

# RELACIÓN DE LAS MUTACIONES DEL GEN CARD15 CON LA GRAVEDAD DE LA ENFERMEDAD DE CROHN

E. Leo-Carnerero<sup>1</sup> ([eleoc@telefonica.net](mailto:eleoc@telefonica.net)), P. Herrera-Martín<sup>1</sup>, F. Del Castillo-Corzo<sup>1</sup>, C. Trigo Salado, F. González-Escribano<sup>2</sup>, J.R. García-Lozano<sup>2</sup>, J.M. Herrera-Justiniano<sup>1</sup>, J.L. Márquez-Galán<sup>1</sup>

Servicio de Aparato Digestivo<sup>1</sup>. Servicio de Inmunología<sup>2</sup>. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla.

## Resumen

**Introducción y objetivos:** La búsqueda de factores pronósticos en la enfermedad de Crohn (EC) es muy importante para adecuar las diferentes estrategias terapéuticas de forma individualizada. Se ha relacionado la existencia de mutaciones CARD15 con un peor pronóstico de la enfermedad. Nuestro objetivo es analizar cómo influyen estas mutaciones sobre el riesgo de cirugía y recurrencia posterior.

**Material y métodos:** Incluimos 81 pacientes con EC a los que se realiza estudio genético del gen CARD15. Se clasifican en función de su fenotipo y se analiza la prevalencia de cirugía y recurrencia postquirúrgica en cada grupo.

**Resultados:** El 33% de los pacientes presentan mutaciones CARD15, con tendencia a presentar afectación ileal y patrón estenosante/penetrante con más frecuencia, pero sin significación estadística. Los pacientes con mutaciones no tienen mayor probabilidad de cirugía (55 vs 46%,  $p=0,4$ ), ni de recurrencia posterior (46 vs 70%,  $p=0,1$ ). El tiempo de evolución y la presencia de estenosis son los únicos factores independientes que predicen cirugía. El tiempo desde la cirugía y quizás el tabaquismo lo hacen sobre la recurrencia.

**Conclusiones:** La presencia de mutaciones CARD15 no implica un peor pronóstico si lo consideramos en función del riesgo quirúrgico. Además, el riesgo de que la enfermedad recurra tras la intervención tampoco se ve influida por estas mutaciones.

**Palabras clave:** Enfermedad de Crohn, Fenotipo, Genética, CARD15, Cirugía.

## Introducción

La enfermedad de Crohn (EC) es un proceso inflamatorio crónico en cuya etiopatogenia están implicados una serie de factores ambientales y genéticos<sup>1</sup>. El curso natural

de la enfermedad es muy variable, progresando frecuentemente hacia patrones estenosantes o penetrantes<sup>2, 3</sup> que condicionan la necesidad de cirugía<sup>4</sup>. La introducción de los fármacos inmunosupresores -principalmente la azatioprina- creó grandes expectativas, aunque los estudios de los que disponemos hasta ahora no han demostrado que consigan disminuir el riesgo de cirugía<sup>5</sup>, probablemente por su tardía introducción en la terapéutica clásica. En ese sentido, existe en la actualidad una tendencia a la utilización precoz de los fármacos inmunosupresores y biológicos<sup>6</sup>, sugiriéndose que podrían modificar la historia natural de la enfermedad, si bien lo ideal sería poder pronosticar qué pacientes van a presentar una mala evolución desde el diagnóstico y en ellos instaurar terapias agresivas precozmente. Durante años, se han realizado múltiples estudios dirigidos a conocer cuáles son los factores que influyen negativamente sobre la evolución de la enfermedad, siendo los principales la afectación ileal y la existencia de un patrón estenosante o penetrante<sup>7-10</sup>.

Los recientes avances en genética han permitido que hoy sepamos del carácter poligénico de la EC, conociendo hasta el momento en torno a 30 genes implicados<sup>11</sup>. Las mutaciones del gen CARD15 son las más ampliamente asociadas a la susceptibilidad de padecer la EC<sup>12-13</sup>, siendo los polimorfismos R702W, G908R y L1007fs los más frecuentes. La presencia de estas mutaciones, que tan sólo explicarían en torno al 30% de la predisposición genética a padecer la enfermedad en España<sup>14</sup>, se asocia fenotípicamente a un patrón de localización ileal y comportamiento estenosante<sup>15-20</sup>, lo que implicaría peor pronóstico y mayor riesgo quirúrgico. En lo que se refiere a la cirugía aunque existen estudios que encuentran una mayor frecuencia de mutaciones entre los pacientes intervenidos<sup>19-21</sup> en pocos se comporta como una variable independiente<sup>22</sup>, siendo por tanto la asociación poco consistente<sup>23</sup>. Igualmente se han comunicado resultados contradictorios sobre la influencia de las mutaciones CARD15 en el riesgo de recurrencia postquirúrgica o necesidad de una segunda intervención<sup>22-24</sup>.

