de A3. Los resultados se muestran en la **tabla 15**.

**Tabla 15.** Necesidad de anti-TNF según el grupo de edad al diagnóstico.

			edad			Total
			< 16 AÑOS	16-40 AÑOS	> 40 AÑOS	
Adalimumab o Infliximab	NO	Recuento	1	48	19	68
		% dentro de edad	16,7%	64,9%	86,4%	66,7%
	SI	Recuento	5	26	3	34
		% dentro de edad	83,3%	35,1%	13,6%	33,3%

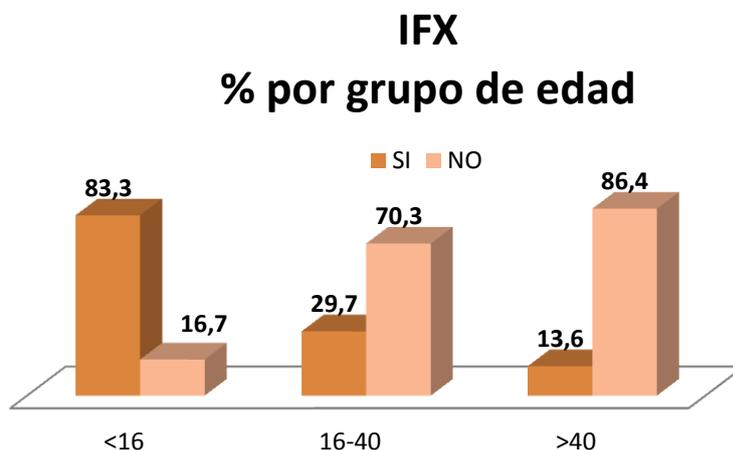
### Utilización de anti-TNF % por grupo de edad



De igual manera se ha detectado asociación entre la necesidad de IFX y la edad al diagnóstico ( $p=0,004$ ). La mayoría de los pacientes tratados con anti-TNF lo fueron con IFX al menos como primer anti-TNF (30 de 34): 83,3% de A1, 29,7% de A2, 13,6% de A3, siendo los de menor edad los que más lo necesitaron. Los resultados se muestran en la **tabla 16**.

**Tabla 16.** Necesidad de IFX según el grupo de edad al diagnóstico.

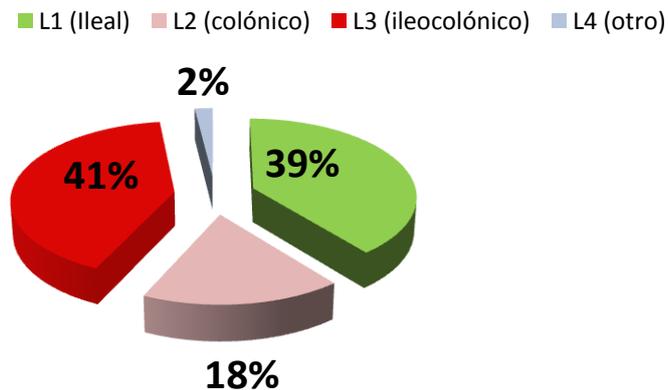
			edad			Total
			< 16 AÑOS	16-40 AÑOS	> 40 AÑOS	
infiximab	NO	Recuento	1	52	19	72
		% dentro de edad	16,7%	70,3%	86,4%	70,6%
	SI	Recuento	5	22	3	30
		% dentro de edad	83,3%	29,7%	13,6%	29,4%



Al igual que ocurre con AZA, no se ha detectado asociación entre la edad al diagnóstico y el alcanzar respuesta ( $p=0,911$ ) o remisión ( $p=0,205$ ) con IFX. 22 pacientes de los 30 que recibieron infiximab respondieron al fármaco, sin grandes diferencias entre los grupos (80% en A1, 72,7% en A2 y 66,7% en A3). 11 pacientes

alcanzaron la remisión frente a 8 que respondieron al fármaco sin alcanzarla. Aunque no se detectó significación, hay diferencias en los perfiles de porcentajes de edad para los que presentan remisión y los que no la presentan.

### 8.2.2. LOCALIZACIÓN (clasificados en L1-L2-L3)



No se ha detectado significación estadística entre la localización de la enfermedad y los antecedentes familiares de EII (p=0,594). En los que no tienen antecedentes los mayores porcentajes se distribuyen entre la localización ileal (90%) e ileocolónica (85,7%), mientras que en los que sí, el porcentaje es similar entre los grupos (10% en L1; 22,2% en L2; 14,3% en L3).

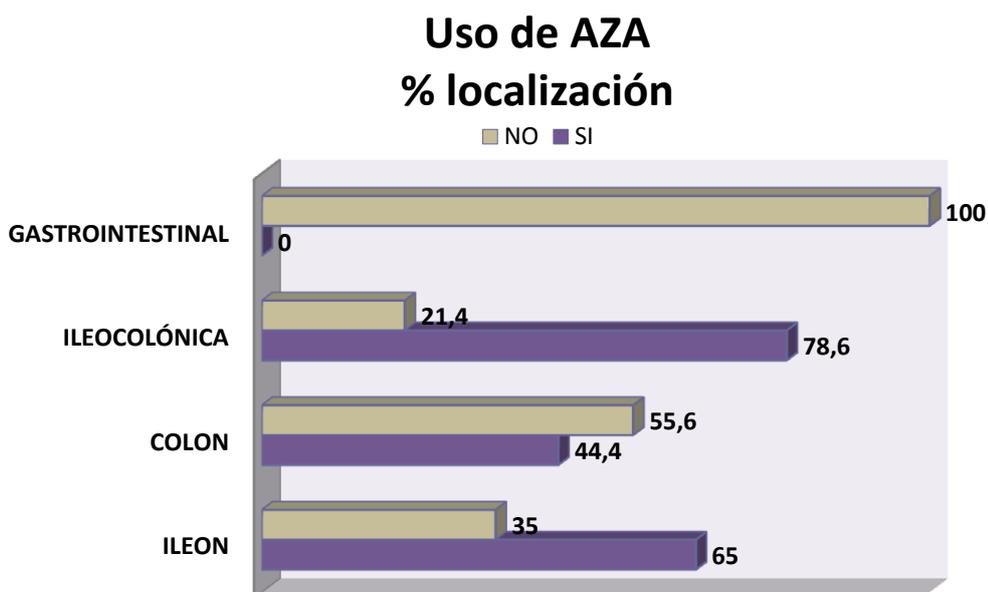
Tampoco se ha detectado asociación con la necesidad de cirugía (p=0,132). En los que no precisaron cirugía los porcentajes son parecidos entre ellos, mientras que en los que precisaron cirugía son mayores para las localizaciones ileal (57,5%) e ileocolónica (57,1%). Existe una tendencia a la significación entre la localización y la necesidad de corticoides en el primer brote (p=0,079), estableciéndose la mayor necesidad nuevamente en las localizaciones ileal (30%) e ileocolónica (47,6%).

Se ha detectado asociación con la necesidad de AZA (p=0,015). De los 67 pacientes que recibieron azatioprina, los mayores porcentajes se sitúan de nuevo

entre las localizaciones ileal (65,0%) e ileocolónica (78,6%). Los resultados se muestran en la **tabla 17**.

**Tabla 17.** Necesidad de AZA y localización de la EC.

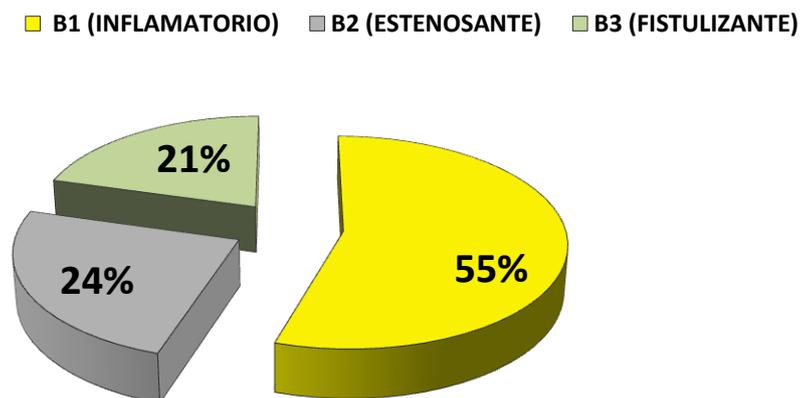
			localizacion				Total
			ILEON	COLON	ILEOCOLÓNICO	GASTROINTEST	
AZATIOPRINA	NO	Recuento	14	10	9	2	35
		% dentro de localización	35,0%	55,6%	21,4%	100,0%	34,3%
	SI	Recuento	26	8	33	0	67
		% dentro de localización	65,0%	44,4%	78,6%	0,0%	65,7%



No hemos encontrado asociación entre la localización y la respuesta ( $p=0,354$ ) o remisión con AZA ( $p=0,795$ ): en cuanto a la respuesta, los porcentajes son similares entre los distintos grupos (L1,L2,L3 y L4) y en cuanto a la remisión, las mayores diferencias se sitúan entre las localizaciones ileal (36,4%) e ileocolónica (54,5%).

La asociación de la utilización de anti-TNF y las diferentes localizaciones tampoco ha dado resultados estadísticamente significativos. Pero la tendencia de porcentajes va a favor de su uso en las localizaciones ileal e ileocolónica, aunque más pronunciadas en esta última (55,9%). Tampoco se ha detectado asociación entre la localización y la necesidad ( $p=0,197$ ), respuesta ( $p=0,224$ ) o remisión con IFX ( $p=0,629$ ).

### 8.2.3. FENOTIPO/COMPORTAMIENTO (Clasificados en B1-B2-B3).



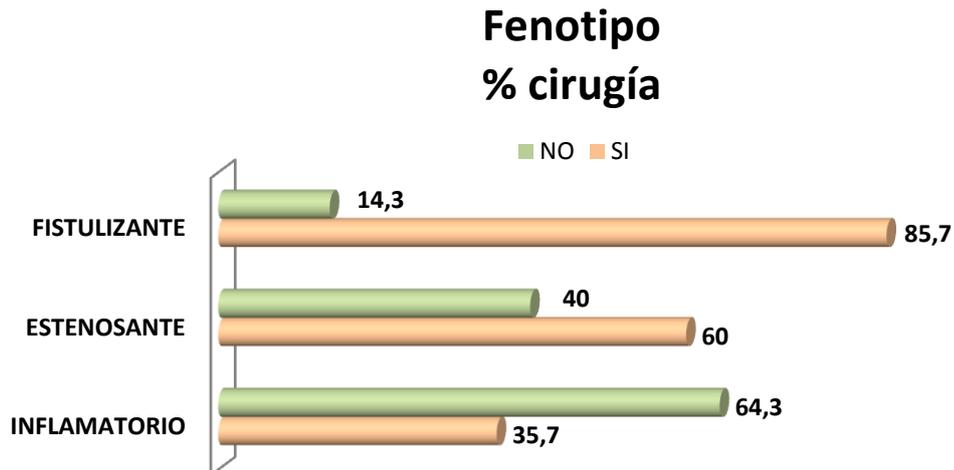
No se ha detectado significación entre el fenotipo y los antecedentes familiares de EIIC ( $p=0,728$ ). Los perfiles del comportamiento de la enfermedad en función de los antecedentes familiares son parecidos, si bien hay una diferencia en

el comportamiento fistulizante, con un mayor porcentaje de pacientes entre los que sí tienen antecedentes familiares de primer grado con EIIC (19% de B3 frente a 12 % en B2 y 12,5% en B1).

Se ha detectado asociación potente entre el fenotipo y la necesidad de intervención quirúrgica ( $p=0,000$ ). Entre los que no precisaron cirugía el comportamiento de la enfermedad mayoritariamente es inflamatorio (64,3%), mientras que entre los que precisaron intervención quirúrgica el mayor porcentaje corresponde a las formas fistulizantes (85,7%) y estenosantes (60%), como se muestra en la **tabla 18**.

**Tabla 18.** Necesidad de cirugía y fenotipo de la EC.

			comportamiento			Total
			INFLAMATORIO	ESTENOSANTE	FISTULIZANTE	
cirugía si o no	NO	Recuento	36	10	3	49
		% dentro de comportamiento	64,3%	40,0%	14,3%	48,0%
	SI	Recuento	20	15	18	53
		% dentro de comportamiento	35,7%	60,0%	85,7%	52,0%

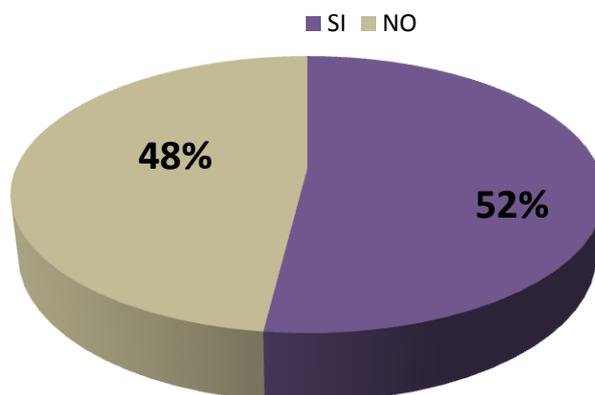


Aunque sin encontrar significación estadística entre el fenotipo y la necesidad de corticoides en el primer brote ( $p=0,303$ ), dentro del comportamiento inflamatorio el porcentaje de pacientes que recibieron corticoides (42,9%) es mayor frente a las formas estenosantes (40%) y fistulizantes (23,8%).

Tampoco se ha detectado asociación con la necesidad ( $p=0,249$ ), respuesta o remisión con AZA. Dentro de los pacientes que recibieron azatioprina, el mayor porcentaje lo representa el comportamiento fistulizante (81%), aunque sin grandes diferencias con el resto de los grupos (62,5% en B1 y 60% en B2).

Existe sin embargo una tendencia a la significación ( $p=0,065$ ) con la necesidad de anti-TNF, de forma que los pacientes con fenotipo fistulizante fueron los que más lo recibieron (52,4%). Dentro de las formas estenosantes es mayor el porcentaje de pacientes que no recibió el tratamiento (80% vs. 20%). No se detectó asociación entre el fenotipo y la necesidad ( $p=0,233$ ), respuesta ( $p=0,753$ ) y remisión ( $p=0,658$ ) con IFX. Responden mejor los pacientes con fenotipo fistulizante (77,8%) y en cuanto a porcentajes de remisión, son similares entre los distintos perfiles de comportamiento.

## 8.2.4. CIRUGÍA



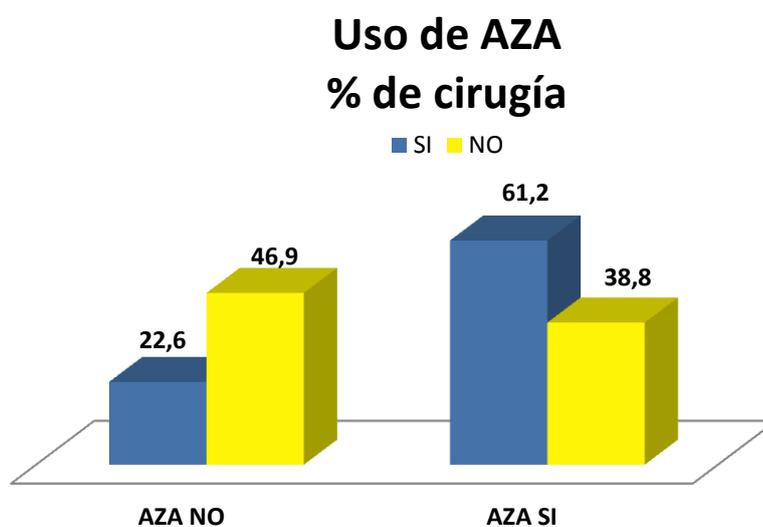
No se ha detectado significación estadística entre el haberse sometido a cirugía y tener antecedentes familiares de EIIC ( $p=0,676$ ). Tampoco se ha detectado asociación con la necesidad de corticoides en el primer brote ( $p= 0,606$ ), siendo los porcentajes similares entre los pacientes que precisaron intervención quirúrgica y los que no.

Se ha detectado asociación con la necesidad ( $p=0,01$ ) y la respuesta ( $p=0,038$ ) a AZA, como se muestra en las **tablas 19-20**.

**Tabla 19.** *Uso de AZA y cirugía.*

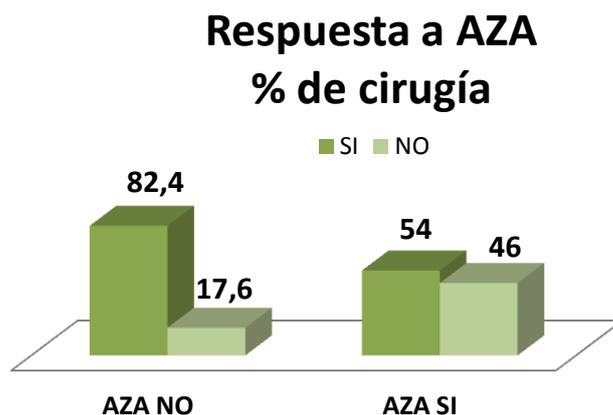
			cirugía si o no		Total
			NO	SI	
AZATIOPRINA	NO	Recuento	23	12	35
		% dentro de AZATIOPRINA	65,7%	34,3%	100,0%
		% dentro de cirugía	46,9%	22,6%	34,3%
	SI	Recuento	26	41	67
		% dentro de AZATIOPRINA	38,8%	61,2%	100,0%
		% dentro de cirugía	53,1%	77,4%	65,7%

Si nos fijamos en los porcentajes, vemos que del conjunto de individuos que no tomaron azatioprina, el 22% precisó cirugía. Sin embargo, de los que sí tomaron el fármaco, el 61,2% fue intervenido. Si realizamos la interpretación por columnas, podemos decir que de los pacientes que precisaron intervención quirúrgica, el 77,4% tomó azatioprina, mientras que de los que no, el 53,1% recibió el fármaco. Esto se explica porque los pacientes con un curso más grave de la enfermedad son los que reciben más fármacos inmunomoduladores y los que más se operan.



**Tabla 20.** Respuesta a AZA y cirugía.

			cirugía si o no		Total
			NO	SI	
NO	Recuento	3	14	17	
	% dentro de RESPUESTA AZATIOPRINA	17,6%	82,4%	100,0%	
SI	Recuento	23	27	50	
	% dentro de RESPUESTA AZATIOPRINA	46,0%	54,0%	100,0%	

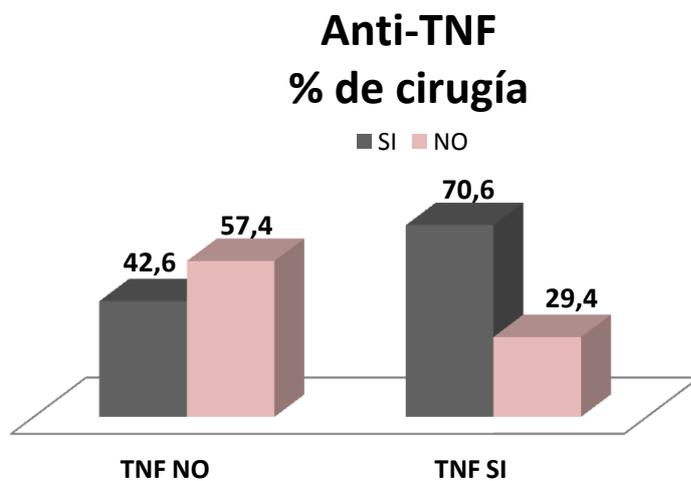


Se observa cómo, de los que no obtuvieron respuesta, el 82,4% precisó intervención quirúrgica frente al 54% de aquellos que sí respondieron al fármaco. Sin embargo, no se ha detectado asociación ( $p=0,189$ ) entre la necesidad de cirugía y la remisión con AZA. De los pacientes que no presentaron remisión, el 66,7% precisó intervención quirúrgica, mientras que de los que sí la alcanzaron, el 50% fue intervenido.

Se ha detectado asociación entre la necesidad de anti-TNF ( $p=0,008$ ) y de IFX ( $p=0,019$ ) con precisar intervención quirúrgica, así como entre alcanzar la remisión con IFX y la cirugía ( $p=0,02$ ). No se detectó asociación con la respuesta a IFX ( $p=0,027$ ), pero hay que tener en cuenta que sólo 8 pacientes no tuvieron respuesta. En este sentido, aunque no se ha obtenido significación estadística, hay gran diferencia en los porcentajes, ya que de los que no presentaron respuesta el 87,5% precisaron cirugía frente al 63,6% de los que sí respondieron. Los resultados se muestran en las **tablas 21-23**.

