

PUNTO DE VISTA

## Susceptibilidad genética y regulación de la inflamación en la enfermedad de Crohn. Relación con el sistema inmune innato

A. S. Peña y M. Peñate\*

*Departamento de Gastroenterología. Laboratorio de Inmunogenética. University Medical Center. Amsterdam. The Netherlands. \*Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Insular de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria. Spain*

---

Peña AS, Peñate M. Susceptibilidad genética y regulación de la inflamación en la enfermedad de Crohn. Relación con el sistema inmune innato. *Rev Esp Enferm Dig* 2002; 94:351-355.

---

Aunque en la actualidad la etiología de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) sigue siendo desconocida, se ha propuesto la existencia de una respuesta inflamatoria anormal contra la microflora entérica en un huésped susceptible genéticamente como una de ellas (1). Esta hipótesis del desorden genético se apoya en el agrupamiento familiar que existe en la enfermedad y los estudios en gemelos, especialmente en la enfermedad de Crohn (CD) (2). La búsqueda de genes de susceptibilidad para la IBD ha hecho que se identificaran muchos locus para la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, en concreto un locus de susceptibilidad para la enfermedad de Crohn en la región pericentromérica del cromosoma 16 (IBD1) por Hugot y cols. en 1996 y otros grupos en diferentes países (3-8).

Recientemente Hugot y cols. y Ogura y cols., utilizando diferentes procedimientos y basándose en la existencia de este gen de susceptibilidad que se superpone con el IBD1 en el cromosoma 16q12 identificaron el primer gen de susceptibilidad para la enfermedad de Crohn, el *NOD2* (3,9). La inserción de mutaciones en el gen *NOD2* es lo que confiere el incremento de la susceptibilidad a la enfermedad de Crohn pero no a la colitis ulcerosa (10). Así, dada la localización genómica y el papel de las proteínas del Nod en el reconocimiento de los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) se ha propuesto al *NOD2* como un gen de susceptibilidad para la enfermedad de Crohn y además se le atribuye un papel en el sistema inmune innato (3,9,11).

En el número de noviembre de 2001 de esta revista ya tuvimos la oportunidad de discutir la importancia de la inmunidad innata en la regulación de la respuesta inmune y también revisamos el papel desempeñado por el *NOD2* o *CARD15*, en el cambio del enfoque de la investigación dentro de la enfermedad de Crohn hacia el estudio de la inmunidad innata en lugar del sistema inmune adquirido (12). Este importante descubrimiento, el primer gen de susceptibilidad para la enfermedad de Crohn, ha mostrado la existencia de un modelo molecular para entender un mecanismo patogénico en la enfermedad de Crohn (3).

### LA FAMILIA Nod

Nod es una familia de proteínas que contiene un nucleótido unido a un dominio de oligomerización (NOD) que participa en la regulación de la muerte celular programada o apoptosis (PCD) y la respuesta inmune del huésped contra los patógenos. El dominio C-terminal es un sensor para ligandos intracelulares mientras que el N-terminal media la unión a bajo flujo de los efectores moleculares y la activación de diferentes vías de señales. Los miembros de la familia incluyen Apaf-1, Ced-4, Nod1, Nod2 y los productos citosólicos de los genes de resistencia a las enfermedades en las plantas (13).

El Nod1 determina el grado de respuesta a los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias mostrando actividad uniéndose a los mismos. La respuesta inmune a los patógenos microbianos se inicia con el reconocimiento de sus componentes específicos por las células del huésped en la superficie celular y en el citosol. Mientras que la respuesta desencadenada por los productos patógenos en la superficie de las células inmunes está bien estudiada, la que se inicia en el citosol lo es menos. El Nod2, otro miembro de la familia que se expresa en los monocitos, también determina el grado de respuesta a los componentes bacterianos

---

Recibido: 3-05-02.  
Aceptado: 10-05-02.

Correspondencia: A. S. Peña. University Medical Center. Department of Gastroenterology. Laboratory of Immunogenetics. P. O. Box 7057. 1007 MB Amsterdam. The Netherlands. e-mail: as.pena@umc.nl

pero con un patrón de respuesta diferente al observado con el Nod1. Las repeticiones ricas en leucina del Nod1 y Nod2 son necesarias para que los lipopolisacáridos induzcan la activación de un factor nuclear NF- $\kappa$ B. Nod1 y Nod2 son homólogos en los mamíferos de los productos del gen de resistencia a las enfermedades de las plantas que pueden funcionar como receptores citosólicos para los componentes patógenos de las bacterias (11).