**Tabla 1. Polimorfismos de las mutaciones del gen CARD15.**

Pacientes N = 81 (%)	
<b>No mutaciones</b>	54 (67)
<b>Mutaciones</b>	27 (33)*
R702W	14 (17)
G908R	9 (11)
L1007fs	6 (7)

\* Mutaciones complejas: 2 homocigotos L1007fs y 4 heterocigotos mixtos: 3 G908R+R702W y 1 G908R+L1007fs.

Nuestro objetivo es determinar la influencia de las mutaciones del gen CARD15 sobre el pronóstico de la enfermedad de Crohn en una población andaluza, especialmente sobre la probabilidad de cirugía y de recurrencia postquirúrgica.

## Material y métodos

### Pacientes

Incluimos 81 pacientes con EC que acuden consecutivamente a las consultas monográficas de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Virgen del Rocío. En todos ellos el diagnóstico de la EC se realizó en base a criterios clínicos, endoscópicos, histológicos y radiológicos ampliamente aceptados<sup>25</sup>. Dividimos fenotípicamente a los pacientes según la clasificación de Montreal<sup>26</sup>, determinando la edad de los pacientes al diagnóstico (A1 menores de 17 años; A2 de 17 a 40 años y A3 mayores de 40 años), la localización de la enfermedad (L1

**Tabla 2. Características basales y fenotipo (Clasificación de Montreal) en función de la existencia de mutaciones CARD15.**

	Mutaciones n = 27	No mutaciones n=54	P
Sexo (hombres/mujeres)	13/14	25/29	<b>n.s.</b>
Tabaco	10 (37)	28 (52)	<b>0,2</b>
Tiempo evolución EC (años)	9,3 ± 7,1	9,6 ± 6,2	<b>n.s.</b>
Edad al diagnóstico	26,3 ± 12,1	28,1 ± 9,9	<b>n.s.</b>
Localización ileal	24 (89)	39 (72)	<b>0,08</b>
Patrón B2/B3	20 (74)	30 (56)	<b>0,1</b>
Afectación L4	4 (15)	8 (15)	<b>n.s.</b>
Afectación perianal	9 (33)	15 (28)	<b>n.s.</b>
M. extraintestinales	10 (37)	20 (37)	<b>n.s.</b>
Tratamiento			
Inmunosupresores	17 (63)	39 (72)	<b>n.s.</b>
Biológicos	5 (18)	12 (22)	<b>n.s.</b>

Entre paréntesis, porcentajes.

**Tabla 3. Factores que influyen sobre la presencia de patrón estenosante/penetrante (B2/B3).**

	<b>B1</b> n = 31	<b>B2/B3</b> n = 50	<b>P</b>
Edad al diagnóstico (años)	29,5±13	26,2±8,8	<b>n.s.</b>
Tiempo evolución EC (años)	7,1±4,4	11±7,1	<b>0,004*</b>
Tabaco	16 (51)	22 (44)	<b>n.s.</b>
Afectación ileal	18 (58)	45 (90)	<b>0,002*</b>
Mutación CARD15	7 (22)	20 (40)	<b>0,1</b>

B1: Patrón inflamatorio. B2: Patrón estenosante. B3: Patrón penetrante. \* Factores independientes en análisis multivariante. Entre paréntesis, porcentajes.

ileal, L2 colónica, L3 ileocolónica -aunque al analizar los datos clasificamos a los pacientes en función de que exista o no afectación ileal- y L4 si existe afectación de tramos altos) y el comportamiento (B1 inflamatorio, B2 estenosante y B3 penetrante, independiente de si además existe afectación perianal) de la enfermedad en el momento del análisis, no al diagnóstico. Se recogen también el sexo, hábito tabáquico -considerando fumador al paciente que ha fumado en cualquier momento de la evolución de la enfermedad- y el tiempo de evolución desde el diagnóstico.

