

CARACTERIZACIÓN DE BIOMARCADORES EN LA  
RECURRENCIA POSTQUIRÚRGICA DE LA ENFERMEDAD  
DE CROHN: VALOR PREDICTIVO Y/O IMPLICACIÓN  
PATOGENÉTICA DE LOS MISMOS

**Autora:** Elena Cerrillo Bataller

**Director:** Miquel Àngel Gassull Duró

**Co-Directora:** Ana Belén Beltrán Niclós

Departament de Medicina.

Universitat Autònoma de Barcelona.

**Trabajo de investigación.**

**Junio 2011.**

## ÍNDICE

Resumen.....	Pág. 3
Introducción .....	Pág. 5
Material y métodos .....	Pág.12
Resultados.....	Pág.16
Discusión .....	Pág.24
Conclusiones .....	Pág.30
Tablas y gráficos.....	Pág.31
Bibliografía.....	Pág.39

**Introducción:** Un alto porcentaje de pacientes con enfermedad de Crohn (EC) requieren de cirugía resectiva durante el curso de su enfermedad. Sin embargo, la enfermedad tiende a reaparecer casi invariablemente tras la cirugía, por lo que la recurrencia postquirúrgica (RP) constituye un verdadero problema en estos pacientes. No se han caracterizado hasta la fecha marcadores biológicos que, por su valor predictivo, pudieran ser de utilidad en el manejo postquirúrgico de estos pacientes. El objetivo de nuestro estudio fue caracterizar los patrones evolutivos tras la cirugía de determinadas citoquinas en plasma, así como de otros marcadores biológicos en sangre y en heces, y evaluar su posible utilidad como marcadores predictivos de la RP durante el primer año tras la intervención.

**Material y métodos:** Se estudiaron prospectivamente los pacientes con EC sometidos a una primera cirugía resectiva en nuestro centro desde junio de 2009 hasta mayo de 2011, obteniéndose antes de la intervención muestra de sangre periférica (para determinación de perfiles de citoquinas, proteína C reactiva y fibrinógeno) y de heces (para determinación de calprotectina fecal). Se realizó un seguimiento evolutivo durante el primer año tras la cirugía, con determinaciones periódicas de las variables expuestas anteriormente, con el objetivo de analizar el perfil evolutivo de las mismas y caracterizar los cambios o alteraciones en sus niveles que pudieran acontecer en el curso de una eventual recurrencia durante el seguimiento. Se analizaron los resultados obtenidos comparando el subgrupo de pacientes que presentaron recurrencia de la enfermedad durante el seguimiento respecto al resto.

**Resultados:** Se analizaron los datos relativos a 15 pacientes con EC intervenidos. La mediana de edad fue de 46 años, un 73,3% varones. La localización más frecuente en base a la clasificación de Montreal fue la ileal (66,7%), seguida de la ileocólica (26,7%). Un total de 7 pacientes (46,7%) presentaron recurrencia de la enfermedad durante el seguimiento (12 meses), confirmada mediante prueba morfológica. Al analizar y comparar la evolución de la calprotectina fecal y de los parámetros bioquímicos analizados (PCR y fibrinógeno) entre el subgrupo de pacientes con recurrencia respecto al resto de pacientes, se apreciaron diferencias significativas en la evolución de la calprotectina fecal y el fibrinógeno, concordantes con la aparición de la recurrencia. Igualmente, el análisis comparativo entre ambos subgrupos de las citoquinas analizadas mostró una tendencia significativa de la IL-1B e IFN-g a elevarse a los 6 meses post-intervención en los pacientes con recurrencia.

**Conclusiones:** Determinados marcadores fecales y serológicos, como la calprotectina fecal y el fibrinógeno, en conjunto con la medición de determinadas citoquinas en plasma (IL-1B e IFN-g), podrían ser de utilidad en la práctica clínica para detectar la recurrencia postquirúrgica en los pacientes con EC.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Crohn (EC) es una enfermedad crónica intestinal de causa desconocida que afecta a un número cada vez más creciente de pacientes. A pesar de que se dispone en la actualidad de potentes fármacos que han demostrado su eficacia en el control de la actividad inflamatoria, un alto porcentaje de pacientes con EC, hasta el 80%, requieren de al menos una cirugía resectiva durante el curso de su enfermedad, principalmente para el tratamiento de las complicaciones asociadas (1). Sin embargo, la enfermedad tiende a reaparecer incluso tras la resección de todo el tramo intestinal macroscópicamente afecto, por lo que la recurrencia postquirúrgica (RP) es prácticamente la norma en estos pacientes y constituye un verdadero problema en el manejo de la enfermedad.

