



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Malaltia de Crohn: estudi del polimorfisme rs2066844 en una mostra de població mallorquina.

Vanessa Torrens Juaneda

Grau de Biologia

Any acadèmic 2014-15

DNI de l'alumne: 41745787M

Treball tutelat per José Aurelio Castro Ocón
Departament de Genètica

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació.

Paraules clau del treball: Enfermedad de Crohn, NOD2, rs2066844.

Índice

1. Introducción.....	4
1.1. Enfermedad Inflamatoria Intestinal.....	4
1.1.1. Epidemiología.....	4
1.2. Enfermedad de Crohn.....	4
1.2.1. Patología.....	4
1.2.2. Etiología.....	5
1.2.3. Clasificación.....	6
1.2.4. Factores Inmunológicos, Ambientales y Genéticos.....	6
1.3. NOD2.....	9
1.3.1. rs2066844.....	11
2. Objetivos.....	12
3. Material y Métodos.....	12
4. Resultados.....	16
5. Discusión.....	22
6. Conclusiones.....	24
7. Referencias Bibliográficas.....	25

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad Inflamatoria Intestinal (IBD)

El término Enfermedad Inflamatoria Intestinal (Intestinal Bowel Disease, IBD) engloba distintas patologías del tracto digestivo: Enfermedad de Crohn (EC), Colitis Ulcerosa (CU) y Colitis Indeterminada (CI). Estas patologías inflamatorias crónicas afectan a distintas zonas del tracto digestivo. La CU se puede definir como una inflamación ulcerativa de las mucosas recto-colónicas; la EC puede afectar a cualquier zona del tubo digestivo. Solo en caso de que la región afectada se concentre en el colon se habla de CI. Estas enfermedades se presentan en forma de brotes de actividad, en los que la inflamación y los síntomas se agudizan. Estos brotes son imprevisibles y van seguidos de períodos de remisión de duración indeterminada (Oliver, 2008; Pous, 2014).

Pueden presentarse a cualquier edad, aunque normalmente aparece entre los 20-40 años. En general no hay diferencia entre sexos, pero en cuanto se estudian las estadísticas por separado, se observa una mayor incidencia de la Enfermedad de Crohn en mujeres, mientras que la Colitis Ulcerosa no presenta variación. Estos resultados varían según la región geográfica y la etnia (Brant y Nguyen, 2008; García *et al*, 2014). La causa de estas enfermedades no está definida, si bien se ha sugerido un factor inmunológico y genético, además de factores ambientales.

1.1.1 Epidemiología

En los últimos años se ha producido un aumento de los casos en España, dependiendo de la región. La incidencia de la Colitis Ulcerosa varía entre 0'6 y 6 casos/100.000 habitantes / año, con una media de 3'8. Mientras que en la Enfermedad de Crohn, las cifras oscilan entre 0'4 y 5'5 casos /100.000 habitantes / año, cuya media es de 1'9.

En conjunto, la incidencia de la Enfermedad inflamatoria Intestinal es de 87-110 casos/100.000 habitantes /año (Pajares y Gisbert, 2001; Sicilia *et al*, 2009; Keller *et al*, 2015).

1.2. Enfermedad de Crohn

Es una enfermedad inflamatoria del tracto digestivo, está clasificada como enfermedad genética común compleja.

1.2.1. Patología

La enfermedad de Crohn se caracteriza por el desarrollo de una inflamación crónica que afecta a todo el tracto digestivo, preferentemente íleon terminal, colon y región perianal. Esta inflamación ocurre como respuesta a una mala regulación de la respuesta inmune innata, frente a los patógenos de la flora intestinal, al incremento de la permeabilidad a través de la barrera intestinal y a un defecto en el sistema inmune adaptativo (Goyette *et al*, 2007; Norouzinia y Naderi, 2015). Las regiones dañadas forman parches. Las lesiones presentan granulomas no caseificantes en la submucosa, úlceras y fisuras (Sepúlveda *et al*, 2008).

1.2.2. Etiología

Estudios recientes indican que en algunas enfermedades que implican una inflamación del intestino, el aumento de permeabilidad de la membrana está presente antes de desarrollar la enfermedad (Wolters *et al*, 2011). Aun así, no hay una causa exacta que implique el desarrollo de la Enfermedad de Crohn.

Se cree que una pérdida de homeostasis intestinal daría lugar a la Enfermedad de Crohn. Esta pérdida resulta de un cambio en la tolerancia frente a la flora intestinal. Sin embargo, la implicación de las bacterias no explica todo el contexto de la enfermedad. Así bien, se han estudiado diversos defectos del sistema inmunológico que podrían ser los causantes de esta pérdida de la homeostasis. Estos fallos se pueden agrupar de la siguiente forma:

Defectos en la permeabilidad de la barrera epitelial intestinal

Una alteración de la permeabilidad intestinal causaría una exposición del sistema inmune a los antígenos, provocando la secreción de citoquinas inflamatorias. Este aumento de la permeabilidad puede ser debido a mutaciones en genes relacionadas con la integridad de la barrera intestinal como podrían ser DLG5 y MYO9B. También pueden estar involucrados genes de transportadores como MDR/ABCB (multidrug resistant protein/ATP-binding cassette), OCTN1 y OCTN2 (organic cations transporters) (Goyette *et al*, 2007; Yamamoto, 2010). Estos transportadores se ocupan del transporte de moléculas a través de membranas intra- y extracelulares.

Además, varios estudios han demostrado que la mucosa de los enfermos de la EC presenta un aumento de la permeabilidad y una alteración en la producción de mucus.

Defectos del sistema inmune innato

La no distinción entre organismos patógenos y comensales influye en la EC. La diferenciación de los dos tipos de organismos se da mediante receptores de reconocimiento de patrón. Hay dos tipos de receptores involucrados.

Por una parte, los receptores tipo Toll: los receptores TLR3 y TLR4 presentan una distribución distinta en enfermos de Crohn. El receptor TLR3 presenta una expresión disminuida, mientras que la de TLR4 aumenta (Cario *et al*, 2000).

Por otra parte, los receptores tipo NOD: la proteína más implicada en la EC ha sido la NOD2 (“nucleotide-binding oligomerization domain”), que reconoce al muramil dipéptido de la pared bacteriana. La NOD2 es secretada por monocitos, macrófagos, células T y B, células dendríticas, células de Paneth y células epiteliales intestinales. Se han hallado tres mutaciones en el receptor de esta proteína. Así, el gen NOD2, que se encuentra en el cromosoma 16, se ha convertido en el principal factor de susceptibilidad (Hugot *et al*, 2001; Ogura *et al*, 2001).

Defectos del sistema inmune adaptativo

En los enfermos de Crohn, el reconocimiento y el desarrollo de la respuesta inmune a un antígeno se ve alterada, de forma que se induce una respuesta inmunológica proinflamatoria. Este fallo puede deberse a un defecto de los receptores Toll de las células presentadoras, que provoca una respuesta exagerada o disfuncional.

Así mismo, varios estudios con enfermos de Crohn y Colitis apuntan a que existe un defecto en la generación de las células T reguladoras *in vivo* (Kraus *et al*, 2004). En los enfermos de EC predominan las células T efectoras sobre las reguladoras. Los linfocitos T *naive* se diferencian preferentemente en células Th1 (“T helper 1”), que secretan citoquinas inflamatorias, produciendo de esta forma la inflamación.

Las mutaciones que podrían originar lo anteriormente descrito se darían en genes relacionados en el sistema inmune adaptativo, como en el gen del HLA (human leukocyte antigen) y el TNF- α (tumoral necrosis factor α), dentro de los genes MHC (major histocompatibility complex), así como en las subunidades o los receptores de citoquinas como IL-12 y IL-23 (Goyette *et al*, 2007).

