El significado de las mutaciones de *CARD15* en la enfermedad de Crohn. La contribución española

La NOD2 es una proteína citosólica que se expresa principalmente en monocitos, macrófagos y células dendríticas, que se detecta también en las células de Paneth del intestino delgado (1,2). La estructura básica de la proteína (1040 aminoácidos) contiene tres regiones: a) dos dominios de reclutamiento de caspasas N-terminales (CARD), por los que el Comité de Nomenclatura Internacional decidió cambiar el nombre del gen que codifica esta proteína por el de *CARD15*; b) un sitio central de unión de nucleóticos (NBS); y c) múltiples repeticiones carboxiterminales ricas en leucina (LRR), similares a los dominios extracelulares de los receptores de tipo "TOLL" "peaje" e importantes para detectar una proteína superficial específica de las bacterias grampositivas y gramnegativas: el muramil-dipéptido. La unión del muramil-dipéptido a la NOD2 activa el factor nuclear κ B (NF- κ B) en circunstancias normales. En 1996, una búsqueda de todo el genoma, realizada en dos paneles consecutivos e independientes de familias con varios miembros afectados mediante un método no paramétrico de ligamiento bipuntual entre pares de hermanos, identificó un locus de susceptibilidad a la EC en el cromosoma 16q12 (3). En 2001, tres grupos independientes que emplearon abordajes y poblaciones diferentes implicaron a la NOD2 en la susceptibilidad a la enfermedad de Crohn, señalando un posible vínculo entre la respuesta inmunitaria innata a los componentes bacterianos y el desarrollo de la enfermedad (4-6). A estos primeros estudios España contribuyó activamente aportando pacientes y familias afectas de enfermedad de Crohn procedentes de los hospitales de Sant Pau de Barcelona y de Trias i Puyol de Badalona (5). De manera más fundamental, España ha contribuido con los trabajos pioneros de Gabriel Núñez sobre el papel de las proteínas NOD-LRR en las interacciones huésped-microorganismo y los procesos inflamatorios (7-12). En la raza blanca se han hallado al menos 30 mutaciones en el gen *CARD15* que producen cambios no conservadores de la proteína (13,14), pero las más frecuentes, localizadas en el tercio distal del gen, son dos mutaciones de cambio de sentido: una, la SNP8 (2104C > T; rs17860491), lleva a (R702W) (sustitución de arginina por triptófano); la otra, la SNP12 (2722G > C; rs17860492), lleva a (G908R) (sustitución de glicina por arginina). También está la mutación SNP13 (3020insC; rs17860493) debido a la inserción de citosina (L1007fsinsC) que da por resultado una proteína NOD2 más corta. Estas tres mutaciones representan más del 82% de los cromosomas mutados (14) y son las responsables de los alelos de susceptibilidad a la enfermedad. Ello significa que los portadores de estos alelos tienen riesgo de sufrir de la enfermedad de Crohn. Sin embargo, el riesgo no es igual para los tres alelos de susceptibilidad. En la mayoría de los estudios, los portadores de R702W tienen un riesgo dos veces mayor, los de G908R un riesgo tres veces mayor y los mutantes 1007fs un riesgo cuatro veces mayor; el riesgo de homocigóticos mutados (generalmente de la mutación

Editorial

1007fs) o los heterocigotos compuestos es de 17,1; IC 95% 10,7-27,2 (15). En algunas poblaciones, como la de Toledo, en España, y de Rennes, en Francia, la mutación R702W fue la mutación de *CARD15* que se asoció de manera más significativa a la enfermedad de Crohn. Es más, esta variante de susceptibilidad presentó una asociación independiente al comportamiento estenosante de la enfermedad (16,17).

