

Enfermedad inflamatoria intestinal: Una mirada inmunológica

Sofía E Sepúlveda^{1a}, Caroll J Beltrán^{1,2b}, Alexis Peralta^{1c},
Paola Rivas^{1d}, Néstor Rojas^{1d}, Carolina Figueroa³,
Rodrigo Quera^{4,5}, Marcela A. Hermoso^{1e}.

Inflammatory bowel diseases: An immunological approach

Inflammatory bowel diseases (IBD) are inflammatory diseases with a multifactorial component that involve the intestinal tract. The two relevant IBD syndromes are Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). One factor involved in IBD development is a genetic predisposition, associated to NOD2/CARD15 and Toll-like receptor 4 (TLR4) polymorphisms that might favor infectious enterocolitis that is possibly associated to the development of IBD. The identification of specific immunologic alterations in IBD and their relationship to the etiology of the disease is a relevant research topic. The role of intra and extracellular molecules, such as transcription factors and cytokines that are involved in the inflammatory response, needs to be understood. The relevance of immunologic molecules that might drive the immune response to a T helper (Th) 1, Th 2 or the recently described Th 17 phenotype, has been demonstrated in animal models and clinical studies with IBD patients. CD and UC predominantly behave with a Th 1 and Th 2 immune phenotype, respectively. Recently, an association between CD and Th 17 has been reported. The knowledge acquired from immunologic and molecular research will help to develop accurate diagnostic methods and efficient therapies (Rev Méd Chile 2008; 136: 367-75).

(Key words: Colitis, ulcerative; Crohn disease; T-Lymphocytes, Helper-Inducer; Inflammatory bowel diseases; Nod2 signaling adaptor protein)

Recibido el 10 de octubre, 2006. Aceptado el 25 de enero, 2007.

Trabajo apoyado por Proyecto FONDECYT #1050451 y Proyectos OAIC 169/06 y 167/06 N°268, Hospital Clínico Universidad de Chile.

¹Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago de Chile. ²Oficina de Apoyo a la Investigación Clínica, Hospital Clínico Universidad de Chile, Santiago de Chile. ³Departamento de Medicina Interna, Hospital Clínico Universidad de Chile, Santiago de Chile. ⁴Sección de Gastroenterología, Hospital Clínico Universidad de Chile, Santiago de Chile. ⁵Departamento de Gastroenterología, Clínica Las Condes, Santiago de Chile.

^aTecnólogo Médico, Estudiante Programa Doctorado ICBM, Universidad de Chile

^bQuímico Farmacéutico, Estudiante Programa Doctorado ICBM, Universidad de Chile

^cEstudiante Bioquímica, Universidad de Chile

^dEstudiante Medicina, Universidad de Chile

^eBioquímico, PhD

Correspondencia a: Dra. Marcela A. Hermoso. Programa de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Independencia 1027. E mail: mhermoso@med.uchile.cl

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), donde destacan la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC), corresponden a una serie de patologías inflamatorias de etiología multifactorial que afectan principalmente el tracto intestinal. Son consideradas de gran importancia en la clínica contemporánea debido al deterioro severo de la calidad de vida de quienes las padecen y al riesgo de desarrollar cáncer colorrectal¹.

La incidencia de EII se ha incrementado en el último tiempo paralelamente al progreso de las sociedades, especialmente en países industrializados del norte de Europa, Reino Unido y Estados Unidos de Norteamérica; y en zonas en desarrollo de Asia, África y Latinoamérica, demostrando que su ocurrencia es un proceso dinámico². Aunque en Chile no existen datos estadísticos de su incidencia, la experiencia clínica demuestra un aumento en la atención de pacientes con EII en los últimos años. En un estudio reciente se demostró que durante el periodo comprendido entre 1990 y 2002, de un total de 258 pacientes atendidos en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile y en Clínica Las Condes, 69% de los pacientes con EC y 59% con CU fueron diagnosticados durante el período 1996-2002³.

Si bien la etiología de las EII aún no se comprende en su totalidad, se han descrito factores genéticos, ambientales e inmunológicos (Figura 1), que contribuyen en su patogénesis⁴. Se ha demostrado que, tanto en pacientes como en modelos murinos de EII, existen algunos factores genéticos capaces de aumentar el riesgo de desarrollar la enfermedad, dentro de ellos: polimorfismos en genes de receptores de reconocimiento de patógenos de tipo Toll 4 (TLR4) e intracelular NOD2/CARD15⁵.