En el pasado noviembre aún no quedaba claro cómo el gen *NOD2* o *CARD15* que tiene dos dominios de reclutamiento de caspasas (CARD) podía integrar las señales tanto para el sistema inmune adaptativo como para el innato. Recientes descubrimientos en la biología molecular de la respuesta inflamatoria han aportado mayor claridad sobre los mecanismos que explican no sólo la actuación de este gen en la activación del NF- $\kappa$ B sino también en la de la respuesta Th1 característica de la enfermedad de Crohn. La activación de este gen en su forma mutada da lugar a una anomalía en la inducción de la activación de la muerte celular programada de las células T (apoptosis), que es un importante mecanismo en la limitación del inicio de una respuesta inmune. Previamente, la apoptosis ya había sido identificada como un mecanismo importante en la resolución de la inflamación y recientemente se ha postulado que los defectos en los linfocitos en la apoptosis juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria. En este sentido, las mutaciones en el gen *NOD2* conducirían a una apoptosis anormal, una interesante hipótesis que todavía requiere más datos para su comprobación (14).

## RELACIÓN ENTRE LA INMUNIDAD INNATA Y EL *NOD*

El sistema inmune innato regula la respuesta inmediata a los patógenos microbianos en múltiples organismos incluido el humano. La respuesta inmune innata se inicia por el reconocimiento de los componentes patógenos específicos por las células inmunes del huésped (11). Las células de los mamíferos tienen receptores en la superficie celular y mecanismos intracelulares que inician la respuesta defensiva contra los patógenos microbianos y median la activación del NF- $\kappa$ B (15,16).

Las mutaciones en el *NOD2* alteran la estructura del dominio rico en repeticiones de leucina de la proteína. El *NOD2* salvaje activa el factor nuclear NF- $\kappa$ B, regulado por el dominio C-terminal de repeticiones ricas en leucina, que tiene un papel inhibitorio y también actúa como un receptor intracelular para los componentes de los patógenos microbianos (lipopolisacáridos bacterianos). Así, el producto del gen *NOD2* confiere susceptibilidad a la enfermedad de Crohn por alteración en el reconocimiento de estos componentes y/o por sobreactivación del NF- $\kappa$ B en los monocitos, sugiriendo un punto de unión entre la respuesta inmune innata a los

componentes de las bacterias y el desarrollo de la enfermedad (3,9).

## RELACIÓN ENTRE LA INMUNIDAD INNATA Y LOS RECEPTORES *TOLL-LIKE*

Los receptores *Toll-like* son una familia de receptores de la superficie de las células que están relacionados con la proteína Toll de la *Drosophila*, una molécula implicada en la defensa contra la infección micótica en la mosca (15).

10 receptores *Toll-like* (TLRs) han sido identificados en los mamíferos. Dos miembros de la familia, TLR2 y TLR4 median la respuesta a diferentes componentes de la pared celular bacteriana incluyendo lipopolisacáridos (LPS), lipopéptidos, peptidoglicanos (PGN) y ácido lipoteicoico (LTA) (7,17-20). Los TLRs de los mamíferos tienen múltiples repeticiones ricas en leucina en el dominio externo y un receptor de dominio IL1-Toll intracelular que media una cascada de señal al núcleo. La estimulación del TLR2 y del TLR4 permite el reclutamiento de la molécula adaptadora MyD88 y la serín-quinasa IL1R-quinasa asociada, dos componentes de señalización que junto con el TRAF6, median la activación del NF- $\kappa$ B (15). El TLR2 además, es un vínculo molecular entre los productos de los microbios, la apoptosis y los mecanismos de defensa del huésped. Las lipoproteínas de las bacterias (BLPs) estimulan la producción de NF- $\kappa$ B y la apoptosis a través de la estimulación del TLR2 (19).