**Tabla 21.** Administración de anti-TNF y cirugía.

			cirugía si o no		Total
			NO	SI	
adalimumab o infiximab	NO	Recuento	39	29	68
		% dentro de adalimumab o infiximab	57,4%	42,6%	100,0%
	SI	Recuento	10	24	34
		% dentro de adalimumab o infiximab	29,4%	70,6%	100,0%



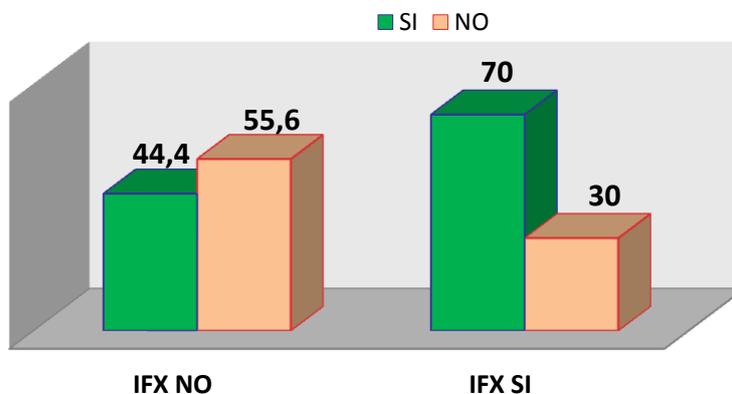
De los pacientes que recibieron anti-TNF un 70,6% fueron intervenidos, mientras que de los que no los usaron, un 42,6% precisaron cirugía. Interpretado de otra forma, de los no operados, un 20,4% tomaron anti-TNF, mientras que de los que sí precisaron intervención quirúrgica, un 45,3% tomaron anti-TNF. Al igual

que con los resultados de azatioprina, ésto se entiende porque los pacientes que precisaron fármacos biológicos fueron aquellos con un curso más grave de la enfermedad y por tanto los que más cirugías precisaron.

**Tabla 22.** Necesidad de IFX y cirugía.

			cirugía si o no		Total
			NO	SI	
infiximab	NO	Recuento	40	32	72
		% dentro de infiximab	55,6%	44,4%	100,0%
	SI	Recuento	9	21	30
		% dentro de infiximab	30,0%	70,0%	100,0%

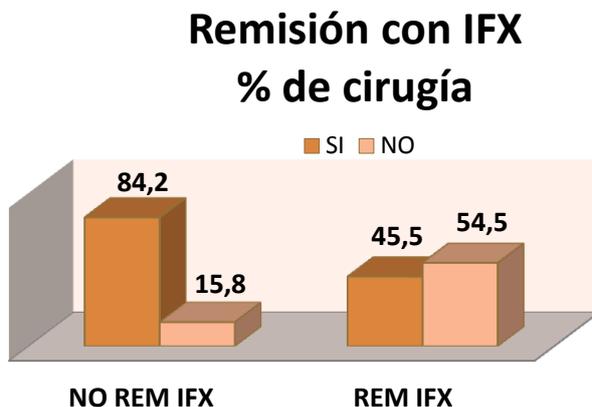
### Pacientes con IFX % de cirugía



La asociación se observa en que de los que han tenido este tratamiento el 70% ha requerido intervención quirúrgica frente al 44,4% de los que no lo recibieron. Nuevamente interpretamos los resultados en función de un curso más grave de la enfermedad.

**Tabla 23.** Remisión con IFX y cirugía.

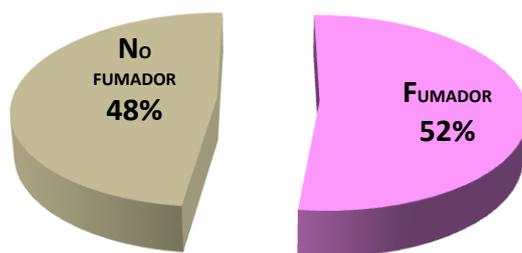
			cirugía si o no		Total
			NO	SI	
remisión con infliximab	NO	Recuento	3	16	19
		% dentro de remisión con infliximab	15,8%	84,2%	100,0%
	SI	Recuento	6	5	11
		% dentro de remisión con infliximab	54,5%	45,5%	100,0%



Examinando los porcentajes se observa una diferencia importante, ya que de los que no presentaron remisión el 84,2% fueron intervenidos frente al 45,5% de lo que sí la alcanzaron.

### 8.2.5. TABACO

No se ha detectado asociación entre el tabaco y ninguna de las variables clínicas analizadas, probablemente por el tamaño de la muestra.



### 8.3. Asociaciones de polimorfismos con variables clínicas y epidemiológicas.

#### 8.3.1. COMPARACIÓN DE POLIMORFISMOS CON GRUPO CONTROL (SUSCEPTIBILIDAD)

##### 8.3.1.1. Análisis del riesgo del polimorfismo NOD2 en función del modelo

NOD2	CASO; N(%)	CONTROL; N(%)	OR (IC al 95%)	P
Alelo C	22(10.5)	188(89.5)	24.119(14.354;40.527)	<b>0.000</b>
Alelo T	180(92.8)	14(7.2)	1	
Homocigoto CC	0(0)	88(100)		<b>0.000</b>
Heterocigoto CT	22(64.7)	12(35.3)		
Homocigoto TT	79(98.8)	1(1.2)		

	Genotipo	CASO; N(%)	CONTROL; N(%)	OR	IC del 95%	p <sup>a</sup>
<b>Codominante</b>	TT	79(98.8)	1(1.2)	1		
	CT	22(64.7)	12(35.3)	43.091	(5.309;349.781)	<b>0.000</b>
	CC	0(0)	88(100)	-	-	-
<b>Dominante</b>	TT	79(98.8)	1(1.2)	1		
	CT-CC	22(18)	100(82)	259.091	(47.369;272.183)	<b>0.000</b>
<b>Recesivo</b>	CC	0(0)	88(100)	1		
	CT-TT	101(88.6)	13(11.4)	-	-	-

En el gen NOD2, el homocigoto más frecuente en los enfermos de Crohn es el TT (98.8%) y el más frecuente en el grupo control el CC (100%). El alelo T es más frecuente en los enfermos de Crohn que en el grupo control (92.8% versus 7.2%), siendo las diferencias existentes en los porcentajes estadísticamente significativas ( $p=0.000$ ).

En la segunda de las dos tablas anteriores se analiza el modelo de herencia: en el modelo codominante se observa que la presencia del genotipo homocigoto TT tiene un riesgo aumentado de ser enfermo de Crohn; de 43,091 (5,309; 349,781) veces más que la presencia del heterocigoto CT, siendo este resultado estadísticamente significativo ( $p=0.000$ ).

En el modelo dominante, se observa que la presencia del genotipo homocigoto TT multiplica por 259,091 (47,369; 272,183) veces la probabilidad de ser enfermo de Crohn frente a la presencia del genotipo homocigoto CC o el heterocigoto CT. Sin embargo, como cabría esperar, en el modelo recesivo vemos cómo la presencia del genotipo homocigoto CC es protector frente a la enfermedad de Crohn ( $OR=1$ ).

## 8.3.1.2. Análisis del riesgo del polimorfismo P53 en función del modelo

P53	CASO; N(%)	CONTROL; N(%)	OR (IC al 95%)	P
Alelo C	75(52.5)	68(47.5)	1	0.612
Alelo G	129(49.8)	130(50.2)	1.111(0.739;1.673)	
Homocigoto CC	23(67.6)	11(32.4)		<b>0.013</b>
Heterocigoto CG	29(38.7)	46(61.3)		
Homocigoto GG	50(54.3)	42(45.7)		

	Genotipo	CASO; N(%)	CONTROL; N(%)	OR	IC del 95%)	p <sup>a</sup>
Codominante	GG	50(54.3)	42(45.7)	1		
	CG	29(38.7)	46(61.3)	1.888	(1.016;3.510)	<b>0.044</b>
	CC	23(67.6)	11(32.4)	0.569	(0.249;1.302)	0.182
Dominante	GG	50(54.3)	42(45.7)	1		
	CG-CC	52(47.7)	57(52.3)	1.305	(0.748;2.276)	0.348
Recesivo	CC	23(67.6)	11(32.4)	1		
	CG-GG	79(47.3)	88(52.7)	2.329	(1.068;5.081)	<b>0.034</b>

En el gen p53, el homocigoto más frecuente en los enfermos de Crohn es el CC (67.6%) y el más frecuente en el grupo control el heterocigoto CG (61.3%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,013$ ). El alelo C es más frecuente en los enfermos de Crohn que en el grupo control (52.5% versus 47.5%), no resultando esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.612$ ).

En cuanto al modelo de herencia, en el modelo codominante se observa que la presencia del genotipo homocigoto GG tiene un riesgo aumentado de ser enfermo de Crohn; de 1,888 (1,016; 3,510) veces más que la presencia del heterocigoto CG, siendo

este resultado estadísticamente significativo ( $p=0,044$ ), y de 0,569 (0,249; 1,302) veces más que la del homocigoto CC, aunque este último resultado carece de significación estadística ( $p=0,182$ ).

En el modelo dominante, se observa que la presencia del genotipo homocigoto GG multiplica por 1,305 (0,748; 2,276) veces la probabilidad de ser enfermo de Crohn frente a la presencia del genotipo homocigoto CC o el heterocigoto CG, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,348$ ).

En el modelo recesivo, la presencia del genotipo homocigoto CC multiplica por 2,329 (1,068; 5,081) veces la probabilidad de ser enfermo de Crohn frente a la presencia del genotipo homocigoto GG o el heterocigoto CG, siendo este resultado estadísticamente significativo ( $p=0,034$ ).

### 8.3.1.3. Análisis del riesgo del polimorfismo ATG16L1 en función del modelo

ATG16L1	CASO; N(%)	CONTROL; N(%)	OR (IC al 95%)	P
Alelo A	79(45.2)	96(54.8)	1.410(0.950;2.093)	0.088
Alelo G	123(53.7)	106(46.3)	1	
Homocigoto AA	18(50)	18(50)		<b>0.025</b>
Heterocigoto AG	43(41.7)	60(58.3)		
Homocigoto GG	40(63.5)	23(36.5)		

	Genotipo	CASO; N(%)	CONTROL; N(%)	OR	IC del 95%)	p <sup>a</sup>
Codominante	GG	40(63.5)	23(36.5)	1		
	AG	43 (41.7)	60(58.3)	2.427	(1.273;4.627)	<b>0.007</b>
	AA	18(50)	18(50)	1.739	(0.748;3.991)	0.192
Dominante	GG	40(63.5)	23(36.5)	1		
	AG-AA	61(43.9)	78(56.1)	2.224	(1.205;4.103)	<b>0.011</b>
Recesivo	AA	18(50)	18(50)	1		
	AG-GG	83(50)	83(50)	1	(0.486;2.056)	1

En el gen ATG16L1, el homocigoto más frecuente en los enfermos de Crohn es el GG (63,5%) y el más frecuente en el grupo control es el heterocigoto AG (58,3%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,025$ ). El alelo G es más frecuente en los enfermos de Crohn que en el grupo control (53.7% vs 46.3%), tendiendo esta diferencia a la significación estadística ( $p=0,088$ ).

En cuanto al modelo de herencia, en el modelo codominante se observa que la presencia del genotipo homocigoto GG tiene un riesgo aumentado de ser enfermo de Crohn; de 2,427 (1,273; 4,627) veces más que la presencia del heterocigoto AG y de 1,739 (0,748; 3,991) veces más que la del homocigoto AA, siendo el primer resultado estadísticamente significativo ( $p=0,007$ ), aunque no este último ( $p=0,192$ ).

En el modelo dominante, se observa que la presencia del genotipo homocigoto GG multiplica por 2,224 (1,205; 4,103) veces la probabilidad de ser enfermo de Crohn frente a la presencia del genotipo homocigoto AA o el heterocigoto AG, siendo este resultado estadísticamente significativo ( $p=0,011$ ).

Sin embargo, en el modelo recesivo los genotipos AA, AG y GG se distribuyen igual entre enfermos de Crohn y controles, si bien esta resultado no resulta significativo ( $p=1$ ).

#### 8.3.1.4. Análisis del riesgo del polimorfismo BAX en función del modelo

BAX	CASO; N(%)	CONTROL; N(%)	OR (IC al 95%)	P
Alelo G	167 (49.4)	171(50.6)	1	0.523
Alelo A	37 (53.6)	32(46.4)	0.845(0.503;1.419)	
Homocigoto GG	66(48.9)	69(51.1)		0.314
Heterocigoto GA	35(57.4)	26(42.6)		
Homocigoto AA	1(25)	3(75)		

	Genotipo	CASO; N(%)	CONTROL; N(%)	OR	IC del 95%	p <sup>a</sup>
<b>Codominante</b>	GG	66(48.9)	69(51.1)	1		
	GA	35(57.4)	26(42.6)	0.711	(0.386;1.307)	0.272
	AA	1(25)	3(75)	2.870	(0.291;28.286)	0.367
<b>Dominante</b>	GG	66(48.9)	69(51.1)	1		
	GA-AA	36(55.4)	29(44.6)	0.771	(0.425;1.396)	0.389
<b>Recesivo</b>	AA	1(25)	3(75)	1		
	GA-AA	101(51.5)	95(48.5)	0.314	(0.032;3.067)	0.293

En el gen BAX, el genotipo más frecuente entre los enfermos de Crohn es el GA (57,4%) y el más frecuente en el grupo control el GG (51,1%). El alelo A es más frecuente en los enfermos de Crohn que en el grupo control (53,6% *versus* 46,4%), aunque los porcentajes son similares y por tanto las diferencias no son estadísticamente significativas ( $p=0,523$ ).

En cuanto al modelo de herencia, en el modelo codominante se observa que la presencia del genotipo homocigoto GA tiene un riesgo aumentado de ser enfermo de Crohn; de 0,711 (0,386; 1,307) veces más que la presencia del homocigoto GG y de 2,870 (0,291; 28,286) veces más que la del homocigoto AA, sin alcanzar estos resultados la significación estadística ( $p=0,272$ ).

En el modelo dominante, se observa que la presencia del genotipo GA-AA multiplica por 0,771 (0,425; 1,396) veces la probabilidad de ser enfermo de Crohn frente a la presencia del genotipo homocigoto GG ( $p=0,389$ ). En el modelo recesivo vemos cómo la presencia del genotipo homocigoto AA es protector frente a la enfermedad de Crohn (OR=1;  $p=0,293$ ).

## 8.3.1.5. Análisis del riesgo del polimorfismo BCL2 en función del modelo

BCL2	CASO; N(%)	CONTROL; N(%)	OR (IC al 95%)	P
Alelo C	99(45.8)	117(54.2)	1.460(0.987;2.160)	0.058
Alelo A	105(55.3)	85(44.7)	1	
Homocigoto CC	22(43.1)	29(56.9)		0.087
Heterocigoto CA	55(48.2)	59(51.8)		
Homocigoto AA	25(65.8)	13(34.2)		

	Genotipo	CASO; N(%)	CONTROL; N(%)	OR	IC del 95%)	p <sup>a</sup>
<b>Codominante</b>	AA	25(65.8)	13(34.2)	1		
	CA	55(48.2)	59(51.8)	2.063	(0.961;4.430)	0.063
	CC	22(43.1)	29(56.9)	2.535	(1.062;6.048)	<b>0.036</b>
<b>Dominante</b>	AA	25(65.8)	13(34.2)	1		
	CA-CC	77(46.7)	88(53.3)	2.198	(1.052;4.591)	<b>0.036</b>
<b>Recesivo</b>	CC	22(43.1)	29(56.9)	1		
	CA-AA	80(52.6)	72(47.4)	0.683	(0.360;1.294)	0.242

En el gen BCL2, el homocigoto más frecuente en los enfermos de Crohn es el AA (65,8%) y el más frecuente en el grupo control el CC (56,9%), si bien esta diferencia no resulta estadísticamente significativa ( $p=0,087$ ). El alelo A es más frecuente en los enfermos de Crohn que en el grupo control (55,3% versus 44,7%), tendiendo este resultado a la significación estadística ( $p=0,058$ ).

En cuanto al modelo de herencia, en el modelo codominante se observa que la presencia del genotipo homocigoto AA tiene un riesgo aumentado de ser enfermo de Crohn; de 2,063 (0,961; 4,430) veces más que la presencia del heterocigoto CA, sin alcanzar este resultado la significación estadística ( $p=0,063$ ) y de 2,535 (1,062; 6,048)

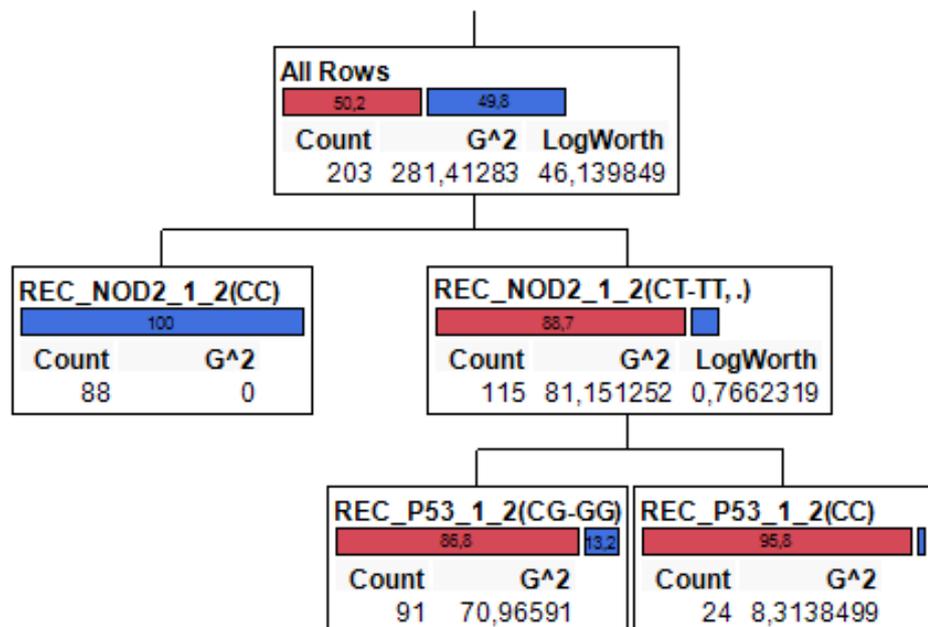
veces más que la del homocigoto CC, siendo este resultado estadísticamente significativo ( $p=0,036$ ).

En el modelo dominante, se observa que la presencia del genotipo homocigoto AA multiplica por 2,198 (1,052; 4,591) veces la probabilidad de ser enfermo de Crohn frente a la presencia del genotipo homocigoto CC o el heterocigoto CA, siendo este resultado estadísticamente significativo ( $p=0,036$ ).

En el modelo recesivo vemos cómo la presencia del genotipo homocigoto CC es protector frente a la enfermedad de Crohn, aunque este resultado no alcanza la significación estadística ( $p=0.242$ ).

