

PUNTO DE VISTA

NOD2/CARD15: diferencias geográficas en la población española y su aplicación clínica en la enfermedad de Crohn

M. Barreiro de Acosta¹, J. L. Mendoza², R. Lana³, J. E. Domínguez Muñoz¹ y M. Díaz-Rubio²

¹Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. A Coruña. ²Servicios de Aparato Digestivo (Unidad de EII) y ³Medicina Interna. Hospital Clínico San Carlos. Madrid

RESUMEN

La enfermedad de Crohn (EC) es una enfermedad compleja desde el punto de vista de la genética puesto que para el desarrollo de la enfermedad se tiene que producir una interacción entre factores genéticos y ambientales. Las mutaciones del gen NOD2/CARD15 se han asociado con la susceptibilidad a padecer la EC. El gen NOD2/CARD15 codifica una proteína que actúa como un receptor intracelular de la proteína dipeptidomuramyl que se encuentran en la pared de cubierta de algunas bacterias. Actualmente se desconoce cuál es el papel exacto de estas mutaciones en el funcionamiento de la proteína NOD2/CARD15. Estas mutaciones se han asociado con la localización en intestino delgado de la enfermedad, el comportamiento fibroestenotante y con un curso más grave de la enfermedad. Las tres mutaciones asociadas con la EC presentan una distribución desigual entre las diferentes razas y áreas geográficas del mundo, con variaciones a lo largo de Europa y España. La determinación de las mutaciones del NOD2/CARD15 no se puede utilizar todavía en la práctica clínica. La principal razón es que estas variantes genéticas sólo incrementan el riesgo de una forma marginal y los podemos identificar en muchos sujetos sanos. Actualmente no se recomienda realizar estudios de despistaje en familiares de primer grado que padecen la EC porque no disponemos de ninguna medida preventiva para evitar la enfermedad.

Palabras clave: NOD2/CARD15. Enfermedad de Crohn. Epidemiología. Enfermedad inflamatoria intestinal.

ABSTRACT

Crohn's disease (CD) is a genetically complex disease in which both genetic susceptibility and environmental factors play key roles in the development of the disorder. NOD2/CARD15 mutations are associated with CD. NOD2 encodes for a protein that is an intracellular receptor for a bacterial product (muramyl dipeptide), though the exact functional consequences of these mutations remain the subject of debate. NOD2/CARD15 mutations are associated with ileal CD, with stricturing behavior, and possibly with a more complicated course of CD. NOD2/CARD15 mutations associated with CD have demonstrated heterogeneity across ethnicities and populations throughout the world, with regional variations across Europe and Spain.

de), though the exact functional consequences of these mutations remain the subject of debate. NOD2/CARD15 mutations are associated with ileal CD, with stricturing behavior, and possibly with a more complicated course of CD. NOD2/CARD15 mutations associated with CD have demonstrated heterogeneity across ethnicities and populations throughout the world, with regional variations across Europe and Spain.

However, "NOD2/CARD15 testing" is not yet ready for use in the clinical setting. One of the reasons is that we know that these genetic variants increase the risk of disease only marginally, and many healthy individuals carry the risk alleles. At present it is not recommended to screen first-degree relatives, because we do not have the ability to prevent the disease at the present time.

Key words: NOD2/CARD15. Crohn's disease. Epidemiology. Inflammatory bowel disease.

Barreiro de Acosta M, Mendoza JL, Lana R, Domínguez Muñoz JE, Díaz-Rubio M. NOD2/CARD15: diferencias geográficas en la población española y su aplicación clínica en la enfermedad de Crohn. *Rev Esp Enferm Dig* 2010; 102: 321-326.

ABREVIATURAS

CU: colitis ulcerosa.

EC: enfermedad de Crohn.

EII: enfermedad inflamatoria intestinal.

NOD2/CARD15: nucleotide oligomerization domain 2/ caspase recruitment domain 15.

INTRODUCCIÓN

La fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) todavía plantea numerosos interrogantes. Actualmente sabemos que están implicados factores genéti-

Recibido: 14-09-09.

Aceptado: 17-09-09.