Ya se ha visto anteriormente que un cromosoma mutado normalmente lleva sólo una de las variantes frecuentes. Así, los individuos afectados que portan mutaciones compuestas proceden de ambos cromosomas 16, indicando que los han heredado del padre y de la madre. Estas mutaciones compuestas son las responsables de la falta de respuesta a los productos bacterianos específicos, como se demostró elegantemente en Michigan y París (18-20). Estas mutaciones determinan una respuesta anormal al muramil-dipéptido (MDP) que pueden conducir a la enfermedad, principalmente en el íleon (15,21). Sin embargo, incluso en este subgrupo de pacientes resulta obvio que, para que se exprese la enfermedad, son necesarios otros factores genéticos y ambientales. Así, los pacientes con afectación ileal y los portadores de mutaciones de *CARD15* presentan también un descenso específico de las alfa-defensinas que repercute enormemente sobre los microorganismos luminales (22). Además, los pacientes con anticuerpos frente a *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA+) tienen una frecuencia mayor de alelos mutantes de *CARD15*, aunque los títulos mayores de ASCA se han asociado a mayores probabilidades de enfermedad de Crohn ileal y de conducta estenosante/penetrante con independencia del estado de *CARD15* (23). En un estudio poblacional de Canadá se ha confirmado que el *CARD15* y el consumo de tabaco son factores de riesgo independientes entre sí. El riesgo atribuible a los portadores de *CARD15* fue del 26,7% y el achacado a ser fumador activo fue del 46,8% (24). De Diego y cols. analizaron la frecuencia del hábito tabáquico en pacientes con mutaciones de *CARD15* y observaron una asociación inversamente significativa con el tabaquismo tanto en los pacientes heterocigotos para 1007fs como en los heterocigotos y homocigotos compuestos; el 72% de los fumadores no tenían ninguna de estas tres mutaciones (25). Al igual que en la periodontitis, otra enfermedad compleja frecuente, la máxima frecuencia de portadores de mutaciones de *CARD15* se encontró entre los pacientes no fumadores sin *Porphyromonas gingivalis* ni *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (29,4 frente a 17,4% en los controles) (26). La diferencia no fue significativa pero confirma la falta de interacción entre estas mutaciones y este importante factor ambiental, que interviene en la regulación de la permeabilidad intestinal y la inflamación (27,28).

Un metaanálisis de las mutaciones de *CARD15* en la enfermedad de Crohn de poblaciones diversas ayudó a cartografiar la frecuencia y las diferencias geográficas de las mutaciones; las frecuencias de alelos y genotipos de las tres mutaciones más habituales se calcularon en 3.575 controles sanos de raza blanca reclutados por 15 grupos distribuidos en tres continentes. Las frecuencias alélicas de las mutaciones R702W, G908R y 1007fs eran del 4,3% (3,6-4,9), el 1,2% (0,8-1,6) y el 2,3% (1,8-2,8), respectivamente, con grandes fluctuaciones geográficas de los alelos G908R, 1007fs y de tipo silvestre o salvaje ($p < 0,0001$). A nivel poblacional, no se observó ninguna relación sencilla entre las frecuencias de las mutaciones y las incidencias de la enfermedad en las poblaciones estudiadas. A nivel individual no se halló ningún déficit significativo de portadores de mutaciones de dosis doble entre los controles sanos, lo que prueba en gran medida que la penetrancia de la mayoría de los genotipos de riesgo es baja y confirma que el *CARD15* opera interactuando con otros cofactores de riesgo desconocidos (29). Los estudios de controles de diferentes regiones de España (16,30-33), como Oviedo y Valladolid, no difieren significa-

Editorial

tivamente de los datos obtenidos a partir de 15 cohortes de controles sanos de raza blanca entre los que no había españoles (29) (Tabla I).