El término recurrencia se utiliza para definir la aparición de nuevas lesiones de EC tras una resección intestinal quirúrgica teóricamente curativa, a diferencia del término recidiva, que hace referencia a la reaparición de sintomatología clínica (2).

La RP se localiza frecuentemente en la zona de la anastomosis y/o proximalmente a la misma, reproduciendo el mismo patrón inicial de la enfermedad, y se sabe además que la tendencia a la recurrencia es mayor en la EC de localización ileocolónica, en comparación con otras localizaciones (8,9). Su incidencia varía según las series publicadas y según el tipo de recurrencia considerada (endoscópica, clínica, radiológica o quirúrgica), pero siempre tiende a ser elevada. Se estima que, en ausencia de tratamiento, más del 60% de los pacientes operados presentan lesiones endoscópicas en el neoíleon terminal al año de la cirugía (3-5) y la recurrencia clínica sin tratamiento se presenta hasta en un 20-30% de los pacientes al año tras resección ileal o ileocolónica, con un incremento del 10% en cada año posterior (7). Se ha demostrado que la gravedad de las lesiones endoscópicas muestra una buena correlación con la probabilidad de presentar síntomas de la enfermedad. De hecho, los síntomas suelen aparecer cuando el paciente ya

presenta lesiones endoscópicas severas y no es infrecuente observar pacientes con lesiones de recurrencia bastante avanzadas que todavía permanecen asintomáticos (8). Por ello, los índices clínicos como el CDAI (Crohn's disease activity index) presentan una sensibilidad muy baja a la hora de discriminar a los pacientes que pueden presentar una recurrencia.

Múltiples estudios han tratado de establecer cuáles son los factores de riesgo potenciales para el desarrollo de recurrencia en la EC. Entre los factores que han demostrado en la mayoría de los estudios ser predictivos de una recurrencia precoz tras la cirugía se incluyen: el tabaquismo activo, la historia de cirugía intestinal previa (incluyendo apendicectomía), el patrón penetrante de la enfermedad, la afectación perianal y la resección extensa de intestino delgado (7,8). La ausencia de tratamiento profiláctico también se ha asociado con un mayor riesgo de recurrencia, aunque el tema de administrar profilaxis a todos los pacientes tras la cirugía continúa siendo controvertido.

Dado que, como se ha comentado anteriormente, las tasas de recurrencia son muy elevadas y que no disponemos en la actualidad de ningún marcador o índice predictivo validado que nos permita distinguir a la minoría de pacientes que van a permanecer asintomáticos, se tiende a dar tratamiento de forma prácticamente universal a todos los pacientes tras la cirugía. Sin embargo, no tratar puede ser una opción válida en aquellos pacientes considerados de "muy bajo riesgo" de recurrencia según los factores que se expusieron anteriormente (9).

La monitorización clínica no constituye un método fiable en estos pacientes para la evaluación de la recurrencia, ya que determinados síntomas en el contexto postoperatorio (como la diarrea secundaria a malabsorción de sales biliares, sobrecrecimiento bacteriano, o a un síndrome de intestino corto tras resección intestinal extensa), pueden interpretarse de forma errónea como una reaparición de la enfermedad. Además, como ya se ha comentado anteriormente, no disponemos hasta el momento de índices clínicos que hayan sido validados en este subgrupo específico de pacientes. El tratamiento de prevención de la recurrencia no está universalmente establecido e incluso se

ha sugerido recientemente realizarlo de forma personalizada (10). Se recomienda revisar endoscópicamente la vertiente ileal de la anastomosis para asegurar el mantenimiento de la curación mucosa o detectar estados de recurrencia que precisen de una intensificación del tratamiento.

La ileocolonoscopia continúa siendo en la actualidad la técnica utilizada para el diagnóstico de la RP, permitiendo definir la presencia y severidad de la recurrencia morfológica, así como predecir el curso clínico postquirúrgico de la enfermedad. Se recomienda realizar una evaluación endoscópica durante el primer año tras la cirugía, siendo fundamental ésta para la toma de decisiones terapéuticas (11). Sin embargo, la ileocolonoscopia es un método costoso e invasivo, y no exento de riesgos. Por ello, sería interesante disponer de marcadores biológicos que fuesen de fácil obtención y que presentasen a su vez una buena correlación con la presencia de lesiones mucosas, permitiéndonos detectar precozmente la recurrencia de la enfermedad de un modo sencillo, menos costoso y no invasivo para el paciente.

Entre los métodos alternativos no invasivos que están siendo evaluados en los últimos años para el diagnóstico de la recurrencia tras la cirugía se encuentran los marcadores fecales, como la calprotectina.