La CU se caracteriza por una inflamación que afecta en su inicio principalmente el recto, pudiendo extenderse en forma continua y difusa hacia el colon. La CU cursa con infiltrado linfocitario que se extiende de manera continua a través de la mucosa y una pérdida total de la arquitectura normal de criptas con desarrollo de microabscesos en el fondo de éstas, e infiltrado inflamatorio en la lámina propia. Por otro lado, la EC se caracteriza por el desarrollo de una inflamación crónica y transmural, que puede comprometer todos los segmentos del tracto digestivo, afectando preferentemente el íleon terminal, colon y región perianal. Las zonas dañadas forman lesiones inflamatorias en parches⁶. Las lesiones presentan granulomas no caseificantes en la submucosa, úlceras profundas y fisuras con infiltra-

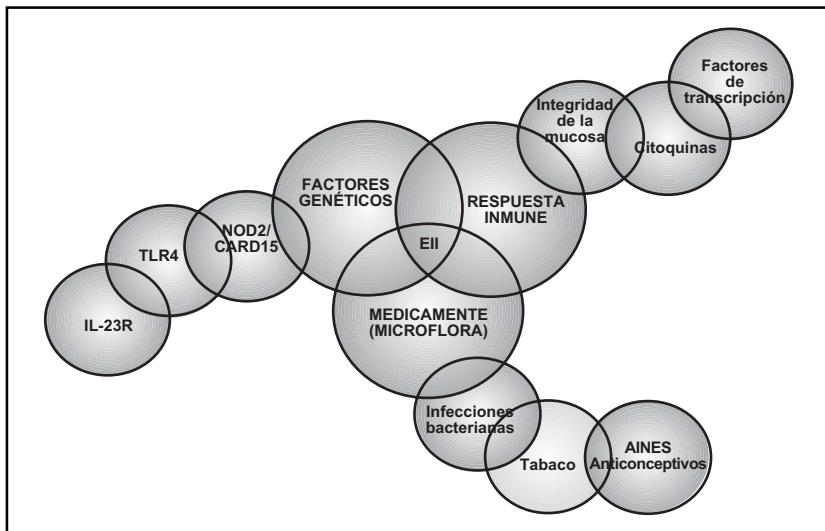


Figura 1. Avances en la comprensión de los factores involucrados en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias intestinales. IL-23R (receptor de IL-23); TLR4 (receptor de tipo Toll 4); NOD2/CARD15 (receptor intracelular NOD2/CARD15); AINES (antiinflamatorios no esteroidales).

do inflamatorio inespecífico. Pese a la existencia de criterios diferenciales entre CU y EC, no es posible clasificar muchos de los casos de EII (10% a 15%), denominándose como “colitis indeterminada”⁷.

Las EII se caracterizan por su cronicidad, evolución con recaídas, complicaciones y limitada eficacia terapéutica médica. Actualmente, su tratamiento es sólo sintomático a través del uso de moduladores de la inflamación, como mesalazina o ácido 5-aminosalicílico, esteroides e inmunosupresores, de elevado costo y en muchos casos de evolución clínica desfavorable. Por estas razones, el estudio de los mecanismos que participan en su patogénesis es relevante y prioritario, y puede orientar hacia el desarrollo de mejores herramientas diagnósticas y de tratamiento. Al respecto, la inmunología se abre paso como una poderosa herramienta de conocimiento sobre la etiología de las EII.

INMUNOLOGÍA DEL INTESTINO
Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

El intestino constituye una extensa superficie mucosa con vellosidades, microvellosidades y criptas,

especialmente diseñadas para aumentar el área de contacto y favorecer la absorción de nutrientes que provienen principalmente de los alimentos. Los componentes del intestino interactúan con los alimentos como también con más de 400 especies diferentes de bacterias comensales, que se alojan en la mucosa y facilitan procesos asociados con la nutrición⁸. Debido al gran número de bacterias presentes en el intestino, el sistema inmune debe ser capaz de diferenciar entre comensales y patógenos, y generar adecuadas respuestas de tolerancia o inflamación, respectivamente.

La respuesta inmune del intestino está mediada en parte por tres tipos de células: epiteliales especializadas o de Paneth (CP), localizadas en la base de las criptas de Lieberkühn; las epiteliales diferenciadas de tipo M, distribuidas a lo largo del tracto digestivo, y las células dendríticas (CD) (Figura 2). Cada tipo celular ejerce un papel específico en la defensa contra patógenos intestinales.