Correspondencia: Manuel Barreiro de Acosta. Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Clínico Universitario. C/ Choupana, s/n. 15706 Santiago de Compostela, A Coruña. e-mail: manubarreiro@hotmail.com

cos y ambientales, que al interactuar entre ellos conducen a una respuesta inmunitaria alterada, permitiendo la iniciación y progresión del proceso inflamatorio intestinal hacia su cronicidad. Múltiples estudios epidemiológicos apoyan la participación de un componente genético en la susceptibilidad a padecer la EII, tanto la colitis ulcerosa (CU) como la enfermedad de Crohn (EC). Conocemos las diferencias étnicas en su prevalencia, con un claro predominio en la raza blanca y sobre todo en judíos; el grado de concordancia en gemelos mono- y dicigóticos, que es mayor en la EC; la existencia de agregación familiar y su posible asociación con otros trastornos autoinmunes o síndromes genéticos bien conocidos (1-4).

La búsqueda de genes de susceptibilidad para padecer la EII es difícil debido a la complejidad de los factores genéticos, entre los que destacan la ausencia de un patrón de transmisión mendeliana simple, la penetrancia incompleta de los genes y la heterogeneidad genética. La EII es una enfermedad poligénica, donde varios genes están implicados en la susceptibilidad para padecer la EII (5).

La mayoría de los investigadores están de acuerdo en que el gen de susceptibilidad más consistente para padecer la EC, y no para padecer la CU, está localizado en el cromosoma 16, llamado NOD2 (*nucleotide oligomerization domain*), ahora denominado CARD15 (*C-terminal caspase recruitment domains*) (6-8). Este gen codifica una proteína que se expresa en los monocitos, macrófagos, células dendríticas y células epiteliales. En este gen destacan 3 polimorfismos (R702W, G908R y L1007fs) que se han asociado con una activación alterada del NF- κ B (8). La presencia de estas tres mutaciones representa más del 82% de las posibles mutaciones de este gen y las otras 27 es improbable que generen ningún cambio funcional en la proteína que sintetizan (9).

A continuación revisaremos el papel de estas mutaciones en la EC, como influyen sobre las características clínicas de la EC, las diferentes prevalencias que existen en el mundo e incluso en España y, finalmente, cuál puede ser su utilidad actual y futura en el manejo de la EII.

PAPEL DE LAS MUTACIONES DEL GEN NOD2/CARD15 EN LA EC

La importancia de las mutaciones del gen NOD2/CARD15 en la EC no reside únicamente en la consistencia de la reproducibilidad entre los estudios de asociación entre estas mutaciones y la susceptibilidad a padecer la EC.

El aspecto más importante del descubrimiento de las mutaciones del gen NOD2/CARD15 es que ha permitido construir interesantes teorías que explicarían cuál es la causa de la EC relacionadas con la existencia de una alteración en la regulación de la respuesta inmune del huésped hacia las bacterias intraluminales del intestino. La asociación de las mutaciones del NOD2/CARD15 con la EC, con el síndrome de Blau (una enfermedad autonómi-

ca dominante, caracterizada por artritis, uveítis, rash cutáneo y la presencia de granulomas) y posiblemente con la sarcoidosis en edades tempranas de la vida, sugiere que este gen influye en el desarrollo de los granulomas en las enfermedades granulomatosas. La formación de los granulomas habitualmente se produce por una respuesta del huésped sano a infecciones de gérmenes intracelulares (micobacterias y hongos) y es dependiente de la activación de los linfocitos T *helper 1* y de las citoquinas que secretan –principalmente interleucina-12, interferón- γ y tumor de necrosis tumoral (TNF)– (10).

El déficit de gen NOD2/CARD15 altera el receptor del NOD2/CARD15 lo que induce una alteración en el funcionamiento de las placas de Peyer en el intestino delgado, caracterizado por una exagerada respuesta del sistema inmune y un incremento de la permeabilidad intestinal, lo que contribuiría a la inflamación crónica del intestino (11). Por lo tanto, los pacientes portadores de las mutaciones del gen NOD2/CARD15 no podrían controlar adecuadamente las infecciones bacterias, fundamentalmente al reconocer de forma defectuosa a la proteína muralmildipéptico (MDP), que se encuentra en la pared de la cubierta celular de las bacterias enteroinvasivas como la *Salmonella* y la *Escherichia coli* enteroinvasivas (12) y las micobacterias (13). Aunque cabe destacar que 8 años después del descubrimiento de que estas mutaciones están asociadas a la susceptibilidad para padecer EC, las consecuencias exactas de estas mutaciones sobre el funcionamiento de la proteína que sintetizan permanece sin conocerse.