En el sistema inmune humano, el complejo TLR4.MD2.CD14 sirve como receptor de superficie para los LPS (15). Además del complejo TLR4 de la superficie de las células hay muchas evidencias de que las células de los mamíferos tienen un receptor intracelular que detecta LPS en el citoplasma de las células infectadas por las bacterias (16). Estas observaciones sugieren que los TLRs y los miembros de la familia Nod representan otro sistema inmune innato para el reconocimiento de un amplio rango de productos bacterianos (11).

## NF- $\kappa$ B

El gen *NOD2*, regulado por el dominio C-terminal con repeticiones ricas en leucina, activa al factor nuclear NF- $\kappa$ B, que tiene un papel inhibitorio y también actúa como un receptor intracelular para los componentes de los patógenos microbianos. Estas observaciones sugieren que el producto del gen *NOD2* confiere susceptibilidad a la enfermedad de Crohn por alterar el reconocimiento de estos componentes y/o por sobreactivación del NF- $\kappa$ B en los monocitos (3,9).

Muchas evidencias soportan la disregulación inducida en el NF- $\kappa$ B por las bacterias en la enfermedad de Crohn: la susceptibilidad a la IBD espontánea en ratones ha sido asociada con las mutaciones en los receptores *Toll-like 4*

(TLR4), un miembro de una familia de activadores NF- $\kappa$ B que es conocido que se unen a lipopolisacáridos a través de sus dominios LRRs (18,21); ratones modificados genéticamente utilizados como modelos para la enfermedad inflamatoria crónica intestinal (enfermedad de Crohn) no la manifiestan en ambientes libres de gérmenes y sólo la desarrollan cuando se exponen a la flora entérica comensal normal; el tratamiento con antibióticos produce una mejoría transitoria en los pacientes con CD (22); el NF- $\kappa$ B tiene un papel principal en la IBD y es activado en las células mononucleares de la lámina propia en el CD (23); y por último, el tratamiento del CD está basado en el uso de sulfasalacina y glucocorticoides, dos conocidos inhibidores del NF- $\kappa$ B (24,25).

Todavía es el regulador más importante de la expresión genética de varios genes pro y antiinflamatorios, como Pilar Nosti y uno de nosotros describimos en esta revista hace cuatro años (26). En el mismo año Rogler y cols. (27) mostraron por primera vez la activación del NF- $\kappa$ B durante la inflamación de la mucosa humana *in situ*. Estos autores usaron un anticuerpo monoclonal (mAb) alfa-p65 y demostraron la existencia de NF- $\kappa$ B activado en las muestras de biopsias de mucosa intestinal inflamada. El número de células con NF- $\kappa$ B activado estaba relacionado con el grado de inflamación de la mucosa. Posteriormente se demostró que el NF- $\kappa$ B p65 nuclear tenía una fuerte correlación positiva tanto con el CDAI como con el índice de Van Hees para muestras tratadas y sin tratar con glucocorticoides (28). La molécula NF- $\kappa$ B también juega un papel importante en el inicio de la respuesta inmune innata. Probablemente se debe a la presencia de los sitios de unión del NF- $\kappa$ B en las regiones promotoras de muchos genes de respuesta inflamatoria y de fase aguda.

### NF- $\kappa$ B Y RECEPTORES *TOLL-LIKE*

Durante algún tiempo se pensó que la quinasa I $\kappa$ B era el único regulador maestro del NF- $\kappa$ B, la inmunidad innata y la diferenciación epidermal (29). El TLR3 de los mamíferos reconoce el dsRNA; la mayor parte de los virus en algún momento de su replicación lo producen. La activación del receptor del TLR3 induce a su vez la activación de NF- $\kappa$ B, la producción de IFN tipo 1 y a través de una vía de señalización dependiente de la MyD88, una proteína adaptadora compartida por todos los TLR conocidos, induce también la producción de citocinas (30). Más recientemente se ha demostrado que el dsRNA activa dos programas separados que pueden funcionar de manera independiente entre sí. Uno de ellos intenta disminuir la tasa de síntesis de proteínas en las células del huésped y prevenir la replicación viral. Este programa está mediado por la proteínquinasa R (PKR) y conduce a la autoeliminación de las células infectadas mediante la apoptosis. El segundo programa es responsable de la producción de IFNs antivirales tipo 1. A esto contribuyen células *naïve*. Puesto que requiere la supervivencia de la cé-

lula infectada dependerá de la expresión de genes antiapoptóticos a través de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (31).