### 8.4. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE GENES

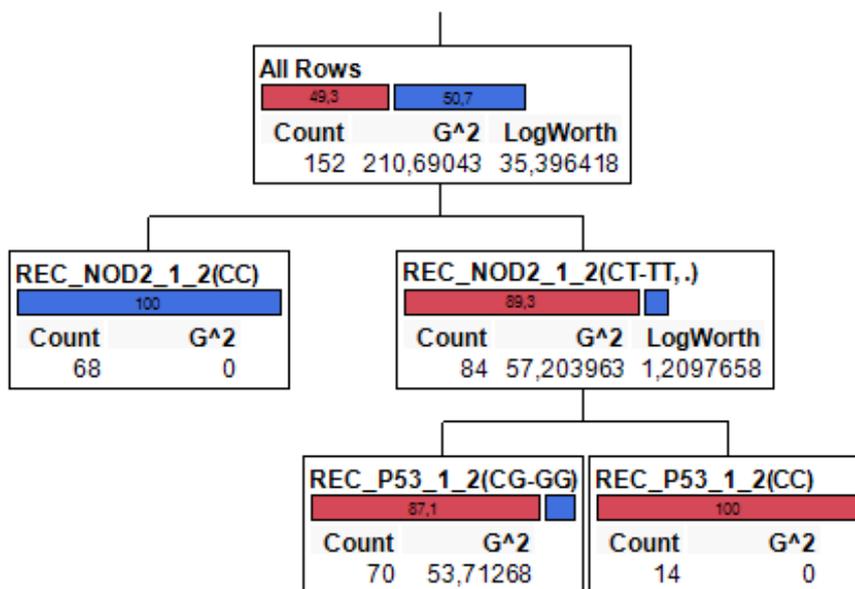
En el análisis se han incluido los genes estudiados en sus formas dominantes o recesivas en función de la significación y la magnitud del odds-ratio que se ha obtenido en el análisis individual de cada gen. Así, para los genes NOD2, p53 y BAX se ha elegido la forma (o modelo) recesivo y para BCL2 y ATG16L1 la forma (o modelo) dominante. El árbol obtenido, procediendo como se explicó en el capítulo de material y métodos, es el siguiente:



Partimos de todos los pacientes divididos en los grupos casos y controles. La primera segmentación se produce por el modelo recesivo de NOD2, de manera que los individuos con genotipo CC son todos controles, mientras que el 88,7% de los individuos con genotipo CT ó TT son casos. Este modelo con un solo gen presenta un  $R^2=0,708$ , con una gran estabilidad, ya que varía muy poco del obtenido mediante el 5 *fold cross validation* ( $R^2=0,71$ ). El porcentaje de bien clasificados es de 93%.

En la segunda segmentación ningún gen es significativo, si bien p53 es el que menor p-valor presenta ( $p=0,17$ ), por lo que realizamos una segunda segmentación para explorar los resultados. El  $R^2$  aumenta muy poco:  $R^2=0,714$ . Los porcentajes de casos son del 95,8% para el alelo CC y del 86,8% para los alelos CG/GG. El porcentaje de bien clasificados es el mismo que en la segmentación sin p53. En el modelo general, con todas las estimaciones, la sensibilidad es del 100% y la especificidad es del 87%, el valor predictivo positivo (VPP) es del 89% y el valor predictivo negativo (VPN) es del 100%.

Al realizar el procedimiento de validación donde se repite el proceso de elaboración del árbol para una submuestra constituida por el 75% de las observaciones (muestra de entrenamiento) y otra submuestra para validar el poder de predicción del modelo (muestra de validación), el árbol obtenido con la muestra de entrenamiento fue el siguiente:



Se observa cómo es muy similar al obtenido con la muestra completa, manteniéndose los porcentajes. El poder de clasificación fue alto tanto para la muestra de entrenamiento como para la muestra de validación (ver las tablas siguientes). Los porcentajes de bien clasificados fueron del 94% para la muestra de entrenamiento y del 92% para la muestra de validación. Por tanto, se observa cómo el patrón de segmentación es estable. Si hacemos los cálculos en el proceso de validación, la sensibilidad es del 100% y la especificidad del 86%. El VPP es del 92% y el VPN del 100%.

M.entrenamiento		Predicción		M. validación		Predicción	
Actual	caso	control	Actual	caso	control		
	caso	75		0	caso	27	0
control	9	68	control	4	20		

## **8.5. INTERACCIÓN ENTRE GENES Y COMPORTAMIENTO DE LA ENFERMEDAD**

En el estudio de las interacciones genes-ambiente para la descripción de la estructura porcentual de las variables clínicas, los árboles obtenidos han tenido un bajo poder de clasificación y no hay significación estadística en las distintas particiones. Los árboles de clasificación están condicionados a los tamaños muestrales grandes para la obtención de clasificaciones estables y con poder de predicción alto. Hay que puntualizar que este análisis se utiliza sólo en el grupo de enfermos de Crohn, y por lo tanto los genes NOD2 y p53 pierden la importancia que presentaron en el análisis de interacción gen-gen para los casos- controles. Ésto es debido a que en el grupo de enfermos el 88,7% son NOD2 (CT-TT), por lo que este gen pierde su importancia para el análisis, dado que mayoritariamente aparecen en un grupo. Los resultados obtenidos en este aspecto se adjuntan en el **ANEXO II.**

## **9. DISCUSIÓN.**

### **9.1. ASPECTOS CLÍNICOS**

La muestra, elegida de forma aleatoria de entre los más de 400 pacientes controlados en nuestra consulta por EC, se comporta en cuanto a edad, sexo y resto de variables clínicas, de forma similar a otras poblaciones (198) (199). Por grupos de edad, predominan los diagnosticados entre 16 y 40 años (A2 de Montreal; 72,5%). La distribución en cuanto al género es bastante homogénea, con un ligero predominio del sexo femenino (43,1% V; 56,9% M).

Hay una tendencia a la necesidad de GCs en el primer brote cuanto menor es la edad de diagnóstico, pero sin significación estadística ( $p=0,087$ ); fue menos frecuente su utilización en mayores de 40 años. AZA se utilizó fundamentalmente en formas inflamatorias (62,5%) o fistulizantes (81%), de localización ileal (65%) o ileocolónica (78,6%) ( $p=0,015$ ). Existe significación estadística con la utilización de AZA ( $p=0,002$ ) y de anti-TNF ( $p=0,005$ ) cuanto más jóvenes eran los pacientes, que se explicaría por ser formas más agresivas. En los años recientes, el uso de inmunomoduladores y de anti-TNF es cada vez más común. No obstante, las últimas publicaciones demuestran un riesgo ligeramente elevado de linfomas en pacientes con IMM, por lo que la tendencia actual iría a evitar AZA en paciente jóvenes y mayores de 65 años (200). La edad de diagnóstico no se relacionó de forma significativa con la respuesta ni con la remisión alcanzada con AZA ni con anti-TNF.

Como era de esperar, el mayor porcentaje de pacientes que precisaron intervención quirúrgica correspondió a las formas fistulizantes (85,7%) y estenosantes (60%) ( $p=0,000$ ). Hay una tendencia a mayor probabilidad de cirugía cuando la localización es ileal (57,5%) o ileocolónica (57,1%), por lo que la localización ileal sería la determinante de cirugía ( $p=0,132$ ). Del mismo modo, dado que una de las indicaciones de la cirugía es la falta de respuesta al tratamiento farmacológico, los pacientes que necesitaron IMM o anti-TNF se operaron con más frecuencia ( $p=0,01$ ). La cirugía no fue necesaria cuando hubo respuesta o remisión con estos fármacos ( $p=0,038$  para la respuesta a AZA;  $p=0,02$  para la remisión con IFX).

En esta muestra, el tabaco no ha sido un factor determinante de comportamiento o de tratamiento, pero el tamaño de la misma impide sacar conclusiones a este respecto. El tabaco es un agente demostrado de comportamiento agresivo y de fracaso de los tratamientos (201), y en nuestra serie, también los porcentajes de estos subgrupos van en este sentido.

## **9.2. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS**

Los estudios de GWAs en la EIIC han detectado múltiples asociaciones de determinados SNPs y asociaciones de estos polimorfismos con otras enfermedades que se pueden considerar autoinmunes. Algunos de estos SNPs confieren susceptibilidad a padecer la enfermedad y otros a desarrollar determinados fenotipos de la misma. Se han identificado hasta el momento 163 SNPs asociados con la EIIC, de los cuales 30 son específicos para la EC (84). Sin embargo, las conclusiones a las que hasta ahora se ha llegado, si exceptuamos con reservas los resultados con *NOD2*, no han supuesto ninguna utilidad clínica y no han respondido satisfactoriamente a las expectativas de las hipótesis que los sustentaban. Los resultados obtenidos a menudo no se replican en otros estudios y, en todo caso, la fuerza de la asociación entre genotipo y fenotipo ha sido en general pequeña, con áreas bajo la curva inferiores a 0,70. Por este motivo se justifican estudios como el actual, que estudian SNPs de genes susceptibles de influir en los procesos de autofagia y apoptosis en poblaciones más pequeñas y homogéneas (49).

### **NOD2 (rs2066844)**

Numerosos genes se han implicado hasta el momento en el pronóstico de la EC y se han hecho varios intentos para clasificar la enfermedad según perfiles genéticos. En este sentido, *NOD2/CARD15* parece no ser únicamente un gen de susceptibilidad, sino modificador de la enfermedad (59). De entre todos los estudios publicados acerca de la relevancia clínica de las mutaciones de *NOD2/CARD15*, algunos proporcionan información acerca de la localización de la enfermedad, en concreto la asociación con

la localización ileal y del tracto intestinal superior (48), aunque en algunos es la ausencia de localización colónica. Otros estudios aportan datos acerca de la relación entre las variantes de *NOD2/CARD15* con las formas estenosantes o penetrantes de la enfermedad, así como con una edad de comienzo más temprana y una mayor necesidad de cirugía. Estas variantes se asocian no solamente a una primera resección intestinal, sino también a la necesidad de nuevos procedimientos quirúrgicos en los pacientes con EC (76). Los heterocigotos y homocigotos mutados de las distintas variables de *NOD2* presentan un riesgo aumentado de un curso de la enfermedad más agresivo (58). Incluso se ha relacionado *NOD2/CARD15* con cuadros de obstrucción intestinal aguda (126).

Nuestros resultados son consistentes con los de estudios previos en cuanto a la alta penetrancia que presenta la enfermedad en pacientes homocigotos para el alelo de riesgo "T" de este SNP. En nuestra muestra, el presentar el alelo T para el SNP rs2066844 de *NOD2* se asoció de forma muy importante con padecer EC frente a controles. El alelo T es más frecuente en los enfermos de Crohn que en el grupo control (92,8% vs. 7,2%), donde predomina el alelo C [OR: 24,12; (IC:14.354;40.53)], independientemente del fenotipo. Esta asociación es muy superior a la de otras series publicadas y podría ser debida bien al tamaño muestral, bien a las características de nuestra población. En el modelo codominante, el genotipo homocigoto TT ha sido el más frecuente entre los enfermos de Crohn (98,8%), con OR 43,091 (IC; 95%-5,309;349,781), y el más frecuente en el grupo control el CC (100%), con OR=1; esta asociación aumenta en el modelo dominante. En resumen, no hemos encontrado homocigotos para CC con EC ni en el modelo codominante ni en el recesivo y sólo un control presentaba TT en el modelo codominante, por lo que podríamos afirmar que el alelo C protegería de padecer EC.

La alta penetrancia del alelo T en nuestra muestra de pacientes con EC justificaría el no encontrar relación con ninguna de las variables clínicas analizadas, ni siquiera con la localización ni con el comportamiento. Las diferencias que a este respecto se describen en otros estudios son difíciles de explicar: probablemente se deben al

pequeño tamaño muestral de algunos de ellos, la variabilidad de la enfermedad entre poblaciones e incluso diferencias “interobservador”. Habría que discutir también si verdaderamente existe relación entre algunas variantes del gen, las formas estenosantes y una mayor necesidad de cirugía, o si los resultados de los estudios tan sólo reflejan el alto porcentaje de pacientes con EC ileal que desarrollan estenosis y requieren por tanto intervención quirúrgica, y que este fenómeno estuviera determinado por aspectos genéticos del paciente.

### **P53 (Pro/Arg)**

*p53* es un gen supresor de tumores, habiéndose analizado de forma extensa el SNP Arg>Pro en el codón 72 (R72P) en estudios dirigidos a este campo, dado que este dominio es esencial en la respuesta apoptótica y en la inhibición de la carcinogénesis (127). Sin embargo, poco sabemos del papel que juega en la EIIC y de su relevancia clínica. En un estudio que evaluó la asociación de este SNP con el riesgo de desarrollar CU en una población del norte de Irán [n=190 (115 hombres; 75 mujeres); edad media  $32 \pm 8,6$  años], encontraron también una frecuencia significativamente mayor del alelo *Pro* (C) en la población con CU frente a la población control ( $p < 0,0001$ ). Sin embargo, no encontraron asociación entre ser portador del alelo *Pro* y mayor riesgo de enfermedad extensa ( $p < 0,45$ ), colitis izquierda ( $p < 0,38$ ), o un comienzo más temprano de la enfermedad ( $p < 0,33$ ) (146).

La asociación de este polimorfismo con la EC parece de particular interés en cuanto a identificar marcadores genéticos que impliquen una potencial transformación maligna de la enfermedad. Así, se han detectado mutaciones de *p53* en fluidos procedentes del colon en pacientes con CU (172). Se han demostrado también alteraciones de la proteína *p53* en pacientes con CCR asociado a CU (202). Nuestros resultados son consistentes con los de otros ensayos, donde el alelo *Pro* se ha descrito como un genotipo adverso relacionado con el desarrollo de distintos tipos de cáncer, aunque éste no ha sido uno de los objetivos de nuestro estudio.

En nuestra muestra, el alelo C (*Pro*) es más frecuente en los enfermos de Crohn que en el grupo control (52,5% vs. 47,5%), sin diferencias estadísticamente significativas. El genotipo para p53 (*Pro/Arg*) homocigoto CC (HN=*Pro/Pro*) ha sido el más frecuente entre nuestros enfermos de Crohn (67,6%), y el heterocigoto CG el más frecuente en el grupo control (61,3%),  $p=0,013$ , replicándose de forma significativa estos resultados en los modelos codominante y recesivo ( $p=0,044$  ;  $p=0,034$ ). El interés de nuestros resultados radica en que hasta ahora pocos estudios habían identificado *p53* como un gen de susceptibilidad para desarrollar EC. Probablemente si se aumentara el tamaño de la muestra estas diferencias serían más marcadas y podría ser adecuado replicar estos resultados en otras poblaciones. Al analizar si este polimorfismo se asociaba a diferencias en cuanto a la edad de presentación, sexo u otras variables clínicas, no hemos encontrado datos estadísticamente significativos.

#### **ATG16L1 (rs2241880)**

En 2007, en estudios GWAs, se identificó un SNP de *ATG16L1* asociado con un mayor riesgo de desarrollar EC: rs2241880 (203) (135). Dicho polimorfismo resulta en el cambio del alelo A por el alelo G en la posición 300 (T300A), siendo el genotipo GG el que se asociaba con la enfermedad, especialmente con la localización ileal de la misma. La prevalencia de este SNP es relativamente frecuente en la población general: 58.1% en EC frente a 51.3% en población control. En un estudio alemán que incluyó 768 pacientes con EC, además de confirmarse una fuerte asociación de este SNP con el riesgo de padecer la enfermedad ( $p=3.7 \times 10^{-6}$ ), se encontró también asociación significativa con otros 8 SNPs (rs13412102, rs12471449, rs6431660, rs1441090, rs2289472, rs2241879, rs3792106, rs4663396), con p valores entre  $4.1 \times 10^{-2}$  y  $3.6 \times 10^{-6}$ . Para los 9 SNPs de *ATG16L1*, los alelos menores fueron menos frecuentes en los pacientes con EC, con ORs < 1.0 (51).

Según nuestros resultados, el alelo G es más frecuente en los enfermos de Crohn que en el grupo control (53,7% vs. 46,3%;  $p=0,08$ ). El ser portador del alelo A, al igual que ocurre en el estudio previamente citado, sugiere un efecto protector frente a

padecer EC (138). El genotipo homocigoto GG es el más frecuente entre los enfermos de Crohn (63,5%;  $p=0,025$ ) y el heterocigoto AG el más frecuente en el grupo control (58,3%). La asociación de GG y Crohn para este SNP ha sido significativa, al igual que la descrita en otras series, tanto en el modelo codominante ( $p=0,007$ ) como en el dominante ( $p=0,01$ ).

No hemos encontrado diferencias entre los distintas variables alélicas y el fenotipo de enfermedad, como tampoco con el sexo o con el grupo de edad al diagnóstico. Tampoco en el estudio de Glas *et al.* encontraron relación entre los distintos genotipos de rs2241880 (T300A) y la edad al diagnóstico; el comportamiento de la enfermedad; la presencia de manifestaciones extraintestinales; la aparición de estenosis, fístulas o abscesos; ni el uso de IMM (138). Tampoco en otro estudio británico realizado en una población más amplia se encontró relación entre rs2241880 y un determinado fenotipo de la enfermedad (138), lo que sugiere que el potencial efecto de este SNP sobre el riesgo de desarrollar enfermedad ileal es mucho más débil que con el de ciertas variantes de *NOD2/CARD15* como p.Leu1007fsX1008 (204).

### **BAX (rs4645878)**

Los datos de los que disponemos acerca de *BAX* y *BCL2* en EIIC se dirigen fundamentalmente a la expresión de dichas proteínas a nivel de las células T de la lámina propia en la EC, encontrando una disminución en cuanto a la expresión de *BAX* y un aumento de la *ratio* BCL-XL/*BAX*, lo que implicaría una resistencia a los mecanismos de apoptosis de dichas células y contribuiría finalmente a cronificar la inflamación (205). De igual manera, en la CU, se ha encontrado una expresión disminuida de *BAX* a nivel del epitelio colónico inflamado, aunque, a diferencia de la EC, no parece que el sistema *BAX/BCL2* esté implicado en inducir la apoptosis de las células epiteliales de la mucosa colónica (182). Sin embargo, así como en nuestra población se replican los datos que ya conocíamos por estudios previos y distintos GWAs acerca de *NOD2*, no hemos encontrado otros estudios de genes candidatos en EIIC en los que se hayan estudiado estos polimorfismos de *BAX* (rs4645878) y *BCL2*

(rs2279115). Se han realizado estudios con *BAX* (rs4645878) en enfermedades hematológicas (206) y en cáncer de pulmón (207), y con *BCL2* (rs2279115) también en enfermedades hematológicas (208) y distintos tipos de cáncer: pulmón (209); mama (208); tiroides (210); riñón (211); próstata (212).

En nuestra muestra, el genotipo más frecuente entre los enfermos de Crohn es el GA (57,4%) y el más frecuente en el grupo control el GG (51,1%). El alelo A es más frecuente en los enfermos de Crohn que en el grupo control (53,6% versus 46,4%), aunque los porcentajes son similares y por tanto las diferencias no son estadísticamente significativas ( $p=0,523$ ). Por tanto, en nuestro estudio, el ser portador del alelo G parece conferir cierta protección a desarrollar EC frente a portar el alelo A, sin observar significación estadística en ninguno de los modelos de herencia. Sin embargo, es el primer estudio realizado en nuestra población en el que se intentan identificar *BAX* y *BCL2* como genes de susceptibilidad para padecer EC, y tal vez en poblaciones mayores conseguiríamos resultados más alentadores en este sentido.

### **BCL2 (rs2279115)**

Como se ha citado anteriormente, *BAX/BCL2* es un sistema que interactúa en los procesos de apoptosis. Se ha comprobado que el incremento de la *ratio* Bax/Bcl-2 promueve muerte celular programada de células CD4.

Aunque no llega a la significación estadística ( $p=0,058$ ), el alelo A es más frecuente en nuestros enfermos de Crohn que en el grupo control (55,3% vs. 44,7%). El genotipo homocigoto AA es el más frecuente entre los EC (65,8%) y el homocigoto CC el más frecuente en el grupo control (56,9%), pero también sin significación estadística ( $p=0,087$ ).

Al calcular la OR para los modelos codominante, dominante y recesivo se observa que la presencia del genotipo homocigoto AA aumenta la probabilidad de ser enfermo de Crohn frente a la presencia del genotipo homocigoto CC o el heterocigoto CA,

siendo este resultado estadísticamente significativo en el modelo dominante ( $p=0,036$ ).

### **9.3. INTERACCIONES GEN-GEN**

Hemos elegido el método estadístico CART frente a MARS o Regresión Logística (LR) para el estudio de interacción entre genes por ser el modelo que mejor se adapta para análisis estadísticos en muestras similares a la nuestra en cuanto a número de sujetos y de polimorfismos estudiados.