DIFERENCIAS GEOGRÁFICAS Y ÉTNICAS EN LA PREVALENCIA DE LAS MUTACIONES DEL GEN CARD15/NOD2 MUNDIAL

Al igual que se ha descrito una importante variación geográfica en cuanto al riesgo de desarrollar EC, se han demostrado grandes diferencias poblacionales y geográficas en cuanto a la presencia de las variantes del gen NOD2/CARD15 en los pacientes con EC. La prevalencia de pacientes con EC portadores de al menos un alelo de susceptibilidad del gen CARD15 varía entre el 27 y el 50% en la mayoría de las poblaciones europeas de raza caucásica. El estudio multicéntrico de Lesage y cols. (9), con participación de varios países europeos mostró una frecuencia de portadores del 50%. Otros estudios en países centroeuropeos mostraron cifras similares, así en Gran Bretaña (Oxford) (12) la frecuencia de pacientes portadores era del 38,5%, en Bélgica (14) del 46,3%, en Italia (15) 38,2%, en Francia (16) 38%, en Alemania (17) 36,5% y del 46% en la República Checa (18). Sin embargo en los países escandinavos, generalmente caracterizados por ser poblaciones más homogéneas, se encontraron frecuencias mucho más bajas de lo esperado para población europea: en Finlandia (19) la frecuencia de portadores fue del 15,5%, en Suecia (20) del 15,2% y en Dinamarca (21) del 21%.

En las poblaciones caucásicas relativamente alejadas de Europa, pero descendientes directos sin apenas mestizaje de población europea, las frecuencias que se encontraron fueron similares a las de los países centroeuropeos. En Estados Unidos (22,23) los porcentajes de portadores varían desde el 36,5 al 45%, en Canadá (24,25) entre el 32,5 y el 45% (esta última en la región de Québec); finalmente en Australia (26) se observaron mutaciones en el 36,7% de los portadores. Por otro lado, ha sido muy llamativo el hecho de que no se haya podido identificar ni una sola variante en las poblaciones asiáticas de Japón (27), Corea (28), China (29,30) e India (31) ni en pacientes ni en controles, con la característica añadida de que estas poblaciones son mucho más homogéneas. Muy recientemente se ha publicado un estudio en Irán (32), aunque es cierto que con un número escaso de pacientes, en el que se observaron mutaciones en el 32% de los enfermos con EC, con lo que se confirma el dato de que en poblaciones asiáticas también pueden estar presentes estas mutaciones. En otros países de origen árabe como Turquía (33) la frecuencia de pacientes con EC portadores de las mutaciones fue muy baja (10,7%), mientras que en Túnez (34) la frecuencia resultó tan baja que no se observaron diferencias estadísticamente significativas con el grupo control. En el otro estudio realizado en población africana, en concreto en pacientes de color de Sudáfrica (35), apenas se encontraron mutaciones.

Como curiosidad, en Latinoamérica se han realizado solamente dos estudios. Uno en Chile (36) con un número de pacientes tan escaso que apenas se pueden extrapolar conclusiones, aunque la tendencia de los resultados parece orientar a un número muy bajo de pacientes portadores. El otro se ha realizado en Brasil (37) y se han observado mutaciones en el 30% de los pacientes con EC; es importante recordar que la población de Brasil es muy heterogénea y existe un importante número de descendientes alemanes.

Con todos estos datos parece claro que el origen étnico de los pacientes juega un papel primordial en el número de portadores de las mutaciones. En un estudio realizado en Israel (38) en judíos tanto de origen Ashkenazi como

de origen no Ashkenazi se observaron mutaciones en el 27% de los mismos, sin observarse diferencias entre ambos orígenes, pero en otro estudio reciente realizado en Israel en población de origen árabe (39) se observó una frecuencia de mutaciones muy baja (menos del 9% de portadores) sin apreciarse diferencias con los controles. En más países se han encontrado diferencias étnicas, en Nueva Zelanda, donde se vio que los pacientes de origen Maorí tenían menos mutaciones (40). En las islas británicas se observaron importantes diferencias entre la población de Oxford (12) y la escocesa (41).

