

TEMA 3. GENÉTICA DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL. ASPECTOS PRÁCTICOS.

Carlos Taxonera, Natalia López-Palacios

Unidad de EII. Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Clínico "San Carlos". Madrid.

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) comprende básicamente dos entidades, enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU) con un comportamiento clínico heterogéneo. Aunque la etiología no es bien conocida, existe un consenso generalizado que relaciona el daño en la EII con una respuesta inmune alterada frente a la microflora de la luz intestinal que se produce en pacientes con susceptibilidad genética. El resultado final depende de una compleja interrelación entre factores inmunológicos, ambientales (tabaco, infecciones, hormonas) y genéticos.

La genética influye, no sólo en la susceptibilidad a la EII (como se deriva de los estudios de agregación familiar y en gemelos) sino que también parece condicionar el fenotipo (tipo de EII, localización, severidad). Por otro lado, los genes pueden ser los determinantes de la respuesta y los efectos adversos de los fármacos usados en la EII, dando lugar a los estudios de farmacogenética.

Susceptibilidad genética en la EII

Los estudios de concordancia en gemelos y de agregación familiar objetivan la importancia de los factores gené-

ticos en la aparición y expresión de la EII¹. Los estudios en gemelos son una potente herramienta en la detección de la diferente contribución de la genética y el ambiente en la etiología de la EII. En gemelos con una teórica similar exposición ambiental, las diferencias en la prevalencia entre pares monocigotos y dicigotos estiman la contribución de los genes a padecer la enfermedad. Tres estudios objetivan una muy superior concordancia para padecer EII en pares monocigotos (Tabla 1) comprobando además que los monocigotos concordantes para EII lo son también para el tipo de enfermedad²⁻⁵, lo que sugiere que ciertos factores genéticos son diferentes para la EC y la CU. La influencia genética es mayor en la EC que en la CU: la tasa de concordancia combinada de estos estudios para gemelos monocigotos es de 36% para EC y de 16% para la CU²⁻⁵.

Existe una clara agregación familiar en la EII. En los parientes de primer grado, el mayor riesgo es padecer el mismo tipo de enfermedad (EC o CU) que el familiar afecto, pero también están expuestos a padecer cualquier EII, con un riesgo mayor para familiares de sujetos con EC para padecer CU que viceversa^{6,7}. Los pacientes con EC refieren tener familiares de primer grado con EC con una tasa de 6% a 16%, mientras que la tasa para presentar cualquier tipo de EII aumenta a entre 9% y 22%⁷⁻¹⁶. El riesgo es algo menor en la CU,

Tabla I. Tasas de concordancia para EC y CU en tres series de gemelos monocigotos o dicigotos.

	Concordancia			
	EC		CU	
	Monocigotos	Dicigotos	Monocigotos	Dicigotos
Halfvarson(3)	9/18 (50%)	1/26 (4%)	3/16 (19%)	0/20 (0%)
Orholm(4)	5/10 (50%)	0/27 (0%)	3/21 (14%)	2/44 (5%)
Thompson(5)	5/25 (20%)	3/46 (7%)	6/38 (16%)	1/34 (3%)

tanto para padecer la misma enfermedad (posibilidad entre 6% y 11%) o EII en general (7%-14%)^{7,9,10,16}.

Para delimitar el riesgo de padecer una EII que tienen los familiares de primer grado se usa el riesgo relativo ajustado a edad (RRAE) asumiendo que los pacientes viven 70 años y de acuerdo al método de Strómgren's¹⁷. En poblaciones caucásicas no judías, los familiares de primer grado de un paciente con EC tienen un RRAE para padecer EII a lo largo de su vida entre el 4.8% y el 5.2%⁹⁻¹¹, mientras que, en los familiares de sujetos con CU, es de 1.6%⁹. En poblaciones judías el riesgo es claramente superior, con RRAE de 8% y de 5.2% para pacientes con EC y CU, respectivamente⁹.