Los genes hTLR 7 y 8 están localizados en el cromosoma sexual X, mientras que el gen hTLR 9 está localizado en el cromosoma 3. La expresión de los hTLR 7-9 constitutivamente activos estimula una vía de señalización NF- $\kappa$ B apoyando indirectamente la suposición de que estos receptores están implicados en las respuestas celulares a los estímulos que activan la inmunidad innata (32).

Tanto las señales inductoras de NF- $\kappa$ B como el IFN-Gamma son necesarios para la activación máxima de los genes claves implicados en las respuestas inmunes adquiridas. Estas son moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I, CD40 y el receptor de muerte Fas (33). Muchos aspectos de cómo las diferentes vías utilizan un complejo de quininas común que en última instancia activan al NF- $\kappa$ B han sido clarificados por la inactivación de genes y el análisis bioquímico (34). La complejidad y riqueza de esta regulación es ilustrada por los hechos de que el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y el polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria (PACAP), dos neuropéptidos multifuncionales, inhiben la unión del NF- $\kappa$ B debido a la estabilización del I $\kappa$ B a través de la inhibición de la actividad alfa de la quinasa I $\kappa$ B (35).

### SÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO

Es de interés el descubrimiento de que varias lipoproteínas estimulaban la transcripción TLR-dependiente de la síntesis del óxido nítrico inducido (iNOS) y de la producción de óxido nítrico, una potente vía microbicida. Como uno de nosotros revisó previamente con Asun García González (36), mientras pequeñas cantidades de NO producidas por NOS calcio-dependiente constitutivos endoteliales pueden servir para preservar la integridad de la mucosa intestinal, grandes cantidades de NO sintetizados por NOS calcio-independientes inducibles pueden desempeñar un papel clave en el empeoramiento de la inflamación y pueden estar asociados con el desarrollo de daño en la mucosa intestinal y la amplificación de la respuesta inmune en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. De hecho, se demostró posteriormente en un modelo experimental que la aminoguanidina, un inhibidor selectivo de la síntesis del óxido nítrico inducible, incrementaba el daño colónico y la respuesta inflamatoria en la colitis inducida por TNB en ratas mostrando una mayor y prolongada actividad de unión del factor nuclear B (NF- $\kappa$ B)/Rel en el colon (37).

### LIPOPROTEÍNAS MICROBIANAS

Las lipoproteínas microbianas son también potentes estimuladoras de la producción de IL-12 en macrófagos

humanos, inducción que se produce mediante receptores *Toll-like*, lo que confirma la importancia de esta citocina en la construcción de un puente entre la respuesta inmune innata y la adquirida (38). Igualmente el peptidoglicano soluble de las paredes celulares de los Gram positivos activan la coexpresión sinérgicamente mejorada del TLR2 y CD14 (el receptor en el monocito para el LPS), siendo la activación TLR2 mediada por la translocación inducible del NF- $\kappa$ B (39). Los TLR 1-9 humanos contienen un dominio externo con múltiples repeticiones ricas en leucina (LRRs) y un dominio citoplasmático homólogo al receptor humano de la IL-1.

El TLR5 de los mamíferos reconoce la flagelina bacteriana, tanto de los Gram positivos como Gram negativos. La activación del receptor moviliza el factor nuclear NF- $\kappa$ B y estimula la producción de TNF- $\alpha$ . Esto ocurre mediante el adaptador proteínico MyD88, lo que sugiere que el TLR5 ha evolucionado para permitir específicamente a los mamíferos detectar patógenos bacterianos flagelados (40).

El receptor *Toll-like 4* actúa como transductor de la señal de la endotoxina transmembrana. Puesto que el LPS activa el IRAK en los macrófagos murinos, una quinasa con un papel crítico en la transducción de las señales en la IL-1 e IL-18, y puesto que la eliminación de la IRAK interrumpe varias cascadas de señales disparadas por endotoxinas, esta quinasa y el conjunto de señalización IL-1/Toll desempeñan un papel predominante en la detección y respuesta a las infecciones de los Gram negativos (41).