Tabla I. Comparación de frecuencias alélicas en % entre las mutaciones más frecuentes de CARD15 en poblaciones de control de distintas regiones de España y controles sanos de raza blanca

Ciudad	Controles (n)	Año	R702W Exón 4	G908R Exón 8	1007fs Exón 11
Santiago (30)	227	2003	5,3	0,7	1,1
Santiago (31)	165	2004	5,8	1,0	1,0
Madrid (32)	343	2004	5,4	2,3	1,6
Barcelona (33)	156*	2006	7,0	1,3	1,9
Toledo (16)	172	2006	3,4	1,1	2,0
Oviedo. L. Rodrigo y cols.					
Presente número	86	2007	5,2	1,0	1,6
Valladolid **	272	2007	5,2	2,2	1,8
16 cohortes de controles sanos de raza blanca (29)	3.575	2007	4,3 (3,6-4,9)	1,2 (0,8-1,6)	2,3 (1,8-2,8)

*Donantes y pacientes sometidos a trasplantes alogénicos de células madre sin células T. **Comunicación personal del Dr. JA Garrote, Valladolid.

El artículo publicado en este número de *Revista Española de Enfermedades Digestivas* aporta datos recientes sobre la frecuencia de estas mutaciones habituales en la población sana de Asturias y en pacientes con enfermedad de Crohn. Los autores muestran que la prevalencia de las mutaciones de *CARD15* no era diferente de la observada en la población de control, aunque la mutación 1007fs, al igual que en los resultados de Toledo (16), seguía la misma tendencia positiva en los pacientes con afectación ileal; el 11,3% portaban esta mutación en dosis simple y el 17,3% en heterocigotos compuestos. Las diferencias observadas con otros centros no se deben a las observadas en la población de control sana, a pesar del pequeño número de controles procedentes de Asturias con genotipo de las mutaciones más frecuentes de *CARD15*, como puede verse en la tabla I. Desgraciadamente no es posible hacer comparaciones estrictas, ya que no todos los autores citan las frecuencias alélicas en sus publicaciones, además la selección de pacientes es diferente. En España no hay estudios poblacionales y muchas de las publicaciones proceden de centros de referencia como el de Madrid y el de Barcelona (32,34-36).

Varios estudios han hallado una asociación positiva entre presencia de mutaciones, especialmente las 1007fs, intervención quirúrgica previa debida a la enfermedad de Crohn, principalmente resecciones ileales (37), resecciones ileocecales y alto riesgo de recidiva postoperatoria y reoperación (38). Seiderer y cols. hallaron que la presencia homocigota de la variante 1007fs de *CARD15* se asocia a un curso muy agresivo de la EC con afectación ileal en todos los pacientes afectados y una alta incidencia de estenosis fibroestenóticas que con frecuencia precisan intervención quirúrgica (39). Estos hallazgos se confirmaron también en Galicia (40) y en un estudio prospectivo de Barcelona (35). Entre 70 pacientes catalanes que precisaron cirugía, la recurrencia postoperatoria fue también más frecuente en los pacientes con variantes de *CARD15* en los análisis univariado y multivariado (OR: 3,29; IC 95%: 1,13-9,56), necesitándose antes la reoperación ($p = 0,03$) (35). Más recientemente se ha realizado un interesante estudio clínico prospectivo para confirmar que la variante 1007fs de *CARD15* es un factor pronóstico independiente de la aparición de esteno-

Editorial

sis intestinales y de la necesidad de intervención quirúrgica. A una serie de pacientes con enfermedad de Crohn que presentaban síntomas clínicos indicativos de estenosis intestinal les hicieron de manera prospectiva un genotipo en busca de las tres variantes más corrientes de *CARD15*, siguiéndoseles mediante enteroclis por resonancia magnética para analizar la presencia de estenosis de intestino delgado. Además, basándose en hallazgos clínicos y radiológicos, la necesidad de intervención quirúrgica la valoró un cirujano independiente que no conocía los resultados del genotipo de *CARD15*. Veinticinco de los 40 pacientes (62%) con al menos una variante de *CARD15* se diagnosticaron de estenosis intestinal con la enteroclis por resonancia magnética (OR = 9,44; IC: 3,21-27,77; $p = 0,00028$, Bonferroni corregido). En concreto, la presencia de la variante 1007fs se asoció a un mayor riesgo de estenosis intestinal (OR = 12,00; IC: 3,47-41,54, $p = 0,00042$, Bonferroni corregido). Veintiuno de los 31 pacientes con estenosis (68%) requirieron cirugía, siendo 13 de estos 21 (62%) portadores de la variante 1007fs. El genotipo podría ser pues una importante herramienta diagnóstica en la clínica para identificar a los pacientes de alto riesgo con determinadas necesidades diagnósticas y terapéuticas. Este importante estudio también ha mostrado que la enteroclis por resonancia magnética es una técnica excelente para diagnosticar las estenosis de intestino delgado (41). En otro estudio de niños con esta mutación se observó un riesgo 6,6 veces mayor de presentar fenotipos estenosantes con necesidad de cirugía, por lo que las pruebas genéticas pueden identificar a los niños con EC y riesgo de cirugía precoz (42).