La calprotectina fecal (CPF) es una proteína que está presente en el citoplasma de los neutrófilos y su presencia en las heces es directamente proporcional a la migración de los mismos hacia el tracto intestinal. Tiene la ventaja de poseer una excelente estabilidad en las heces a temperatura ambiente, durante períodos prolongados (de hasta una semana), siendo resistente a la degradación proteolítica. Otra ventaja añadida que presenta este marcador es poder cuantificarse mediante un método de ELISA, sencillo y barato.

La concentración de esta proteína en heces se correlaciona de forma estrecha con el grado de inflamación mucosa, lo que refleja un paralelismo entre los valores de CPF y la actividad de la enfermedad (12). De hecho, se ha sugerido que la normalización de sus valores fecales en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) que reciben tratamiento, es un indicador fiable de que se ha logrado la curación mucosa. Así mismo, otro de los aspectos

más prometedores de este marcador sería su capacidad para predecir la recidiva. De hecho, algunos autores han descrito que concentraciones elevadas de este marcador en heces se asocian con un mayor riesgo de presentar recidiva clínica (13,14).

Sin embargo, la utilidad de los marcadores fecales para la evaluación precoz y no invasiva de la RP no ha sido todavía establecida y se precisan más estudios al respecto que confirmen su verdadera utilidad. Recientemente, los marcadores fecales han mostrado ser superiores al CDAI y a la proteína C reactiva (PCR) en predecir la actividad endoscópica de la enfermedad medida por el CDEIS (Crohn's disease endoscopic index of severity) (15). Sin embargo, aunque hay resultados prometedores al respecto (16,23), el papel de los marcadores fecales inflamatorios no ha sido apropiadamente evaluado hasta el momento en el contexto postquirúrgico, y serían necesarios más estudios que clarifiquen con exactitud la utilidad de la CPF como marcador predictivo de recurrencia en este subgrupo de pacientes.

Nuestro grupo ha verificado que la CPF es un marcador potente de inflamación, pero que presenta como limitación importante el hecho de ser muy inespecífico, habiendo observado que se encuentra elevado inicialmente en todos los pacientes tras una cirugía resectiva. Ello sugiere que su utilidad podría ser dudosa en el contexto de un postoperatorio inmediato, aunque por otra parte, no se ha caracterizado hasta el momento el intervalo de tiempo que tardaría este marcador en normalizarse tras la cirugía, y si, posteriormente, podría volver a ser de utilidad como marcador predictivo de actividad de la enfermedad.

Por otro lado, el importante papel que parece jugar la inmunología en el desarrollo de la enfermedad, así como sus posibles implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas, ha abierto nuevas y prometedoras vías de investigación en este campo.

A este respecto, las evidencias sugieren que la enfermedad acontece en sujetos genéticamente predispuestos como resultado de una compleja interacción entre factores genéticos, ambientales e inmunológicos. Dentro de



esta etiología multifactorial, la inadecuada activación del sistema inmune de la mucosa intestinal en respuesta a un factor intraluminal (probablemente la propia flora intestinal) parece tener un papel preponderante en la patogenia de la enfermedad (17). A pesar de que esta pérdida de tolerancia inmune hacia antígenos normalmente contenidos en la luz intestinal representa una característica común entre la EC y la colitis ulcerosa (CU), estas entidades difieren en sus características y evolución natural de la respuesta inmune. A nivel de la lámina propia de la mucosa intestinal de los pacientes con EC se sabe que predominan los linfocitos CD4+ con un fenotipo predominantemente Th1, asociado a la producción de un determinado perfil de citoquinas (IL-2, IL-12, IFN-g, TNF-a), importantes mediadores responsables de la respuesta celular de la inmunidad (16).

Recientemente se ha descrito otra vía de respuesta inmunológica efectora CD4+ Th, el eje IL-23/Th17, que parece jugar un papel fundamental en numerosas enfermedades inflamatorias crónicas, incluyendo la EII (18). Están comenzando a conocerse las relaciones entre los genes implicados en la respuesta IL-23/Th17 y la regulación de la homeostasis intestinal. La IL-23 interviene en la línea celular CD4+ Th17, caracterizada por la secreción de IL-17 y la expresión del factor de transcripción ROR (retinoic acid-related orphan receptor) así como de otras células inmunes y no inmunes. La relación entre las células T efectoras tales como las Th17 y CD4+ Treg está regulada de forma que su desbalance puede desencadenar inflamación y autoinmunidad.