## PROTEÍNAS HEAT SHOCK

También es sabido que las *heat shock protein* (HSP) constituyen una señal interna que interactúa con las células dendríticas presentadoras de antígenos a través de una vía NF- $\kappa$ B altamente conservada. Las proteínas HSP estimulan la secreción de citocinas por los macrófagos e inducen la expresión de moléculas presentadoras de antígenos y coestimuladoras en las células dendríticas. Sin embargo esto sólo sucede cuando hay necrosis celular pero no cuando se induce la apoptosis (42). La HSP60 humana activa las células mononucleares de sangre periférica y los macrófagos derivados de monocitos mediante la señalización CD14 y la proteína-quinasa p38 mitógeno activada, compartiendo esta vía con el LPS bacteriano (43).

## CONSIDERACIONES FINALES

El gen *CARD15/NOD2* codifica una proteína en la región citoplasmática de los monocitos humanos implicada en el reconocimiento de los LPS bacterianos. Aunque este mecanismo no está totalmente claro existe evidencia reciente de que otra quinasa citoplasmática con un dominio

de reclutamiento de caspasas, Rip2, también conocida como RICK y CARDIAK, media la señalización para los receptores de los sistemas inmunes innato y adaptativo.

La susceptibilidad genética a la enfermedad de Crohn no está limitada al cromosoma 16. El reconocimiento de una vía de transducción que cuando se disregula contribuye a la patogénesis del CD acelerará el descubrimiento de genes adicionales de susceptibilidad, ayudará a la identificación de factores ambientales asociados y en la búsqueda de tratamientos específicos (3).

Se necesitan más trabajos para responder a estas y otras cuestiones. Es demasiado pronto para que exista un beneficio claro en la práctica clínica. La mayoría de los pacientes con variantes o mutaciones del gen *NOD2* son sanos y el curso clínico de los que portan o no mutaciones en el *NOD* no se conoce. Hasta el momento la mayoría de los homocigotos para las mutaciones padecen la enfermedad de Crohn pero el curso clínico de los pacientes con mutaciones no es conocido aún. Por el momento la mayor parte de estudios publicados indican que los pacientes con mutaciones del gen *NOD2/CARD15* padecen la enfermedad de Crohn que afecta al íleon terminal y tienden a evolucionar a estenosis (44-48). De todas formas hay poca información de todas las posibles mutaciones del gen y es posible que la combinación de algunas aumente el riesgo de padecer formas fistulosas de la enfermedad. También parece claro que las mutaciones del gen aparecen en la enfermedad de Crohn y no en la colitis ulcerosa (49).

Se necesita la colaboración de los pacientes con los investigadores para resolver algunas cuestiones e identificar otros genes de susceptibilidad para la IBD. La identificación de estos genes tendrá implicaciones seguras, no sólo para los pacientes con mutaciones en el *NOD2*, sino también para sus familias. Estos avances muestran los beneficios del proyecto genoma humano y de la publicación de las bases de datos genéticas. Además, por primera vez, un gen para una enfermedad poligénica y multifactorial compleja ha podido ser identificado usando dos técnicas diferentes, la clonación posicional y la aproximación a los genes candidatos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998 (115): 182-205.
2. Binder V. Genetic epidemiology of inflammatory bowel disease. *Digest Dis* 1998 (16): 351-5.
3. Hugot JP, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411 (6837): 599-603.
4. Ohmen J. Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* 1996;5: 1679-83.
5. Curran ME. Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16. *Gastroenterology* 1998; (115): 1066-71.
6. Cavanaugh JA. Analysis of Australian Crohn's disease pedigrees refines the localization for susceptibility to inflammatory bowel disease on chromosome 16. *Ann Hum Genet* 1998 (62): 291-8.