La homocigosidad de la mutación 1007fs de *CARD15* se asocia a un curso agresivo de la EII con una incidencia elevada de estenosis fibróticas que a menudo precisan intervención (39). Sin embargo, recomendar el genotipo de *CARD15* como planteamiento diagnóstico en todos los pacientes de enfermedad de Crohn no está indicado en este momento, pues estas variantes genéticas sólo explican alrededor del 20% de la susceptibilidad de esta enfermedad. Sin embargo, como concluyeron Seiderer y cols. (41), las pruebas indican que los genotipos son una útil herramienta diagnóstica en los pacientes con síntomas clínicos sugerentes de estenosis intestinal para poder detectar lo antes posible a los enfermos de alto riesgo y posiblemente prevenir las complicaciones que se asocian a este subgrupo de pacientes.

Estos recientes resultados avalarían el desarrollo de pruebas basadas en el genotipo. De hecho ya se han comercializado pruebas basadas solamente en la genotipificación del ADN (p. ej., PROMETHEUS® *NOD2/CARD15*, Prometheus Laboratories, San Diego, CA, USA). Tales pruebas identificarán de manera específica a algunos individuos de alto riesgo de presentar enfermedad de Crohn, portadores de 2 mutaciones frecuentes de *CARD15* (43-45); sin embargo, la sensibilidad quizá sea baja al no lograr detectar las mutaciones raras. Se ha predicho que estas estarían presentes en el 25% de los portadores de mutaciones dobles (14), lo que posiblemente es una infraestimación causada por otras mutaciones de *CARD15* causantes de la enfermedad y aun no identificadas (p. ej., en las regiones reguladoras y promotoras, aunque hasta ahora estas no parecen ser importantes para la susceptibilidad) o por variantes en el número de copias. Las pruebas de tipo secuencial para buscar variantes raras son muy laboriosas y caras por lo que normalmente suelen necesitarse otros análisis de muestras parentales (45).

La complejidad que poseen las bases genéticas de la enfermedad inflamatoria intestinal hace que las pruebas genéticas convencionales sean demasiado caras y largas como para resultar prácticas. El IBDchip® de Progenika (otra contribución española) permite un cribado rápido y rentable de gran número de los "polimorfismos debidos a una mutación de un nucleótido" (PSN) asociados a la enfermedad de

Editorial

Crohn y colitis ulcerosa. Actualmente, el IBDchip® genotipifica 102 PSN en 63 genes. Estas mutaciones se analizan así simultáneamente. Este desarrollo ha demostrado que la factibilidad de la tecnología es casi perfecta, pues los coeficientes de especificidad y sensibilidad se hallan por encima del 99,7% respecto a todos los PSN comprobados. Esta potente herramienta de genotipificación se está validando en varias poblaciones de pacientes europeos y norteamericanos con enfermedad inflamatoria intestinal y la mejor selección de los PSN se espera que aumente el valor al predecir el curso de la enfermedad.