1.2.3. Clasificación

Enfermedad de Crohn		
Edad al diagnóstico		
A1	16 años o menos	
A2	17-40 años	
A3	Más de 40 años	
Localización		
	Modificador	
	Tracto GI superior	
L1	Ileon terminal	L1+L4 Ileon terminal+GI superior
L2	Colon	L2+L4 Colon+GI superior
L3	Ileocolon	L3+L4 Ileocolon+GI superior
L4	Tracto GI superior	
Conducta		
	Modificador	
	E. perianal	
B1	No estenosante, no penetrante	B1p No estenosante, no penetrante + perianal
B2	Estenosante	B2p Estenosante + perianal
B3	Penetrante	B3p Penetrante + perianal
<i>B1: diagnóstico provisional. En los estudios se da un plazo variable hasta considerarlo definitivo (se sugieren 5-10 años).</i>		

Tabla 1. En esta tabla se observa la clasificación de la Enfermedad de Crohn teniendo en cuenta la edad de diagnóstico, la localización y la conducta (Medina *et al*, 2010).

1.2.4. Factores influyentes

Estas enfermedades están influidas por diversos factores: inmunológico, ambiental y genético. Los factores ambientales inciden sobre individuos con predisposición genética para efectuar una respuesta inmune desproporcionada, cuya reacción desencadena la enfermedad (Díez *et al*, 2007; García *et al*, 2014).

Factor ambiental

A nivel mundial, la mayor incidencia la encontramos en Norte América y Europa, mientras que la menor en Sur América, África y Asia (Loftus *et al*, 2004). Además, se ha visto que la enfermedad prevalece en zonas urbanas si lo comparamos con las estadísticas de las zonas rurales. Parece que el desarrollo económico de los países está asociado con un aumento en el riesgo de padecer Enfermedad Inflamatoria Intestinal (Norouzinia y Naderi, 2015). Debido a esto, se puede afirmar que los factores ambientales juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Algunos de los más importantes son la dieta, la higiene, el estrés y el tabaco (Cho, 2008).

Estudios relacionados con el consumo de hidratos de carbono y ácidos grasos poli-insaturados han revelado que no son factores importantes en el desarrollo de la enfermedad. Por otra parte, otros estudios sugieren que la leche materna confiere protección frente a la enfermedad inflamatoria intestinal (Riordan *et al*, 1998; Geerling *et al*, 2000; Weylandt *et al*, 2005).

En cuanto a la higiene, se sugiere que al mejorarla, nuestro sistema inmunológico se ve menos expuesto a antígenos y ello conlleva un mal desarrollo. Dicha afirmación es aceptada pero es solo una teoría pendiente de comprobación. (Hampe *et al*, 2003; Gent *et al*, 1994; McCormick *et al*, 2001; Ananthakrishnan, 2015).

El estrés, aunque no se sabe muy bien cómo influye, si se ha visto que está relacionado con el sistema inmune y el sistema nervioso. (Mawdsley *et al*, 2005; Ananthakrishnan, 2015).

El tabaco, el factor más estudiado, es un factor de riesgo para padecer la Enfermedad de Crohn (Ananthakrishnan, 2015).

Factor inmunológico

Los factores inmunológicos se concentran en tres tipos distintos de células del intestino.

En primer lugar, las células de Paneth, que se encuentran en el fondo de las criptas de Lieberkühn, son las encargadas de secretar lisozimas, α y β defensinas y fosfolipasa A2 secretora (Hecht *et al*, 1999). El conjunto de éstas confiere protección a las células troncales localizadas en las criptas, contra agentes patógenos y ayudan a controlar el tamaño poblacional y la diversidad de las bacterias comensales (Cunliffe *et al*, 2004). También identifican metabolitos de bacterias Gram-Positivas mediante el receptor intracelular NOD2/CARD5 (Inohara *et al*, 2005). Una de las posibles causas de la EC es un fallo en la secreción de α -defensinas 5 y 6 (Wehkamp *et al*, 2004), aumentando la colonización intestinal por bacterias patógenas. Esto provocaría una activación constante y alterada del sistema inmune.

En segundo lugar, las células M (Microfold), que recubren las placas de Peyer, tienen un papel importante en el reconocimiento de microorganismos patógenos lumbinales. Éstas reconocen patrones moleculares de las bacterias a través de receptores apicales como TLR4, factor activador de plaquetas e integrina $\alpha 5\beta 1$. Estos ligandos se translocan hacia la lámina propia, donde toman contacto con los receptores TLRs de las Células Dendríticas (Sanders *et al*, 2005). Un fallo en estos receptores podría inducir EC.

Por último, las Células Dendríticas, que se encuentran en los tejidos linfoides asociados a mucosa (MALTs), como pueden ser las placas de Peyer, la lámina propia o ganglios mesentéricos (Iwasaki *et al*, 1999); pero que son capaces de formar uniones con las células epiteliales parecidas a las *tight junctions* y proyectan sus dendritas a través del epitelio (Sánchez Barceló, 2013). Las CD procesan los antígenos y los presentan a linfocitos T, esto puede desencadenar dos tipos de respuesta, respuesta inmune celular (Th1) o respuesta inmune humoral (Th2), dependiendo del patógeno. Las CDs pueden activar una respuesta de tipo Th2 antiinflamatoria. En el desarrollo de estas CDs no inflamatorias participan las células del epitelio, secretando factores tisulares como la linfopoyetina tímica estromal (TSLP). Aunque la producción de TSLP no previene la secreción de IL-12 (citoquina proinflamatoria), sí induce a una respuesta Th2 antiinflamatoria (Watanabe *et al*, 2005). Además, se ha observado una deficiencia en la expresión de TSLP en pacientes de EC (Rimoldi *et al*, 2005). Esto lleva a pensar que la TSLP tiene un papel importante en la tolerancia intestinal.

Factores genéticos

La enfermedad de Crohn está clasificada como enfermedad genética común compleja. Cuando un desorden complejo depende de distintos genes, un gen en particular no tiene un gran efecto (D'Addabbo *et al*, 2009). De esta forma, los factores genéticos solo pueden explicar una pequeña proporción de la herencia y de la susceptibilidad a la enfermedad (Van Limbergen *et al*, 2008).

En gemelos monoigóticos, las tasas de concordancia en la EC se encuentra entre el 20-50% (Norouzinia y Naderi, 2015), y en dizigóticos, 4-12%. Mientras que en hermanos la tasa es de 13-36%. En casos familiares, se ha observado que la edad de diagnóstico y el fenotipo de la enfermedad son heredables (Goyette *et al*, 2007). Cabe destacar que entre el 5-20% de los enfermos presentan una historia familiar con IBD.

Esta diferencia en las tasas de concordancia demuestra que los factores genéticos contribuyen en la EC, pero al no darse una concordancia al 100% en gemelos monoigóticos, cabe esperar una influencia por otros factores ambientales.

1.3. Nucleotide-binding oligomerization domain 2 o NOD2

Este gen, también conocido como CD, ACUG, BLAU, IBD1, NLRC2, NOD2B, CARD15, CLR16.3 y PSORAS1, pertenece a la familia de NLR (*NOD like receptor*). Se encuentra localizado en el cromosoma 16q21. La familia de receptores NLR está relacionada con la respuesta inmune frente a lipopolisacáridos intracelulares (LPD) y al MDP (*Muramyl dipeptide*), compuesto derivado del peptidogluano, componente de la pared bacteriana tanto de Gram-positivos, como de Gram-negativos, y activa la proteína NFκB (Strober *et al*, 2014).