DIFERENCIAS GEOGRÁFICAS EN ESPAÑA

En España no existen tantas diferencias étnicas pero sí se observan grandes diferencias en la prevalencia de las mutaciones del CARD15 entre los habitantes de distintas comunidades autónomas. En cuanto al porcentaje de pacientes con EC portadores de alguna de las mutaciones en el primer estudio publicado, del Hospital Clínico de Madrid (42), se observaron mutaciones en el 32,8% de los pacientes y el 10,7% los controles. El siguiente estudio realizado unos pocos meses después en población gallega refirió mutaciones en el 27,9% de los pacientes y en el 15,2% de los controles (43). Posteriormente se han realizado dos estudios independientes en Cataluña, uno sin población control (44), en el que se observaron mutaciones en el 30,5% de los pacientes y otro con población control (45) en el que el porcentaje de portadores fue del 30,9 y del 6% para pacientes y controles respectivamente. Se ha realizado otro estudio en Toledo (46), donde la frecuencia de pacientes era del 27,3% y la de controles del 13,3%. El último estudio publicado hasta ahora es el realizado en población asturiana (47), y fue el único realizado en nuestro país en el que no se han observado diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con EC portadores de mutaciones (17,3%) y los controles (17,6%). En la tabla I se muestra detalladamente la presencia de cada una de las tres mutaciones estudiadas en pacientes y controles en los estudios españoles.

Tabla I. Frecuencia de portadores de las principales mutaciones del gen CARD15 en los distintos estudios españoles

		<i>R702W</i>		<i>G908R</i>		<i>1007fs</i>	
Madrid (42)	Pacientes	13,7	$p < 0,05$	8,3	$p < 0,05$	14,2	$p < 0,05$
	Controles	4,3		2,1		4,3	
Galicia (43)	Pacientes	13,3	$p = n.s.$	7,9	$p < 0,05$	8,5	$p < 0,05$
	Controles	11,5		1,8		1,8	
Barcelona (45)	Pacientes	22,6	$p < 0,01$	5,1	$p = 0,16$	8,2	$p = 0,17$
	Controles	4,0		0		4,4	
Toledo (46)	Pacientes	15	$p < 0,05$	6	$p = 0,16$	9	$p = 0,10$
	Controles	7		2		4	
Asturias (47)	Pacientes	8,8	$p = n.s.$	3	$p = n.s.$	6	$p = n.s.$
	Controles	11,6		2,3		3,5	

Como curiosidad y dada la cercanía con algunas poblaciones estudiadas, en la península ibérica se han realizado otros dos estudios, uno en Oporto (48) en el que se observaron mutaciones en el 34,6% de los pacientes y en el 12,9% de los controles. Sin embargo en otro estudio realizado en Lisboa (49), aunque con un número muy limitado de pacientes, se observaron mutaciones en el 21% de los pacientes y en el 16% de los controles, sin observarse diferencias estadísticamente significativas.

IMPACTO DE LAS MUTACIONES SOBRE LA ENFERMEDAD DE CROHN

Resulta importante conocer el valor de las mutaciones genéticas una vez se ha establecido el diagnóstico de la enfermedad. Se han publicado resultados consistentes en cuanto a la relación entre las mutaciones del gen CARD15 y la localización de la enfermedad. En un estudio en población británica (12) se observó que las mutaciones sólo se asociaban significativamente con la enfermedad ileal, con un riesgo relativo de 4 cuando se portaba una mutación y de 30 con dos o más mutaciones. Estos resultados han sido corroborados en otros estudios, así como en el metaanálisis de Economou [OR 2.53 (95% IC: 2,01-3,16)] (50). Además de una mayor asociación con las formas ileales, otros estudios han descrito que las variantes CARD15/NOD2 se correlacionan inversamente con la enfermedad de Crohn de colon (9,25). Una probable hipótesis que justifica estos resultados es la gran diferencia entre los mecanismos de tolerancia inmune entre íleon y colon, estando este último expuesto a una mayor concentración de bacterias que el íleon, pudiendo el colon utilizar mecanismos inmunológicos que no dependerían de la función del CARD15 (51).