Se ha realizado recientemente un estudio del *CARD15* para predecir el aumento de los costes quirúrgicos de la enfermedad de Crohn. Este estudio, que también precisa validación, ilustra también la importancia que tiene combinar las pruebas genéticas y serológicas. En una cohorte extrahospitalaria europea e israelí de diseño prospectivo (n = 228), a la que se siguió durante una media de 8,3 años (DE 2,6), la medición de los ASCA (IgG, IgA) y las tres mutaciones más comunes de *CARD15* indica que los pacientes con EC que son positivos para G908R y ASCA devengan mayores costes sanitarios (46). Considerando que la frecuencia de G908R no es muy relevante en España basado en estudios de pacientes de centros de referencia, habrá que explorar otras combinaciones. En este sentido, la influencia combinada de las mutaciones de *CARD15* y del genotipo 4G/4G del gen del inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1 (PAI-1) sobre el comportamiento de la enfermedad de Crohn ha mostrado en 170 pacientes estudiados de manera prospectiva que es capaz de predecir la enfermedad de Crohn complicada y, por lo tanto, que los pacientes con estas variantes podrían beneficiarse de intervenciones precoces (34).

Otra importante aportación española radica en el campo del trasplante alogénico de células madre (TCM). Un grupo de hematólogos de Barcelona (33) ha encontrado que había variantes de *CARD15* en nueve (11%) de 76 pacientes sometidos a TCM alogénico con depleción de células T y seis (8%) de los 65 donantes. Estas variantes genéticas se asociaron a una menor supervivencia sin enfermedad (17 frente a 48%, p = 0,03). Además, la muerte por infección pulmonar fue más frecuente en el grupo de pacientes con mutaciones de *CARD15*. Estos resultados confirman los estudios previos en el terreno de los trasplantes (47-51) y avalan la hipótesis de que el efecto perjudicial de las variantes de *CARD15* podría estar producido por una alteración del sistema inmunitario innato, más que por la activación del sistema inmunitario adaptativo (33). El papel de estas mutaciones en el deterioro de la función de barrera y la translocación bacteriana podría ser un tema importante en la fisiopatología de la sepsis precoz; la mortalidad relacionada con la sepsis (día 30) estaba aumentada en los pacientes con variantes de *CARD15* (42 frente a 31%) y fue máxima (57%) en los 8 pacientes que portaban la mutación 1007fs (52).

Sin duda, los futuros estudios de este gen y de sus interacciones con otros genes y con los factores ambientales contribuirán al conocimiento de la enfermedad de Crohn. La importancia clínica de estas mutaciones y su aplicación se han revisado recientemente (43,53-55), pero está claro que habremos de seguir considerando estos importantes hallazgos como herramientas útiles con que seguir tipificando estas complejas enfermedades. Por el momento, las pruebas indican que los genotipos son una útil herramienta diagnóstica en los casos con síntomas clínicos indicativos de estenosis intestinal, con el fin de identificar a los pacientes de alto riesgo y posiblemente de prevenir las complicaciones de este subgrupo de pacientes con enfermedad de Crohn. Todavía queda mucho por hacer y descubrir pero está claro que la contribución de España en este campo es muy importante.

Editorial

A. S. Peña

*Laboratorio de Inmunogenética. Departamento de Patología y Gastroenterología.
Centro Médico Universitario VU. Amsterdam, Países Bajos*