Además de las funciones descritas anteriormente, NOD2 también interviene en la producción de criptidinas intestinales (α -defensinas). Éstas son secretadas principalmente por las células de Paneth. (Strober *et al*, 2014)

La proteína para la que codifica presenta dos dominios de unión a caspasas (CARDs) en el extremo N-terminal y seis repeticiones ricas en leucina (LRRs) localizadas en el extremo C-terminal. Además, presenta un dominio NACHT (*NAIP, CIITA, HET-E and TP1-containing domain*).



Figura 1: Representación de los dominios de NOD2. (Adaptado de Boyle *et al*, 2014)

NOD2 se expresa tanto en células presentadoras de antígenos (macrófagos y células dendríticas), donde cumple su función inmunitaria frente MDP y LPD, como en células epiteliales intestinales, donde su activación es necesaria para la síntesis de criptidinas. (Strober *et al*, 2014)

Interacción con otras proteínas

Actualmente no se comprende la complejidad con la que se relacionan todas las moléculas de una célula y tampoco como se ven influenciadas unas por otras. En este caso, ésto se intenta explicar en la Figura 2.

Sin presencia de su ligando, NOD2 se encuentra inactivado, en una conformación autoinhibitoria mediante la acción de chaperonas, como Hsp70 y Hsp90. Además, también se ha observado que SGT1 representa un papel importante, aunque no está muy claro cuál. El ligando de NOD2 es MDP. Se sabe que éste es reconocido por las regiones LRRs, aunque recientemente también se ha sugerido que el dominio NACHT puede tener cierta importancia (Grimes *et al*, 2012; Mo *et al*, 2012; Boyle *et al*, 2014). Seguidamente, NOD2 es activado por interacciones en los enlaces, o bien entre los dominios LRRs y NACHT o entre NOD2 y otras proteínas como las chaperonas. La activación de NOD2 es aún difusa. Debido a la activación de NOD2, se requiere retirar la bacteria en cuestión, para eso se necesita p38, una MAPK. (Homer *et al*, 2012).

Una de las interacciones más estudiadas es NOD2-RIP2. Aún así, quedan muchas preguntas por resolver. Lo que sí se sabe es que RIP2 se une a CARDa de NOD2 y esto activa la vía de NFκB y de las MAPK (Figura 2) (Park *et al*, 2007). Por otro lado, CARDa también se une a ATG16L1 (Autophagy-related protein 16-1). De esta forma está relacionado con la autofagia, aunque esta relación aún se encuentra en las primeras fases de investigación. Algunos de los SNP en esta interacción son fundamentales para entender la EC (Travassos *et al*, 2010).

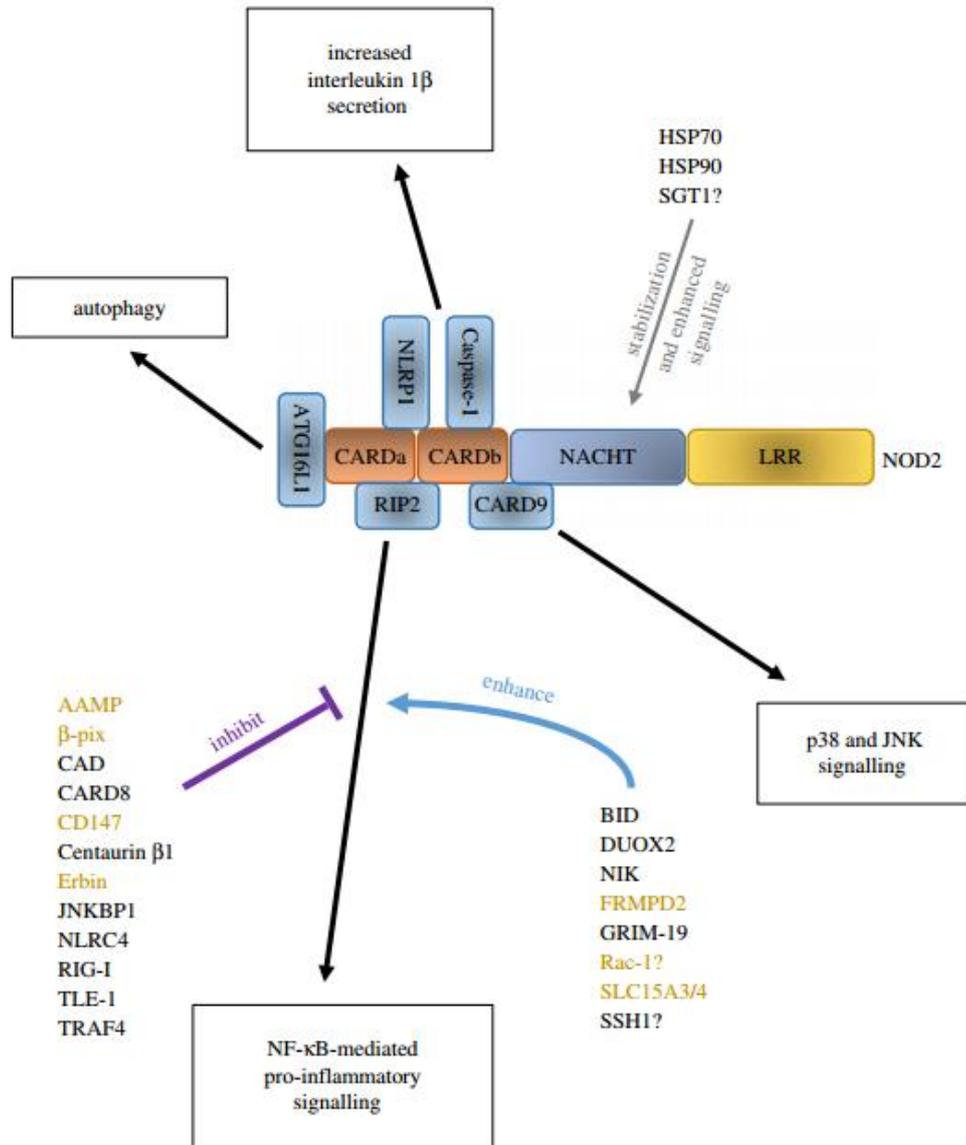


Figura 2: Esquema de las interacciones conocidas de NOD2 con otras moléculas de la célula. En los recuadros negros se encuentran las funciones clave que tiene NOD2. Las proteínas que influyen directamente en estas funciones se encuentran situadas en una localización relevante. El impacto de proteínas en NOD2, está resaltado con una flecha. Las proteínas que ejercen su influencia e interactúan con NOD2 en la membrana están escritas en color beige. Cuando el papel de las proteínas no está claro, se indica con un interrogante y la proteína se sitúa en el sitio más probable de actuación (según Boyle *et al*, 2014).

NOD2 y Enfermedad de Crohn

Aunque NOD2 interacciona con muchas moléculas distintas, hay algunas que tienen más importancia en el contexto de la EC. Las moléculas como NLRP1 y NLRP3 aumentan la secreción de interleucina-1 β , dando una respuesta pro-inflamatoria. Otras moléculas como CARD8 y TLE1 inhiben la señalización de NF κ B. Por otra parte, CARD9 aumenta la señalización de p38. También está ATG16L1, relacionada con la autofagia (Hsu *et al*, 2007; Zhemakova *et al*, 2008).

En los últimos años, se han incrementado los estudios y las investigaciones en este campo, concretamente relacionado con este gen. Esto es debido a su implicación con el Síndrome de Blau y la Enfermedad de Crohn (La Torre *et al*, 2014).

En el caso de la EC, las mutaciones que presenta NOD2 son de tipo SNP (*Single nucleotide polymorphism*). Los SNP más relacionados con EC se localizan en las regiones LRRs.