Los hermanos son considerados los familiares con mayor riesgo de padecer EII. Este riesgo se expresa mediante el λ_s : la relación entre el riesgo de hermanos de una persona afecta comparado con el riesgo de la población general. El λ_s para hermanos de afectos por EC es muy elevado y oscila entre 25 y 42^{6,7,13,18,19}, sin embargo, para hermanos de pacientes con CU es entre 6 y 156,7, similar al promedio en los parientes de primer grado. El RRAE para hermanos de pacientes con EC es de 5.1% para padecer EC y de 7% para padecer cualquier tipo de EII⁹. El RRAE para hermanos con CU es de 0.9% para padecer cualquier EII⁹.

El riesgo para los hijos de padecer EII es muy alto cuando ambos padres están afectos: sobrepasa a los 30 años el 30%, siendo similar cuando ambos padres padecen EC o CU o se trata de parejas mixtas^{20,21}. Cuando sólo uno de los padres padece EII el riesgo de los hijos es considerablemente inferior: 9% cuando el padre padece EC y 6% cuando padece CU.

Los padres de pacientes con EII son los familiares de primer grado con menor riesgo de padecer EII^{6,7,9-11}. El riesgo para parientes de segundo grado solo está levemente elevado en algún estudio⁶.

Influencia de la herencia en el fenotipo

Los estudios de concordancia de fenotipo, cuando se comparan casos familiares de IBD frente a casos esporádicos, ofrecen datos inconsistentes. En algunos estudios, la edad al diagnóstico es menor en los casos familiares^{8,9,22,23}, pero en otros no existen diferencias^{10,12,16,24}. No se observan tampoco diferencias consistentes en cuanto a la localización y comportamiento clínico en la EII familiar comparada con los casos esporádicos^{12,16,24,25}. En familias múltiples con dos o más afectos sí se detecta una elevada concordancia, tanto para localización como para comportamiento clínico^{22,26-28}. No se constata mayor incidencia de manifestaciones extraintestinales en la EII familiar comparada con la EII esporádica²⁹.

Un aspecto debatido es la existencia de anticipación, entendida como el aumento de la severidad y la disminución de la edad de presentación de una enfermedad heredada. La anticipación genética en la EII se apoya en la observación de que los niños afectos son diagnosticados a una edad de 12 a 23 años menor que sus parientes afectos^{23,24,27,30}. Sin embargo, hoy sabemos que la anticipación no ocurre en la EII, y su presencia se asocia al fallo en las correcciones estadísticas³¹.

En ocasiones, los factores ambientales explican las discordancias observadas en los estudios de EII familiar. El uso de tabaco modifica el riesgo de padecer EII en parejas de hermanos: los hermanos fumadores en las parejas discordantes para este hábito suelen padecer con más frecuencia EC32. También los estudios en gemelos confirman el papel del tabaco en el fenotipo y explican las diferencias observadas en los pares discordantes^{4,33}.

EII: búsquedas sistemáticas y refinadas en el genoma

El estudio de los genes en una enfermedad multifactorial y compleja como la EII suele realizarse por dos métodos principales³⁴. El análisis de linkaje (ligamiento) consiste en una revisión sistemática en el total del genoma en busca de regiones (o locus) con elevada posibilidad de contener genes de la enfermedad. Se trata de encontrar en pares de familiares afectos, alelos de marcadores genéticos ligados a locus de susceptibilidad. Desde del primer estudio completo del genoma para EC por Hugot³⁵ diversos grupos han rastreado mediante este método el genoma para EII³⁶⁻⁴⁵. Aunque se han encontrado locus de susceptibilidad en la mayoría de los cromosomas, solo 7 de ellos (denominados IBD1-IBD7) cumplen criterios estrictos de reproducibilidad³⁵⁻⁴⁵. Ciertos locus están ligados solo a la EC (IBD1), otros a la CU (IBD2) y algunos confieren susceptibilidad a la EII en general. Los locus de susceptibilidad contienen muchos cientos de genes y precisan de un rastreo para identificar genes concretos; éste puede realizarse mediante estudios de linkage (mapeo fino) o mediante el segundo método usado que consiste en el análisis de genes candidatos. En este caso, de acuerdo a una hipótesis previa, se comparan las frecuencias de variantes alélicas de un gen concreto en pacientes frente a controles: un exceso va a favor de la implicación del gen en la enfermedad estudiada.