Las CP pueden identificar algunos metabolitos de bacterias Gram-positivas, como el muramilo dipéptido, mediante el receptor intracelular NOD2/CARD15⁹. Las CP secretan lisozimas, α - y β -

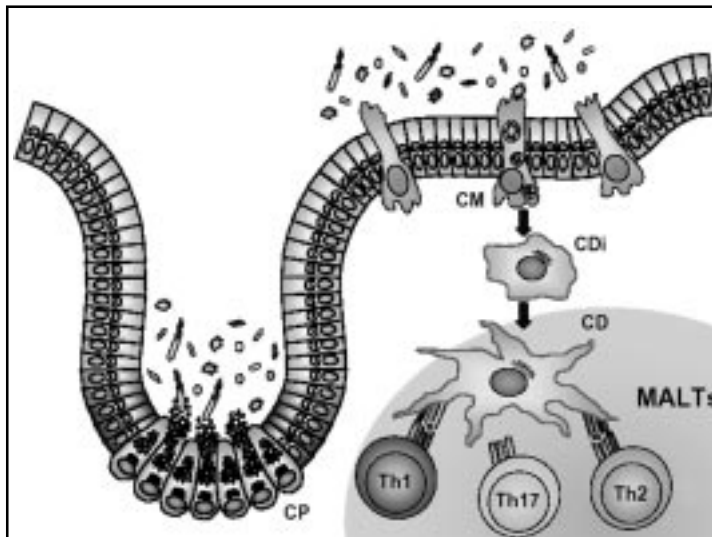


Figura 2. Distribución de las células involucradas en el desarrollo de respuestas inmunes en el intestino. Las células de Paneth (CP) secretan sustancias que protegen a las células troncales, ubicadas en las criptas, contra agentes patógenos. Las células M (CM) captan antígenos de patógenos presentes en el lumen, los procesan y pueden entregarlos a células dendríticas inmaduras (CDi). Las células dendríticas (CD) son capaces de procesar antígenos y presentarlos a linfocitos T *naïve*, ubicados en ganglios mesentéricos o placas de Peyer (MALTs), guiándolos hacia una respuesta Th1 o Th2.

■

defensinas y fosfolipasa A2 secretora¹⁰, que protegen a las células troncales ubicadas en las criptas contra agentes patógenos ingeridos y limitan el número y composición de las bacterias comensales¹¹ (Figura 2). Las defensinas presentan propiedades bactericidas¹² que forman poros de conductancia en las células epiteliales y activan la secreción de IL-8, que recluta a los leucocitos al sitio de infección¹³.

Una de las causas que contribuirían al desarrollo de la EC es una menor capacidad de las CP de secretar las α -defensinas 5 y 6¹⁴, favoreciendo la colonización intestinal por bacterias patógenas y un desbalance del medioambiente de citoquinas, provocando la activación constante e inadecuada del sistema inmune¹⁵.

Las células M también cumplen un papel central en el reconocimiento de patrones moleculares de microorganismos patógenos lumbales, a través de receptores presentes en la superficie apical, tales como el TLR4, el factor activador de plaquetas e integrina $\alpha 5\beta 1$ ¹⁶. Muchos de estos ligandos reconocidos son traslocados hacia la lámina propia, en donde se ponen en contacto con receptores de reconocimiento, entre los que destaca los TLRs de las CDs¹⁷ (Figura 2). Las CDs son capaces de conectar la inmunidad innata con la adaptativa, a través de la activación de los linfocitos T *naïve* en órganos linfoides secundarios (Figura 2), pudiendo dirigir la respuesta inmune hacia un perfil Th1 (respuesta inmune celular) o Th2 (respuesta inmune humoral), dependiendo del tipo de patógeno y el ambiente de citoquinas circundante.

Las CDs se distribuyen en los tejidos linfoides asociados a mucosa (MALTs), tales como las placas de Peyer, la lámina propia y los ganglios mesentéricos¹⁸. Las CDs de la lámina propia pueden alcanzar antígenos lumbales en forma directa extendiendo sus terminales dendríticos, sin afectar la integridad del epitelio, a través de uniones estrechas (*tight-junctions*) formadas por ambas entidades celulares¹⁹. El material antigénico proveniente de células epiteliales, alimentos o bacterias comensales, puede ser presentado por las CDs a células T presentes en los MALTs, en un ambiente que induce un estado de inactivación del linfocito, generando el fenómeno de tolerancia inmunológica²⁰.

Las CDs de la mucosa intestinal pueden, además, promover una respuesta preferentemente de tipo

Th2, de característica antiinflamatoria, en células T activadas *in vitro*, e inducir la secreción de IgA por células B. En el desarrollo de estas CDs no-inflamatorias, participan las células epiteliales a través de la producción de ciertos factores tisulares expresados constitutivamente por el epitelio, como la linfopoyetina tímica estromal (TSLP). Pese a que el acondicionamiento de CDs *in vitro* con TSLP no previene la producción de IL-12, ésta mantiene la inducción del patrón Th2 frente a antígenos bacterianos²¹. Además, se ha demostrado que TSLP se expresa deficientemente en células epiteliales intestinales de pacientes con EC²². Estas propiedades le otorgan a la TSLP un papel decisivo en la tolerancia intestinal y, probablemente, en la etiología de la EC.