Los estudios más recientes intentan explicar la relación entre como los SNP y la disfuncionalidad resultante incrementan la susceptibilidad. Para ello hay dos teorías. Por un lado, la primera teoría se centra en la función defensiva del NOD2, es decir, en la producción de α -defensinas. Esta teoría se basa en que los enfermos de EC presentan una inflamación más aguda en el íleon terminal, donde la densidad de células de Paneth es mayor. Por tanto, un fallo en NOD2 podría causar la no producción de α -defensinas. Por otro lado, la segunda explicación es que NOD2 se vuelve mucho más sensible y, por tanto, las reacciones que desencadena son desproporcionadas (Strober *et al*, 2014). Los SNP de NOD2 más relacionados con la EC son rs2066844, G908R y 1007fs.

Se escogió el polimorfismo rs2066844 para este estudio ya que en distintos estudios se ha visto que se encuentra relacionado con la Enfermedad de Crohn (Glas *et al*, 2010; Jung *et al*, 2012).

1.3.1. Rs2066844

SNP es una variación de un único nucleótido en una secuencia de DNA. Esta variación ocurre cuando un nucleótido (A, G, C o T) difiere entre individuos o entre cromosomas homólogos de un mismo individuo (Cho, 2008). En este caso la diferencia recae en una Citosina o una Timina.

Los SNP (*single nucleotide polymorphism*) son las variaciones genéticas más corrientes, con un número estimado de 10 millones de SNP en el genoma humano. Se ha visto que la variación genética en humanos se da por un patrón de alelos con SNP muy relacionados, que definen los haplotipos (Goyette *et al*, 2007).

En este caso, el SNP estudiado es rs2066844 (C/T). Siendo con C el “wild type” y con T la variante. Se localiza en la región LRRs.

CCAGACATCTGAGAAGGCCCTGCTC[C/T]GGCGCCAGGCCTGTGCCCGCTGGT

La variación de estos nucleótidos resulta en un cambio de Arginina a Triptófano en la posición 720 de la proteína.

2. OBJETIVOS

1. El objetivo principal de este trabajo ha sido la detección de un polimorfismo implicado en la Enfermedad de Crohn, concretamente el SNP *rs2066844* del gen NOD2, tanto en una muestra control como en una muestra de pacientes.
2. Comprobar si las muestras están en equilibrio de Hardy-Weinberg.
3. Comparar la prevalencia del polimorfismo en la muestra control y en los pacientes, así como con otras poblaciones.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo

Las muestras de este trabajo se han obtenido de individuos sanos y de individuos enfermos diagnosticados para la EC de forma voluntaria. Algunos de los individuos sanos presentaban alguna enfermedad autoinmune.

Junto a la muestra se recogieron datos personales, clínicos y ambientales y un consentimiento informado firmado. Todos estos datos se han utilizado de forma anónima.

La extracción se hizo a partir de una muestra de epitelio bucal obtenida mediante un hisopo. Se frotó el hisopo durante 30 segundos por la cara interior de las mejillas y por las encías. Cada muestra se tomó por triplicado.

En total se ha hecho un estudio de 64 controles y 16 pacientes. Con el fin de que la muestra fuese lo más representativa posible, en los controles, se utilizaron 36 muestras ya disponibles en el laboratorio de genética y 28 controles nuevos que se añadieron a los anteriores. Los 16 pacientes se genotiparon en el presente estudio.

Extracción de DNA

Se realizó una extracción con fenol cloroformo de DNA. Se preparó para cada hisopo un tubo Eppendorf con 500µl de tampón DLB, 50µL de SDS al 10% y 5µL de Proteinasa K (20 mg/ml). Seguidamente, las muestras se incubaron a 56°C durante 3 horas con agitación suave. Se les dió un golpe de centrifuga y se añadieron 20µl de NaCl 5M, 250µl fenol y 250µl de cloroformo:isoamílico (24:1) y se agitó por inversión. Se centrifugaron las muestras, por segunda vez, durante 10 minutos a 15000 rpm y se pasó la fase acuosa (fase superior) a otro tubo. Se rescató el sobrenadante y se le añadieron 100µl de DLB para recuperar el volumen perdido.

A continuación se añadieron 500µl de cloroformo:isoamílico (24:1), se agitó y se centrifugó durante 10 minutos a 15000 rpm. De nuevo, se pasó la fase superior a un nuevo tubo, al que se le añadió 1 ml de etanol absoluto frío y se guardaron las muestras a -20°C durante toda la noche.

Al día siguiente se centrifugaron las muestras durante 30 minutos a 15000, se eliminó el sobrenadante por decantación. Finalmente, se secaron mediante bomba de vacío durante unos 30 minutos y el pellet obtenido se resuspendió en 20µl de TE.

Análisis de los Polimorfismos

Para detectar la variante del SNP *rs2066844*, se procedió a amplificar un fragmento de 100pb del gen NOD2, dónde se encontraba el polimorfismo. Posteriormente, se realizó una digestión con la enzima de restricción MspI (reconoce la secuencia GGCC), dando como resultado dos bandas de 54 pb y 46 pb en caso de que sea un individuo homocigoto sin la variante, una sola banda de 100pb en caso de que sea homocigoto para la variante y tres bandas de 100pb, 54pb y 46pb en caso de que sea heterocigoto (Arnott *et al*, 2004).

Para la reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) se usaron los reactivos de Biotools®:

10X Reaction Buffer	
Tris HCl	750 mM
KCl	500 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	200 mM
MgCl ₂	20 mM

TAQ Polimerase	
	1u/µl

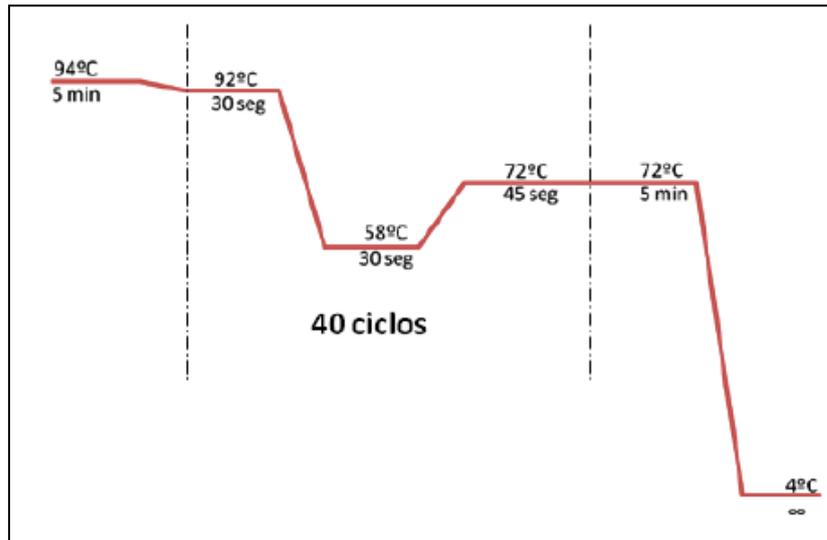
Para cada PCR se añadió:

PCR	
Buffer (x10)	2 µl
dNTPs	0,5 µl
TAQ	1 µl
Primers (20ng/µL)	0,6 + 0,6 µl
DNA (50ng/µL)	1 µl
H ₂ O	14,3 µl
Volumen total	20 µl

Los primers utilizados fueron:

Primer	Secuencia
R720W-F	5'- CTG GCT GAG TGC CAG ACA TC - 3'
R720W-R	5'- GGA TGG AGT GGA AGT GCT TG- 3'

El programa utilizado fue el siguiente:



El producto de PCR se digirió siguiendo estas directrices:

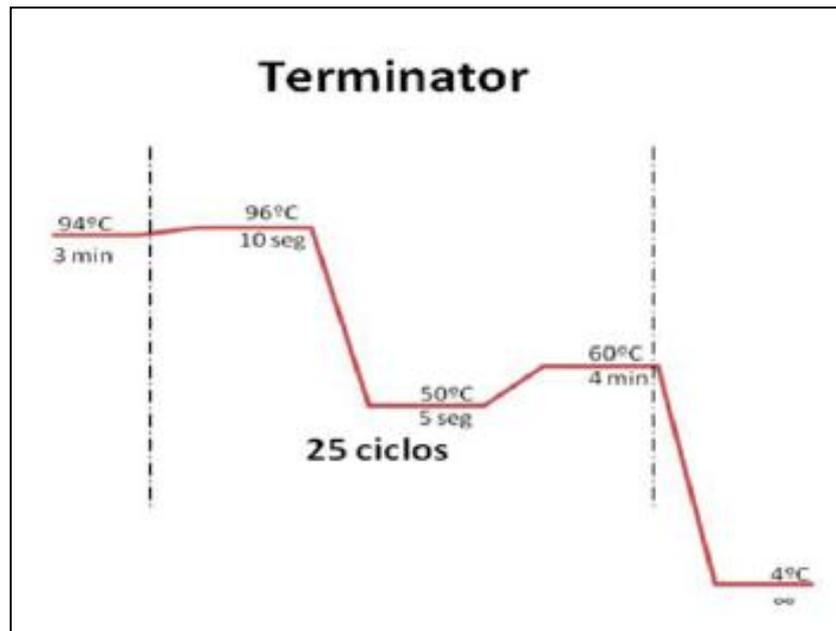
A 10 μ l de producto de PCR se le añade 1 μ l de la enzima de restricción MspI y se incuba a 37°C durante 1 hora. El resultado de la digestión se corrió en geles de agarosa al 3%, con bromuro de etidio. El marcador de peso molecular usado fue Invitrogen Lader 10bp.

Además, para confirmar dichos resultados, se secuenciaron el 10% de las muestras. Para ello se siguieron las siguientes indicaciones:

El producto de la PCR, de 100pb, fue purificado con MSB Spin PCRapace Kit de Invitex®, ateniendonos a las indicaciones del fabricante. Posteriormente, se prosiguió con la reacción de Terminator mediante los reactivos BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit. Para cada muestra se añadió:

Reactivo	Volumen
Buffer	1,2 μ l
Primer	1 μ l
Big Dye Terminator	0,6 μ l
H ₂ O	6,2 μ l
Muestra	1 μ l

Se uso el programa siguiente:



A continuación a 10µl de producto de PCR se incorporaron 50µl de Etanol absoluto frio y 2 µl de Acetato sódico (NaAc) para precipitar las muestras. Se dejaron en el congelador durante 30 minutos y seguidamente se centrifugaron durante 30 minutos a velocidad (rpm) máxima. Se prosiguió retirando el sobrenadante y se añadieron 100 µl de Etanol 70%. Se volvió a centrifugar a máxima velocidad (rpm) durante 10 minutos. Se retiró de nuevo el sobrenadante y las muestras se secaron en la bomba de vacío.

Antes de secuenciar, las muestras se resuspendieron en 20 µl de agua.

Se secuenciaron las F y R del 10% de las muestras. El secuenciador utilizado fue Automated ABI 3130 sequencer (Applied Biosystems®).

4. RESULTADOS

En las siguientes tablas están resumidos los datos relevantes de cada individuo, tanto controles como enfermos.

Muestra	Sexo	Año de Nacimiento	Enfermedades Autoinmunes o Antiinflamatorias	Antecedentes Familiares Crohn	Tabaquismo
C-001	M	1975	No	No	Si
C-002	M	1971	No	No	No
C-003	M	1975	No	No	No
C-004	H	1975	No	No	No
C-005	M	1978	Dermatitis por Contacto	No	Ex
C-006	M	1969	No	No	No
C-007	H	1969	No	No	No
C-008	H	1975	No	No	No
C-009	M	1979	Hipotiroidismo autoinmune	No	Si
C-010	M	1972	No	No	Ex
C-011	M	1985	No	No	Ex
C-012	H	1977	No	No	Si
C-013	H	1985	No	No	Si
C-014	M	1974	No	No	No
C-017	M	1976	No	Si	No
C-018	M	1950	No	Si	No
C-019	M	1966	No	No	No
C-020	H	1959	No	No	Ex
C-021	M	1987	No	No	Si
C-022	M	1986	No	No	Si
C-023	M	1990	Psoriasis	No	No
C-024	M	1978	No	No	Si
C-025	M	1980	Alergias alimentarias	No	No
C-027	M	1977	No	No	No
C-028	H	1977	No	No	Ex
C-029	H	1949	No	No	No
C-030	H	1963	No	No	No
C-031	M	1975	Hipotiroidismo autoinmune	No	No
C-032	H	1949	No	No	No
C-033	H	1948	No	No	Ex
C-035	M	1963	No	No	Si
C-036	M	1973	No	No	No
C-037	H	1948	No	No	No
C-038	M	1968	No	No	No
C-039	M	1966	No	No	No
C-040	H	1983	No	No	Si

Tabla 2a. Datos relevantes de cada individuo control participante.

Muestra	Sexo	Año de Nacimiento	Enfermedades Autoinmunes o Antiinflamatorias	Antecedentes Familiares Crohn	Tabaquismo
C-041	M	1958	No	No	No
C-042	M	1991	No	No	No
C-043	H	1988	No	No	No
C-044	H	1956	Psoriasis	No	No
C-045	H	1992	No	No	No
C-046	H	1990	No	No	No
C-047	H	1992	No	No	No
C-048	M	1996	No	No	No
C-049	H	1991	No	No	No
C-050	M	1960	Hipotiroidismo	No	No
C-051	M	1959	No	No	No
C-061	M	1995	Celiaquia	No	No
C-062	M	1993	VIH	No	No
C-063	H	1992	No	No	Ex
C-064	H	1991	Alergia estacional	No	No
C-065	H	1994	Dermatitis	No	No
C-066	M	1991	Celiaquia y Psoriasis en gotas en la niñez	No	No
C-067	H	1992	Alergia estacional	No	No
C-071	M	1991	No	No	No
C-072	M	1990	Escemas en la piel e Intolerancia a la Lactosa	No	No
C-073	H	1989	No	No	Si
C-074	H	1992	No	No	No
C-075	H	1991	Alergia estacional	No	No
C-076	M	1990	No	No	No
C-077	H	1991	No	No	No
C-078	H	1993	No	No	No
C-079	H	1993	Alergia estacional	No	No
C-080	M	1992	No	No	No

Tabla 2b. Datos relevantes de cada individuo control participante.

Muestra	Sexo	Año de Nacimiento	Tabaquismo
101	H	1974	Si
2	M	1955	Ex
3	M	1977	No
4	H	1976	No
5	M	1948	Si
20		1984	No
24		1974	No
25	M	1985	Si
27	H	1988	No
28	M	1965	No
29	M	1965	No
30	H	1992	No
31	M	1974	No
32	M	1990	No
34	M	1982	No
35	M	1956	No

Tabla 2c. Datos relevantes de cada paciente estudiado.