Gen NOD2/CARD15 y EC

En 2001 Hugot identifica con el método de mapeo fino en el locus IBD1 el gen NOD2/CARD1546. De manera simultánea, pero usando el método del gen candidato, Ogura y Hampe identifican el mismo gen localizado en la región pericentromérica del cromosoma 16 (16q12)^{47,48}. Existen treinta mutaciones del gen NOD2/CARD15 asociadas a la EC. De entre éstas, tres mutaciones independientes (R702W, G908R y Cins1007fs) se relacionan en diversos estudios, uno de nuestro grupo, con la susceptibilidad a la EC en caucásicos^{47,49-51}. Las mutaciones del gen NOD2/CARD15 no se presentan o son muy raras en Asiáticos, Africanos, Árabes y Afroamericanos⁵². El gen NOD2/CARD15 presenta un claro efecto genodis: en un metaanálisis el riesgo relativo global para desarrollar EC en heterocigotos simples (MW) es de 2.4 (95% IC 2-2.9), y para personas con dos o más mutaciones (MM, homocigotos simples o heterocigotos compuestos) asciende a 17.1 (95% IC 10.7-27.2)⁵³. Las variantes de NOD2/CARD15 predisponen para padecer EC pero no CU50.

Respecto a la patogénesis, el gen NOD2/CARD15 está implicado en la regulación de la inmunidad innata que permite al huésped reconocer bacterias mediante series complejas de receptores en la superficie celular (receptores Toll-like) o por medio de receptores intracelulares⁵⁴. El gen NOD2/CARD15 codifica una proteína implicada en el reconocimien-

to de dipéptidos de la muraina presentes en el peptidoglicano de bacterias gram positivas y negativas, dando lugar a la activación de la ruta de señalización NF-KB^{55,56}. La proteína se expresa en monocitos, macrófagos, células epiteliales y dendríticas pero también en células de Paneth, localizadas primariamente en el ileon terminal⁵⁷. Pacientes con polimorfismos para NOD2/CARD15 tienen una menor producción de alfa-defensinas (llamadas criptidinas) en las células de Paneth, lo que relaciona funcionalmente al gen con la EC de ileon⁵⁸.

En cuanto a la influencia genética sobre el fenotipo, los polimorfismos del gen NOD2/CARD15 son mas frecuentes en la EC de ileon (cuando se compara con localización limitada a colon)⁵³ y predisponen para el comportamiento clínico estenosante⁵⁹⁻⁶¹. Las variantes NOD2/CARD15 también se han relacionado con la enfermedad fistulosa no perianal⁶¹.

Otros genes relacionados preferentemente con la EC

La región IBD5 en el cromosoma 5q³¹⁻³³ (locus IBD5) se asocia con susceptibilidad para la EC⁶². Se presta una atención particular a las variaciones en los genes transportadores de cationes orgánicos OCTN1 y OCTN2⁶³. Otros determinantes genéticos que se han relacionado con menor solidez con la EC incluyen el DLG5 en el cromosoma 10⁶⁴, NOD1⁶⁵ y TLR4 y 9⁶⁶. Más recientemente, el gen ILR3 en el cromosoma 1p31 (que codifica una subunidad del receptor para la citocina proinflamatoria IL-23) se ha asociado con la EC⁶⁷. En cuanto a las interacciones entre gen-ambiente no se objetiva asociación entre el gen NOD2/CARD15 y el tabaco^{68,69}. Sin embargo en un estudio reciente si se objetiva interacción entre genes del locus IBD4 y el consumo de

tabaco⁶⁹.