La gravedad de la EC la evaluamos analizando la necesidad de tratamiento con fármacos inmunosupresores o terapia biológica, la probabilidad y número de intervenciones quirúrgicas y la recurrencia postquirúrgica. Consideramos exclusivamente la cirugía resectiva, excluyendo las reconstrucciones del tránsito y la intervención sobre patología perianal. Se ha recogido el tiempo de evolución desde el diagnóstico hasta el momento de la cirugía, así como el tiempo de seguimiento después de la primera intervención.

### Estudio genético

Todos los pacientes firman un consentimiento informado para su realización. El DNA fue extraído de sangre periférica usando el mini kit "QIAamp DNA blood" (Izasa, Barcelona, España). Los tres alelos del gen CARD15: 3020insC (L1007fs), 2722G>C (G908R) y 2104C>T (R702W), fueron tipados en sistema de PCR LightCycler (Roche, Mannheim, Alemania) como se ha descrito previamente<sup>27</sup>.

### Análisis estadístico

Las variables cuantitativas son expresadas como medias ± desviación estándar y comparadas mediante el test de la t de Student, mientras que las categóricas se comparan mediante el test de Chi-cuadrado, o test exacto de Fisher cuando proceda. Realizamos análisis de regresión lineal

múltiple para determinar qué factores influyen de forma independiente sobre el pronóstico de la EC. Consideramos estadísticamente significativos valores de la  $p < 0,05$ . Los resultados son analizados mediante el programa estadístico SPSS v.12.0

## Resultados

Veintisiete de los 81 pacientes (33%) presentan al menos una mutación del gen CARD15, y 6 de ellos (7,4%) sufren una afectación homocigota o doble heterocigota. La mutación R702W es la más frecuente en nuestra serie, en 14 pacientes (17%). En la [tabla 1](#) se muestran los diferentes polimorfismos encontrados.

Como se detalla en la [tabla 2](#) no existen diferencias significativas en cuanto al consumo de tabaco, la edad al diagnóstico de la EC o el tiempo de evolución de la misma en función de la existencia de mutaciones. Además, el consumo de fármacos inmunosupresores y biológicos es similar en ambos grupos. Sin embargo, los pacientes con mutaciones presentan más frecuentemente afectación ileal (89% vs 72%) y patrón estenosante/penetrante (74% vs 56%), sin alcanzar significación estadística.

Cuando analizamos qué factores influyen sobre la existencia de patrones avanzados de comportamiento (B2 y B3), la afectación ileal y la duración de la enfermedad son los únicos factores independientes según el análisis multivariante, pero no las mutaciones CARD15 ([tabla 3](#)). No encontramos relación de las mismas con otras características fenotípicas que pueden condicionar el pronóstico de la enfermedad, como la patología perianal, afectación de tramos altos o manifestaciones extraintestinales ([tabla 2](#)).

En cuanto al riesgo de cirugía resectiva, 15 de los

**Tabla 4. Factores que influyen en la probabilidad de cirugía y el riesgo de recurrencia postquirúrgica.**

	Cirugía			Recurrencia postquirúrgica		
	No (n=41)	Sí (n = 40)	p	No (n=16 )	Sí (n=24 )	p
Edad diagnóstico (años)	28,7±11,7	26,3±9,4	n.s.	<b>27±11,7</b>	<b>25,8±8,2</b>	<b>n.s.</b>
Tiempo evolución (años)	7,1±4,7	12±7,1	0,01*		-	
Tiempo seguimiento postquirúrgico (meses)		-		<b>33,2±40,3</b>	<b>135,4±79,1</b>	<b>&lt;0,0001*</b>
Tabaco	22 (53)	16 (40)	ns	<b>2 (13)</b>	<b>13 (54)</b>	<b>0,01</b>
Afectación ileal	27 (66)	36 (90)	0,01	<b>14 (87)</b>	<b>22 (91)</b>	<b>n.s.</b>
Patrón estenosante	13 (31)	37 (92)	<0,001*	<b>15 (93)</b>	<b>22 (91)</b>	<b>n.s.</b>
Mutación CARD15	12 (29)	15 (37)	0,4	<b>8 (50)</b>	<b>7 (29)</b>	<b>0,1</b>

Entre paréntesis, porcentajes. \* Factores predictivos independientes en análisis multivariante.