Resultados del Polimorfismo rs2066844

Muestra	rs2066844	Muestra	rs2066844
C-001	wt/wt	C-038	wt/wt
C-002	wt/wt	C-039	wt/wt
C-003	wt/wt	C-040	wt/v
C-004	wt/wt	C-041	wt/wt
C-005	wt/wt	C-042	wt/wt
C-006	wt/wt	C-043	wt/wt
C-007	wt/wt	C-044	wt/wt
C-008	wt/wt	C-045	wt/wt
C-009	wt/wt	C-046	wt/wt
C-010	wt/wt	C-047	wt/wt
C-011	wt/wt	C-048	wt/wt
C-012	wt/wt	C-049	wt/wt
C-013	wt/wt	C-050	wt/wt
C-014	wt/wt	C-051	wt/v
C-017	wt/wt	C-061	wt/wt
C-018	wt/wt	C-062	wt/wt
C-019	wt/wt	C-063	wt/wt
C-020	wt/v	C-064	wt/wt
C-021	wt/wt	C-065	wt/wt
C-022	wt/wt	C-066	wt/v
C-023	wt/v	C-067	wt/wt
C-024	wt/v	C-071	wt/wt
C-025	wt/wt	C-072	wt/wt
C-027	wt/wt	C-073	wt/wt
C-028	wt/wt	C-074	wt/wt
C-029	wt/wt	C-075	wt/wt
C-030	wt/wt	C-076	wt/wt
C-031	wt/wt	C-077	wt/v
C-032	wt/wt	C-078	wt/wt
C-033	wt/wt	C-079	wt/wt
C-035	wt/wt	C-080	wt/v
C-036	wt/wt	TOTAL	64
C-037	wt/wt		

Tabla 3a. Resultados del polimorfismo en individuos control.

Muestra	rs2066844
101	wt/wt
2	wt/wt
3	wt/wt
4	wt/v
5	wt/wt
20	wt/v
24	wt/wt
25	wt/wt
27	wt/wt
28	wt/v
29	wt/wt
30	wt/wt
31	wt/wt
32	wt/wt
34	wt/wt
35	wt/wt
TOTAL	16

Tabla 3b. Resultados del polimorfismo en individuos enfermos.

POLIMORFISMO rs2066844										
Genotipo	Total		Sin EC		Sin EA		Con EC		Con EA	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
wt/wt	69	86,3	56	70	42	52,5	13	16,25	27	33,75
wt/v	11	17,2	8	10	6	7,5	3	3,75	5	6,25
v/v	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
Total	80									

Tabla 4. Resultados en valores y porcentajes de los individuos totales de cada genotipo, los individuos sin EC de cada genotipo, los individuos sin Enfermedades Autoinmunes (EA), los que presentan Enfermedad de Crohn y los que presentan Enfermedades Autoinmunes.

Los resultados de este polimorfismo se obtuvieron mediante PCR, seguida de una digestión y su posterior electroforesis en un gel de agarosa 3%.

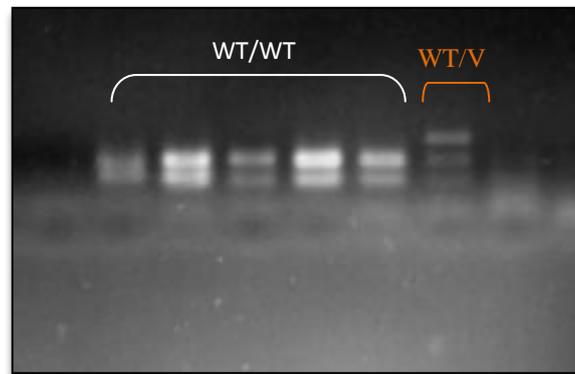


Figura 3. Imagen de un gel de agarosa 3%. Los cinco primeros individuos presentan solo dos bandas, eso significa que son homocigotos wt/wt. Mientras que el 6º individuo presenta tres bandas, por tanto, es un heterocigoto wt/v.

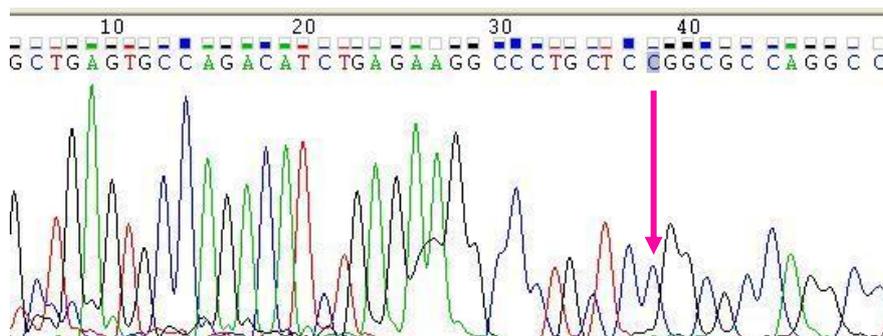


Figura 4. Cromatograma de una secuencia de un individuo homocigoto wt/wt. Como se observa con la flecha fucsia, el pico azul corresponde al SNP, y es de C, el alelo más frecuente. En el caso de ser un heterocigoto, se observaría un pico de color rojo, correspondiente a una T.

Frecuencias Alélicas

Con los resultados obtenidos se han calculado las frecuencias alélicas (p y q). Seguidamente se ha comprobado si las poblaciones se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg mediante χ^2 .

Resultados para la muestra control:

Genotipo	Frecuencia Observada	Frecuencia Alélica	Frecuencia Esperada
wt/wt	56	p= 0,9375	56,25
wt/v	8	q= 0,0625	7,5
v/v	0		0,25
$\chi^2= 0,2844$ (con 1 g.l.)			

Tabla 5. Valores para el cálculo del equilibrio Hardy-Weinberg de la muestra control para el polimorfismo rs2066844.

Resultados para la muestra de pacientes:

Genotipo	Frecuencia Observada	Frecuencia Alélica	Frecuencia Esperada
wt/wt	13	p= 0,90625	13,14
wt/v	3	q= 0,09375	2,72
v/v	0		0,14
$\chi^2= 0,1712$ (con 1 g.l.)			

Tabla 6. Valores para el cálculo del equilibrio Hardy-Weinberg de la muestra de pacientes para el polimorfismo rs2066844.

Los valores obtenidos apuntan a que la población tanto control como enferma se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg. Además se realizó una Chi-cuadrado con una tabla de contingencia para saber si las diferencias entre las dos poblaciones eran significativas. Se comprobó que no había diferencias significativas.

	wt/wt	wt/v	
Control	56	8	64
Enfermos	13	3	16
	69	11	80
$\chi^2= 0,05$ (con 1 g.l.)			

Tabla 7. Tabla de contingencia para los distintos genotipos encontrados en este estudio. Debido a los bajos valores se ha realizado la corrección de Yates.

	wt	v	
Control	120	8	128
Enfermos	29	3	32
	149	11	160
$\chi^2= 0,06$ (con 1 g.l.)			

Tabla 8. Tabla de contingencia para los distintos alelos encontrados en este estudio. Debido a los bajos valores se ha realizado la corrección de Yates.

Frecuencias alélicas del polimorfismo rs2066844 en distintas poblaciones

La frecuencia del polimorfismo depende del origen de la muestra, como se puede apreciar en la tabla siguiente:

Población	Frecuencia Alelica de C	Frecuencia Alelica de T
Europeos	0,979	0,021
Caucásicos	0,935	0,065
Afroamericanos	1	0
Asiáticos	1	0
Hispánicos	0,978	0,022

Tabla 9. Frecuencias alélicas del polimorfismo rs2066844 en distintas poblaciones. Se han marcado en color fucsia los valores más parecidos a los obtenidos en este estudio. Estos valores se han obtenido de: National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Los resultados obtenidos no difieren mucho de lo esperado ya que las frecuencias del polimorfismo en la población de Mallorca son muy parecidas a las frecuencias en Caucásicos e Hispánicos, y muy diferentes de Afroamericanos y Asiáticos.

5. DISCUSIÓN

Los estudios genéticos realizados, como por ejemplo en el presente estudio, son importantes en este tipo de enfermedades con una herencia compleja. Aunque no se puede obtener una cura a partir de ellos, es importante entender la enfermedad en todos los ámbitos para poder hacer un diagnóstico y poder paliar los síntomas de forma más eficiente y garantizar una buena calidad de vida a los enfermos.

Polimorfismo

Aunque la técnica utilizada descrita anteriormente ya había sido utilizada, se tuvo que poner a punto de nuevo y mejorar algunas cosas. Se intentó utilizar distintas Taq Polimerasas, aunque ninguna tuvo éxito. Finalmente se optó por la Taq Polimerasa de BioTools®.