Bibliografía

1. Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, et al. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 2003; 125: 47-57.
2. Ogura Y, Lala S, Xin W, Smith E, Dowds TA, Chen FF, et al. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 2003; 52: 1591-7.
3. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugier L, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; 379: 821-3.
4. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001; 357: 1925-8.
5. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603.
6. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603-6.
7. Dowds TA, Masumoto J, Chen FF, Ogura Y, Inohara N, Nunez G. Regulation of cryopyrin/Pypaf1 signaling by pyrin, the familial Mediterranean fever gene product. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302: 575-80.
8. Inohara, Chamaillard, McDonald C, Nunez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 355-83.
9. Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, et al. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 1999; 274: 14560-7.
10. Inohara N, Nunez G. The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene* 2001; 20: 6473-81.
11. Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nunez G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 2001; 276: 2551-4.
12. Park JH, Kim YG, Shaw M, Kanneganti TD, Fujimoto Y, Fukase K, et al. Nod1/RICK and TLR signaling regulate chemokine and antimicrobial innate immune responses in mesothelial cells. *J Immunol* 2007; 179: 514-21.
13. King K, Bagnall R, Fisher SA, Sheikh F, Cuthbert A, Tan S, et al. Identification, evolution, and association study of a novel promoter and first exon of the human NOD2 (CARD15) gene. *Genomics* 2007; 90: 493-50.
14. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 845-57.
15. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 2393-404.
16. De Diego C, Alcántara M, Valle J, Pérez-Gruoso MJ, Muñoz-Rosas C, Carrobbles JM, et al. Frequency of CARD15 polymorphisms in patients with Crohn's disease from Toledo, Spain: genotype-phenotype correlation. *Genet Test* 2006; 10: 178-85.
17. Heresbach D, Gicquel-Douabin V, Birebent B, D'Halluin P N, Heresbach-Le Berre N, Dreano S, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms in Crohn's disease: a genotype-phenotype analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 55-62.
18. Chamaillard M, Philpott D, Girardin SE, Zouali H, Lesage S, Chareyre F, et al. Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 3455-60.
19. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003; 278: 8869-72.
20. Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 371-82.
21. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, et al. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 854-66.
22. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, et al. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 18129-34.
23. Dassopoulos T, Frangakis C, Cruz-Correa M, Talor MV, Burek CL, Datta L, et al. Antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* in Crohn's disease: higher titers are associated with a greater frequency of mutant NOD2/CARD15 alleles and with a higher probability of complicated disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 143-51.
24. Brant SR, Wang MH, Rawsthorne P, Sargent M, Datta LW, Nouvet F, et al. A population-based case-control study of CARD15 and other risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 313-23.
25. de Diego C, Alcántara M, Valle J, Repiso A, Carrobbles JM, Martínez-Castro P. Influence of smoking habits and CARD15 mutations on the onset of Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 1209-11.
26. Laine ML, Murillo LS, Morre SA, Winkel EG, Pena AS, van Winkelhoff AJ. CARD15 gene mutations in periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 890-3.