Como se indicó en el apartado de resultados: *“En el análisis se han incluido los genes estudiados en sus formas dominantes o recesivas en función de la significación y la magnitud de los odds-ratio que se han obtenido en el análisis individual de cada gen. Así, para los genes NOD2, p53 y BAX se ha elegido la forma (o modelo) recesivo y para BCL2 y ATG16L1 la forma (o modelo) dominante.”*

En el análisis de interacción, el 88,7% de los individuos con genotipo CT ó TT de *NOD2* son casos y el 95,8% de aquellos con genotipo CC de *p53* desarrollarían la enfermedad, si bien este último resultado no ha alcanzado la significación estadística ( $p=0,17$ ). Por lo tanto, los genotipos CT/TT de *NOD2* y el genotipo CC de *p53*, clasificarían con una precisión del 94% a los pacientes con EC frente a los controles ( $S=100\%$ ;  $E=86\%$ ;  $VPP=92\%$ ;  $VPN=100\%$ ).

La evidencia científica en cuanto a la interacción gen-gen en la EIIC (epistasis) es muy escasa. Dos estudios recientes han descrito una interacción entre *NOD2/CARD9* y *REL* en CU (213), así como entre las tres mutaciones más ampliamente estudiadas de *NOD2* (1007finsC, R702W y G908R) con otros tres genes asociados a la EIIC (*IL23R*, *DLG5*, y *OCTN1*) (119). En este último estudio se observó una mayor frecuencia de las tres mutaciones de *NOD2* entre la población con EIIC y se confirmó una asociación significativa con la EC pero no con la CU. Para la interacción gen-gen utilizaron un método estadístico similar al de nuestro estudio, que incluye los genes estudiados en sus formas dominantes o recesivas en función de la significación y la magnitud del

odds-ratio obtenido en el análisis individual de cada gen, y estudiaron la interacción entre los SNPs de *NOD2* y entre éstos y los otros genes. Los resultados mostraron una asociación significativa entre los distintos polimorfismos en la EC pero no en la CU. En otro estudio donde utilizan un método de análisis estadístico similar a *CART*, la regresión logística (LR), analizan un modelo de predicción que resulta de combinar los 71 alelos de riesgo identificados en la EC a través de los distintos GWAs realizados hasta el momento. Analizan también, mediante el método de LR, la interacción entre *NOD2*, *ATG16L1*, *IL10/IL9*, *C13orf31* y *chr21q*. Encuentran que la combinación de los 71 SNPs (en su modo dominante) tiene un poder moderado-bueno de predecir el riesgo de padecer la enfermedad (AUC= 0,75), que es mayor a mayor número de alelos de riesgo. El añadir las interacciones genéticas aumentaba la predicción del riesgo (AUC= 0,77;  $p < 0,0001$ ) (114). Los resultados de nuestro estudio refuerzan la idea de que múltiples genes, cada uno de ellos con una pequeña contribución, están implicados en la susceptibilidad de padecer EC. Además, al igual que en los estudios mencionados, aquellos individuos portadores de un mayor número de alelos de riesgo tienen mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (214) (215).

Una vez identificadas estas interacciones genéticas, es necesario demostrar la relevancia que estos hallazgos tienen a nivel biológico. Según el modelo estadístico utilizado en nuestro estudio (*CART*), las dos primeras segmentaciones se producen por *NOD2* y *p53*, lo que se ha explicado por la implicación de estos genes en los mecanismos de respuesta del huésped a los distintos microorganismos y en la regulación de los mecanismos de apoptosis. Así, *NOD2* fue el primer gen que se relacionó con la EC, y los distintos SNPs afectan al dominio Nod, encargado del reconocimiento de microorganismos. *p53* es un gen supresor de tumores y uno de los principales reguladores de la integridad del genoma y del ciclo celular a través de distintas vías apoptóticas. *BAX* y *ATG16L1* son genes relacionados con mecanismos de apoptosis y autofagia respectivamente, elementos cruciales en la respuesta inmune innata a las bacterias intracelulares. Conocemos también la interacción entre *NOD2* y *ATG16L1* en el secuestro de bacterias en el interior de los autofagosomas (214), aunque esta interacción no ha conseguido replicarse en algunos estudios (139).

Los estudios más recientes consideran que el procesamiento defectuoso de las bacterias intracelulares es un factor determinante en la patogenia de la EC. En este sentido, los procesos de autofagia y muerte celular programada (apoptosis) juegan un papel esencial. De ahí que genes implicados en estas vías (*ATG16L1*, *p53*, *BAX*, *BCL-2*) sean objeto de numerosos estudios como el presente.

#### **9.4. ESTUDIO DE VARIABLES CLÍNICAS Y POLIMORFISMOS**

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre los polimorfismos objeto de este estudio y las variables clínicas analizadas. En estudios previos, los intentos de relacionar genotipo y fenotipo habían dado lugar a algunas asociaciones en estudios de cohortes, pero sin poder replicar estos resultados de forma consistente en poblaciones más amplias, salvo la asociación, en la EC (138), entre *NOD2* y la enfermedad ileal de comportamiento estenosante/fistulizante (216) y, en la CU (38, 216, 216), entre *HLA DRB\*0103* con formas extensas y graves. Probablemente ésto sea atribuible a diferencias en cuanto al diseño de los estudios en lo que concierne al tipo de población, criterios de clasificación, criterios en cuanto a la definición de las variables estudiadas, duración de la enfermedad, o tamaño de la población-muestra estudiada. Además, (217) la EC es una entidad que puede variar a lo largo del tiempo en cuanto a su forma de comportamiento: de ahí la importancia de clasificar a los pacientes según criterios estables como pueden ser los factores genéticos (84).

No hemos encontrado tampoco relación entre los distintos polimorfismos y la necesidad o respuesta a las terapias utilizadas de forma habitual en la EC. En este sentido son pocos los estudios realizados hasta el momento donde se hayan encontrado relaciones significativas entre variables genéticas y respuesta a los distintos fármacos, así como con la eficacia y toxicidad de los mismos. Hasta el momento, sólo podemos hablar de aplicabilidad clínica en el campo de la farmacogenética en cuanto a la actividad de la enzima TPMT y el riesgo de toxicidad con AZA (38) (104) (105).

## **10. CONCLUSIONES.**

- Las características clínico-terapéuticas de nuestra serie son similares a las descritas en otras poblaciones con Enfermedad de Crohn. Destaca la ausencia de influencia del tabaco en el comportamiento y una mayor utilización de inmunomoduladores, aunque las tasas de remisión alcanzadas con estos fármacos y con los anti-TNF son similares a lo esperado. La mitad de nuestros pacientes precisaron cirugía, lo que concuerda con estudios previos.
- En este estudio se confirma que *NOD2* (rs2066844) y *ATG16L1* (rs2241880) son genes de susceptibilidad en la Enfermedad de Crohn, y se ha identificado *p53* (Pro/Arg) como *locus* de riesgo para desarrollar la enfermedad.
- En nuestro trabajo hemos encontrado una prevalencia de *NOD2* (rs2066844) mayor a la descrita en otras poblaciones. En cuanto a los resultados con *BCL-2* y *BAX*, habría que realizar estudios en cohortes de mayor tamaño para confirmar los resultados intuados en nuestra muestra.
- No hemos encontrado asociación entre los distintos SNPs con el comportamiento de la enfermedad ni con la respuesta a las distintas terapias utilizadas.
- Dada la altísima penetrancia encontrada para el alelo TT de *NOD2* (98,8%; OR=43,091), podríamos incluir este polimorfismo en el algoritmo diagnóstico de la Enfermedad de Crohn en casos de diagnóstico indeterminado. La ausencia de este genotipo haría improbable el diagnóstico de Enfermedad de Crohn.
- Es esencial analizar si estos resultados se confirman en un estudio más amplio de nuestra población.

## **11. BIBLIOGRAFÍA.**

- (1) Shanahan F. Crohn's disease. *Lancet* 2002 Jan 5;359(9300):62-69.
- (2) Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2008 Jun;8(6):458-466.
- (3) Guarner F, Malagelada JR. Role of bacteria in experimental colitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003 Oct;17(5):793-804.
- (4) Achkar JP, Duerr R. The expanding universe of inflammatory bowel disease genetics. *Curr Opin Gastroenterol* 2008 Jul;24(4):429-434.
- (5) Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011 May;140(6):1785-1794.
- (6) Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* 2003 Jun;124(7):1767-1773.
- (7) Graham DB, Xavier RJ. From genetics of inflammatory bowel disease towards mechanistic insights. *Trends Immunol* 2013 Apr 29.
- (8) Kelsen J, Baldassano RN. Inflammatory bowel disease: the difference between children and adults. *Inflamm Bowel Dis* 2008 Oct;14 Suppl 2:S9-11.
- (9) Probert CS, Jayanthi V, Wicks AC, Carr-Locke DL, Garner P, Mayberry JF. Epidemiological study of abdominal tuberculosis among Indian migrants and the indigenous population of Leicester, 1972-1989. *Gut* 1992 Aug;33(8):1085-1088.
- (10) Bernstein CN. Epidemiologic clues to inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2010 Dec;12(6):495-501.
- (11) Auvin S, Molinie 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). *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005 Jul;41(1):49-55.
- (12) Molodecky NA, Soon IS, 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 Jan;142(1):46-54.e42; quiz e30.

- (13) Jayanthi V, Probert CS, Pinder D, Wicks AC, Mayberry JF. Epidemiology of Crohn's disease in Indian migrants and the indigenous population in Leicestershire. *Q J Med* 1992 Feb;82(298):125-138.
- (14) Kugathasan S, Judd RH, Hoffmann RG, Heikenen J, Telega G, Khan F, et al. Epidemiologic and clinical characteristics of children with newly diagnosed inflammatory bowel disease in Wisconsin: a statewide population-based study. *J Pediatr* 2003 Oct;143(4):525-531.
- (15) Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003 Jul;3(7):521-533.
- (16) Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006 Jul;3(7):390-407.
- (17) Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989 Feb 9;320(6):365-376.
- (18) Korzenik JR, Dieckgraefe BK. Is Crohn's disease an immunodeficiency? A hypothesis suggesting possible early events in the pathogenesis of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000 Jun;45(6):1121-1129.
- (19) Brannigan AE, O'Connell PR, Hurley H, O'Neill A, Brady HR, Fitzpatrick JM, et al. Neutrophil apoptosis is delayed in patients with inflammatory bowel disease. *Shock* 2000 May;13(5):361-366.
- (20) Ina K, Kusugami K, Hosokawa T, Imada A, Shimizu T, Yamaguchi T, et al. Increased mucosal production of granulocyte colony-stimulating factor is related to a delay in neutrophil apoptosis in Inflammatory Bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1999 Jan;14(1):46-53.
- (21) Fadeel B, Ahlin A, Henter JI, Orrenius S, Hampton MB. Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. *Blood* 1998 Dec 15;92(12):4808-4818.
- (22) 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 May;60(5):571-607.

- (23) Roseth AG, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N. Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestion* 1997;58(2):176-180.
- (24) Schroder O, Naumann M, Shastri Y, Povse N, Stein J. Prospective evaluation of faecal neutrophil-derived proteins in identifying intestinal inflammation: combination of parameters does not improve diagnostic accuracy of calprotectin. *Aliment Pharmacol Ther* 2007 Oct 1;26(7):1035-1042.
- (25) Roseth 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. *Scand J Gastroenterol* 1999 Jan;34(1):50-54.
- (26) Horsthuis K, Stokkers PC, Stoker J. Detection of inflammatory bowel disease: diagnostic performance of cross-sectional imaging modalities. *Abdom Imaging* 2008 Jul-Aug;33(4):407-416.
- (27) Beaugerie L, Seksik P, Nion-Larmurier I, Gendre JP, Cosnes J. Predictors of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006 Mar;130(3):650-656.
- (28) Dayharsh GA, Loftus EV, Jr, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Zinsmeister AR, Witzig TE, et al. Epstein-Barr virus-positive lymphoma in patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine. *Gastroenterology* 2002 Jan;122(1):72-77.
- (29) Kandiel A, Fraser AG, Korelitz BI, Brensinger C, Lewis JD. Increased risk of lymphoma among inflammatory bowel disease patients treated with azathioprine and 6-mercaptopurine. *Gut* 2005 Aug;54(8):1121-1125.
- (30) Colombel JF, Loftus EV, Jr, Tremaine WJ, Egan LJ, Harmsen WS, Schleck CD, et al. The safety profile of infliximab in patients with Crohn's disease: the Mayo clinic experience in 500 patients. *Gastroenterology* 2004 Jan;126(1):19-31.
- (31) Solberg IC, Vatn MH, Hoie O, Stray N, Sauar J, Jahnsen J, et al. Clinical course in Crohn's disease: results of a Norwegian population-based ten-year follow-up study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007 Dec;5(12):1430-1438.

- (32) Sands BE, Arsenault JE, Rosen MJ, Alsahli M, Bailen L, Banks P, et al. Risk of early surgery for Crohn's disease: implications for early treatment strategies. *Am J Gastroenterol* 2003 Dec;98(12):2712-2718.
- (33) Bernell O, Lapidus A, Hellers G. Recurrence after colectomy in Crohn's colitis. *Dis Colon Rectum* 2001 May;44(5):647-54; discussion 654.
- (34) Andersson P, Olaison G, Bodemar G, Nystrom PO, Sjudahl R. Surgery for Crohn colitis over a twenty-eight-year period: fewer stomas and the replacement of total colectomy by segmental resection. *Scand J Gastroenterol* 2002 Jan;37(1):68-73.
- (35) Hurst RD, Molinari M, Chung TP, Rubin M, Michelassi F. Prospective study of the features, indications, and surgical treatment in 513 consecutive patients affected by Crohn's disease. *Surgery* 1997 Oct;122(4):661-7; discussion 667-8.
- (36) Picco MF, Zubiaurre I, Adluni M, Cangemi JR, Shelton D. Immunomodulators are associated with a lower risk of first surgery among patients with non-penetrating non-stricturing Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2009 Nov;104(11):2754-2759.
- (37) Lemann M, Mary JY, Colombel JF, Duclos B, Soule JC, Lerebours E, et al. A randomized, double-blind, controlled withdrawal trial in Crohn's disease patients in long-term remission on azathioprine. *Gastroenterology* 2005 Jun;128(7):1812-1818.
- (38) Ahmad T, Tamboli CP, Jewell D, Colombel JF. Clinical relevance of advances in genetics and pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology* 2004 May;126(6):1533-1549.
- (39) Ishihara S, Aziz MM, Yuki T, Kazumori H, Kinoshita Y. Inflammatory bowel disease: review from the aspect of genetics. *J Gastroenterol* 2009;44(11):1097-1108.
- (40) Shugart YY, Silverberg MS, Duerr RH, Taylor KD, Wang MH, Zarfes K, et al. An SNP linkage scan identifies significant Crohn's disease loci on chromosomes 13q13.3 and, in Jewish families, on 1p35.2 and 3q29. *Genes Immun* 2008 Mar;9(2):161-167.
- (41) Roth MP, Petersen GM, McElree C, Vadheim CM, Panish JF, Rotter JI. Familial empiric risk estimates of inflammatory bowel disease in Ashkenazi Jews. *Gastroenterology* 1989 Apr;96(4):1016-1020.

- (42) Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2006 Jun 21;12(23):3668-3672.
- (43) Simmons JD, Mullighan C, Welsh KI, Jewell DP. Vitamin D receptor gene polymorphism: association with Crohn's disease susceptibility. *Gut* 2000 Aug;47(2):211-214.
- (44) Polito JM, Childs B, Mellits ED, Tokayer AZ, Harris ML, Bayless TM. Crohn's disease: influence of age at diagnosis on site and clinical type of disease. *Gastroenterology* 1996 Sep;111(3):580-586.
- (45) Yang H, McElree C, Roth MP, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut* 1993 Apr;34(4):517-524.
- (46) Peeters M, Cortot A, Vermeire S, Colombel JF. Familial and sporadic inflammatory bowel disease: different entities? *Inflamm Bowel Dis* 2000 Nov;6(4):314-320.
- (47) Brant SR, Shugart YY. Inflammatory bowel disease gene hunting by linkage analysis: rationale, methodology, and present status of the field. *Inflamm Bowel Dis* 2004 May;10(3):300-311.
- (48) Tsianos EV, Katsanos KH, Tsianos VE. Role of genetics in the diagnosis and prognosis of Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2012 Jan 14;18(2):105-118.
- (49) 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 Nov 1;491(7422):119-124.
- (50) Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut* 2011 Dec;60(12):1739-1753.
- (51) Franke A, McGovern DP, 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. *Nat Genet* 2010 Dec;42(12):1118-1125.
- (52) Van Limbergen J, Philpott D, Griffiths AM. Genetic profiling in inflammatory bowel disease: from association to bedside. *Gastroenterology* 2011 Nov;141(5):1566-71.e1.

- (53) Ventham NT, Kennedy NA, Nimmo ER, Satsangi J. Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: the emerging role of epigenetics. *Gastroenterology* 2013 Aug;145(2):293-308.
- (54) Worthey EA, Mayer AN, Syverson GD, Helbling D, Bonacci BB, Decker B, et al. Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease. *Genet Med* 2011 Mar;13(3):255-262.
- (55) Xiao TS. Subversion of innate immune signaling through molecular mimicry. *J Clin Immunol* 2010 Sep;30(5):638-642.
- (56) Gregersen PK, Olsson LM. Recent advances in the genetics of autoimmune disease. *Annu Rev Immunol* 2009;27:363-391.
- (57) Zhernakova A, van Diemen CC, Wijmenga C. Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases. *Nat Rev Genet* 2009 Jan;10(1):43-55.
- (58) Radford-Smith G, Pandeya N. Associations between NOD2/CARD15 genotype and phenotype in Crohn's disease--Are we there yet? *World J Gastroenterol* 2006 Nov 28;12(44):7097-7103.
- (59) Cleynen I, Gonzalez JR, Figueroa C, Franke A, McGovern D, Bortlik 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 Dec 21.
- (60) Lacher M, Schroepf S, Ballauff A, Lohse P, von Schweinitz D, Kappler R, et al. Autophagy 16-like 1 rs2241880 G allele is associated with Crohn's disease in German children. *Acta Paediatr* 2009 Nov;98(11):1835-1840.
- (61) Amre DK, Mack DR, Morgan K, Israel D, Lambrette P, Costea I, et al. Interleukin 10 (IL-10) gene variants and susceptibility for paediatric onset Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2009 May 1;29(9):1025-1031.
- (62) Gazouli M, Pachoula I, Panayotou I, Mantzaris G, Chrousos G, Anagnou NP, et al. NOD2/CARD15, ATG16L1 and IL23R gene polymorphisms and childhood-onset of Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2010 Apr 14;16(14):1753-1758.

- (63) Amre DK, Mack DR, Morgan K, Krupoves A, Costea I, Lambrette P, et al. Autophagy gene ATG16L1 but not IRGM is associated with Crohn's disease in Canadian children. *Inflamm Bowel Dis* 2009 Apr;15(4):501-507.
- (64) Storr M, Emmerdinger D, Diegelmann J, Pfennig S, Ochsenkuhn T, Goke B, et al. The cannabinoid 1 receptor (CNR1) 1359 G/A polymorphism modulates susceptibility to ulcerative colitis and the phenotype in Crohn's disease. *PLoS One* 2010 Feb 26;5(2):e9453.
- (65) Sanchez R, Levy E, Costea F, Sinnett D. IL-10 and TNF-alpha promoter haplotypes are associated with childhood Crohn's disease location. *World J Gastroenterol* 2009 Aug 14;15(30):3776-3782.
- (66) Biank V, Friedrichs F, Babusukumar U, Wang T, Stoll M, Broeckel U, et al. DLG5 R30Q variant is a female-specific protective factor in pediatric onset Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2007 Feb;102(2):391-398.
- (67) Essers JB, Lee JJ, Kugathasan S, Stevens CR, Grand RJ, Daly MJ, et al. Established genetic risk factors do not distinguish early and later onset Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009 Oct;15(10):1508-1514.
- (68) Latiano A, Palmieri O, Cucchiara S, Castro M, D'Inca R, Guariso G, et al. Polymorphism of the IRGM gene might predispose to fistulizing behavior in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2009 Jan;104(1):110-116.
- (69) Barreiro-de Acosta M, Pena AS. Clinical applications of NOD2/CARD15 mutations in Crohn's disease. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2007 Mar;37(1):49-54.
- (70) 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. *Inflamm Bowel Dis* 2005 Jul;11(7):645-652.
- (71) Aithal GP, Day CP, Leathart J, Daly AK, Hudson M. Association of single nucleotide polymorphisms in the interleukin-4 gene and interleukin-4 receptor gene with Crohn's disease in a British population. *Genes Immun* 2001 Feb;2(1):44-47.