A parte de este cambio, también se hizo un cambio en cuanto al marcador de peso molecular. En este estudio se utilizó un marcador de peso molecular específico para secuencias cortas, 10bp DNA Lader de Invitrogen™.

Una vez solucionados estos problemas, se obtuvieron resultados como los que se ven en la Figura 3. En el caso de homocigotos “wild type” se obtenían dos bandas diferenciadas de 54 y 46 pb. Mientras que en el caso de heterocigotos se observaban tres bandas. Esto se debe a que la enzima de restricción no corta en la variante de NOD2, por tanto, las bandas tendrían una longitud de 100, 54 y 46 pb. En el caso de haber aparecido homocigotos para el alelo variante solo se hubiera obtenido una banda de 100pb.

Equilibrio Hardy-Weinberg

Como se ha visto en el apartado de Resultados, las poblaciones tanto la de controles como la de enfermos se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg. Esto significa que no existen diferencias significativas entre el número de individuos esperados con cada uno de los genotipos bajo la hipótesis de equilibrio poblacional y los que hemos encontrado en el presente trabajo.

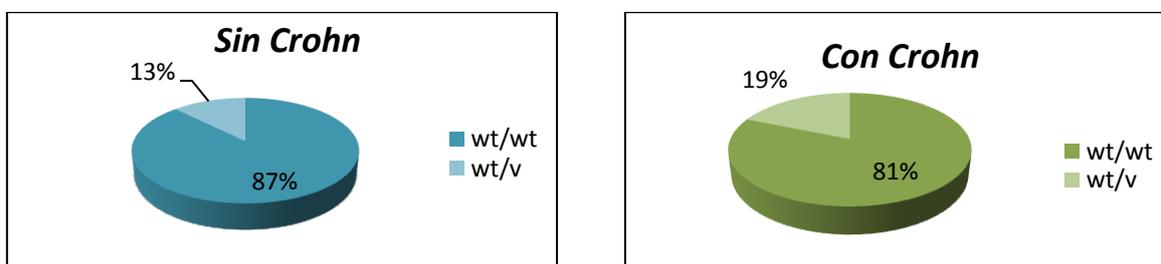


Figura 5. Representación de los porcentajes de los distintos genotipos (wt/wt y wt/v) en la población control (Sin Crohn) y en la población enferma (Con Crohn) del presente estudio.

Frecuencias alélicas

Las frecuencias alélicas obtenidas (Tablas 5 y 6) no presentan una diferencia significativa entre ellas. Aún así, se puede observar que la frecuencia del alelo variante se encuentra más elevada en los enfermos de Crohn que en la población control. Esto seguramente se debe al bajo tamaño muestral en pacientes. Para poder determinar si realmente es mayor en pacientes, se debería hacer un estudio con una muestra mayor de enfermos de Crohn.

Estas frecuencias también se han comparado con otras de distintas regiones (Tabla 9). Como se esperaba las frecuencias se parecen a las de los Caucásicos y a las de los Europeos. Para poder tener una comparación más exhaustiva, se compararon las frecuencias con otro estudio realizado en población caucásica (Glas *et al*, 2010). Las frecuencias de este estudio las podemos encontrar en la tabla 10, dónde podemos observar la similitud de dichas frecuencias con las obtenidas en el presente estudio.

Frecuencias (Glas <i>et al</i> , 2010)		
	Controles	Crohn
WT	0,95	0,911
V	0,05	0,089
Frecuencias en el presente estudio		
WT	0,9375	0,9063
V	0,0625	0,0938

Tabla 10. Comparativa entre las frecuencias en un estudio en Caucásicos, tanto con controles como enfermos, y las frecuencias obtenidas en este estudio.

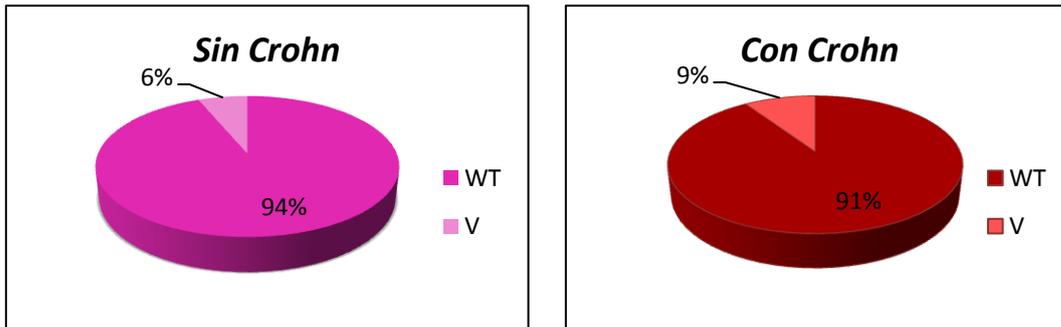


Figura 6. Representación de los porcentajes de los distintos alelos (wt y v) en la población control (Sin Crohn) y en la población enferma (Con Crohn) del presente estudio.

6. CONCLUSIONES

Con este estudio se han obtenido las conclusiones siguientes:

1. Se ha puesto a punto el método de análisis para el polimorfismo rs2066844 relacionado con la Enfermedad de Crohn.
2. La población de controles y de enfermos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.
3. La frecuencia del alelo variante, aunque no de manera significativa, es más alta en los enfermos de Crohn que en los controles. Seguramente no se ha reflejado la diferencia debido al bajo tamaño muestral de enfermos. Para un estudio más clarificador se debería coger una muestra poblacional mayor.
4. Las frecuencias obtenidas, tanto de controles como de los enfermos, son del mismo orden que en otras poblaciones estudiadas, sobre todo entre los Caucásicos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ananthakrishnan A. *Epidemiology and risk factors for IBD*. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2015.
- Arnott IDR, et al. *NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe?* Genes and Immunity 2004; 5: 414–425.
- Boyle J, Parkhouse R, Monie T. *Insights into the molecular basis of the NOD2 signalling pathway*. Open biology. 2014; 4 (12): 140–178.
- Brant SR, Nguyen GC. *Is there a gender difference in the prevalence of Crohn's disease or ulcerative colitis?* Inflamm Bowel Diseases, 2008. 14 Issue Suppl 2: S 2–3.
- Cario E, Podolsky DK. *Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease*. Infect Immun. 2000. 68(12): 7010–7017.
- Cho J. *Inflammatory bowel disease: genetic and epidemiologic considerations*. World Journal of Gastroenterology. 2008; 14 (3): 338 – 347.
- Cunliffe RN, Mahida YR. *Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract*. Journal Leukocyte Biology, 2004; 75: 49 – 58.
- D'Addabbo A, Latiano A, Palmieri O, Creanza MT, Maglietta R, Annese V, Ancona N. *Association of genetic profiles to Crohn's disease by linear combinations of single nucleotide polymorphisms*. Artificial Intelligence in Medicine. 2009; 46: 131 – 138.
- Díez RE, Alonso PML, Zambrano CB, Cuevas SJ, Eusebio ME. *Enfermedad de Crohn cutánea, perianal y vulvar*. Medicina Cutánea Ibero – Latino – Americana 2007; 35 (3): 145 – 148.
- García OMH, Gomes SA, Jiménez, OM V, Fabián L G, Rodríguez L W. *Caracterización de pacientes con enfermedad de Crohn atendidos en el Instituto de Gastroenterología de Cuba*. Revista cubana de Investigaciones Biomédicas. 2014; 33 (3).
- Geerling B, Dagnelie P, Badart – Smook A, Russel M, Stockbrügger R & Brummer R. *Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis*. American Journal of Gastroenterology 2000. 95: 1008 – 1013.
- Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. *Inflammatory bowel disease and domestic hygiene and infancy*. Lancet, 1994; 343: 766 – 767.
- Glas J, et al. *The NOD2 single nucleotide polymorphisms rs2066843 and rs2076756 are novel and common Crohn's disease susceptibility gene variants*. PLoS One. 2010; 5 (12).
- Goyette P, Labré C, Trinh T, Xavier R, Rioux J. *Molecular pathogenesis of inflammatory bowel disease: Genotypes, phenotypes and personalized medicine*. Annals of Medicine. 2007; 39: 177 – 199.
- Grimes CL, Ariyananda LDZ, Melnyk JE, O'Shea EK. *The innate immune protein Nod2 binds directly to MDP, a bacterial cell wall fragment*. J. Am. Chem. Soc. 2012 ; 134: 13 535– 13 537.
- Hampe J, Heymann K, Krawczak M, Schreiber S. *Association of inflammatory bowel disease with indicators for childhood antigen and infection exposure*. International Journal of Colorectal Disease, 2003; 18 (5): 413 – 417.
- Hecht G. *Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine*. American Journal Physiology, 1999; 277: C351 – 8.