27 pacientes con mutaciones CARD15 (55%) requieren intervención, frente al 46% del grupo control (25/54;  $p=0,4$ ). Igualmente el número de intervenciones por paciente a lo largo del seguimiento es similar en ambos grupos (1,5 en el grupo mutado frente a 1,3;  $p=0,4$ ). Aunque el análisis inicial muestra que la localización ileal aumenta el riesgo de cirugía, en el análisis multivariante el patrón estenosante/penetrante y el tiempo de evolución de la EC son los únicos factores independientes que predicen cirugía (tabla 4).

El riesgo de recurrencia postquirúrgica es superior en los pacientes sin mutaciones CARD15 (46 vs 70%;  $p = 0,1$ ), aun teniendo menos tiempo de seguimiento tras la intervención quirúrgica inicial (111,2 vs 86,6 meses). En este caso, el análisis multivariante muestra que el tiempo de evolución tras la cirugía, así como el hábito tabáquico -este último sin significación estadística ( $p=0,08$ )- son los factores que influyen sobre el riesgo de recurrencia postquirúrgica (tabla 4).

## Discusión

Desde que a principios de la presente década aparecieron de forma simultánea los primeros trabajos implicando las mutaciones del gen CARD15 en la susceptibilidad de padecer la EC<sup>12, 13, 28</sup> se han publicado numerosas series dirigidas a conocer cual es su importancia real, estimándose que explicaría en torno al 20% de la predisposición genética a padecer EC. Entre nuestros pacientes el 33% presentan al menos una mutación de los más frecuentes polimorfismos CARD15 implicados, resultado muy similar a los descritos en diferentes poblaciones españolas<sup>29-32</sup>. Estos datos son

similares a los de otros países del área mediterránea<sup>33-34</sup> y países centroeuropeos<sup>19, 35</sup>, mientras en los del Norte de Europa las mutaciones CARD15 son significativamente menos frecuentes<sup>36-37</sup>, y prácticamente inexistentes en poblaciones asiáticas<sup>38-39</sup>. Esta variabilidad genética es incluso apreciada en regiones españolas con una menor mezcla étnica en el transcurso de la historia, como Asturias<sup>40</sup>.

Entre los diferentes polimorfismos CARD15, el R702W es el más frecuente entre nuestros pacientes (17%), lo cual es concordante con la mayoría de las series anteriormente referidas<sup>29, 30, 40</sup>. Sin embargo, de las 3 principales mutaciones conocidas (R702W, G908R y L1007fs) parece que la que más predispone a padecer la enfermedad es la L1007fs, según muestra un metanálisis que incluye 42 cohortes de pacientes, donde la presencia de este polimorfismo aumenta hasta 4 veces el riesgo de padecer EC<sup>15</sup>, existiendo series posteriores que inciden en su papel protagonista<sup>19, 35</sup>. Entre nuestros pacientes no hemos podido constatar estos datos al no contar con grupo control.

De los factores que se han asociado a una mala evolución de la enfermedad, son la afectación ileal y la existencia de patrón estenosante de los que tenemos resultados más consistentes<sup>7-10</sup>, además del tiempo de evolución de la enfermedad. Como sabemos, el paso del tiempo favorece la progresión de la EC hacia patrones agresivos, tanto el estenosante como el penetrante<sup>2, 3</sup>. Uno de los puntos más interesantes a la hora de determinar la situación genética de cada individuo con EC es saber si la presencia de mutaciones concretas se asocia a alguno de estos patrones de comportamiento. Diferentes estudios muestran una relación entre la existencia de mutaciones CARD15 y la afectación ileal<sup>16-20</sup>, encontrando entre nuestros pacientes una tendencia en ese

sentido sin alcanzar significación estadística ( $p=0,08$ ), posiblemente condicionado por el pequeño tamaño muestral. La explicación fisiopatológica de esta asociación es que las mutaciones del gen CARD15 provocan anomalías en una proteína citosólica que se expresa en monocitos, macrófagos y células dendríticas, además de las células de Paneth de intestino delgado, abundantes en íleon terminal<sup>41</sup>. Esta proteína está implicada en el reconocimiento de muramilo dipéptidos derivados de péptidoglicanos bacterianos y su alteración provoca una alteración de la respuesta inmune frente a los mismos.