- (72) Brand S, Beigel F, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, et al. IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006 Apr;290(4):G827-38.
- (73) Gonzalez S, Rodrigo L, Martinez-Borra J, Lopez-Vazquez A, Fuentes D, Nino P, et al. TNF-alpha -308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF-alpha production and inflammatory activity in Crohn's patients with fistulizing disease. *Am J Gastroenterol* 2003 May;98(5):1101-1106.
- (74) Bouma G, Poen AC, Garcia-Gonzalez MA, Schreuder GM, Felt-Bersma RJ, Meuwissen SG, et al. HLA-DRB1\*03, but not the TNFA -308 promoter gene polymorphism, confers protection against fistulising Crohn's disease. *Immunogenetics* 1998 May;47(6):451-455.
- (75) Wellcome Trust Case Control Consortium, Craddock N, Hurles ME, Cardin N, Pearson RD, Plagnol V, et al. Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2010 Apr 1;464(7289):713-720.
- (76) Mardini HE, Gregory KJ, Nasser M, Selby L, Arsenescu R, Winter TA, et al. Gastroduodenal Crohn's disease is associated with NOD2/CARD15 gene polymorphisms, particularly L1007P homozygosity. *Dig Dis Sci* 2005 Dec;50(12):2316-2322.
- (77) Dambacher J, Staudinger T, Seiderer J, Sisic Z, Schnitzler F, Pfennig S, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) -173G/C promoter polymorphism influences upper gastrointestinal tract involvement and disease activity in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007 Jan;13(1):71-82.
- (78) Thalmaier D, Dambacher J, Seiderer J, Konrad A, Schachinger V, Pfennig S, et al. The +1059G/C polymorphism in the C-reactive protein (CRP) gene is associated with involvement of the terminal ileum and decreased serum CRP levels in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006 Oct 1;24(7):1105-1115.
- (79) Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, Hampe J, Onnie CM, Soars D, et al. A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology* 2007 May;132(5):1665-1671.
- (80) Ouburg S, Mallant-Hent R, Crusius JB, van Bodegraven AA, Mulder CJ, Linskens R, et al. The toll-like receptor 4 (TLR4) Asp299Gly polymorphism is associated with colonic

localisation of Crohn's disease without a major role for the *Saccharomyces cerevisiae* mannan-LBP-CD14-TLR4 pathway. *Gut* 2005 Mar;54(3):439-440.

(81) Pierik M, Joossens S, Van Steen K, Van Schuerbeek N, Vlietinck R, Rutgeerts P, et al. Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2006 Jan;12(1):1-8.

(82) Vermeire S, Pierik M, Hlavaty T, Claessens G, van Schuerbeek N, Joossens S, et al. Association of organic cation transporter risk haplotype with perianal penetrating Crohn's disease but not with susceptibility to IBD. *Gastroenterology* 2005 Dec;129(6):1845-1853.

(83) Seiderer J, Elben I, Diegelmann J, Glas J, Stallhofer J, Tillack C, et al. Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2008 Apr;14(4):437-445.

(84) Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M, Tassies D, Piu J, Reverter JC, et al. Combined type-1 plasminogen activator inhibitor and NOD2/CARD15 genotyping predicts complicated Crohn's disease behaviour. *Aliment Pharmacol Ther* 2007 Feb 15;25(4):429-440.

(85) Glas J, Seiderer J, Wetzke M, Konrad A, Torok HP, Schmechel S, et al. rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants. *PLoS One* 2007 Sep 5;2(9):e819.

(86) Weiss B, Lebowitz O, Fidder HH, Maza I, Levine A, Shaoul R, et al. Response to medical treatment in patients with Crohn's disease: the role of NOD2/CARD15, disease phenotype, and age of diagnosis. *Dig Dis Sci* 2010 Jun;55(6):1674-1680.

(87) Angelberger S, Reinisch W, Dejaco C, Miehsler W, Waldhoer T, Wehkamp J, et al. NOD2/CARD15 gene variants are linked to failure of antibiotic treatment in perianal fistulating Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2008 May;103(5):1197-1202.

(88) Henckaerts L, Figueroa C, Vermeire S, Sans M. The role of genetics in inflammatory bowel disease. *Curr Drug Targets* 2008 May;9(5):361-368.

- (89) Bohanec Grabar P, Logar D, Lestan B, Dolzan V. Genetic determinants of methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis patients: a study of polymorphisms affecting methotrexate transport and folate metabolism. *Eur J Clin Pharmacol* 2008 Nov;64(11):1057-1068.
- (90) Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2004 Jan;75(1):13-33.
- (91) Todhunter CE, Sutherland-Craggs A, Bartram SA, Donaldson PT, Daly AK, Francis RM, et al. Influence of IL-6, COL1A1, and VDR gene polymorphisms on bone mineral density in Crohn's disease. *Gut* 2005 Nov;54(11):1579-1584.
- (92) Gelbmann CM, Rogler G, Gierend M, Gross V, Scholmerich J, Andus T. Association of HLA-DR genotypes and IL-1ra gene polymorphism with treatment failure of budesonide and disease patterns in Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001 Dec;13(12):1431-1437.
- (93) Kocsis AK, Lakatos PL, Somogyvari F, Fuszek P, Papp J, Fischer S, et al. Association of beta-defensin 1 single nucleotide polymorphisms with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 2008 Mar;43(3):299-307.
- (94) Browning BL, Annese V, Barclay ML, Bingham SA, Brand S, Buning C, et al. Gender-stratified analysis of DLG5 R30Q in 4707 patients with Crohn disease and 4973 controls from 12 Caucasian cohorts. *J Med Genet* 2008 Jan;45(1):36-42.
- (95) Griga T, Wilkens C, Wirkus N, Epplen J, Schmiegel W, Klein W. A polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor gene is involved in the genetic predisposition of Crohn's disease and associated with cumulative steroid doses. *Hepatogastroenterology* 2007 Apr-May;54(75):784-786.
- (96) Ho GT, Moodie FM, Satsangi J. Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease? *Gut* 2003 May;52(5):759-766.
- (97) Annese V, Valvano MR, Palmieri O, Latiano A, Bossa F, Andriulli A. Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2006 Jun 21;12(23):3636-3644.

- (98) Louis E, Vermeire S, Rutgeerts P, De Vos M, Van Gossum A, Pescatore P, et al. A positive response to infliximab in Crohn disease: association with a higher systemic inflammation before treatment but not with -308 TNF gene polymorphism. *Scand J Gastroenterol* 2002 Jul;37(7):818-824.
- (99) Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2004 Jan;75(1):13-33.
- (100) Farrell RJ, Murphy A, Long A, Donnelly S, Chirikuri A, O'Toole D, et al. High multidrug resistance (P-glycoprotein 170) expression in inflammatory bowel disease patients who fail medical therapy. *Gastroenterology* 2000 Feb;118(2):279-288.
- (101) Barreiro M. NOD2, CD14 and TLR4 mutations do not influence response to adalimumab in patients with Crohn's disease: a preliminary report. NOD2, CD14 and TLR4 mutations do not influence response to adalimumab in patients with Crohn's disease: a preliminary report. *Rev Esp Enferm Dig.* 2010;102(10):591-595.
- (102) Sandborn WJ, Gasink C, Gao LL, Blank MA, Johanss J, Guzzo C, et al. Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease. *N Engl J Med* 2012 Oct 18;367(16):1519-1528.
- (103) Danese S. New therapies for inflammatory bowel disease: from the bench to the bedside. *Gut* 2012 Jun;61(6):918-932.
- (104) Schwab M, Schaffeler E, Marx C, Fischer C, Lang T, Behrens C, et al. Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism. *Pharmacogenetics* 2002 Aug;12(6):429-436.
- (105) Srimartpirom S, Tassaneeyakul W, Kukongviriyapan V, Tassaneeyakul W. Thiopurine S-methyltransferase genetic polymorphism in the Thai population. *Br J Clin Pharmacol* 2004 Jul;58(1):66-70.
- (106) Lennard L. TPMT in the treatment of Crohn's disease with azathioprine. *Gut* 2002 Aug;51(2):143-146.

- (107) Colombel JF, Ferrari N, Debuysere H, Marteau P, Gendre JP, Bonaz B, et al. Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology* 2000 Jun;118(6):1025-1030.
- (108) Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001 May 31;411(6837):599-603.
- (109) Vermeire S. Review article: genetic susceptibility and application of genetic testing in clinical management of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006 Oct;24 Suppl 3:2-10.
- (110) Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996 Feb 29;379(6568):821-823.
- (111) Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002 Apr;70(4):845-857.
- (112) Roussomoustakaki M, Koutroubakis I, Vardas EM, Dimoulios P, Kouroumalis EA, Baritaki S, et al. NOD2 insertion mutation in a Cretan Crohn's disease population. *Gastroenterology* 2003 Jan;124(1):272-3; author reply 273-4.
- (113) Vignal C, Singer E, Peyrin-Biroulet L, Desreumaux P, Chamaillard M. How NOD2 mutations predispose to Crohn's disease? *Microbes Infect* 2007 Apr;9(5):658-663.
- (114) Lin Z, Hegarty JP, John G, Berg A, Wang Z, Sehgal R, et al. NOD2 Mutations Affect Muramyl Dipeptide Stimulation of Human B Lymphocytes and Interact with Other IBD-Associated Genes. *Dig Dis Sci* 2013 May 26.
- (115) Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003 Apr;124(4):993-1000.

- (116) Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005 Feb 4;307(5710):731-734.
- (117) Wehkamp J, Stange EF, Fellermann K. Defensin-immunology in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin Biol* 2009 Jun;33 Suppl 3:S137-44.
- (118) Raza A, Yousaf W, Giannella R, Shata MT. Th17 cells: interactions with predisposing factors in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Expert Rev Clin Immunol* 2012 Feb;8(2):161-168.
- (119) McGovern DP, Gardet A, Torkvist L, Goyette P, Essers J, Taylor KD, et al. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat Genet* 2010 Apr;42(4):332-337.
- (120) Akolkar PN, Gulwani-Akolkar B, Heresbach D, Lin XY, Fisher S, Katz S, et al. Differences in risk of Crohn's disease in offspring of mothers and fathers with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1997 Dec;92(12):2241-2244.
- (121) Csilag C, Nielsen OH, Borup R, Olsen J, Bjerrum JT, Nielsen FC. CARD15 status and familial predisposition for Crohn's disease and colonic gene expression. *Dig Dis Sci* 2007 Aug;52(8):1783-1789.
- (122) 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. *Am J Gastroenterol* 2004 Feb;99(2):299-305.
- (123) Helio T, Halme L, Lappalainen M, Fodstad H, Paavola-Sakki P, Turunen U, et al. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut* 2003 Apr;52(4):558-562.
- (124) Rodriguez-Perez N, Aguinaga-Barrilero A, Gorriono-Echebarria MB, Perez-Blas M, Martin-Villa JM. Analysis of Crohn's disease-related CARD15 polymorphisms in Spanish patients with idiopathic uveitis. *Dis Markers* 2008;24(2):111-117.
- (125) Peeters H, Vander Cruyssen B, Mielants H, de Vlam K, Vermeire S, Louis E, et al. Clinical and genetic factors associated with sacroiliitis in Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2008 Jan;23(1):132-137.

- (126) Adler J, Rangwalla SC, Dwamena BA, Higgins PD. The prognostic power of the NOD2 genotype for complicated Crohn's disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2011 Apr;106(4):699-712.
- (127) Guagnozzi D, Cossu A, Viscido A, Corleto V, Annese V, Latiano A, et al. Acute intestinal obstruction and NOD2/CARD15 mutations among Italian Crohn's disease patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2004 Sep-Oct;8(5):179-185.
- (128) Kurzawski G, Suchy J, Kladny J, Grabowska E, Mierzejewski M, Jakubowska A, et al. The NOD2 3020insC mutation and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 2004 Mar 1;64(5):1604-1606.
- (129) Tuupanen S, Alhopuro P, Mecklin JP, Jarvinen H, Aaltonen LA. No evidence for association of NOD2 R702W and G908R with colorectal cancer. *Int J Cancer* 2007 Jul 1;121(1):76-79.
- (130) Kaser A, Blumberg RS. Autophagy, microbial sensing, endoplasmic reticulum stress, and epithelial function in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011 May;140(6):1738-1747.
- (131) Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med* 2010 Jan;16(1):90-97.
- (132) Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim YG, Magalhaes JG, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* 2010 Jan;11(1):55-62.
- (133) Kuma A, Mizushima N, Ishihara N, Ohsumi Y. Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem* 2002 May 24;277(21):18619-18625.
- (134) Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 2008 Nov 13;456(7219):259-263.

- (135) 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. *Nat Genet* 2009 Dec;41(12):1335-1340.
- (136) Kuballa P, Huett A, Rioux JD, Daly MJ, Xavier RJ. Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *PLoS One* 2008;3(10):e3391.
- (137) Lapaquette P, Glasser AL, Huett A, Xavier RJ, Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol* 2010 Jan;12(1):99-113.
- (138) Glas J, Konrad A, Schmechel S, Dambacher J, Seiderer J, Schroff F, et al. The ATG16L1 gene variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) are strongly associated with susceptibility to Crohn's disease in the German population. *Am J Gastroenterol* 2008 Mar;103(3):682-691.
- (139) Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007 Feb;39(2):207-211.
- (140) Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004 May;4(5):335-348.
- (141) Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* 2010 Apr 2;584(7):1287-1295.
- (142) Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov* 2007 Apr;6(4):304-312.
- (143) Hartford CM, Ratain MJ. Rapamycin: something old, something new, sometimes borrowed and now renewed. *Clin Pharmacol Ther* 2007 Oct;82(4):381-388.
- (144) Massey DC, Bredin F, Parkes M. Use of sirolimus (rapamycin) to treat refractory Crohn's disease. *Gut* 2008 Sep;57(9):1294-1296.
- (145) Reinisch W, Panes J, Lemann M, Schreiber S, Feagan B, Schmidt S, et al. A multicenter, randomized, double-blind trial of everolimus versus azathioprine and placebo

to maintain steroid-induced remission in patients with moderate-to-severe active Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2008 Sep;103(9):2284-2292.

(146) Sakamuro D, Sabbatini P, White E, Prendergast GC. The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* 1997 Aug 18;15(8):887-898.

(147) Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 2003 Mar;33(3):357-365.

(148) Shen H, Solari A, Wang X, Zhang Z, Xu Y, Wang L, et al. P53 codon 72 polymorphism and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Oncol Rep* 2004 May;11(5):1115-1120.

(149) Soultz N, Sourvinos G, Dokianakis DN, Spandidos DA. P53 Codon 72 Polymorphism and its Association with Bladder Cancer. *Cancer Lett* 2002 May 28;179(2):175-183.

(150) Fan R, Wu MT, Miller D, Wain JC, Kelsey KT, Wiencke JK, et al. The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000 Oct;9(10):1037-1042.

(151) Shen H, Zheng Y, Sturgis EM, Spitz MR, Wei Q. P53 codon 72 polymorphism and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Cancer Lett* 2002 Sep 26;183(2):123-130.

(152) Granja F, Morari J, Morari EC, Correa LA, Assumpcao LV, Ward LS. Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. *Cancer Lett* 2004 Jul 16;210(2):151-157.

(153) Wang XL, Wang J, Wilcken DE. Interactive effect of the p53 gene and cigarette smoking on coronary artery disease. *Cardiovasc Res* 1997 Aug;35(2):250-255.

(154) Pietrowski D, Bettendorf H, Riener EK, Keck C, Hefler LA, Huber JC, et al. Recurrent pregnancy failure is associated with a polymorphism in the p53 tumour suppressor gene. *Hum Reprod* 2005 Apr;20(4):848-851.

(155) Gomez-Sanchez JC, Delgado-Esteban M, Rodriguez-Hernandez I, Sobrino T, Perez de la Ossa N, Reverte S, et al. The human Tp53 Arg72Pro polymorphism explains different functional prognosis in stroke. *J Exp Med* 2011 Mar 14;208(3):429-437.

- (156) Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2009 Jul;124(1):3-20; quiz 21-2.
- (157) Levine AD. Apoptosis: implications for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2000 Aug;6(3):191-205.
- (158) Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-306.
- (159) Edelblum KL, Yan F, Yamaoka T, Polk DB. Regulation of apoptosis during homeostasis and disease in the intestinal epithelium. *Inflamm Bowel Dis* 2006 May;12(5):413-424.
- (160) Hagiwara C, Tanaka M, Kudo H. Increase in colorectal epithelial apoptotic cells in patients with ulcerative colitis ultimately requiring surgery. *J Gastroenterol Hepatol* 2002 Jul;17(7):758-764.
- (161) Marini M, Bamias G, Rivera-Nieves J, Moskaluk CA, Hoang SB, Ross WG, et al. TNF-alpha neutralization ameliorates the severity of murine Crohn's-like ileitis by abrogation of intestinal epithelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Jul 8;100(14):8366-8371.
- (162) Zeissig S, Bojarski C, Buegel N, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, et al. Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor alpha antibody treatment. *Gut* 2004 Sep;53(9):1295-1302.
- (163) Dirisina R, Katzman RB, Goretsky T, Managlia E, Mittal N, Williams DB, et al. p53 and PUMA independently regulate apoptosis of intestinal epithelial cells in patients and mice with colitis. *Gastroenterology* 2011 Sep;141(3):1036-1045.
- (164) Goretsky T, Dirisina R, Sinh P, Mittal N, Managlia E, Williams DB, et al. p53 mediates TNF-induced epithelial cell apoptosis in IBD. *Am J Pathol* 2012 Oct;181(4):1306-1315.
- (165) Chang WC, Coudry RA, Clapper ML, Zhang X, Williams KL, Spittle CS, et al. Loss of p53 enhances the induction of colitis-associated neoplasia by dextran sulfate sodium. *Carcinogenesis* 2007 Nov;28(11):2375-2381.
- (166) Berg DJ, Davidson N, Kuhn R, Muller W, Menon S, Holland G, et al. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest* 1996 Aug 15;98(4):1010-1020.

- (167) Okayasu I, Yamada M, Mikami T, Yoshida T, Kanno J, Ohkusa T. Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium-induced colitis model. *J Gastroenterol Hepatol* 2002 Oct;17(10):1078-1083.
- (168) Yoshida T, Mikami T, Mitomi H, Okayasu I. Diverse p53 alterations in ulcerative colitis-associated low-grade dysplasia: full-length gene sequencing in microdissected single crypts. *J Pathol* 2003 Feb;199(2):166-175.
- (169) Takaku H, Ajioka Y, Watanabe H, Hashidate H, Yamada S, Yokoyama J, et al. Mutations of p53 in morphologically non-neoplastic mucosa of long-standing ulcerative colitis. *Jpn J Cancer Res* 2001 Feb;92(2):119-126.
- (170) Nelson HH, Wilkojmen M, Marsit CJ, Kelsey KT. TP53 mutation, allelism and survival in non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2005 Oct;26(10):1770-1773.
- (171) Sullivan A, Syed N, Gasco M, Bergamaschi D, Trigiant G, Attard M, et al. Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene* 2004 Apr 22;23(19):3328-3337.
- (172) Vaji S, Salehi Z, Aminian K. Association of p53 codon 72 genetic polymorphism with the risk of ulcerative colitis in northern Iran. *Int J Colorectal Dis* 2011 Feb;26(2):235-238.
- (173) Vietri MT, Riegler G, Ursillo A, Caserta L, Cioffi M, Molinari AM. P53 Codon 72 Polymorphism in Patients Affected with Ulcerative Colitis. *J Gastroenterol* 2007 Jun;42(6):456-460.
- (174) Eren F, Akkiprik M, Atug O, Sonmez O, Tahan G, Ozdemir F, et al. R72P polymorphism of TP53 in ulcerative colitis patients is associated with the incidence of colectomy, use of steroids and the presence of a positive family history. *Pathol Oncol Res* 2010 Dec;16(4):563-568.
- (175) Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995 Mar 10;267(5203):1456-1462.
- (176) Kabelitz D, Pohl T, Pechhold K. Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes. *Immunol Today* 1993 Jul;14(7):338-339.
- (177) Mountz JD, Wu J, Cheng J, Zhou T. Autoimmune disease. A problem of defective apoptosis. *Arthritis Rheum* 1994 Oct;37(10):1415-1420.