- Homer C, et al. *A dual role for receptor – interacting protein kinase 2 (RIP2) kinase activity in nucleotide – binding oligomerization domain 2 (NOD2) – dependent autophagy.* Journal of Biological Chemistry. 2012; 287 (30): 25565 – 25576.
- Hsu Y – MS, Zhang Y, You Y, Wang D, Li H, Duramad O, Qin X – F, Dong C, Lin X. *The adaptor protein CARD9 is required for innate immune responses to intracellular pathogens.* Nat. Immunol. 2007; 8: 198– 205
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. *Association of NOD2 leucine rich repeat variants with susceptibility to Crohn’s disease.* Nature, 2001. 31; 411 (6837): 599 – 603.
- Inohara N, Núñez G. *NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis.* National Review Immunology, 2005; 3: 371 – 82.
- Iwasaki A, Kelsall BL. *Mucosal immunity and inflammation. I. Mucosal dendritic cells: their specialized role in initiating T cell responses.* American Journal Physiology, 1999; 276: G1074 – 8.
- Jung C, et al. *Genotype/phenotype analyses for 53 Crohn’s disease associated genetic polymorphisms.* PloS one. 2012; 7 (12).
- Kraus TA, Toy L, Chan L, et al. *Failure to induce oral tolerance in Crohn’s and ulcerative colitis patients: possible genetic risk.* Annals of the New York Academy of Science, 2004. 1029: 225 – 238.
- Keller J, et al. *Increased risk of stroke among patients with Crohn’s disease: a population-based matched cohort study.* International Journal of Colorectal Disease. 2015; 1-9.
- La Torre F, et al. *Early – onset sarcoidosis caused by a rare CARD15/NOD2 de novo mutation and responsive to infliximab: a case report with long – term follow – up and review of the literature.* Clinical rheumatology, 2014; 1 – 5.
- Loftus E. *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence and environmental influences.* Gastroenterology 2004. 126: 1504 – 1517.
- Mawdsley JE, Rampton DS. *Psychological stress in IBD: New insight into pathogenic and therapeutic implications.* Gut, 2005; 54 (10): 1481 – 1491.
- McCormick PA, Manning D. *Chronic inflammatory bowel disease and the “over – clean” environment: Rarity in the Irish “Traveller” community.* Irish Medical Journal, 2001; 94 (7): 203 – 204.
- Medina E, Fuentes D, Suárez L, Prieto G. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal.* Protocolos de diagnóstico – terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica. 2010.
- Mo J, Boyle JP, Howard CB, Monie TP, Davis BK, Duncan JA. *Pathogen sensing by nucleotidebinding oligomerization domain – containing protein 2 (NOD2) is mediated by direct binding to muramyl dipeptide and ATP.* J. Biol. Chem. 2012; 287: 23 057– 23 067.
- NCBI. *National Center for Biotechnology Information.* U.S. National Library of Medicine.
- Norouzinia M, Naderi N. *Personalized management of IBD; is there any practical approach?.* Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench. 2015; 8 (1): 1 – 3.
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. *A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn’s disease.* Nature, 2001. 31; 411 (6837): 603 – 606.
- Oliver, Fº Javier. *Tesis: Nuevos marcadores genéticos de predisposición a la enfermedad inflamatoria intestinal.* Dirigida por Javier Martín Ibáñez. 2008, Universidad de Granada (CSIC).

- Pajares JM, Gisbert JP. *Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal en España. Una revisión sistemática*. Revista española de enfermedades digestivas, 2001. 93: 9 – 14.
- Park J – H, Kim Y – G, McDonald C, Kanneganti T – D, Hasegawa M, Body – Malapel M, Inohara N, Nunez G. *RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs*. J. Immunol. 2007; 178: 2380 – 2386.
- Pous Serrano S. *Tesis: Exactitud diagnóstica de la resonancia magnética preoperatoria en la determinación de la extensión y grado de actividad inflamatoria de la enfermedad de Crohn yeyuno – ileal*. Dirigida por Eduardo García – Granero Ximénez y Pilar Nos Mateu. 2014. Universitat de València.
- Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM *et al*. *Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells*. Natural Immunology, 2005; 6: 507 – 14.
- Riordan A, Ruxton C, Hunter J. *A review of associations between Crohn's disease and consumptions of sugars*. European Journal of Clinical Nutrition. 1998. 52: 229 – 238.
- Sánchez B. *TFM: Enfermedad de Crohn: estudio preliminar de cinco polimorfismos genéticos en una muestra de población mallorquina*. Dirigido por Dr. José A. Castro y Dra. Cori Ramón. 2013, Universitat de les Illes Balears.
- Sanders DS. *Mucosal integrity and barrier function in the pathogenesis of early lesions in Crohn's disease*. Journal of Clinic Pathology, 2005; 58: 568 – 72.
- Sepúlveda S, Beltrán C, Peralta A, Rivas P, Rojas N, Figueroa C, Quera R, Hermoso M. *Inflammatory bowel diseases: An immunological approach*; Rev Méd Chile 2008; 136: 367 – 375.
- Sicilia B, Vicente R, Gomollon F. *Enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa: discusión de la epidemiología clásica*. Acta Gastroenterológica Latinoamericana, 2009. 39 (2).
- Strober W, *et al*. *Cellular and molecular mechanisms underlying NOD2 risk-associated polymorphisms in Crohn's disease*. Immunological reviews. 2014; 260 (1): 249 – 260.
- Travassos LH *et al*. *Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry*. Nat. Immunol. 2010; 11: 55 – 62.
- Van Limbergen J, Russell RK, Drummond HE, Aldhous MC, Round NK, Nimmo ER, *et al*. *Definition of phenotypic characteristics of childhood – onset inflammatory bowel disease*. Gastroenterology. 2008; 135: 1114–22.
- Watanabe N, Hanabuchi S, Marloie – Provost MA, Antonenko S, Liu YJ, Soumelis V. *Human TSLP promotes CD40 ligand – induced IL – 12 production by myeloid dendritic cells but maintains their Th2 priming potential*. Blood Journal, 2005; 105: 4749 – 51.
- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, Schelee M *et al*. *NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha – defensin expression*. Gut, 2004; 53: 1658 – 64.
- Weylandt K, Kang J. *Rethinking lipid mediators*. Lancet 2005. 366: 618 – 620.
- Wolters V, Xu W, Zhao X, Walters T, Griffiths A, Silverberg M, Muise A. *Replication of genetic variation in the MYO9B gene in Crohn's disease*; Human Immunology 2011; 72: 592 – 597.
- Yamamoto JK. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal: bases moleculares y clínicas*. Revista Gastroenterológica de México. 2010; 75(2): 189 – 90.