Editorial

27. Birrenbach T, Bocker U. Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 848-59.
28. McGilligan VE, Wallace JM, Heavey PM, Ridley DL, Rowland IR. Hypothesis about mechanisms through which nicotine might exert its effect on the interdependence of inflammation and gut barrier function in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 108-15.
29. Hugot JP, Zaccaria I, Cavanaugh J, Yang H, Vermeire S, Lappalainen M, et al. Prevalence of CARD15/NOD2 mutations in Caucasian healthy people. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1259-67.
30. Ferreira-Vidal I, Barros F, Pablos JL, Carracedo A, Gómez-Reino JJ, Gonzalez A. CARD15/NOD2 analysis in rheumatoid arthritis susceptibility. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42: 1380-2.
31. Nunez C, Barreiro M, Domínguez-Munoz JE, Lorenzo A, Zapata C, Pena AS. CARD15 mutations in patients with Crohn's disease in a homogeneous Spanish population. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 450-6.
32. Fernández L, Mendoza JL, Martínez A, Urcelay E, Fernández-Arquero M, García-Paredes J, et al. IBD1 and IBD3 determine location of Crohn's disease in the Spanish population. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 715-22.
33. Granell M, Urbano-Ispizua A, Arostegui JJ, Fernandez-Aviles F, Martinez C, Rovira M, et al. Effect of NOD2/CARD15 variants in T-cell depleted allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2006; 91: 1372-6.
34. Alvarez-Lobos M, Arostegui JJ, 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; 25: 429-40.
35. Alvarez-Lobos M, Arostegui JJ, Sans M, Tassies D, Plaza S, Delgado S, et al. Crohn's disease patients carrying Nod2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence. *Ann Surg* 2005; 242: 693-700.
36. Mendoza JL, Murillo LS, Fernandez L, Pena AS, Lana R, Urcelay E, et al. Prevalence of mutations of the NOD2/CARD15 gene and relation to phenotype in Spanish patients with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 1235-40.
37. Radlmayr M, Torok HP, Martin K, Folwaczny C. The c-insertion mutation of the NOD2 gene is associated with fistulizing and fibrostenotic phenotypes in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 2091-2.
38. Buning C, Genschel J, Buhner S, Kruger S, Kling K, Dignass A, et al. Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 1073-8.
39. 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; 41: 1421-32.
40. Barreiro M, Nunez C, Dominguez-Munoz JE, Lorenzo A, Barreiro F, Potel J, et al. Association of NOD2/CARD15 mutations with previous surgical procedures in Crohn's disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97: 547-53.
41. Seiderer J, Brand S, Herrmann KA, Schnitzler F, Hatz R, Crispin A, et al. Predictive value of the CARD15 variant 1007fs for the diagnosis of intestinal stenoses and the need for surgery in Crohn's disease in clinical practice: results of a prospective study. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 1114-21.
42. Kugathasan S, Collins N, Maresso K, Hoffmann RG, Stephens M, Werlin SL, et al. CARD15 gene mutations and risk for early surgery in pediatric-onset Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 1003-9.
43. Silverberg MS. The time has come for NOD2/CARD15 testing for families with Crohn's disease: pro. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 504-6.
44. Chamaillard M, Iacob R, Desreumaux P, Colombel JF. Advances and perspectives in the genetics of inflammatory bowel diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 143-51.
45. van Heel DA, Hunt KA, King K, Ghosh S, Gabe SM, Mathew CG, et al. Detection of muramyl dipeptide-sensing pathway defects in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 598-605.
46. Odes S, Friger M, Vardi H, Claessens G, Bossuyt X, Riis L, et al. Role of ASCA and the NOD2/CARD15 mutation Gly908Arg in predicting increased surgical costs in Crohn's disease patients: a project of the European Collaborative Study Group on Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 874-81.
47. Mayor NP, Shaw BE, Hughes DA, Maldonado-Torres H, Madrigal JA, Keshav S, et al. Single Nucleotide Polymorphisms in the NOD2/CARD15 Gene Are Associated With an Increased Risk of Relapse and Death for Patients With Acute Leukemia After Hematopoietic Stem-Cell Transplantation With Unrelated Donors. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4262-9.
48. Kruger B, Boger CA, Schroppel B, Obed A, Hoffmann U, Murphy BT, et al. Impact of NOD2/CARD15 haplotypes on the outcome after kidney transplantation. *Transpl Int* 2007; 20: 600-7.
49. Rogler G, Holler E. Can NOD2/CARD15 mutations predict intestinal graft-versus-host disease and aid our understanding of Crohn's disease? *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 62-3.
50. Dickinson AM, Middleton PG, Rocha V, Gluckman E, Holler E. Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants. *Br J Haematol* 2004; 127: 479-90.
51. Holler E, Rogler G, Herfarth H, Brenmoehl J, Wild PJ, Hahn J, et al. Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GVHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2004; 104: 889-94.
52. Brenmoehl J, Herfarth H, Gluck T, Audebert F, Barlage S, Schmitz G, et al. Genetic variants in the NOD2/CARD15 gene are associated with early mortality in sepsis patients. *Intensive Care Med* 2007; 33: 1541-8.
53. Barreiro-de Acosta M, Pena AS. Clinical Applications of NOD2/CARD15 mutations in Crohn's Disease. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana* 2007; 37: 49-54.
54. Vermeire S. NOD2/CARD15: relevance in clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 569-75.
55. Ahmad T, Tamboli CP, Jewell D, Colombel JF. Clinical relevance of advances in genetics and pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology* 2004; 126: 1533-49.