A pesar de que los resultados son menos consistentes, en el citado metaanálisis (50) se ha observado una asociación de las variantes de CARD15 con los pacientes con formas fibroestenóticas de la EC [OR 1,94 (95% IC 1,61-2,34)]. Analizando por separado los principales estudios se puede observar que en la mayoría de ellos los pacientes con EC estenótica presentaban un mayor número de mutaciones que el resto de los pacientes (9,12, 22), siendo mayor la asociación con este patrón de la enfermedad en los pacientes que presentaban la variante de la inserción (L1007insC) (52). La asociación de las mutaciones con las formas estenóticas necesitan estudios más detallados en el futuro, en primer lugar porque es sabido que los patrones evolutivos en la EC pueden variar con los años de enfermedad y, en segundo lugar, porque la enfermedad estenótica se asocia positivamente con la enfermedad ileal, lo que podría suponer un sesgo a la hora de interpretar estos resultados.

Con respecto a la asociación con las formas más graves de la enfermedad, la mayoría de los estudios publicados (7,15,19,48,53) encuentran una mayor necesidad de cirugía ileal en los individuos con mutaciones en CARD15, si bien existen otros trabajos que no confirman

dicha asociación (38,54). En la mayoría de los estudios la mutación asociada con más fuerza ha sido la de la inserción (1007fs); de hecho, en un estudio en el que solamente se analizó esta mutación también se encontró asociación con la cirugía (55). Algunos estudios merecen especial atención al aportar conceptos diferentes, así Kugathasan y cols. (23) observaron que en población pediátrica los pacientes con mutaciones en CARD15 tenían un riesgo mayor de cirugía (hazard ratio, 5,8; $p < 0,0001$) y de que la cirugía era más precoz (hazard ratio, 2,24). En 3 estudios independientes, uno realizado en Alemania (17), otro en Italia (56) y otro por el grupo del Hospital Clinic de Barcelona (44) observaron además que los pacientes con mutaciones del gen presentaban más riesgo de reintervenciones y que estas además eran más precoces.

Si consideramos la necesidad de cirugía como un índice de gravedad, estos resultados estarían de acuerdo con las afirmaciones que apuntan un importante papel del gen CARD15 en la susceptibilidad para casos más graves de la EC. Sin embargo, hay que resaltar que a pesar de la relación existente entre estas mutaciones y la necesidad de cirugía en la EC, la proporción de pacientes portadores de mutaciones dentro de aquellos que requieren cirugía es todavía demasiado baja como para poder utilizar esta relación como método predictivo. Además, hay que considerar que existe siempre un porcentaje de individuos que requieren intervención quirúrgica y no portan mutaciones en este gen.

¿SE PUEDEN UTILIZAR LAS MUTACIONES DEL NOD2/CARD15 EN LA PRÁCTICA HABITUAL?

Actualmente la realización de pruebas genéticas en la EII no está preparada para ser utilizada en la práctica clínica. La principal razón para realizar esta afirmación es que hasta el momento la mayoría de los genes solamente incrementan el riesgo a padecer la enfermedad marginalmente y además, muchos individuos sanos que no padecerán la enfermedad son portadores de estas mutaciones. De hecho, muchos individuos que portan la mutación NOD2/CARD15 no sufrirán la EC. El riesgo relativo cuando se tiene una mutación es de 2 a 3 veces, pero aumenta de 20 a 40 veces en el caso de presentar dos mutaciones (9,12,14-18). Con la prevalencia que existe actualmente de la EC en Europa, se puede decir que el riesgo relativo de padecer EC cuando se tienen dos mutaciones en la población europea es del 4 al 8% (9,12,14-18), sin embargo, la penetrancia es muy baja: menos de un 10% de todas las personas portadoras de dos mutaciones desarrollarán la enfermedad. Esto significa que se necesitan otros genes y estímulos ambientales para padecer la EC (57). Un aspecto muy atractivo es que la determinación de las mutaciones del CARD15/NOD2 pueda identificar individuos de alto riesgo para padecer la EC, como son los familiares de primer grado de los enfermos con EC. En un metaanálisis (50) se ha estimado que la presencia de cualquiera de las mutaciones del NOD2/CARD15 in-