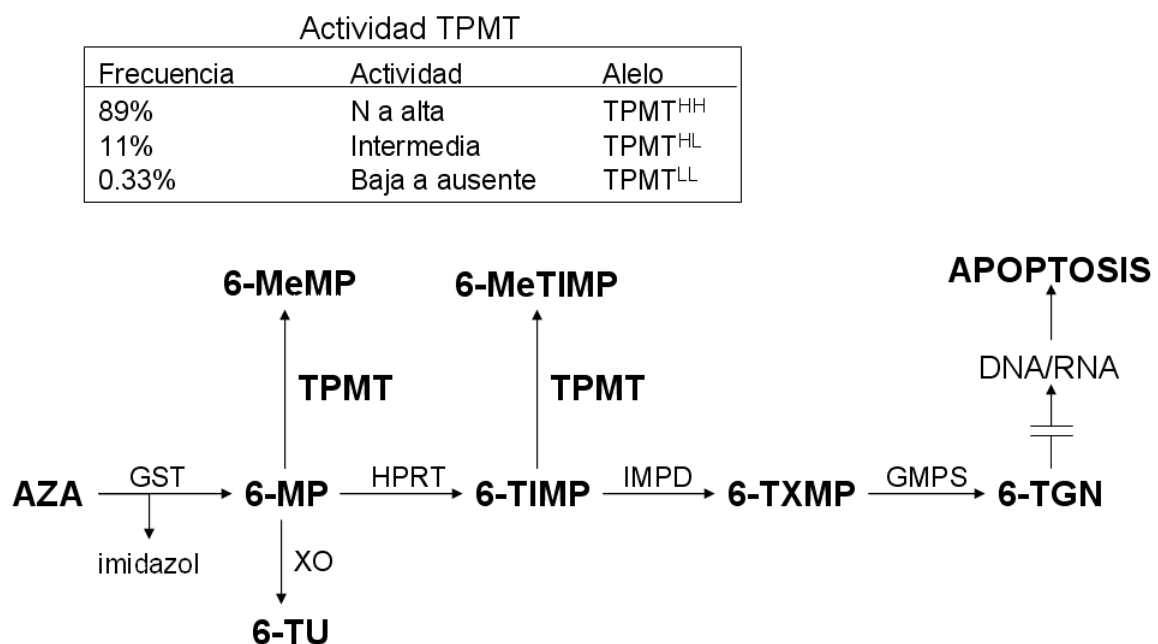
Genes HLA y EII

La región del complejo HLA en el cromosoma 6p incluye al menos 130 genes (locus IBD3). Las moléculas HLA tipo II presentan los antígenos a los receptores de los linfocitos T y están implicados en la inmunidad adaptativa. El elevado polimorfismo de la región ha llevado a estudios discordantes, pero existe consenso en varios estudios de la asociación entre HLADR103 y CU^{38,70}, en especial extensa y severa^{71,72}. En un estudio de nuestro grupo el subtipo poco frecuente de HLADR1, DRB1*0103, se presenta en 2.3% de controles, frente a 10,3% de CU⁷³. También se objetiva una asociación, independiente de DRB1*0103, con el gen IKBL en la región HLA⁷⁴. DRB1*0103 se asocia también de manera significativa pero con menor fuerza a la EC limitada a colon⁷⁵.

Farmacogenética y EII

En este momento no disponemos de pruebas estandarizadas para predecir la eficacia o toxicidad de la mayoría de fármacos usados en la EII, pero sabemos que los genes intervienen en su metabolismo y disponibilidad. En la EII los análogos de tiopurina azatioprina (AZA) y 6-mercaptopurina (6-MP) son los fármacos en los que la farmacogenética tiene una mayor relevancia clínica. AZA y 6-MP son metabolizados dando lugar a los diferentes metabolitos tiopurínicos (Figura 1). El principal determinante conocido de las variaciones individuales en el metabolismo de estas drogas es la enzima TPMT (tiopurin metiltransferasa). La distribución de

Figura 1. Metabolización de Azatioprina (AZA) y 6 Mercaptopurina (6-MP) y distribución de la actividad de la enzima Tiopurin-Metiltransferasa (TPMT) en la población.



la actividad de la TPMT es trimodal y depende de variaciones polimórficas en su gen. El 89% de pacientes tienen actividad enzimática normal o alta (homocigotos TPMT/H para el alelo wild type *1), 11% muestran una actividad intermedia (heterocigotos TPMT/L) y solo un 0.3% tienen actividad de la enzima baja o ausente (homocigotos L/L) ⁷⁶. Estos últimos con metabolización preferente vía 6-TGnucleótidos (con efecto apoptótico) están expuestos a padecer mielotoxicidad precoz y severa. Sin embargo la determinación de niveles de TPMT tiene un valor limitado y no predicen adecuadamente la respuesta o la aparición de toxicidad ⁷⁷.

El papel del gen MDR2 en la predicción de respuesta a corticoides no está aclarado, y la búsqueda de polimorfismos del gen no es útil ⁷⁸. En pacientes con CU los polimorfismos de genes de las enzimas NAT1 y NAT2 (N-acetiltransferasas, acetilan la mesalazina en hígado) no se relacionan con la respuesta ni la toxicidad a sulfasalazina y mesalazina ⁷⁹.