7. Chow JC, et al. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999; 274 (16): 10689-92.
8. Annese V. Genetic analysis in Italian families with inflammatory bowel disease supports linkage to the IBD1 locus-a GISC study. *Eur J Hum Genet* 1999; (7): 567-73.
9. Ogura Y, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411 (6837): 603-6.
10. Hampe J, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001; 357 (9272): 1925-8.
11. Inohara N, et al. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 2001; 276 (4): 2551-4.
12. Peñate M, Peña A. Relevance of the innate immune system. *Rev Esp Enferm Dig* 2001; 93 (11): 721-30.
13. Inohara N, Núñez G. The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene* 2001; 20 (44): 6473-81.
14. Beutler B. Autoimmunity and apoptosis: the Crohn's connection. *Immunity* 2001; 15 (1): 5-14.
15. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; (406): 782-7.
16. Philpott DJ, et al. Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J Immunol* 2000; 165 (2): 903-14.
17. Yang RB, et al. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 1998;395 (6699): 284-8.
18. Poltorak A, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282 (5396): 2085-8.
19. Aliprantis AO, et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 1999;285 (5428): 736-9.
20. Schwandner R, et al. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999; 274 (25): 17406-9.
21. Sundberg JP, et al. Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology* 1994; 107 (6): 1726-35.
22. McKay DM. Intestinal inflammation and the gut microflora. *Can J Gastroenterol* 1999; 13 (6): 509-16.
23. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 42 (4): 477-84.
24. Auphan N, et al. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 1995; 270 (5234): 286-90.
25. Wahl C, et al. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* 1998; 101 (5): 1163-74.
26. Nosti-Escanilla MP, Pena AS. NF-kappa B and inflammatory intestinal diseases. *Rev Esp Enferm Dig* 1998;90 (2): 113-9.
27. Rogler G, et al. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1998; 115 (2): 357-69.
28. Thiele K, et al. Cell specific effects of glucocorticoid treatment on the NF-kappaBp65/IkappaBalpha system in patients with Crohn's disease. *Gut* 1999; 45 (5): 693-704.
29. Delhase M, Karin M. The I kappa B kinase: a master regulator of NF-kappa B, innate immunity, and epidermal differentiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1999;64: 491-503.
30. Alexopoulou L, et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413 (6857): 732-8.
31. Iordanov MS, et al. Activation of NF-kappaB by double-stranded RNA (dsRNA) in the absence of protein kinase R and RNase L demonstrates the existence of two separate dsRNA-triggered antiviral programs. *Mol Cell Biol* 2001; 21 (1): 61-72.
32. Chuang TH, Ulevitch RJ. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11 (3): 372-8.
33. Ouaaz F, Li M, Beg AA. A critical role for the RelA subunit of nuclear factor kappaB in regulation of multiple immune-response genes and in Fas-induced cell death. *J Exp Med* 1999; 189 (6): 999-1004.
34. Hatada EN, Krappmann D, Scheidereit C. NF-kappaB and the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000;12 (1): 52-8.
35. Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylylate cyclase-activating polypeptide inhibit expression of Fas ligand in activated T lymphocytes by regulating c-Myc, NF-kappa B, NF-AT, and early growth factors 2/3. *J Immunol* 2001; 166(2): 1028-40.
36. García-González MA, Pena AS. Nitric oxide and inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig* 1998;90(12): 870-6.
37. Dikopoulos N, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis by aminoguanidine increases intestinal damage in the acute phase of rat TNB-colitis. *Eur J Clin Invest* 2001;31 (3): 234-9.
38. Brightbill HD, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 1999;285 (5428): 732-6.
39. Yoshimura A, et al. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 1999; 163 (1): 1-5.
40. Hayashi F, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410 (6832): 1099-103.
41. Swantek JL, et al. IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin. *J Immunol* 2000; 164 (8): 4301-6.
42. Basu S, et al. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 2000; 12 (11): 1539-46.
43. Kol A, et al. Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J Immunol* 2000;164 (1): 13-7.
44. Vavassori P, et al. 3020insC mutation within the NOD2 gene in Crohn's disease: frequency and association with clinical pattern in an Italian population. *Dig Liver Dis* 2002; 34 (2): 153.
45. Murillo L, et al. CARD15 gene and the classification of Crohn's disease. *Immunogenetics* 2002;54 (1): 59-61.
46. Lesage S, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70 (4): 845-57.
47. Cuthbert AP, et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122 (4): 867-74.
48. Ahmad T, et al. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 122 (4): 854-66.
49. Elson CO. Genes, microbes, and T cells-new therapeutic targets in Crohn's disease. *N Engl J Med* 2002; 346 (8): 614-6.