crementa el riesgo de EC familiar [OR 1,41 (95% CI: 1,17-1,69)]. Pero en contra de recomendar su determinación en los familiares de pacientes con EC está que no se dispone de estrategias para evitar que estos individuos padezcan la EC. Teóricamente en este grupo de individuos de alto riesgo se podrían realizar diferentes intervenciones como son modificar genéticamente estas mutaciones mediante terapia génica, disminuir la carga de antígenos bacterianos específicos en la luz intestinal—dada la probabilidad como hemos visto anteriormente de que los genes de susceptibilidad sean específicos para determinadas bacterias (las mutaciones del NOD2/CARD15 y la proteína MDP de la pared celular de las bacterias)— y evitar determinados factores ambientales relacionados con el inicio del proceso inflamatorio intestinal y la ruptura de la barrera mucosa (58). Entre estos factores destacaría el consumo de tabaco, que es un factor exógeno relacionado con la susceptibilidad y peor historia natural de la EC. No se ha encontrado una mayor o menor asociación entre las mutaciones de los genes NOD2/CARD15, fumar y la EC (9,53).

Recientemente, se ha descrito que una combinación de cuatro marcadores genéticos y el consumo de tabaco incrementan solamente la probabilidad post-test para padecer EC aproximadamente al 1%, sugiriendo que el 99% de los individuos que tienen un resultado positivo nunca padecerán la EC (59).

Actualmente existe la necesidad de desarrollar biomarcadores que sean capaces de predecir el curso más agresivo de la EII, tanto en la EC, como en la CU, para utilizar las terapias más agresivas de una forma precoz, e incluso para desarrollar estrategias terapéuticas que nos permitan usar las terapias biológicas como primera opción terapéutica (estrategia que se conoce con el nombre de *top-down*). Pero dado que los factores genéticos están influenciados por factores ambientales, está claro que se necesitan paneles que combinen los factores genéticos con otros factores como los marcadores serológicos y factores clínicos para poder predecir el curso clínico más agresivo de la enfermedad y clasificar a los pacientes en alto y bajo riesgo y de esta forma decidir el tratamiento más adecuado para cada paciente. A pesar de que existen estudios que relacionan las mutaciones del NOD2/CARD15 con un incremento en la necesidad de cirugía (7,15,19,48,53) y por tanto formas más graves, en estos momentos no se puede utilizar con único marcador de gravedad de la enfermedad. Su asociación con la EC de localización ileal (50) y comportamiento estenosante (9,12, 22,50) lo hace atractivo para llegar a una clasificación molecular de la EC, si bien únicamente es útil en investigación.

La farmacogenética nos intenta explicar cómo los genes interfieren en las vías metabólicas de los medicamentos y pueden influir en la respuesta terapéutica y en su toxicidad. Las mutaciones del NOD2/CARD15 también se han postulado como responsables de las diferentes respuestas terapéuticas que presentan los pacientes a tratamientos como los antiTNF, por su capacidad de producir

cambios en la activación del NF-kB y en consecuencia en la producción de antiTNF. Sin embargo no se ha podido demostrar esta asociación en tres cortes independientes de pacientes tratados con infliximab (60,61).

¿QUÉ LE DEBEMOS DECIR A NUESTROS PACIENTES?

Debemos transmitir a nuestros pacientes que la genética todavía no tiene un impacto en el diagnóstico y en predecir el curso clínico de la EII, aunque se están desarrollando interesantes proyectos en este campo. Actualmente no merece la pena que realicen secuenciaciones del genoma los pacientes con fines clínicos individuales sino que tenemos que animarles a que participen en estudios bien diseñados que permitan completar el mapa genético de la EII, que reproduzcan la información que tenemos hasta ahora y permitan identificar dianas terapéuticas para controlar la EII.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yang H, Rotter J. The genetic background of inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 5-14.
2. Duerr R. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin N Am* 2002; 31: 63-76.
3. Ahmad T, Tamboli C, Jewell D, et al. Clinical relevance of advances in genetics and pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology* 2004; 126: 1533-49.
4. Ahmad T, Satsangi J, McGovern D, et al. Review article: the genetics of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 14: 731-48.
5. Mendoza JL, Taxonera C. Clinical value of gene NOD2/CARD15 mutations in Crohn's disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97(8): 541-69.
6. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603.
7. Hampe J, Cuthbert A, Croucher P, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn disease in German and British populations. *Lancet* 2001; 357: 1925-7.
8. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603-6.
9. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 845-57.
10. Henckaerts L, Vermeire S. NOD2/CARD15 disease associations other than Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13(2): 235-41.
11. Barreau F, Meinzer U, Chareyre F, et al. CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice. *PLoS One* 2007; 2(6): e523.
12. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, et al. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 854-66.
13. Ferwerda G, Kullberg BJ, de Jong DJ, et al. Mycobacterium paratuberculosis is recognized by toll-like receptors and NOD2. *J Leukoc Biol* 2007; 82(4): 1011-8.
14. Esters N, Pierik M, van Steen K, et al. Transmission of CARD15 (NOD2) variants within families of patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 299-305.
15. Annese V, Lombardi G, Perri F, et al. Variants of CARD15 are associated with an aggressive clinical course of Crohn's disease --an IG-IBD study. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 84-92.
16. Heresbach D, Gicquel-Douabin V, Birebent B, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms in Crohn's disease: a genotype-phenotype analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 55-62.