- (178) Lenardo MJ. Fas and the art of lymphocyte maintenance. *J Exp Med* 1996 Mar 1;183(3):721-724.
- (179) Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol Today* 1995 Dec;16(12):569-574.
- (180) Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 1998 Apr 10;280(5361):243-248.
- (181) Ina K, Itoh J, Fukushima K, Kusugami K, Yamaguchi T, Kyokane K, et al. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol* 1999 Jul 15;163(2):1081-1090.
- (182) Itoh J, de La Motte C, Strong SA, Levine AD, Fiocchi C. Decreased Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease. *Gut* 2001 Jul;49(1):35-41.
- (183) Eder P, Lykowska-Szuber L, Krela-Kazmierczak I, Stawczyk-Eder K, Zabel M, Linke K. The influence of infliximab and adalimumab on the expression of apoptosis-related proteins in lamina propria mononuclear cells and enterocytes in Crohn's disease - an immunohistochemical study. *J Crohns Colitis* 2013 Oct 1;7(9):706-716.
- (184) Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2005 Nov;37(11):719-727.
- (185) Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994 Jan;124(1-2):1-6.
- (186) Pastorino JG, Chen ST, Tafani M, Snyder JW, Farber JL. The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 1998 Mar 27;273(13):7770-7775.
- (187) Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998 Aug 28;281(5381):1322-1326.
- (188) ten Hove T, van Montfrans C, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* 2002 Feb;50(2):206-211.

- (189) Sandborn WJ, Hanauer SB, Katz S, Safdi M, Wolf DG, Baerg RD, et al. Etanercept for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2001 Nov;121(5):1088-1094.
- (190) Nesbitt A, Fossati G, Bergin M, Stephens P, Stephens S, Foulkes R, et al. Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): in vitro comparison with other anti-tumor necrosis factor alpha agents. *Inflamm Bowel Dis* 2007 Nov;13(11):1323-1332.
- (191) Atreya R, Zimmer M, Bartsch B, Waldner MJ, Atreya I, Neumann H, et al. Antibodies against tumor necrosis factor (TNF) induce T-cell apoptosis in patients with inflammatory bowel diseases via TNF receptor 2 and intestinal CD14(+) macrophages. *Gastroenterology* 2011 Dec;141(6):2026-2038.
- (192) Ueyama H, Kiyohara T, Sawada N, Isozaki K, Kitamura S, Kondo S, et al. High Fas ligand expression on lymphocytes in lesions of ulcerative colitis. *Gut* 1998 Jul;43(1):48-55.
- (193) Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Luinetti O, Ricevuti L, Morera R, Cifone MG, et al. Increased enterocyte apoptosis in inflamed areas of Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 2003 Nov;46(11):1498-1507.
- (194) Kobayashi SD, Deleo FR. An apoptosis differentiation programme in human polymorphonuclear leucocytes. *Biochem Soc Trans* 2004 Jun;32(Pt3):474-476.
- (195) Weinmann P, Scharffetter-Kochanek K, Forlow SB, Peters T, Walzog B. A role for apoptosis in the control of neutrophil homeostasis in the circulation: insights from CD18-deficient mice. *Blood* 2003 Jan 15;101(2):739-746.
- (196) Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett* 2001 Jan 5;487(3):318-322.
- (197) Catarzi S, Marcucci T, Papucci L, Favilli F, Donnini M, Tonelli F, et al. Apoptosis and Bax, Bcl-2, Mcl-1 expression in neutrophils of Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2008 Jun;14(6):819-825.
- (198) Sall J. MonteCarlo calibration of distributions of partition statistics. MonteCarlo calibration of distributions of partition statistics. Technical report, SAS Inst., 2002.
- (199) Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004 May;126(6):1504-1517.

- (200) Lowe AM, Roy PO, B-Poulin M, Michel P, Bitton A, St-Onge L, et al. Epidemiology of Crohn's disease in Quebec, Canada. *Inflamm Bowel Dis* 2009 Mar;15(3):429-435.
- (201) Khan N, Abbas AM, Lichtenstein GR, Loftus EV, Jr, Bazzano LA. Risk of lymphoma in patients with ulcerative colitis treated with thiopurines: a nationwide retrospective cohort study. *Gastroenterology* 2013 Nov;145(5):1007-1015.e3.
- (202) Lang SM, Stratakis DF, Heinzlmann M, Heldwein W, Wiebecke B, Loeschke K. Molecular screening of patients with long standing extensive ulcerative colitis: detection of p53 and Ki-ras mutations by single strand conformation polymorphism analysis and differential hybridisation in colonic lavage fluid. *Gut* 1999 Jun;44(6):822-825.
- (203) Fujii S, Fujimori T, Chiba T. Usefulness of analysis of p53 alteration and observation of surface microstructure for diagnosis of ulcerative colitis-associated colorectal neoplasia. *J Exp Clin Cancer Res* 2003 Mar;22(1):107-115.
- (204) Cummings JR, Cooney R, Pathan S, Anderson CA, Barrett JC, Beckly J, et al. Confirmation of the role of ATG16L1 as a Crohn's disease susceptibility gene. *Inflamm Bowel Dis* 2007 Aug;13(8):941-946.
- (205) 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. *Scand J Gastroenterol* 2006 Dec;41(12):1421-1432.
- (206) Iimura M, Nakamura T, Shinozaki S, Iizuka B, Inoue Y, Suzuki S, et al. Bax is downregulated in inflamed colonic mucosa of ulcerative colitis. *Gut* 2000 Aug;47(2):228-235.
- (207) Zintzaras E, Kitsios GD. Synopsis and synthesis of candidate-gene association studies in chronic lymphocytic leukemia: the CUMAGAS-CLL information system. *Am J Epidemiol* 2009 Sep 15;170(6):671-678.
- (208) Gu S, Wu Q, Zhao X, Wu W, Gao Z, Tan X, et al. Association of CASP3 polymorphism with hematologic toxicity in patients with advanced non-small-cell lung carcinoma treated with platinum-based chemotherapy. *Cancer Sci* 2012 Aug;103(8):1451-1459.

- (209) Park YH, Sohn SK, Kim JG, Lee MH, Song HS, Kim MK, et al. Interaction between BCL2 and interleukin-10 gene polymorphisms alter outcomes of diffuse large B-cell lymphoma following rituximab plus CHOP chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2009 Mar 15;15(6):2107-2115.
- (210) Searle CJ, Brock IW, Cross SS, Balasubramanian SP, Reed MW, Cox A. A BCL2 promoter polymorphism rs2279115 is not associated with BCL2 protein expression or patient survival in breast cancer patients. *Springerplus* 2012;1:38-1801-1-38.
- (211) Eun YG, Hong IK, Kim SK, Park HK, Kwon S, Chung DH, et al. A Polymorphism (rs1801018, Thr7Thr) of BCL2 is Associated with Papillary Thyroid Cancer in Korean Population. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2011 Sep;4(3):149-154.
- (212) Hirata H, Hinoda Y, Nakajima K, Kikuno N, Suehiro Y, Tabatabai ZL, et al. The bcl2 -938CC genotype has poor prognosis and lower survival in renal cancer. *J Urol* 2009 Aug;182(2):721-727.
- (213) Hirata H, Hinoda Y, Kikuno N, Suehiro Y, Shahryari V, Ahmad AE, et al. Bcl2 -938C/A polymorphism carries increased risk of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *J Urol* 2009 Apr;181(4):1907-1912.
- (214) Wang MH, Fiocchi C, Ripke S, Zhu X, Duerr RH, Achkar JP. A novel approach to detect cumulative genetic effects and genetic interactions in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2013 Aug;19(9):1799-1808.
- (215) Weersma RK, Stokkers PC, van Bodegraven AA, van Hogezaand RA, Verspaget HW, de Jong DJ, et al. Molecular prediction of disease risk and severity in a large Dutch Crohn's disease cohort. *Gut* 2009 Mar;58(3):388-395.
- (216) 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 Apr;122(4):854-866.
- (217) Thompson AI, Lees CW. Genetics of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2011 Mar;17(3):831-848.

## **ANEXO I**

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO/ESTUDIO GENÉTICO**

**NOMBRE Y APELLIDOS**.....

**DNI**.....**Nº HISTORIA**.....

**MÉDICO QUE INFORMA**.....

Ha recibido información verbal y escrita sobre el estudio genético que se va a realizar sobre Enfermedad de Crohn.

De acuerdo con esta información he entendido que:

1. Se me va a extraer una muestra de sangre para realizar un estudio genético.
2. El objeto de dicho estudio es analizar genes que estén implicados en la Enfermedad de Crohn, que puedan tener relación con un peor curso de la enfermedad y con la respuesta a ciertos fármacos (biológicos).
3. Debido a la complejidad de estos genes, los estudios pueden demorarse más de un año.
4. Se me informará de los resultados del estudio a mí y/o a las personas por mí autorizadas.
5. Se guardará la confidencialidad de los resultados del estudio, pudiéndose utilizar los datos para estudios epidemiológicos.
6. Si es mi decisión, puedo ejercer el derecho de anular el consentimiento y/o decidir no saber el resultado, así como solicitar que se destruyan las muestras extraídas.

Leído el documento consiento que se me extraiga una muestra de sangre para realizar el Estudio Genético de los genes implicados en la Enfermedad de Crohn.

En Salamanca, a..... de..... de

Firma del paciente

Firma del médico

**ANEXO II****A. ASOCIACIONES ENTRE VARIABLES CLÍNICAS****Tabla 1.** *Edad al diagnóstico y antecedentes familiares de EIIC.*

			edad			Total
			< 16 AÑOS	16-40 AÑOS	> 40 AÑOS	
antecedentes familiares	NO	Recuento	6	65	17	88
		% dentro de antecedentes familiares	6,8%	73,9%	19,3%	100,0%
		% dentro de edad	100,0%	87,8%	77,3%	86,3%
	FAMILIAR I GRADO EII	Recuento	0	9	5	14
		% dentro de antecedentes familiares	0,0%	64,3%	35,7%	100,0%
		% dentro de edad	0,0%	12,2%	22,7%	13,7%
Total		Recuento	6	74	22	102
		% dentro de antecedentes familiares	5,9%	72,5%	21,6%	100,0%
		% dentro de edad	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 2.** *Edad al diagnóstico y localización.*

			edad			Total
			< 16 AÑOS	16-40 AÑOS	> 40 AÑOS	
localizacion2	ILEON	Recuento	2	30	8	40

		% dentro de localizacion2	5,0%	75,0%	20,0%	100,0%
		% dentro de edad	33,3%	40,5%	36,4%	39,2%
	COLON	Recuento	1	10	7	18
		% dentro de localizacion2	5,6%	55,6%	38,9%	100,0%
		% dentro de edad	16,7%	13,5%	31,8%	17,6%
	ILEOCOLONICO	Recuento	3	32	7	42
		% dentro de localizacion2	7,1%	76,2%	16,7%	100,0%
		% dentro de edad	50,0%	43,2%	31,8%	41,2%
	GASTROINTESTINAL	Recuento	0	2	0	2
		% dentro de localizacion2	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
		% dentro de edad	0,0%	2,7%	0,0%	2,0%
Total		Recuento	6	74	22	102

**Tabla 3.** Edad al diagnóstico y fenotipo.

			edad			Total
			< 16 AÑOS	16-40 AÑOS	> 40 AÑOS	
comportamiento	INFLAMATORIO	Recuento	3	44	9	56
		% dentro de comportamiento	5,4%	78,6%	16,1%	100,0%

		% dentro de edad	50,0%	59,5%	40,9%	54,9%
	ESTENOS ANTE	Recuento	0	17	8	25
		% dentro de comportamiento	0,0%	68,0%	32,0%	100,0%
		% dentro de edad	0,0%	23,0%	36,4%	24,5%
	FISTULIZANTE	Recuento	3	13	5	21
		% dentro de comportamiento	14,3%	61,9%	23,8%	100,0%
		% dentro de edad	50,0%	17,6%	22,7%	20,6%
Total		Recuento	6	74	22	102
		% dentro de comportamiento	5,9%	72,5%	21,6%	100,0%
		% dentro de edad	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 4.** Edad al diagnóstico y cirugía.

			edad		
			< 16 AÑOS	16-40 AÑOS	> 40 AÑOS
cirugía si o no	NO	Recuento	2	38	9
		% dentro de cirugía si o no	4,1%	77,6%	18,4%
		% dentro de edad	33,3%	51,4%	40,9%
	SI	Recuento	4	36	13
		% dentro de cirugía si o no	7,5%	67,9%	24,5%
		% dentro de edad	66,7%	48,6%	59,1%
Total		Recuento	6	74	22
		% dentro de cirugía si o no	5,9%	72,5%	21,6%
		% dentro de edad	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 5.** Edad al diagnóstico y respuesta a AZA.

			edad			Total
			< 16 AÑOS	16-40 AÑOS	> 40 AÑOS	
RESPUESTA AZATIOPRINA	NO	Recuento	1	15	1	17
		% dentro de RESPUESTA AZATIOPRINA	5,9%	88,2%	5,9%	100,0 %
		% dentro de edad	16,7%	28,3%	12,5%	25,4%
	SI	Recuento	5	38	7	50
		% dentro de RESPUESTA AZATIOPRINA	10,0%	76,0%	14,0%	100,0 %
		% dentro de edad	83,3%	71,7%	87,5%	74,6%
Total		Recuento	6	53	8	67
		% dentro de RESPUESTA AZATIOPRINA	9,0%	79,1%	11,9%	100,0 %
		% dentro de edad	100,0%	100,0%	100,0%	100,0 %

**Tabla 6.** Edad al diagnóstico y remisión con AZA.

			edad			Total
			< 16 AÑOS	16-40 AÑOS	> 40 AÑOS	
remision con Azatioprina	NO	Recuento	4	38	3	45
		% dentro de remision con Azatioprina	8,9%	84,4%	6,7%	100,0%

		% dentro de edad	66,7 %	71,7%	37,5%	67,2%
	SI	Recuento	2	15	5	22
		% dentro de remision con Azatioprina	9,1%	68,2%	22,7%	100,0%
		% dentro de edad	33,3 %	28,3%	62,5%	32,8%
Total		Recuento	6	53	8	67
		% dentro de remision con Azatioprina	9,0%	79,1%	11,9%	100,0%
		% dentro de edad	100,0 %	100,0 %	100,0%	100,0%

**Tabla 7. Edad al diagnóstico y respuesta a IFX.**

			edad			Total
			< 16 AÑOS	16-40 AÑOS	> 40 AÑOS	
respu sta a infixi mab	NO	Recuento	1	6	1	8
		% dentro de respuesta a infiximab	12,5%	75,0%	12,5%	100,0 %
		% dentro de edad	20,0%	27,3%	33,3%	26,7%
	SI	Recuento	4	16	2	22
		% dentro de respuesta a infiximab	18,2%	72,7%	9,1%	100,0 %
		% dentro de edad	80,0%	72,7%	66,7%	73,3%
Total		Recuento	5	22	3	30
		% dentro de respuesta a infiximab	16,7%	73,3%	10,0%	100,0 %

	% dentro de edad	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
--	------------------	--------	--------	--------	--------

**Tabla 8.** Localización y antecedentes familiares.

			localizacion2				Total
			ILEON	COLON	ILEOCOLONICO	GASTROINTES TINAL	
antecedentes familiares	NO	Recuento	36	14	36	2	88
		% dentro de antecedentes familiares	40,9%	15,9%	40,9%	2,3%	100,0%
		% dentro de localizacion2	90,0%	77,8%	85,7%	100,0%	86,3%
	FAMILIAR I GRADO EII	Recuento	4	4	6	0	14
		% dentro de antecedentes familiares	28,6%	28,6%	42,9%	0,0%	100,0%
		% dentro de localizacion2	10,0%	22,2%	14,3%	0,0%	13,7%
Total		Recuento	40	18	42	2	102
		% dentro de antecedentes familiares	39,2%	17,6%	41,2%	2,0%	100,0%
		% dentro de localizacion2	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

<b>Tabla 9.</b> Localización y cirugía.			localizacion2				Total
			ILEON	COLON	ILEOCOLONICO	GASTROINTES TINAL	
cirugía si o no	NO	Recuento	17	12	18	2	49

		% dentro de cirugía si o no	34,7%	24,5%	36,7%	4,1%	100,0%
		% dentro de localizacion2	42,5%	66,7%	42,9%	100,0%	48,0%
	SI	Recuento	23	6	24	0	53
		% dentro de cirugía si o no	43,4%	11,3%	45,3%	0,0%	100,0%
		% dentro de localizacion2	57,5%	33,3%	57,1%	0,0%	52,0%
Total		Recuento	40	18	42	2	102
		% dentro de cirugía si o no	39,2%	17,6%	41,2%	2,0%	100,0%
		% dentro de localizacion2	100,0 %	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 10.** Localización y necesidad de corticoides en el primer brote.

			localizacion2				Total
			ILEON	COLO N	ILEOCOLONI CO	GASTROINTES TINAL	
CORTICOIDES AL 1º BROTE	N O	Recuento	28	13	22	0	63
		% dentro de CORTICOIDES AL 1º BROTE	44,4%	20,6%	34,9%	0,0%	100,0%
		% dentro de localizacion2	70,0%	72,2%	52,4%	0,0%	61,8%
	S Í	Recuento	12	5	20	2	39
		% dentro de CORTICOIDES AL 1º BROTE	30,8%	12,8%	51,3%	5,1%	100,0%
		% dentro de	30,0%	27,8%	47,6%	100,0%	38,2%

	localizacion2					
Total	Recuento	40	18	42	2	102
	% dentro de CORTICOIDES AL 1º BROTE	39,2%	17,6%	41,2%	2,0%	100,0%
	% dentro de localizacion2	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 11.** Localización y respuesta a azatioprina.

			localizacion2			Total
			ILEON	COLON	ILEOCOLONICO	
RESPUESTA AZATIPRINA	NO	Recuento	9	2	6	17
		% dentro de RESPUESTA AZATIPRINA	52,9%	11,8%	35,3%	100,0%
		% dentro de localizacion2	34,6%	25,0%	18,2%	25,4%
	SI	Recuento	17	6	27	50
		% dentro de RESPUESTA AZATIPRINA	34,0%	12,0%	54,0%	100,0%
		% dentro de localizacion2	65,4%	75,0%	81,8%	74,6%
Total		Recuento	26	8	33	67
		% dentro de RESPUESTA AZATIPRINA	38,8%	11,9%	49,3%	100,0%
		% dentro de localizacion2	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 12.** Localización y remisión con azatioprina.

			localizacion2			Total
			ILEON	COLON	ILEOCOLONIC O	
remision con Azatioprina	N O	Recuento	18	6	21	45
		% dentro de remision con Azatioprina	40,0%	13,3%	46,7%	100,0%
		% dentro de localizacion2	69,2%	75,0%	63,6%	67,2%
	SI	Recuento	8	2	12	22
		% dentro de remision con Azatioprina	36,4%	9,1%	54,5%	100,0%
		% dentro de localizacion2	30,8%	25,0%	36,4%	32,8%
Total		Recuento	26	8	33	67
		% dentro de remision con Azatioprina	38,8%	11,9%	49,3%	100,0%
		% dentro de localizacion2	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 13.** Localización y necesidad de anti-TNF.

			localizacion2				Total
			ILEON	COLO N	ILEOCOLO NICO	GASTROINT ESTINAL	
adalimumab o inflimab	NO	Recuento	29	14	23	2	68
		% dentro de adalimumab o infilimab	42,6%	20,6%	33,8%	2,9%	100,0%

		% dentro de localizacion2	72,5%	77,8%	54,8%	100,0%	66,7%
	SI	Recuento	11	4	19	0	34
		% dentro de adalimumab o infliximab	32,4%	11,8%	55,9%	0,0%	100,0%
		% dentro de localizacion2	27,5%	22,2%	45,2%	0,0%	33,3%
Total		Recuento	40	18	42	2	102
		% dentro de adalimumab o infliximab	39,2%	17,6%	41,2%	2,0%	100,0%
		% dentro de localizacion2	100,0%	100,0 %	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 14.** Localización y necesidad de infliximab.

			localizacion2				Total
			ILEON	COLON	ILEOCOLONIC O	GASTROINTES TINAL	
infliximab	NO	Recuento	31	14	25	2	72
		% dentro de infliximab	43,1%	19,4%	34,7%	2,8%	100,0 %
		% dentro de localizacion2	77,5%	77,8%	59,5%	100,0%	70,6%
	SI	Recuento	9	4	17	0	30
		% dentro de infliximab	30,0%	13,3%	56,7%	0,0%	100,0 %