COMPONENTE GENÉTICO DE LAS ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES

Desde el punto de vista de la interacción entre la inmunología y la genética, se ha postulado que existe cierta predisposición genética de algunos individuos a desarrollar EII, la que estaría relacionada con una inadecuada respuesta inmunológica frente a la microflora comensal. En los últimos años se ha confirmado la presencia de polimorfismos en varios genes que participan en la respuesta inmune innata en pacientes que desarrollan EII. Uno de éstos corresponde a las variantes alélicas del receptor NOD2/CARD15, perteneciente a una superfamilia de genes localizados en el cromosoma 16, y que se expresa principalmente en monocitos, CDs, epitelio intestinal y CP²³. Los polimorfismos de NOD2/CARD15 asociados con mayor frecuencia a EII son: *Arg702Trp*, *Gly908Arg* y *Leu1007fsinsC*, relacionados tanto con el riesgo de desarrollar EC como con el fenotipo de la enfermedad. Estas mutaciones producen defectos en la actividad bactericida de los macrófagos, lo que conduce a infecciones intracelulares persistentes con estimulaciones crónicas de células T; en la función de barrera de las células epiteliales, incrementando la exposición a la microflora; y en el condicionamiento de CDs y células M, que lleva a una pérdida en el balance homeostático de células efectoras y reguladoras²⁴. Los pacientes con EII que presentan los polimorfismos anteriormente mencionados, presentan una enfermedad más severa, de aparición más temprana

na, con compromiso predominantemente del íleon y un requerimiento de cirugía temprana²⁵.

El polimorfismo *Asp299Gly* del TLR4 se ha vinculado con el desarrollo de las EII. El TLR4 reconoce LPS y promueve la activación de NFκB, el cual transloca al núcleo para regular la transcripción de genes efectores. NFκB se expresa principalmente en macrófagos, CDs, células endoteliales y en menor proporción en células epiteliales intestinales. La aumentada expresión en el epitelio intestinal de TLR4, y en especial del alelo *299Gly*, ha sido reportado en pacientes con EC²⁶. En Chile, algunos pacientes con EII presentan estas mutaciones de NOD2/CARD15 y TLR4⁵.

Recientemente, se ha descrito el polimorfismo del receptor de IL-23 *Arg381Gln* (aminoácido del dominio citoplasmático del receptor), el cual se cree otorgaría protección en contra del desarrollo de EC²⁷.

En conjunto, estas evidencias permiten apoyar la hipótesis de que las EII corresponderían a una respuesta inflamatoria anormal de la mucosa frente a la microflora comensal intestinal en individuos genéticamente predispuestos.

INMUNOLOGÍA Y COMPONENTE INFECCIOSO DE LAS EII

La flora intestinal juega un papel crucial en la patogenia de las EII, en demostraciones realizadas en modelos animales libres de patógeno incapaces de desarrollar colitis^{28,29}.

Distintos patógenos han sido asociados con el desarrollo de EII, tanto en pacientes como en modelos animales. En 1913, Dalziel describió la existencia de similitudes histopatológicas y clínicas entre EC y los cuadros observados en paratuberculosis animal y tuberculosis intestinal humana. La subespecie paratuberculosis del *Mycobacterium avium* ha sido propuesta como un agente causal de la EC³⁰.

El desarrollo de gastroenteritis infecciosas, especialmente producidas por *Campylobacter* y *Salmonella*, ha sido estrechamente vinculada con el posterior desarrollo de EII en estudios de cohorte³¹. Además, pacientes pediátricos con EII mostraron un aumento de bacterias patógenas o una disminución en la cantidad de flora comensal en el intestino³², concluyendo que la persistencia de bacterias patógenas en el intestino podría facilitar el desarrollo de EII.

La aparición de algunos defectos funcionales en células de la inmunidad innata podría asociarse al desarrollo de EC. En relación con esta afirmación, la administración diaria de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) a pacientes con EC revirtió la actividad inflamatoria y 40% de ellos mostró remisión de la enfermedad. GM-CSF activa a los macrófagos para eliminar a las bacterias intracelulares, aunque algunos patógenos pueden suprimir la acción del GM-CSF³⁰.