En lo que se refiere al patrón fibroestenósante, también parece estar asociado a la presencia de mutaciones del gen CARD15<sup>16-20, 22, 29</sup>. El 74% de nuestros pacientes con mutaciones tienen un comportamiento estenosante o penetrante, cifra superior – de nuevo sin significación estadística- a la del grupo no mutado. Nos llama la atención en nuestra serie el elevado porcentaje de pacientes con patrones agresivos, seguramente debido al largo tiempo medio de seguimiento, cercano a los 10 años desde el diagnóstico. Los avances genéticos relacionan actualmente numerosos genes de susceptibilidad de padecer EC y progresivamente aparecen estudios que tratan de implicarlos igualmente es su fenotipo. Así, Alvarez-Lobos y cols<sup>30</sup> encuentran que la presencia de estenosis no se debe sólo a la presencia de mutaciones CARD15, sino a la asociación de las misma con mutaciones del gen del PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno), posiblemente porque las mutaciones CARD15 provocarían un incremento del factor de crecimiento beta dando lugar a un depósito de fibroblastos y colágeno en músculo liso, mientras las mutaciones PAI-I condicionan un estado de hipercoagulabilidad que provocan situaciones de isquemia, y la consecuente fibrosis.

Con frecuencia los pacientes con EC requieren cirugía durante su evolución, existiendo varios estudios que analizan cual es la influencia de las mutaciones CARD15 en este punto, encontrando una relación entre la presencia de estos polimorfismos y la necesidad de resección quirúrgica<sup>20, 42-44</sup>, incluso como factor predictivo independientes en algunas series como la de Alvarez-Lobos y cols<sup>30</sup>, que encuentran que la posibilidad de cirugía incrementa significativamente por el hecho de tener mutado el gen CARD15 (OR 3.63), o la de Laghi y cols<sup>45</sup> en la que entre los pacientes con resección ileal el riesgo de presentar estas mutaciones es superior (OR 3,8). Sorprendentemente, pese a que nuestros pacientes con mutaciones presentan una tendencia a tener afectado íleon y a presentar patrones agresivos de comportamiento, el riesgo de cirugía es independientemente de la existencia de polimorfismos (en torno al 50% en ambos grupos), siendo el patrón estenosante y el tiempo de evolución de la enfermedad, las únicas variables independientes en el estudio multivariante. De hecho entre nuestros pacientes con patrón estenosante la probabilidad de intervención sí es francamente elevada (78%, resultados no mostrados), lo que indicaría que el riesgo de intervención se eleva una vez que existe estenosis, independientemente de la localización y de que existan o no mutaciones. Otros factores que pueden influir en una mala evolución como el tabaquismo<sup>46</sup>, la edad al diagnóstico<sup>9</sup> o el tiempo de evolución se descartan como factores de confusión al ser si-

milares entre ambos grupos. Igualmente el tratamiento administrado a ambos grupos es similar, por lo que descartamos que influyan sobre los resultados obtenidos. Además, si consideráramos que la introducción de terapia inmunosupresora es debida a una mayor gravedad de la EC, el hecho de que el porcentaje de utilización sea similar en ambos grupos indicaría una similitud entre la gravedad independientemente de la existencia de mutaciones.

Uno de los grandes problemas del tratamiento de la EC es que la cirugía no cura la enfermedad sino que el riesgo de recurrencia sin realizar profilaxis farmacológica es muy elevado<sup>47</sup>, por lo que muchos de nuestros pacientes requerirán más de una intervención a lo largo de su vida. Hay pocos datos de cómo pueden influir las mutaciones CARD15 sobre la recurrencia y reintervención en la EC, destacando un trabajo de Seiderer y cols<sup>48</sup>, que encuentran que el riesgo de reestenosis tras la intervención es superior entre los pacientes con mutaciones, especialmente cuando son homocigotas. Esto provocaría, que el riesgo de una nueva intervención fuese superior entre los pacientes con mutaciones, además de forma más precoz<sup>30</sup>. Sin embargo en nuestra serie el riesgo de recurrencia postquirúrgica no depende de la existencia de mutaciones CARD15 - incluso es superior entre los pacientes que no las presentan- y el número de intervenciones por paciente similar en ambos grupos, lo cual es concordante con los resultados referidos a la primera cirugía, puesto que el único factor fenotípico que se asocia de forma independiente a un mayor riesgo quirúrgico que encontramos es la presencia de estenosis, que hemos solucionado mediante la intervención inicial. Sólomente el tiempo de seguimiento tras la cirugía y quizá el hábito tabáquico –este sin significación estadística, pero también comunicado por otros grupos<sup>10, 49</sup>- se comportan como factores asociados a la recurrencia de la enfermedad.