		% dentro de localizacion2	22,5%	22,2%	40,5%	0,0%	29,4%
Total		Recuento	40	18	42	2	102
		% dentro de infliximab	39,2%	17,6%	41,2%	2,0%	100,0%
		% dentro de localizacion2	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 15.** Localización y respuesta a infliximab.

			localizacion2			Total
			ILEON	COLON	ILEOCOLONICO	
respuesta a infliximab	NO	Recuento	4	0	4	8
		% dentro de respuesta a infliximab	50,0%	0,0%	50,0%	100,0%
		% dentro de localizacion2	44,4%	0,0%	23,5%	26,7%
	SI	Recuento	5	4	13	22
		% dentro de respuesta a infliximab	22,7%	18,2%	59,1%	100,0%
		% dentro de localizacion2	55,6%	100,0%	76,5%	73,3%
Total		Recuento	9	4	17	30
		% dentro de respuesta a infliximab	30,0%	13,3%	56,7%	100,0%
		% dentro de localizacion2	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 16.** Localización y remisión con infliximab.

			localizacion2			Total
			ILEON	COLON	ILEOCOLONICO	
remisión con infliximab	NO	Recuento	5	2	12	19
		% dentro de remisión con infliximab	26,3%	10,5%	63,2%	100,0%
		% dentro de localizacion2	55,6%	50,0%	70,6%	63,3%
	SI	Recuento	4	2	5	11
		% dentro de remisión con infliximab	36,4%	18,2%	45,5%	100,0%
		% dentro de localizacion2	44,4%	50,0%	29,4%	36,7%
Total		Recuento	9	4	17	30
		% dentro de remisión con infliximab	30,0%	13,3%	56,7%	100,0%
		% dentro de localizacion2	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 17.** Fenotipo y antecedentes familiares.

			comportamiento			Total
			INFLAMATORIO	ESTENOSANTE	FISTULIZANTE	
antecedentes familiares	NO	Recuento	49	22	17	88
		% dentro de antecedentes familiares	55,7%	25,0%	19,3%	100,0%
		% dentro de comportamiento	87,5%	88,0%	81,0%	86,3%

FAMILIAR I GRADO EII	Recuento	7	3	4	14
	% dentro de antecedentes familiares	50,0%	21,4%	28,6%	100,0%
	% dentro de comportamiento	12,5%	12,0%	19,0%	13,7%
Total	Recuento	56	25	21	102
	% dentro de antecedentes familiares	54,9%	24,5%	20,6%	100,0%
	% dentro de comportamiento	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 18.** Fenotipo y necesidad de corticoides en el primer brote.

			comportamiento			Total
			INFLAMAT ORIO	ESTENOSA NTE	FISTULIZA NTE	
CORTICOIDES AL 1º BROTE	NO	Recuento	32	15	16	63
		% dentro de CORTICOIDES AL 1º BROTE	50,8%	23,8%	25,4%	100,0%
		% dentro de comportamiento	57,1%	60,0%	76,2%	61,8%
	SÍ	Recuento	24	10	5	39
		% dentro de CORTICOIDES AL 1º BROTE	61,5%	25,6%	12,8%	100,0%
		% dentro de comportamiento	42,9%	40,0%	23,8%	38,2%
Total		Recuento	56	25	21	102

	% dentro de CORTICOIDES AL 1º BROTE	54,9%	24,5%	20,6%	100,0%
	% dentro de comportamiento	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 19.** Fenotipo y necesidad de azatioprina.

			comportamiento			Total
			INFLAMATORIO	ESTENOSANTE	FISTULIZANTE	
AZATIOPRINA	NO	Recuento	21	10	4	35
		% dentro de AZATIOPRINA	60,0%	28,6%	11,4%	100,0%
		% dentro de comportamiento	37,5%	40,0%	19,0%	34,3%
	SI	Recuento	35	15	17	67
		% dentro de AZATIOPRINA	52,2%	22,4%	25,4%	100,0%
		% dentro de comportamiento	62,5%	60,0%	81,0%	65,7%
Total		Recuento	56	25	21	102
		% dentro de AZATIOPRINA	54,9%	24,5%	20,6%	100,0%
		% dentro de comportamiento	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 20.** Fenotipo y respuesta a azatioprina.

			comportamiento			Total
			INFLAMATORIO	ESTENOSANTE	FISTULIZANTE	
RESPUESTA AZATIPRINA	NO	Recuento	9	2	6	17
		% dentro de RESPUESTA AZATIPRINA	52,9%	11,8%	35,3%	100,0%
		% dentro de comportamiento	25,7%	13,3%	35,3%	25,4%
	SI	Recuento	26	13	11	50
		% dentro de RESPUESTA AZATIPRINA	52,0%	26,0%	22,0%	100,0%
		% dentro de comportamiento	74,3%	86,7%	64,7%	74,6%
Total		Recuento	35	15	17	67
		% dentro de RESPUESTA AZATIPRINA	52,2%	22,4%	25,4%	100,0%
		% dentro de comportamiento	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 21.** Fenotipo y remisión con azatioprina.

			comportamiento			Total
			INFLAMATORIO	ESTENOSANTE	FISTULIZANTE	
remisión con Azatioprina	NO	Recuento	21	11	13	45
		% dentro de remisión con Azatioprina	46,7%	24,4%	28,9%	100,0%
		% dentro de comportami ento	60,0%	73,3%	76,5%	67,2%
	SI	Recuento	14	4	4	22
		% dentro de remisión con Azatioprina	63,6%	18,2%	18,2%	100,0%
		% dentro de comportami ento	40,0%	26,7%	23,5%	32,8%
Total		Recuento	35	15	17	67
		% dentro de remisión con Azatioprina	52,2%	22,4%	25,4%	100,0%
		% dentro de comportami ento	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 22.** Fenotipo y necesidad de anti-TNF.

			comportamiento			Total
			INFLAMATORIO	ESTENOSANTE	FISTULIZANTE	
adalimumab o infliximab	NO	Recuento	38	20	10	68
		% dentro de adalimumab o infliximab	55,9%	29,4%	14,7%	100,0%
		% dentro de comportamiento	67,9%	80,0%	47,6%	66,7%
	SI	Recuento	18	5	11	34
		% dentro de adalimumab o infliximab	52,9%	14,7%	32,4%	100,0%
		% dentro de comportamiento	32,1%	20,0%	52,4%	33,3%
Total		Recuento	56	25	21	102
		% dentro de adalimumab o infliximab	54,9%	24,5%	20,6%	100,0%
		% dentro de comportamiento	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 23.** Fenotipo y necesidad de infliximab.

			comportamiento			Total
			INFLAMATORIO	ESTENOSANTE	FISTULIZANTE	
infiximab	NO	Recuento	40	20	12	72

		% dentro de infliximab	55,6%	27,8%	16,7%	100,0%
		% dentro de comportamiento	71,4%	80,0%	57,1%	70,6%
	SI	Recuento	16	5	9	30
		% dentro de infliximab	53,3%	16,7%	30,0%	100,0%
		% dentro de comportamiento	28,6%	20,0%	42,9%	29,4%
Total		Recuento	56	25	21	102
		% dentro de infliximab	54,9%	24,5%	20,6%	100,0%
		% dentro de comportamiento	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 24.** Fenotipo y respuesta a infliximab.

			comportamiento			Total
			INFLAMATORIO	ESTENOSANTE	FISTULIZANTE	
respuesta a infliximab	NO	Recuento	4	2	2	8
		% dentro de respuesta a infliximab	50,0%	25,0%	25,0%	100,0%
		% dentro de comportamiento	25,0%	40,0%	22,2%	26,7%
	SI	Recuento	12	3	7	22
		% dentro de respuesta a infliximab	54,5%	13,6%	31,8%	100,0%
		% dentro de comportamiento	75,0%	60,0%	77,8%	73,3%

		o				
Total		Recuento	16	5	9	30
		% dentro de respuesta a infliximab	53,3%	16,7%	30,0%	100,0%
		% dentro de comportamiento	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 25. Fenotipo y remisión con infliximab.**

			comportamiento			Total
			INFLAMAT ORIO	ESTENOSAN TE	FISTULIZ ANTE	
remisión con infliximab	NO	Recuento	10	4	5	19
		% dentro de remisión con infliximab	52,6%	21,1%	26,3%	100,0%
		% dentro de comportamiento	62,5%	80,0%	55,6%	63,3%
	SI	Recuento	6	1	4	11
		% dentro de remisión con infliximab	54,5%	9,1%	36,4%	100,0%
		% dentro de comportamiento	37,5%	20,0%	44,4%	36,7%
Total		Recuento	16	5	9	30
		% dentro de remisión con infliximab	53,3%	16,7%	30,0%	100,0%
		% dentro de comportamiento	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 26.** Cirugía y antecedentes familiares.

			cirugía si o no		Total
			NO	SI	
antecedentes familiares	NO	Recuento	43	45	88
		% dentro de antecedentes familiares	48,9%	51,1%	100,0%
	FAMILIAR I GRADO EII	% dentro de cirugía si o no	87,8%	84,9%	86,3%
		Recuento	6	8	14
		% dentro de antecedentes familiares	42,9%	57,1%	100,0%
		% dentro de cirugía si o no	12,2%	15,1%	13,7%
	Total	Recuento	49	53	102
		% dentro de antecedentes familiares	48,0%	52,0%	100,0%
		% dentro de cirugía si o no	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 27.** Cirugía y necesidad de corticoides en el primer brote.

			cirugía si o no		Total
			NO	SI	
CORTICOIDES AL 1º BROTE	NO	Recuento	29	34	63
		% dentro de CORTICOIDES AL 1º BROTE	46,0%	54,0%	100,0%
	SÍ	% dentro de cirugía si o no	59,2%	64,2%	61,8%
		Recuento	20	19	39
	Total	% dentro de CORTICOIDES AL 1º BROTE	51,3%	48,7%	100,0%
		% dentro de cirugía si o no	40,8%	35,8%	38,2%
Recuento		49	53	102	
Total	% dentro de CORTICOIDES AL 1º BROTE	48,0%	52,0%	100,0%	
	% dentro de cirugía si o no	100,0%	100,0%	100,0%	

**Tabla 28.** Cirugía y remisión con azatioprina.

		cirugía si o no		Total	
		NO	SI		
remision con Azatioprina	NO	Recuento	15	30	45
		% dentro de remision con Azatioprina	33,3%	66,7%	100,0%
		% dentro de cirugía si o no	57,7%	73,2%	67,2%
	SI	Recuento	11	11	22
		% dentro de remision con Azatioprina	50,0%	50,0%	100,0%
		% dentro de cirugía si o no	42,3%	26,8%	32,8%
Total	Recuento	26	41	67	
	% dentro de remision con Azatioprina	38,8%	61,2%	100,0%	
	% dentro de cirugía si o no	100,0%	100,0%	100,0%	

**Tabla 29.** Cirugía y respuesta a infliximab.

		cirugía si o no		Total	
		NO	SI		
respuesta a infliximab	NO	Recuento	1	7	8
		% dentro de respuesta a infliximab	12,5%	87,5%	100,0%
		% dentro de cirugía si o no	11,1%	33,3%	26,7%
	SI	Recuento	8	14	22
		% dentro de respuesta a infliximab	36,4%	63,6%	100,0%
		% dentro de cirugía si o no	88,9%	66,7%	73,3%
Total	Recuento	9	21	30	
	% dentro de respuesta a infliximab	30,0%	70,0%	100,0%	
	% dentro de cirugía si o no	100,0%	100,0%	100,0%	

**Tabla 30. Tabaco y localización.**

		localizacion2				Total	
		ILEON	COLON	ILEOCOL ONICO	GASTROIN TESTINAL		
FUMADOR	NO	Recuento	16	11	21	1	49
		% dentro de FUMADOR	32,7%	22,4%	42,9%	2,0%	100,0%
		% dentro de localizacion2	40,0%	61,1%	50,0%	50,0%	48,0%
	SI	Recuento	24	7	21	1	53
		% dentro de FUMADOR	45,3%	13,2%	39,6%	1,9%	100,0%
		% dentro de localizacion2	60,0%	38,9%	50,0%	50,0%	52,0%
Total		Recuento	40	18	42	2	102
		% dentro de FUMADOR	39,2%	17,6%	41,2%	2,0%	100,0%
		% dentro de localizacion2	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 31. Tabaco y fenotipo.**

		comportamiento			Total	
		INFLAMAT ORIO	ESTENOS ANTE	FISTULIZA NTE		
FUMADOR	NO	Recuento	26	11	12	49
		% dentro de FUMADOR	53,1%	22,4%	24,5%	100,0%
		% dentro de comportamiento	46,4%	44,0%	57,1%	48,0%
	SI	Recuento	30	14	9	53
		% dentro de FUMADOR	56,6%	26,4%	17,0%	100,0%
		% dentro de comportamiento	53,6%	56,0%	42,9%	52,0%
Total		Recuento	56	25	21	102
		% dentro de FUMADOR	54,9%	24,5%	20,6%	100,0%

% dentro de comportamiento	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
----------------------------	--------	--------	--------	--------

**Tabla 32.** *Tabaco y cirugía.*

		cirugía si o no		Total	
		NO	SI		
FUMADOR	NO	Recuento	25	24	49
		% dentro de FUMADOR	51,0%	49,0%	100,0%
		% dentro de cirugía si o no	51,0%	45,3%	48,0%
	SI	Recuento	24	29	53
		% dentro de FUMADOR	45,3%	54,7%	100,0%
		% dentro de cirugía si o no	49,0%	54,7%	52,0%
Total	Recuento	49	53	102	
	% dentro de FUMADOR	48,0%	52,0%	100,0%	
	% dentro de cirugía si o no	100,0%	100,0%	100,0%	

**Tabla 33.** *Tabaco y necesidad de corticoides en el primer brote.*

		CORTICOIDES AL 1º BROTE		Total	
		NO	SÍ		
FUMADOR	NO	Recuento	32	17	49
		% dentro de FUMADOR	65,3%	34,7%	100,0%
		% dentro de CORTICOIDES AL 1º BROTE	50,8%	43,6%	48,0%
	SI	Recuento	31	22	53
		% dentro de FUMADOR	58,5%	41,5%	100,0%
		% dentro de CORTICOIDES AL 1º BROTE	49,2%	56,4%	52,0%
Total	Recuento	63	39	102	
	% dentro de FUMADOR	61,8%	38,2%	100,0%	
	% dentro de CORTICOIDES AL 1º BROTE	100,0%	100,0%	100,0%	

**Tabla 34. Tabaco y necesidad de azatioprina.**

		AZATIOPRINA		Total	
		NO	SI		
FUMADOR	Recuento	19	30	49	
	NO	% dentro de FUMADOR	38,8%	61,2%	100,0%
		% dentro de AZATIOPRINA	54,3%	44,8%	48,0%
	SI	Recuento	16	37	53
		% dentro de FUMADOR	30,2%	69,8%	100,0%
		% dentro de AZATIOPRINA	45,7%	55,2%	52,0%
Total	Recuento	35	67	102	
	% dentro de FUMADOR	34,3%	65,7%	100,0%	
	% dentro de AZATIOPRINA	100,0%	100,0%	100,0%	

**Tabla 35. Tabaco y respuesta a azatioprina.**

		RESPUESTA AZATIOPRINA		Total	
		NO	SI		
FUMADOR	Recuento	8	22	30	
	NO	% dentro de FUMADOR	26,7%	73,3%	100,0%
		% dentro de RESPUESTA AZATIPRINA	47,1%	44,0%	44,8%
	SI	Recuento	9	28	37
		% dentro de FUMADOR	24,3%	75,7%	100,0%
		% dentro de RESPUESTA AZATIPRINA	52,9%	56,0%	55,2%
Total	Recuento	17	50	67	
	% dentro de FUMADOR	25,4%	74,6%	100,0%	
	% dentro de RESPUESTA AZATIPRINA	100,0%	100,0%	100,0%	

**Tabla 36.** *Tabaco y remisión con azatioprina.*

		remision con Azatioprina		Total	
		NO	SI		
FUMADOR	NO	Recuento	20	10	30
		% dentro de FUMADOR	66,7%	33,3%	100,0%
		% dentro de remision con Azatioprina	44,4%	45,5%	44,8%
	SI	Recuento	25	12	37
		% dentro de FUMADOR	67,6%	32,4%	100,0%
		% dentro de remision con Azatioprina	55,6%	54,5%	55,2%
Total	Recuento	45	22	67	
	% dentro de FUMADOR	67,2%	32,8%	100,0%	
	% dentro de remision con Azatioprina	100,0%	100,0%	100,0%	

**Tabla 37.** *Tabaco y necesidad de anti-TNF.*

		adalimumab o inflimab		Total	
		NO	SI		
FUMADOR	NO	Recuento	31	18	49
		% dentro de FUMADOR	63,3%	36,7%	100,0%
		% dentro de adalimumab o inflimab	45,6%	52,9%	48,0%
	SI	Recuento	37	16	53
		% dentro de FUMADOR	69,8%	30,2%	100,0%
		% dentro de adalimumab o inflimab	54,4%	47,1%	52,0%
Total	Recuento	68	34	102	
	% dentro de FUMADOR	66,7%	33,3%	100,0%	
	% dentro de adalimumab o inflimab	100,0%	100,0%	100,0%	

**Tabla 38.** *Tabaco y necesidad de infliximab.*

		infliximab		Total	
		NO	SI		
FUMADOR	Recuento	33	16	49	
	NO	% dentro de FUMADOR	67,3%	32,7%	100,0%
		% dentro de infliximab	45,8%	53,3%	48,0%
	SI	Recuento	39	14	53
		% dentro de FUMADOR	73,6%	26,4%	100,0%
		% dentro de infliximab	54,2%	46,7%	52,0%
Total	Recuento	72	30	102	
		% dentro de FUMADOR	70,6%	29,4%	100,0%
		% dentro de infliximab	100,0%	100,0%	100,0%

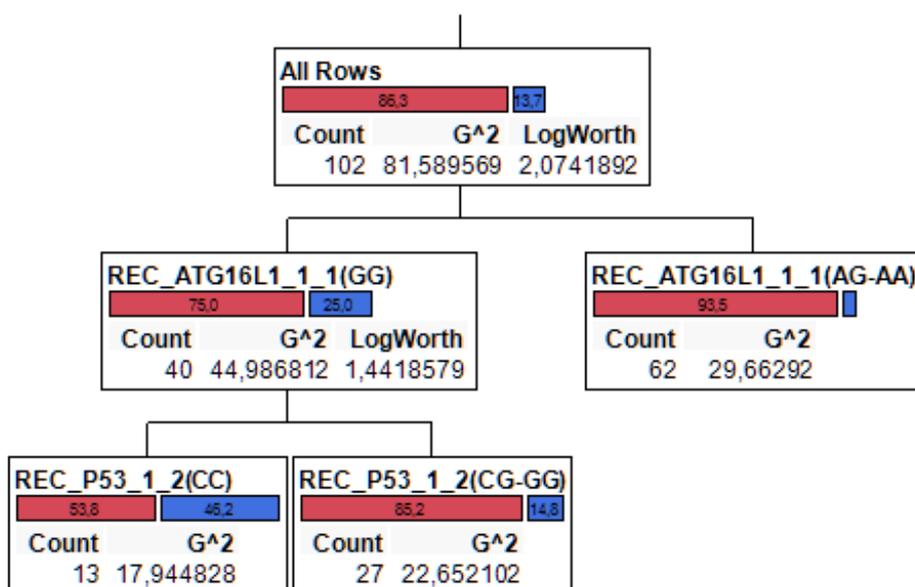
**Tabla 39.** *Tabaco y respuesta a infliximab.*

		respuesta a infliximab		Total	
		NO	SI		
FUMADOR	Recuento	4	12	16	
	NO	% dentro de FUMADOR	25,0%	75,0%	100,0%
		% dentro de respuesta a infliximab	50,0%	54,5%	53,3%
	SI	Recuento	4	10	14
		% dentro de FUMADOR	28,6%	71,4%	100,0%
		% dentro de respuesta a infliximab	50,0%	45,5%	46,7%
Total	Recuento	8	22	30	
		% dentro de FUMADOR	26,7%	73,3%	100,0%
		% dentro de respuesta a infliximab	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabla 40.** Tabaco y remisión con infliximab.