17. Büning C, Genschel J, Bühner S, et al. Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 1073-8.
18. Hradsky O, Lenicek M, Dusatkova P, et al. Variants of CARD15, TNFA and PTPN22 and susceptibility to Crohn's disease in the Czech population: high frequency of the CARD15 1007fs. *Tissue Antigens* 2008; 71: 538-47.
19. Heliö T, Halme L, Lappalainen M, et al. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut* 2003; 52: 558-62.
20. Törkvist L, Noble CL, Lördal M, et al. Contribution of CARD15 variants in determining susceptibility to Crohn's disease in Sweden. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 700-5.
21. Ernst A, Jacobsen B, Østergaard M, et al. Mutations in CARD15 and smoking confer susceptibility to Crohn's disease in the Danish population. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1445-51.
22. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, et al. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 679-88.
23. Kugathasan S, Collins N, Maresio K, et al. CARD15 gene mutations and risk for early surgery in pediatric-onset Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 1003-9.
24. Newman B, Silverberg MS, Gu X, et al. CARD15 and HLA DRB1 alleles influence susceptibility and disease localization in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 306-15.
25. Vermeire S, Wild G, Kocher K, et al. CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 74-83.
26. Cavanaugh JA, Adams KE, Quak EJ, et al. CARD15/NOD2 risk alleles in the development of Crohn's disease in the Australian population. *Ann Hum Genet* 2003; 67: 35-41.
27. Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, et al. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 86-91.
28. Croucher PJ, Mascheretti S, Hampe J, et al. Haplotype structure and association to Crohn's disease of CARD15 mutations in two ethnically divergent populations. *Eur J Hum Genet* 2003; 11: 6-16.
29. Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 1465-70.
30. Li M, Gao X, Guo CC, Wu KC, et al. OCTN and CARD15 gene polymorphism in Chinese patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4923-7.
31. Pugazhendhi S, Amte A, Balamurugan R, et al. Common NOD2 mutations are absent in patients with Crohn's disease in India. *Indian J Gastroenterol* 2008; 27: 201-3.
32. Derakhshan F, Naderi N, Farnood A, et al. Frequency of three common mutations of CARD15/NOD2 gene in Iranian IBD patients. *Indian J Gastroenterol* 2008; 27: 8-11.
33. Uyar FA, Over-Hamzaoglu H, Türe F, et al. Distribution of common CARD15 variants in patients with sporadic Crohn's disease: cases from Turkey. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 706-10.
34. Zouiten-Mekki L, Zaouali H, Boubaker J, et al. CARD15/NOD2 in a Tunisian population with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 130-5.
35. Zaahl MG, Winter T, Warnich L, et al. Analysis of the three common mutations in the CARD15 gene (R702W, G908R and 1007fs) in South African colored patients with inflammatory bowel disease. *Mol Cell Probes* 2005; 19: 278-81.
36. Figueroa C, Peralta A, Herrera L, et al. NOD2/CARD15 and Toll-like 4 receptor gene polymorphism in Chilean patients with inflammatory bowel disease. *Eur Cytokine Netw* 2006; 17: 125-30.
37. Baptista ML, Amarante H, Picheth G, et al. CARD15 and IL23R influences Crohn's disease susceptibility but not disease phenotype in a Brazilian population. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 674-9.
38. Fidler HH, Olschwang S, Avidan B, et al. Association between mutations in the CARD15 (NOD2) gene and Crohn's disease in Israeli Jewish patients. *Am J Med Genet A* 2003; 121: 240-4.
39. Karban A, Atia O, Leitersdorf E, et al. The relation between NOD2/CARD15 mutations and the prevalence and phenotypic heterogeneity of Crohn's disease: lessons from the Israeli Arab Crohn's disease cohort. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 1692-7.
40. Geary RB, Lea RA, Roberts RL, et al. CARD15 allele frequency differences in New Zealand Maori: ancestry specific susceptibility to Crohn's disease in New Zealand? *Gut* 2006; 55: 580.
41. Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, et al. NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun* 2004; 5: 417-25.
42. Mendoza JL, Murillo LS, Fernández L, et al. Prevalence of mutations of the NOD2/CARD15 gene and relation to phenotype in Spanish patients with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 1235-40.
43. Núñez C, Barreiro M, Domínguez Muñoz E. CARD15 Mutations in patients with Crohn's disease in a homogeneous Spanish population. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 450-6.
44. Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M, et al. Crohn's disease patients carrying Nod2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence. *Ann Surg* 2005; 242: 693-700.
45. Cantó E, Ricart E, Busquets D, et al. Influence of a nucleotide oligomerization domain 1 (NOD1) polymorphism and NOD2 mutant alleles on Crohn's disease phenotype. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5446-53.
46. De Diego C, Alcántara M, Valle J, et al. Frequency of CARD15 polymorphisms in patients with Crohn's disease from Toledo, Spain: genotype-phenotype correlation. *Genet Test* 2006; 10: 178-85.
47. Rodrigo L, Martínez-Borra J, Garrote JA, et al. CARD15 mutations are poorly related to Crohn's disease phenotypes in Asturias. *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99: 570-757.
48. Ferreira AC, Almeida S, Tavares M, et al. NOD2/CARD15 and TNFA, but not IL1B and IL1RN, are associated with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 331-9.
49. Vind I, Vieira A, Hougs L, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms in Crohn's disease: a genotype-phenotype analysis in Danish and Portuguese patients and controls. *Digestion* 2005; 72: 156-63.
50. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, et al. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 393-404.
51. Colombel JF. The CARD15 (also known as NOD2) gene in Crohn's disease: Are there implications for current clinical practice? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003; 1: 5-9.
52. Radlmayr M, Torok HP, Martin K, et al. The c-insertion mutation of the NOD2 gene is associated with fistulizing and fibrostenotic phenotypes in Crohn's disease (letter). *Gastroenterology* 2002; 122: 2091-2.
53. Barreiro M, Núñez C, Domínguez-Muñoz JE, et al. Association of NOD2/CARD15 mutations with previous surgical procedures in Crohn's disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97: 547-53.
54. Renda MC, Orlando A, Civitavecchia G, et al. The role of CARD15 mutations and smoking in the course of Crohn's disease in a Mediterranean area. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 649-55.
55. Seiderer J, Schnitzler F, Brand S, et al. Homozygosity for the CARD15 frameshift mutation 1007fs is predictive of early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 1421-32.
56. Maconi G, Colombo E, Sampietro GM, Lamboglia F, D'Inca R, Daperno M, et al. CARD15 gene variants and risk of reoperation in Crohn's disease patients. *Am J Gastroenterol* 2009; 104(10): 2483-91.
57. Henckaerts L, Vermeire S. Genética de la enfermedad inflamatoria intestinal. En: Gassull MA, Gomollon F, Hinojosa J, Obrador A, editores. *Enfermedad inflamatoria intestinal*. Madrid: Aran Ediciones SL; 2007. p. 59-73.
58. Sartor RB. Clinical applications of advances in the genetics of IBD. *Rev Gastroenterol Disord* 2003; 3(Supl. 1): S9-17.
59. McGovern DP, Butler H, Ahmad T, et al. TUCAN (CARD8) genetic variants and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2006; 131(4): 1190-6.
60. Vermeire S, Louis E, Rutgeerts P, et al. NOD2/CARD15 does not influence response to infliximab in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 123(1): 106-11.
61. Mascheretti S, Hampe J, Croucher PJ, et al. Response to infliximab treatment in Crohn's disease is not associated with mutations in the CARD15 (NOD2) gene: an analysis in 534 patients from two multicenter, prospective GCP-level trials. *Pharmacogenetics* 2002; 12(7): 509-15.