FACTORES QUE REGULAN EL BALANCE DE LA RESPUESTA TH1/TH2 EN LAS ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES

La inflamación producida en el intestino a causa de las EII posee características predominantes para cada tipo de enfermedad. Clásicamente se ha descrito que CU presentaría un infiltrado inflamatorio predominantemente de tipo Th2, con secreción de IL-4, IL-5 e IL-13. Por otra parte, EC se ha correlacionado con la presencia de infiltrado de tipo Th1, con presencia de IFNγ, IL-12 y TNFα. Sin embargo, este planteamiento se ha hecho progresivamente menos estricto, más aún con los recientes hallazgos referentes a la presencia de IL-17 en suero y mucosa intestinal de pacientes con EII, principalmente con EC³³. IL-17 se ha descrito como parte de una vía proinflamatoria distinta, denominada Th_{IL-17} o Th17, donde IL-23 tendría un papel trascendental como inductor de la secreción de IL-17³⁴.

La polarización de la respuesta inmune hacia Th1, Th2 o Th17 depende tanto de eventos intrínsecos de las células como del medio ambiente. T-bet y GATA-3 son factores de transcripción asociados al desarrollo de respuestas inflamatorias de tipo Th1 y Th2, respectivamente (Figura 3). T-bet se expresa en células Th1 productoras de IFNγ y su sobreexpresión en células T *naïve* induce IFNγ³⁵. Estas observaciones demuestran que T-bet e IFNγ estarían relacionados con el desarrollo de una respuesta de tipo Th1.

Se ha visto un aumento de T-bet en pacientes con EC en comparación a pacientes con CU o controles¹², lo cual es esencial y suficiente para promover una colitis experimental de tipo Th1. Las células T de ratones deficientes de T-bet son

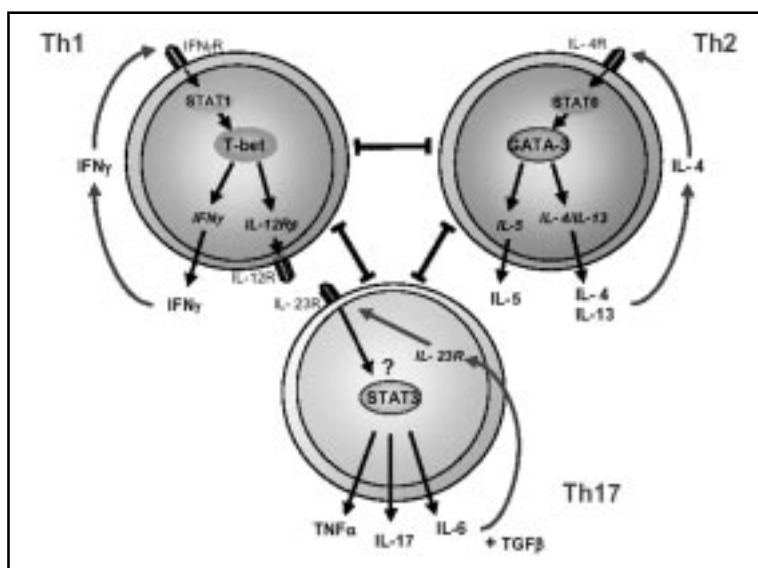


Figura 3. Principales factores involucrados en los patrones inflamatorios de tipo Th1, Th2 y Th17. Los distintos patrones inflamatorios son capaces de inhibirse entre sí a través de la producción de citoquinas específicas de cada respuesta. IFN γ R: receptor de IFN γ ; IL-4R: receptor de IL-4; IL-12R β : cadena β del receptor de IL-12; IL-23R receptor de IL-23.

incapaces de inducir colitis en modelos de transferencia adoptiva³⁶. La inducción de T-bet y el aumento de secreción de IL-12 en linfocitos de lámina propia intestinal de pacientes con EII, generan una respuesta inmune de tipo Th1¹². La vía de señalización de IL-12 involucra fundamentalmente a STAT4 y T-bet, capaces de inducir la expresión de la cadena β del receptor de IL-12 (IL-12R β)³⁷. Se ha visto que esplenocitos de ratones deficientes en STAT1 (STAT1^{-/-}), proteína clave en la señalización de IFN γ , no expresan T-bet, a diferencia de ratones STAT4^{-/-} que expresan niveles normales³⁸.

T-bet también cumple un papel en la producción de IL-17, ya que ratones T-bet^{-/-}, poseen altos niveles basales de esta citoquina pero son incapaces de incrementarlos en respuesta a IL-23; fenómeno no observado en ratones STAT1^{-/-}, en los cuales se induce una sobreexpresión de IL-17³⁹.

El fenotipo Th17, ha sido descrito recientemente en base a estudios en modelo animal de colitis, caracterizados previamente por elevados niveles de IL-12. IL-12 e IL-23 comparten una la subunidad p40, por lo que los efectos atribuidos a terapias anti-p40 dirigidas contra IL-12, podrían

estar bloqueando principalmente IL-23⁴⁰, estos hallazgos sugieren que IL-23 podría tener un papel fundamental en el desarrollo de las EII.