En relación a los anti-TNFs un polimorfismo con funcionalidad significativa en FCGR3A, el gen que codifica para FcγRIIIa expresado en macrófagos y células natural killer, se asocia con la respuesta clínica y biológica a Infliximab en pacientes con EC ⁸⁰. El Fas ligand (FasL, Apo-1L, CD178), es un factor de la familia TNF con un potente efecto proapoptótico. Se ha descrito una asociación significativa entre el polimorfismo Fas ligand C-843T y la respuesta a infliximab para EC luminal ⁸¹. En un estudio de nuestro grupo los pacientes con EC mutantes homocigotos para variantes de IBD5 (IGR2060a_1 and IGR3081a_1) presentan una significativa menor respuesta a infliximab ⁸².

Conclusiones

El factor más potente para el desarrollo de la EII es tener un familiar de primer grado afecto: el riesgo mayor (gemelos aparte) es para el hijo con ambos padres afectados seguido de los hermanos. Los datos en familias apoyan una mayor influencia genética en la EC que en la CU.

Los genes asociados a la EII son muchos, y todos ellos intervienen con una baja penetrancia. En la EC se implican genes, en especial el NOD2/CARD15, relacionados con la inmunidad innata a bacterias, mientras que en la CU son genes HLA (relacionados con la inmunidad adaptativa) los asociados. En cualquier caso la genética no explica más allá del 20% de los casos, dejando un espacio a los efectos del ambiente en la EII. En cuanto a la farmacogenética solo los polimorfismos de TPMT ofrecen una ayuda limitada en la práctica clínica diaria.

BIBLIOGRAFÍA

1. Duerr R. Update on the genetics of Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37:358-367.
2. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G & Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988; 29: 990-996.
3. Halfvarson J, Bodin L, Tysk C et al. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* 2003; 124: 1767-1773.

4. Orholm M, Binder V, Sorensen TI et al. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2000; 35: 1075-1081.
5. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE & Wakefield AJ. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *British Medical Journal* 1996; 312: 95-96.
6. Orholm M, Munkholm P, Langholz E et al. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine* 1991; 324: 84-88.
7. Probert CS, Jayanthi V, Hughes AO et al. Prevalence and family risk of ulcerative colitis and Crohn's disease: an epidemiological study among Europeans and south Asians in Leicestershire. *Gut* 1993; 34:1547-1551.
8. Monsen U, Bernell O, Johansson C & Hellers G. Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1991; 26: 302-306.
9. Yang H, McElree C, Roth MP et al. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut* 1993; 34: 517-524.
10. Peeters M, Nevens H, Baert F et al. Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology* 1996; 111: 597-603.
11. Roth MP, Petersen GM, McElree C et al. Familial empiric risk estimates of inflammatory bowel disease in Ashkenazi Jews. *Gastroenterology* 1989; 96: 1016-1020.
12. Freeman HJ. Familial Crohn's disease in single or multiple first-degree relatives. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2002; 35: 9-13.
13. Satsangi J, Rosenberg WMC & Jewell DP. The prevalence of inflammatory bowel disease in relatives of patients with Crohn's disease. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1994; 6: 413-416.
14. Hampe J, Heymann K, Kruis Wet al. Anticipation in inflammatory bowel disease: a phenomenon caused by an accumulation of confounders. *American Journal of Medical Genetics* 2000; 92: 178-183.
15. Bayless TM, Tokayer AZ, Polito JM et al. Crohn's disease: concordance for site and clinical type in affected family members—potential hereditary influences. *Gastroenterology* 1996; 111: 573-579.
16. Halme L, Turunen U, Helio T et al. Familial and sporadic inflammatory bowel disease: comparison of clinical features and serological markers in a genetically homogeneous population. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2002; 37: 692-698.
17. Tillil H & Kobberling J. Age-corrected empirical genetic risk estimates for first-degree relatives of IDDM patients. *Diabetes* 1987; 36: 93-99.
18. Weterman IT & Pena AS. Familial incidence of Crohn's disease in the Netherlands and a review of the literature. *Gastroenterology* 1984; 86: 449-452.
19. Mayberry JF, Rhodes J & Newcombe RG. Familial prevalence of inflammatory bowel disease in relatives of patients with Crohn's disease. *British Medical Journal* 1980; 280: 84.
20. Laharie D, Debeugny S, Peeters M et al. Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring. *Gastroenterology* 2001; 120: 816-819.
21. Bennett RA, Rubin PH & Present DH. Frequency of inflammatory bowel disease in offspring of couples both presenting with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1991; 100: 1638-1643.