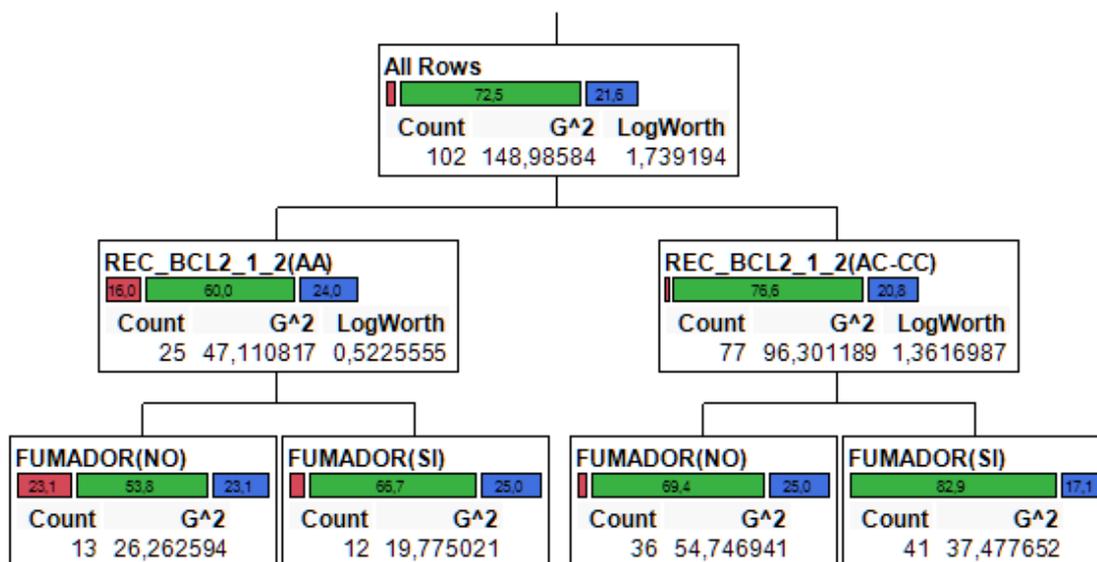
		respuesta a infliximab		Total	
		NO	SI		
FUMADOR	NO	Recuento	33	0	33
		% dentro de FUMADOR	100,0%	0,0%	100,0%
		% dentro de respuesta a infliximab	46,5%	0,0%	45,8%
	SI	Recuento	38	1	39
		% dentro de FUMADOR	97,4%	2,6%	100,0%
		% dentro de respuesta a infliximab	53,5%	100,0%	54,2%
Total		Recuento	71	1	72
		% dentro de FUMADOR	98,6%	1,4%	100,0%
		% dentro de respuesta a infliximab	100,0%	100,0%	100,0%

**B. INTERACCIÓN ENTRE GENES Y COMPORTAMIENTO DE LA ENFERMEDAD**



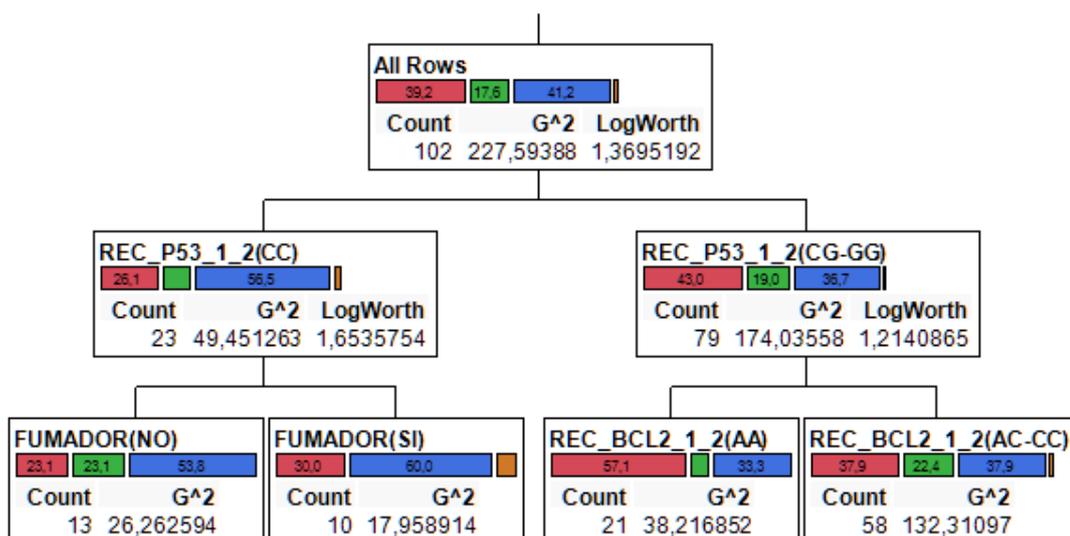
Rojo-NO; Azul-SI

**Figura 1.** Genes y antecedentes familiares.



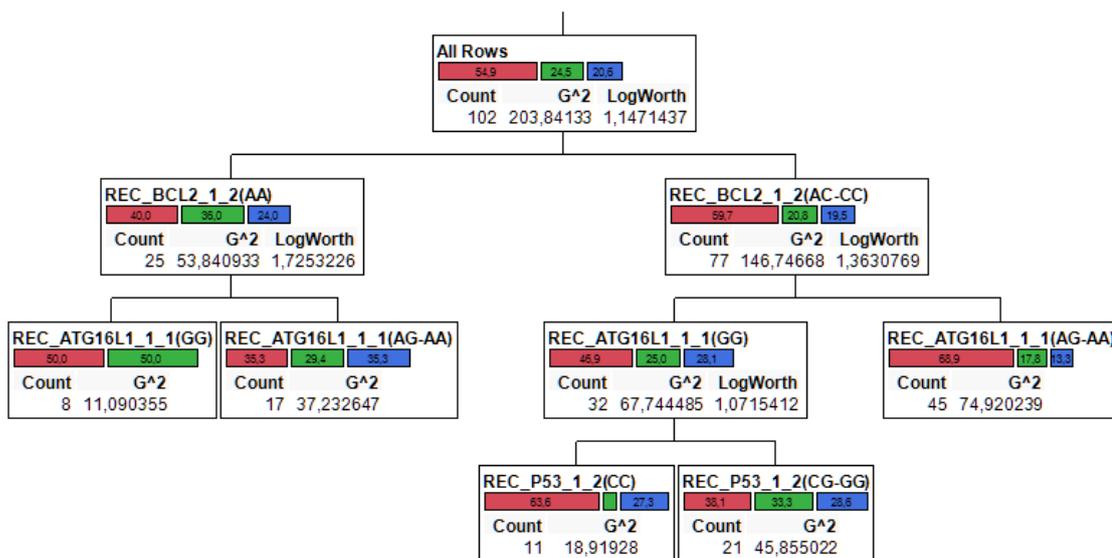
Rojo <16; verde 16-40, azul >40

Figura 2. Genes y edad al diagnóstico (A1-A2-A3).



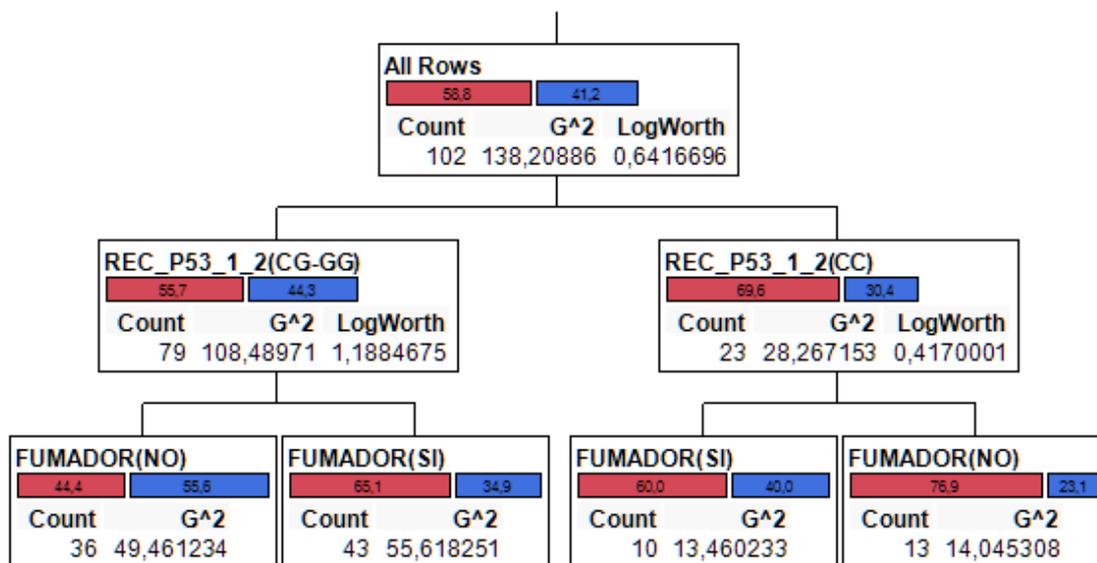
Rojo: ileon; verde: colon; azul: ileocolónico; marrón: gastrointestinal.

Figura 3. Genes y localización (L1, L2, L3).



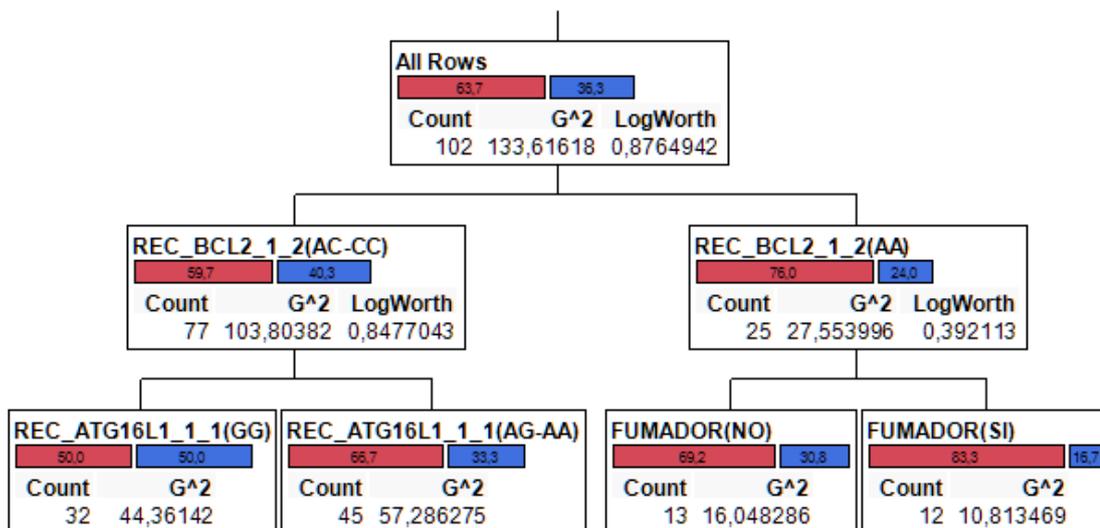
Rojo: inflamatorio; verde: estenosante; azul: fistulizante.

Figura 4. Genes y fenotipo (B1-B2-B3).



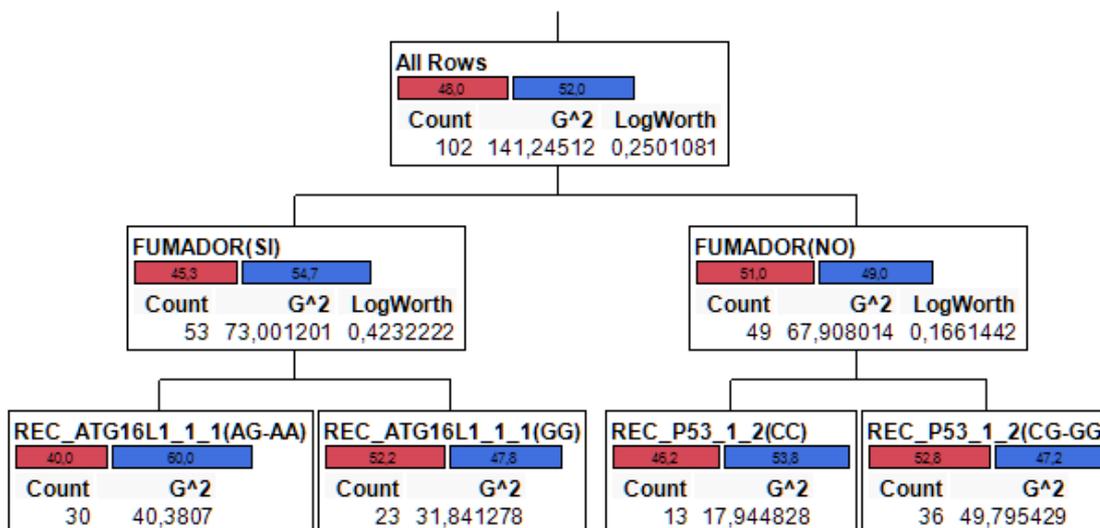
Rojo-NO; Azul-SI

Figura 5. Genes y manifestaciones extraintestinales.



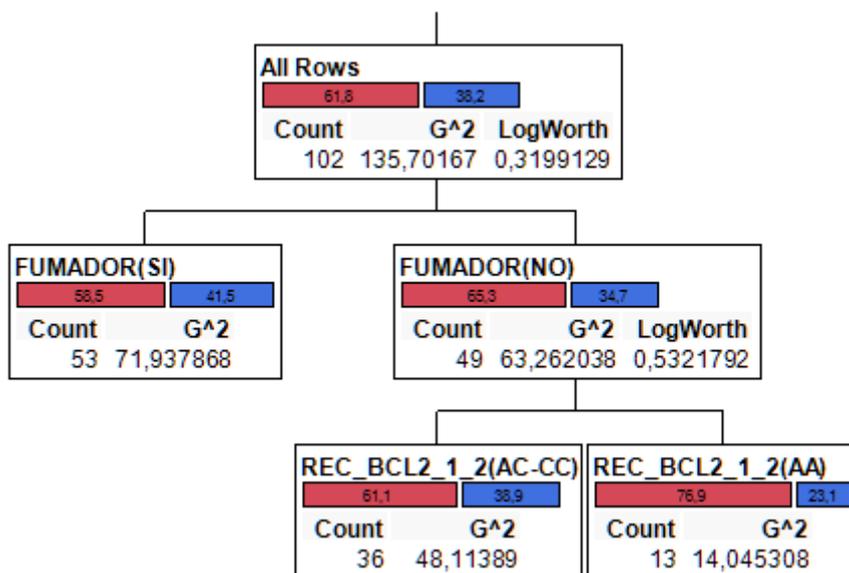
Rojo-NO; Azul-SI

Figura 6. Genes y enfermedad perianal (EPA).



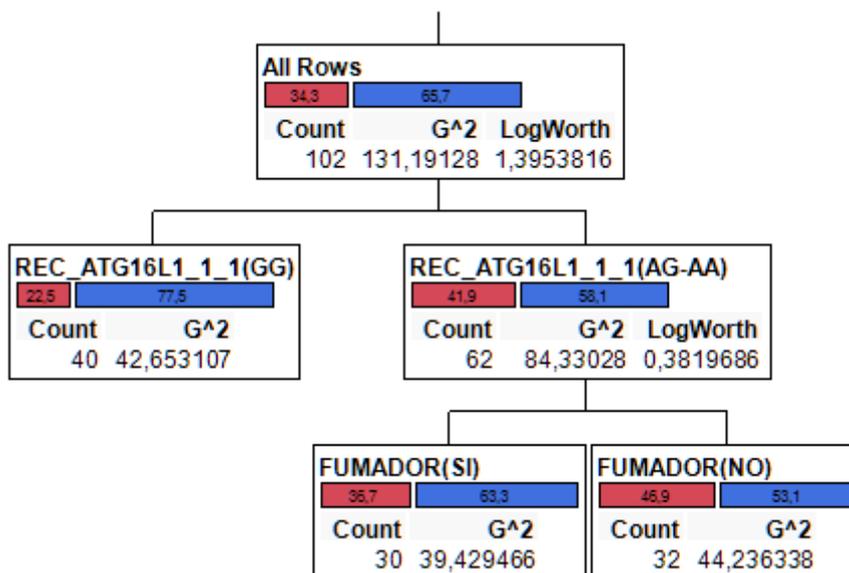
Rojo-NO; Azul-SI

Figura 7. Genes y necesidad de cirugía.



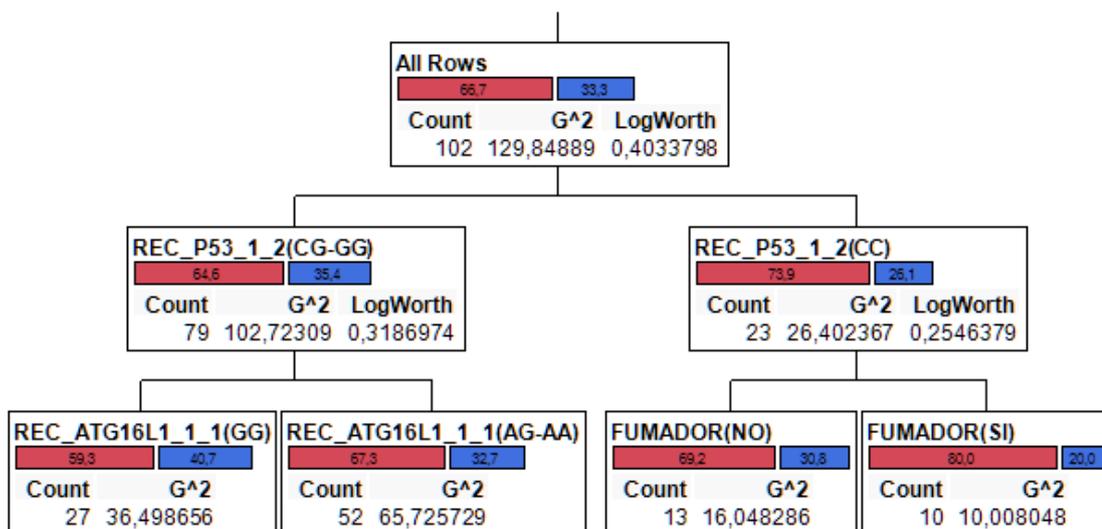
Rojo-NO; Azul-SI

Figura 8. Genes y necesidad de corticoides al inicio.



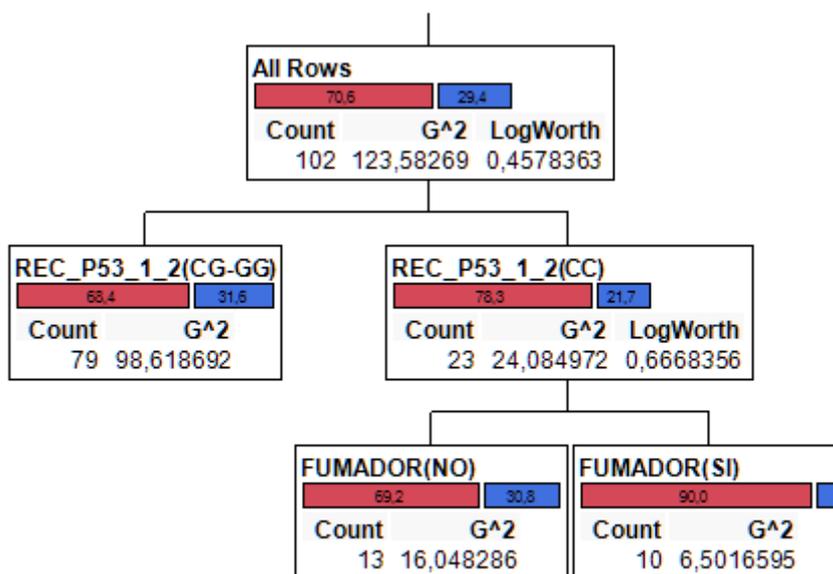
Rojo-NO; Azul-SI

Figura 9. Genes y necesidad de azatioprina.



Rojo-NO; Azul-SI

Figura 10. Genes y necesidad de anti-TNF.



Rojo-NO; Azul-SI

Figura 11. Genes y necesidad de IFX.