En definitiva, según nuestros resultados podemos concluir que la presencia de mutaciones CARD15 tiende a asociarse con un patrón fenotípico ileal estenosante/penetrante, aunque no es un factor predictivo independiente sobre el riesgo de cirugía, que sólo está condicionado por la existencia de estenosis y el tiempo de evolución de la enfermedad. Tampoco se asocian las mutaciones CARD15 a mayor recurrencia o reintervención posterior. Quizá en el futuro un mejor conocimiento de la genética de la EC nos permitirá predecir la evolución de la misma, lo que nos servirá para adecuar el tratamiento de forma individual en cada paciente en función del pronóstico.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Baumgart D, Carding S. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007;369:1627-40.
2. Louis E, Collard A, Oger AF, Degroote E, Aboul Nasr El Yafi FA, et al. Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut* 2001;49:777-82.
3. Chow DK, Leong RW, Lai LH, Wong GL, Leung WK, Chan FK, et al. Changes in Crohn's disease phenotype over time in the Chi-

- nese population: validation of the Montreal classification system. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:536-41.
4. Bernell O, Lapidus A, Hellers G. Risk factors for surgery and postoperative recurrence in Crohn's disease. *Ann Surg* 2000;231:38-45.
  5. Cosnes J, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Afchain P, Tiret E, Gendre JP. Impact of the increasing use of immunosuppressants in Crohn's disease on the need for intestinal surgery. *Gut* 2005;54:237-41.
  6. D'Haens G, Baert F, Van Assche G, Caenepeel P, Vergauwe P, Tuynman H, et al. Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. *Lancet* 2008;371:660-7.
  7. Farmer RG, Whelan G, Fazio VW. Long-term follow-up of patients with Crohn's disease: relationship between the clinical pattern and prognosis. *Gastroenterology* 1985;88:1818-25.
  8. Basilisco G, Campanini M, Cesana B, Ranzi T, Bianchi P. Risk factors for first operation in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1989;84:749-52.
  9. Oostenbrug LE, van Dullemen HM, te Meerman GJ, Jansen PL, Kleibeuker JH. Clinical outcome of Crohn's disease according to the Vienna classification: disease location is a useful predictor of disease course. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006;18:255-61.
  10. Romberg-Camps MJ, Dagnelie PC, Kester AD, Hesselink-van de Kruijs MA, Cilissen M, Engels LG, et al. Influence of phenotype at diagnosis and of other potential prognostic factors on the course of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2009;104:371-83
  11. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet.* 2008;40:955-62.
  12. 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; 31:603-6
  13. 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.
  14. Peña AS. El significado de las mutaciones de CARD15 en la enfermedad de Crohn. La contribución española. *Rev Esp Enferm Dig* 2007;99:563-9.
  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. 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.
  17. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:867-74.
  18. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, et al. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*,2002;123:679-88.
  19. Protic MB, Pavlovic ST, Bojic DZ, Krstic MN, Radojicic ZA, Tarabar DK, et al. CARD15 gene polymorphisms in Serbian patients with Crohn's disease: genotype-phenotype analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2008;20:978-84.
  20. Crawford NP, Colliver DW, Eichenberger MR, Funke AA, Kolodko V, Cobbs GA, et al. CARD15 genotype-phenotype relationships in a small inflammatory bowel disease population with severe disease affection status. *Dig Dis Sci.* 2007;52:2716-24.
  21. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Solberg C, Croucher PJ, Mascheretti S, et al. Association of NOD2 (CARD15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet* 2002;359:1661-5.
  22. Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, 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.
  23. Renda MC, Orlando A, Civitavecchia G, Criscuoli V, Maggio A, Mocchiari F, 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.
  24. 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.
  25. Stange EF, Travis SPL, Vermeire S, Beglinger C, Kupcinkas L, Geboes K, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease : definitions and diagnosis. *Gut* 2006;55:1-15.
  26. Silverberg M, Satsangi J, Ahmad T, Arnott I, Bernstein Ch, Brandt SR, et al. Toward and integrated clinical, molecular, and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a working party of the Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005; 19 (Suppl A): 5A-36A.
  27. Rüegg C, Hersberger M, Wusk B, Rentsch K, Kullak-Ublick GA, von Eckardstein A, et al. Detection of the Arg702Trp, Gly908Arg and Leu1007fsC polymorphisms of the NOD2/CARD15 gene by real-time PCR with melting curve analysis. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:494-498.
  28. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
  29. De Diego C, Alcántara M, Valle J, Pérez-Gruoso MJ, Muñoz-Rosas C, Carroles 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.
  30. Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M, Tassies D, Piu J, Reverter JC, Pique JM, et al. Combined type-1 plasminogen activator inhibitor and NOD2/CARD15 genotyping predicts complicated Crohn's disease behaviour. *Alim Pharmacol Ther* 2007;25: 429-40.
  31. Mendoza JL, Murillo LS, Fernández L, Peña AS, Lana R, Urcelay E, et al. Prevalence of mutations of the NOD2/CARD15 gene and relation to phenotype in Spanish patients with Crohn's disease. *Scan J Gastroenterol* 2003;38:1235-40.
  32. Núñez C, Barreiro M, Domínguez-Muñoz JE, Lorenzo A, Zapata C, Peña AS. CARD15 mutations in patients with Crohn's disease in a homogeneous Spanish population. *Am J Gastroenterol* 2004;99:450-6.
  33. Heresbach D, Gicquel-Douabin V, Birebent B, D'halluin PN, Heresbach-Le Berre N, Dreano S, Siproudhis L, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms in Crohn's disease:a genotype-phenotype analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:55-62.
  34. Bianchi V, Maconi G, Ardizzone S, Colombo E, Ferrara E, Russo A, et al. Association of NOD2/CARD15 mutations on Crohn's disease phenotype in an Italian population. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2007;19:217-23.
  35. Hradsky O, Lenicek M, Dusatkova P, Bronsky J, Nevala J, Valtro-