22. Colombel JF, Grandbastien B, Gower-Rousseau C et al. Clinical characteristics of Crohn's disease in 72 families. *Gastroenterology* 1996; 111: 604–607.
23. Polito JM, Childs B, Mellits ED et al. Crohn's disease: influence of age at diagnosis on site and clinical type of disease. *Gastroenterology* 1996; 111: 580–586.
24. Carbonnel F, Macaigne G, Beaugerie L et al. Crohn's disease severity in familial and sporadic cases. *Gut* 1999; 44: 91–95.
25. Hampe J, Heymann K, Kruis W et al. Anticipation in inflammatory bowel disease: a phenomenon caused by an accumulation of confounders. *American Journal of Medical Genetics* 2000; 92: 178–183.
26. Satsangi J, Grootsholten C, Holt H & Jewell DP. Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; 38: 738–741.
27. Annese V, Andreoli A, Astegiano M et al. Clinical features in familial cases of Crohn's disease and ulcerative colitis in Italy: a GISC study. Italian Study Group for the Disease of Colon and Rectum. *American Journal of Gastroenterology* 2001; 96: 2939–2945.
28. Lee JC & Lennard-Jones JE. Inflammatory bowel disease in 67 families each with three or more affected first-degree relatives. *Gastroenterology* 1996; 111: 587–596.
29. Ricart E, Panaccione R, Loftus EV Jr et al. Autoimmune disorders and extraintestinal manifestations in first-degree familial and sporadic inflammatory bowel disease: a case control study. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10:207-214.
30. Polito JMI. Preliminary evidence for genetic anticipation in Crohn's disease. *Lancet* 1996; 347: 798–800.
31. Picco MFM. Methodologic pitfalls in the determination of genetic anticipation: the case of Crohn's disease. *Annals of Internal Medicine* 2001; 134: 1124–1129.
32. Bridger S, Lee JCV, Bjarnason I et al. In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis. *Gut* 2002; 51:21-25.
33. Halfvarson J, Jess T, Magnuson A et al. Environmental factors in inflammatory bowel disease: a co-twin control study of a Swedish-Danish twin population. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12:934-935.
34. Vermeire S, Rutgeerts P. Current status of genetics research in inflammatory bowel disease. *Genes Immun* 2005; 6:637-645.
35. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; 379: 821–3.
36. Satsangi J, Parkes M, Louis E, et al. Two-stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 1996; 14: 199–202.
37. Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, et al. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7502–7.
38. Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, et al. A genome wide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 808–16.
39. Ma Y, Ohmen JD, Li Z, et al. A genome wide search identifies potential new susceptibility loci for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 1999; 5: 271–8.
40. Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, et al. High-density genome scan in Crohn's disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11–12. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1857–62.
41. Rioux JD, Silverberg MS, Daly MS, et al. Genome wide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1863–70.
42. Williams CN, Kocher K, Lander ES, Daly MJ, Rioux JD. Using a genome-wide scan and meta-analysis to identify a novel IBD locus and confirm previously identified IBD loci. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8: 375–81.
43. Paavola-Sakki P, Ollikainen V, Helio T, et al. Genome-wide search in Finnish families with inflammatory bowel disease provides evidence for novel susceptibility loci. *Eur J Hum Genet* 2003; 11: 112–20.
44. Vermeire S, Rutgeerts P, Van Steen K, et al. Genome wide scan in a Flemish inflammatory bowel disease population: support for the IBD4 locus, population heterogeneity, and epistasis. *Gut* 2004; 53: 980–6.
45. Barmada MM, Brant SR, Nicolae DL, et al. A genome scan in 260 inflammatory bowel disease-affected relative pairs. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 15–22.
46. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of CARD15 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599–603.
47. 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.
48. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001; 357: 1925–8.
49. Cho JH. Significant role of genetics in IBD: the NOD2 gene. *Rev Gastroenterol Disord* 2003; 3 Suppl 1:S18-22.
50. The IBD International Genetics Consortium. International collaboration provides convincing linkage replication in complex disease through analysis of a large pooled data set: Crohn disease and chromosome 16. *Am J Hum Genet*. 2001; 68:1165–1171.
51. 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.
52. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T et al. Toward and integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005; 19 Suppl A:S5-36.
53. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT et al. Differential effects of NOD2 variants on Crohns disease risk and phenotype in disease populations. *Am J Gastroenterol* 2004; 99:2393-404.
54. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005; 307:731–4.
55. 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; 124: 993–1000.
56. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003; 278: 5509–12.
57. Lala S, Ogura Y, Osborne C, et al. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 2003; 125: 47–57.
58. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004; 53: 1658–64.