La expresión del IL-23R en la membrana celular de los linfocitos, puede ser estimulada por acción de TGF β e IL-6³⁴. Una vez que IL-23 se une a su receptor potencia la secreción de citoquinas como IL-6, IL-17 y TNF α , probablemente a través de la activación de STAT3³⁴ (Figura 3). Por otra parte, tanto IL-4 como IFN γ , independientemente, son capaces de inhibir la expresión de respuestas Th17, mientras que TGF β es capaz de inhibir el desarrollo de respuestas Th1 y Th2⁴¹ (Figura 3).

GATA-3 ha sido propuesto como un factor de transcripción asociado a respuestas inmunes Th2. Esplenocitos diferenciados a un fenotipo Th2 presentan altos niveles de GATA-3, a diferencia de linfocitos modulados hacia un perfil Th1⁴². Los linfocitos de lámina propia de intestino de pacientes con EC, expresan GATA-3 en niveles muy bajos o ausentes^{36,42}. GATA-3 controla directamente la expresión del gen de IL-5 e induce IL-4 e IL-13, en linfocitos T y células NK^{43,44}. Se ha visto que IL-13, producida por células NK, es crucial en la patogenia de CU y en respuestas

Th2 atípicas con IL-4 disminuida⁴⁵ y el bloqueo de su expresión disminuye la respuesta inflamatoria Th2 en un modelo murino de asma⁴⁶. El mecanismo molecular de la regulación del fenotipo Th2 involucra la hiperacetilación de histonas asociadas al *loci* de IL-13/IL-4, dependiente de la expresión de GATA-3 y la presencia de un elemento de respuesta conservado en el promotor de IL-13⁴⁷.

Se ha descrito que T-bet y GATA-3 poseen acción antagonista, inactivándose mutuamente. T-bet logra secuestrar a GATA-3 impidiendo que se una al ADN, reprimiendo la expresión de IL-5⁴⁸, e inversamente, GATA-3 inhibe la función de T-bet. El mecanismo de mutua inhibición ha sido observado mediante ensayos de expresión ectópica de ambas moléculas y la consecuente expresión de citoquinas de tipo Th2 en células Th1, tanto en células en proceso de diferenciación, como irreversiblemente diferenciadas⁴⁹.

La expresión de T-bet en esplenocitos es mayor durante los primeros tres días de activación y diferenciación. Se ha visto que la forma fosforilada de T-bet aumenta durante el periodo de diferenciación, disminuyendo severamente en células diferenciadas⁴⁸. Por otra parte, los niveles de GATA-3 disminuyen notablemente en linfocitos Th1 diferenciados⁴², sugiriendo a GATA-3 como un factor de transcripción relevante en el control del balance Th1/Th2.

Las alteraciones en el balance entre T-bet, GATA-3 o factores de transcripción aún no completamente descritos que potencien Th17, podrían tener un papel relevante en la etiología de las EII. Datos preliminares de nuestro grupo, en base al estudio de T-bet en muestras de pacientes crónicos con EII, tratados previamente con distintos fármacos, sugieren que alteraciones en el patrón de expresión de estos factores de transcripción podrían estar relacionados con el estado de la enfermedad (Sepúlveda S.E., et al. XXXIII Congreso Chileno de Gastroenterología, Noviembre 2006, Viña del Mar, Chile). Es probable entonces, que este tipo de estudios deban seguir siendo desarrollados, incluyendo pacientes con etapas tempranas

de la enfermedad, o en base al estudio conjunto de diversos factores de transcripción, de modo de obtener una buena correlación con los fenotipos Th1/Th2/Th17 de estas enfermedades.

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE EC Y CU CON PRINCIPIOS INMUNOLÓGICOS: NUEVAS PERSPECTIVAS

El diagnóstico diferencial de las EII, actualmente enfocado en exámenes de tipo endoscópico y anatomopatológico, no logra discriminar completamente entre pacientes con EC o CU. El diagnóstico de las EII basado en principios inmunológicos ha comenzado a investigarse, por ejemplo, con la evaluación de los marcadores inmunológicos, tales como los autoanticuerpos tipo IgG contra neutrófilos (pANCA) y contra *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA)⁵⁰. Los pANCA se relacionan con cuadros de CU mientras que los ASCA han sido asociados principalmente a EC. Sin embargo, estos marcadores coexisten en pacientes con EC y CU, restándole valor como diagnóstico diferencial⁵⁰.