- va V, 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.
36. Thjodleifsson B, Sigthorsson G, Cariglia N, Reynisdottir I, Gudbjartsson DF, Kristjansson K, et al. Subclinical intestinal inflammation: an inherited abnormality in Crohn's disease relatives? *Gastroenterology* 2003; 124: 1728– 1737.
  37. Medici V, Mascheretti S, Croucher PJ, Stoll M, Hampe J, Grebe J, et al. Extreme heterogeneity in CARD15 and DLG5 Crohn disease-associated polymorphisms between German and Norwegian populations. *Eur J Hum Genet*. 2006;14:459-68.
  38. Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Kazumori T, Nakamura Y. Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. *J Hum Genet* 2002; 47: 469– 472.
  39. Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, Sung JJ. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 1465– 1470.
  40. Rodrigo L, Martínez-Borra J, Garrote JA, Niño P, León AJ, Riestra S, et al. Las mutaciones del gen CARD15 presentan escasa relación con los fenotipos de la enfermedad de Crohn en Asturias. *Rev Esp Enferm Dig* 2007;99:570-5.
  41. Ogura Y, Lala S, Xin W, Smith E, Dowds TA, Chen FF, et al. Expression of NOD2 in Paneth cells: a posible link to Crohn's ileitis. *Gut* 2003;52:1591-7.
  42. Barreiro M, Núñez C, Domínguez-Muñoz 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.
  43. Cukovic-Cavka S, Vermeire S, Hrstic I, Claessens G, Kolacek S, Jakic-Razumovic J, et al. NOD2/CARD15 mutations in Croatian patients with Crohn's disease: prevalence and genotype-phenotype relationship. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006;18:895-9.
  44. 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.
  45. Laghi L, Costa S, Saibeni S, Bianchi P, Omodei P, Carrara A, 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.
  46. Lakatos PL, Szamosi T, Lakatos L. Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? *World J Gastroenterol* 2007;13:6134-9.
  47. Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Kerremans R, Coene-grachts JL, Coremans G. Natural history of recurrent Crohn's disease at the ileocolonic anastomosis after curative surgery. *Gut* 1984;25:665-72.
  48. 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.
  49. Reese GE, Nanidis T, Borysiewicz C, Yamamoto T, Orchard T, Tekkis PP. The effect of smoking after surgery for Crohn's disease: a meta-analysis of observational studies. *Int J Colorectal Dis*. 2008;23:1213-21.

Correspondencia:

E. Leo-Carnerero ([eleoc@telefonica.net](mailto:eleoc@telefonica.net))  
 Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitario Virgen del Rocío.  
 Avda Manuel Siurot s/n. 41013 Sevilla.