59. 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.
60. 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.
61. Brant SR, Picco, Achkar et al. Defining complex contribution of NOD2/CARD15 mutations, age at onset and tobacco use on Crohn's disease phenotypes. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9:281-9.
62. Rioux JD, Daly MJ, Silverberg et al. Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohns disease. *Nat Genet* 2001;29:223-8.
63. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, et al. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 2004; 36: 471–5.
64. Stoll M, Corneliusen B, Costello CM, et al. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2004; 36: 476–80.
65. McGovern DP, Hysi P, Ahmad T, et al. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1245–50.
66. Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, et al. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 2004; 53: 987–92.
67. Duerr RH, Taylor KD Brant SR et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*, 2006; 314:1403-5.
68. Laghi L, Costa S, Saibeni S, et al. Carriage of CARD15 variants and smoking as risk factors for resective surgery in patients with Crohn's ileal disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22:557-64.
69. Pierik M, Yang H, Barmada MM, et al. The IBD international genetics consortium provides further evidence for linkage to IBD4 and shows gene-environment interaction. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11:1-7.
70. Stokkers PC, Reitsma PH, Tygat GN et al. HLA-DR and –DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a metaanalysis. *Gut* 1994; 45:395-401.
71. Ahmad T, Ammuzzi A, Neville M et al. The contribution of human leucocyte antigen complex genes to disease phenotypes in ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 2003; 62:527-35.
72. Bouma G, Crusius JB, García-González MA, et al. Genetic markers in clinically well defined patients with ulcerative colitis (UC). *Clin Exp Immunol*. 1999; 115:294–300.
73. De la Concha EG, Fernández-Arquero M, Martínez A et al. Amino acid polymorphism in residue 71 in the HLA-DR beta chain plays a critical role in susceptibility to ulcerative colitis. *Digest Dis Sci* 1999; 44:2324-9.
74. De la Concha EG, Fernández-Arquero M, Lopez-Nava G, et al. Susceptibility to severe ulcerative colitis is associated with polymorphism in the central MHC gene IKBL. *Gastroenterology*. 2000; 119:1491–1495.
75. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, et al. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 854–66.
76. Weinsilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 1980; 32:651-62.
77. Colombel JF, Ferrari N, Debuysere H, et al. Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology* 2000; 118: 1025–30.
78. McGovern D, Ahmad T, Van Heel D et al. Cytochrome p450 and multidrug-resistance gene 1 (MDR-1) polymorphisms: predictors of the need for colectomy in ulcerative colitis?. *Gastroenterology* 2002; 122:W1313.
79. Ricart E, Taylor WR, Loftus EV, et al. N-acetyltransferase 1 and 2 genotypes do not predict response or toxicity to treatment with mesalamine and sulfasalazine in patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1763–8.
80. Louis E, El Ghoul Z, Vermeire S, et al. Association between polymorphism in IgG Fc receptor IIIa coding gene and biological response to infliximab in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 511.
81. Hlavaty T, Pierik M, Henckaerts L, et al. Polymorphisms in apoptosis genes predict response to infliximab therapy in luminal and fistulizing Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 613–26.
82. Urcelay E, Mendoza JL, Martínez A, Fernández F, Taxonera C et al. IBD5 polymorphisms in inflammatory bowel disease: Association with response to infliximab. *World J Gastroenterol* 2005; 11:1187-92.