En Chile, Beltrán y cols han propuesto realizar el diagnóstico diferencial de las EII, mediante la correlación entre la población de linfocitos T CD4⁺/IFN- γ ⁺ en sangre. Los resultados obtenidos mediante técnicas de citometría de flujo indican que pacientes con EC en etapa activa presentan niveles elevados de linfocitos T CD4⁺/IFN- γ ⁺, mientras que la determinación en pacientes con CU o controles sanos demostró un predominio de linfocitos T CD4⁺/IFN- γ ⁻ (Beltrán C., et al. Falk Symposium 151, Marzo 2006, Sydney, Australia).

El estudio del componente inmunológico involucrado en la fisiopatología de la EII es un ámbito que paulatinamente está comenzando a expandirse y, con un apropiado enfoque, podría reportar grandes beneficios en cuanto al diagnóstico y adecuado tratamiento de pacientes con esta patología. A la luz de los antecedentes antes expuestos, la identificación de moléculas involucradas en el balance Th1/Th2/Th17 de la respuesta inmune puede presentarse como una promisorio herramienta de diagnóstico diferencial y de tratamiento en EII.

REFERENCIAS

1. RUSSEL MG, STOCKBRUGGER RW. Epidemiology of inflammatory bowel disease: an update. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 417-27.
2. LOFTUS EV JR. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126: 1504-17.
3. FIGUEROA C, QUERA R, VALENZUELA J, JENSEN B. Enfermedad Inflamatoria Intestinal: Experiencia de dos centros chilenos [Inflammatory bowel disease: Experience of two Chilean centers]. *Rev Méd Chile* 2005; 133: 1295-304.
4. PODOLSKY DK. Inflammatory bowel disease (1). *N Engl J Med* 1991; 325: 928-37.
5. FIGUEROA C, PERALTA A, HERRERA L, CASTRO P, GUTIERREZ A, VALENZUELA J ET AL. NOD2/CARD15 and Toll-like 4 receptor gene polymorphism in Chilean patients with inflammatory bowel disease. *Eur Cytokine Netw* 2006; 17: 125-30.
6. ORTIGOSA L. Concepto actual y aspectos clínicos de la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. *Colombia Médica* 2005; 36: 16-24.
7. GUINDI M, RIDDELL RH. Indeterminate colitis. *J Clin Pathol* 2004; 57: 1233-44.
8. COOMBES JL, ROBINSON NJ, MALOY KJ, UHLIG HH, POWRIE F. Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol Rev* 2005; 204: 184-94.
9. INOHARA N, NÚÑEZ G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 371-82.
10. HECHT G. Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine. *Am J Physiol* 1999; 277: C351-8.
11. CUNLIFFE RN, MAHIDA YR. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 49-58.
12. MATSUOKA K, INOUE N, SATO T, OKAMOTO S, HISAMATSU T, KISHI Y ET AL. T-bet upregulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease. *Gut* 2004; 53: 1303-8.
13. LIN PW, SIMON PO JR, GEWIRTZ AT, NEISH AS, OUELLETTE AJ, MADARA JL ET AL. Paneth cell cryptidins act *in vitro* as apical paracrine regulators of the innate inflammatory response. *J Biol Chem* 2004; 279: 19902-7.
14. WEHKAMP J, HARDER J, WEICHENTHAL M, SCHWAB M, SCHAFFELER E, SCHLEE M ET AL. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004; 53: 1658-64.
15. WEHKAMP J, SALZMAN NH, PORTER E, NUDING S, WEICHENTHAL M, PETRAS RE ET AL. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 18129-34.
16. TYRER P, FOXWELL AR, CRIPPS AW, APICELLA MA, KYD JM. Microbial pattern recognition receptors mediate M-cell uptake of a gram-negative bacterium. *Infect Immun* 2006; 74: 625-31.
17. SANDERS DS. Mucosal integrity and barrier function in the pathogenesis of early lesions in Crohn's disease. *J Clin Pathol* 2005; 58: 568-72.
18. IWASAKI A, KELSALL BL. Mucosal immunity and inflammation. I. Mucosal dendritic cells: their specialized role in initiating T cell responses. *Am J Physiol* 1999; 276: G1074-8.
19. NIESS JH, BRAND S, GU X, LANDSMAN L, JUNG S, MCCORMICK BA ET AL. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 2005; 307: 254-8.
20. LIU Z, LEFRANCOIS L. Intestinal epithelial antigen induces mucosal CD8 T cell tolerance, activation, and inflammatory response. *J Immunol* 2004; 173: 4324-30.
21. 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* 2005; 105: 4749-51.
22. 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. *Nat Immunol* 2005; 6: 507-14.
23. GRIMM MC, PAVLI P. NOD2 mutations and Crohn's disease: are Paneth cells and their antimicrobial peptides the link? *Gut* 2004; 53: 1558-60.
24. BOUMA G, STROBER W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 521-33.
25. 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.
26. GAZOULI M, MANTZARIS G, KOTSINAS A, ZACHARATOS P, PAPALAMBROS E, ARCHIMANDRITIS A ET AL. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor

- 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 681-5.
27. DUERR RH, TAYLOR KD, BRANT SR, RIOUX JD, SILVERBERG MS, DALY MJ ET AL. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006; 314: 1461-3.
 28. KULLBERG MC, ANDERSEN JF, GORELICK PL, CASPAR P, SUERBAUM S, FOX JG ET AL. Induction of colitis by a CD4+ T cell clone specific for a bacterial epitope. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 15830-5.
 29. SARTOR RB. Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 390-407.
 30. CHAMBERLIN WM, NASER SA. Integrating theories of the etiology of Crohn's disease. On the etiology of Crohn's disease: questioning the hypotheses. *Med Sci Monit* 2006; 12: RA27-33.
 31. GARCÍA RODRÍGUEZ LA, RUIGOMEZ A, PANES J. Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2006; 130: 1588-94.
 32. CONTE MP, SCHIPPA S, ZAMBONI I, PENTA M, CHIARINI F, SEGANTI L ET AL. Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2006; 55: 1760-7.
 33. FUJINO S, ANDOH A, BAMBA S, OGAWA A, HATA K, ARAKI Y ET AL. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003; 52: 65-70.
 34. IWAKURA Y, ISHIGAME H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 2006; 116: 1218-22.
 35. SZABO SJ, KIM ST, COSTA GL, ZHANG X, FATHMAN CG, GLIMCHER LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; 100: 655-69.
 36. NEURATH MF, WEIGMANN B, FINOTTO S, GLICKMAN J, NIEUWENHUIS E, IJIMA H ET AL. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med* 2002; 195: 1129-43.
 37. WEIGMANN B, NEURATH MF. T-bet and mucosal Th1 responses in the gastrointestinal tract. *Gut* 2002; 51: 301-3.
 38. LIGHVANI AA, FRUCHT DM, JANKOVIC D, YAMANE H, ALIBERTI J, HISSONG BD ET AL. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 15137-42.
 39. CHEN Y, LANGRISH CL, MCKENZIE B, JOYCE-SHAIKH B, STUMHOFER JS, MCCLANAHAN T ET AL. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 2006; 116: 1317-26.
 40. YEN D, CHEUNG J, SCHEERENS H, POULET F, MCCLANAHAN T, MCKENZIE B ET AL. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006; 116: 1310-6.
 41. Romagnani S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy* 2006; 36: 1357-1366.
 42. CHAKIR H, WANG H, LEFEBVRE DE, WEBB J, SCOTT FW. T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3. *J Immunol Methods* 2003; 278: 157-69.
 43. NASTA F, UBALDI V, PACE L, DORIA G, PIOLI C. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 inhibits GATA-3 but not T-bet mRNA expression during T helper cell differentiation. *Immunology* 2006; 117: 358-67.
 44. KATSUMOTO T, KIMURA M, YAMASHITA M, HOSOKAWA H, HASHIMOTO K, HASEGAWA A ET AL. STAT6-dependent differentiation and production of IL-5 and IL-13 in murine NK2 cells. *J Immunol* 2004; 173: 4967-75.
 45. FUSS IJ, HELLER F, BOIRIVANT M, LEON F, YOSHIDA M, FICHTNER-FEIGL S ET AL. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1490-7.
 46. GRUNIG G, WARNOCK M, WAKIL AE, VENKAYYA R, BROMBACHER F, RENNICK DM ET AL. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 1998; 282: 2261-3.
 47. YAMASHITA M, UKAI-TADENUMA M, KIMURA M, OMORI M, INAMI M, TANIGUCHI M ET AL. Identification of a conserved GATA3 response element upstream proximal from the interleukin-13 gene locus. *J Biol Chem* 2002; 277: 42399-408.
 48. HWANG ES, SZABO SJ, SCHWARTZBERG PL, GLIMCHER LH. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science* 2005; 307: 430-3.
 49. LEE HJ, TAKEMOTO N, KURATA H, KAMOGAWA Y, MIYATAKE S, O'GARRA A ET AL. GATA-3 induces T helper cell type 2 (Th2) cytokine expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells. *J Exp* 2000; 192: 105-15.
 50. VERGARA T, COFRÉ P, CIFUENTES S, PULGAR U, PUEBLA C, VELASCO S. Prevalencia de marcadores serológicos ANCA y ASCA en una población con colitis ulcerosa. [Presence of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and anti *Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) among patients with ulcerative colitis]. *Rev Méd Chil* 2006; 134: 960-4.