Hasta la fecha, el perfil de citoquinas que intervienen en la etiopatogenia de la enfermedad y su papel exacto no está perfectamente caracterizado, fundamentalmente porque los estudios realizados han evaluado grupos heterogéneos de pacientes, tanto con relación a la actividad clínica como a los tratamientos administrados. Nuestro grupo ha trabajado en identificar la expresión de citoquinas en sangre periférica de pacientes con EC, sugiriendo que pueda existir un perfil diferente dependiendo del estado de actividad de la enfermedad y que la normalización en la expresión de algunas citoquinas podría coincidir con la curación mucosa puesto que existe un decalaje entre el período de actividad, remisión clínica y remisión endoscópica (estudiada

mediante colonoscopia) (19,20). De acuerdo a los resultados observados en nuestro estudio, el hecho de que exista una permanente sobre/infraexpresión de algunas citoquinas en la EC podría tener implicaciones etiopatogénicas, que a su vez podrían evaluarse como objetivos terapéuticos.

Por otra parte, hasta la fecha no se han caracterizado los patrones de expresión de citoquinas en sangre periférica y en la mucosa de los pacientes con EC intervenidos y se desconoce si puede existir un indicador de la presencia de lesiones intestinales que sea de utilidad en el seguimiento postquirúrgico y manejo terapéutico de la recurrencia en estos pacientes.

### **Hipótesis de trabajo y objetivos del estudio:**

Los pacientes afectos de EC sometidos a una primera resección quirúrgica intestinal suponen un campo experimental para determinar qué citoquinas podrían estar implicadas en la patogenia de la enfermedad. El seguimiento en el tiempo de este subgrupo de pacientes permitirá identificar posibles alteraciones en el patrón de expresión de citoquinas que se correlacionen con el desarrollo de la recurrencia postquirúrgica en la EC.

Así mismo, el seguimiento evolutivo de los valores de la CPF tras la cirugía permitirá determinar el tiempo necesario para su normalización, y si posteriormente vuelve a ser de utilidad en este contexto como marcador predictivo de actividad de la enfermedad. Por otra parte, comparar el comportamiento evolutivo de este marcador fecal con el de parámetros bioquímicos como la PCR o el fibrinógeno, permitirá comprobar si existe una correlación entre ambos tipos de marcadores que pudiera ser de utilidad para su uso conjunto en la práctica clínica, a la hora de interpretar una eventual recurrencia de la enfermedad en estos pacientes.

La caracterización de este tipo de biomarcadores sería de gran utilidad en el seguimiento y planteamiento terapéutico de estos pacientes tras la cirugía, haciendo posible la aplicación de un tratamiento preventivo –quizá más intensivo- sólo en el subgrupo de pacientes que realmente lo precise, con lo que

se evitaría la prescripción de una terapia de mantenimiento generalizada. Otra ventaja de poder estimar con fiabilidad la aparición de la recurrencia es que nos permitiría iniciar el tratamiento más precozmente, con los beneficios teóricos de una mayor y más rápida respuesta (y quizá también con menos efectos adversos).

Con las hipótesis anteriores, los objetivos del estudio fueron:

- Determinar si el patrón de expresión de citoquinas cambia con el tiempo tras la cirugía y estudiar si dichos cambios se correlacionan con la aparición de la recurrencia postquirúrgica.
- Caracterizar si la CPF sería de utilidad como marcador predictivo de estados de recurrencia en este contexto específico postoperatorio y el tiempo necesario tras la cirugía para que su elevación pueda ser atribuible nuevamente a la presencia de actividad y no a la propia manipulación quirúrgica/cicatrización de la anastomosis.
- Comparar el comportamiento evolutivo entre la CPF y parámetros bioquímicos como la PCR y el fibrinógeno, para valorar su posible utilidad conjunta a la hora de interpretar la aparición de recurrencia en estos pacientes.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### **Diseño:**

Estudio en una cohorte seleccionada (pacientes con EC ileal sometidos a una primera resección quirúrgica ileal o ileocolónica), con adquisición prospectiva de variables. Estudio transferencial a la práctica clínica de parámetros derivados de la investigación básica en mecanismos fisiopatogénicos.

### **Sujetos de estudio:**

Para la ejecución del proyecto se seleccionaron todos los pacientes atendidos en nuestro centro (Hospital Universitari i Politècnic la Fe) con el diagnóstico de EC de localización ileal o ileocolónica (L1 y L3), que fueron sometidos a una primera cirugía resectiva entre junio de 2009 y mayo de 2011.

Señalar que, aunque inicialmente se pretendía seleccionar los pacientes con EC ileal o ileocolónica, una vez establecido el protocolo de estudio en nuestro centro en coordinación con el servicio de Cirugía General, se acabaron incluyendo todos los pacientes sometidos a una primera cirugía resectiva, independientemente de la localización de la enfermedad. Así, y dado que se trata de un estudio prospectivo que continúa en la actualidad, podremos realizar futuros análisis por subgrupos una vez dispongamos de un mayor número de pacientes. Hasta el momento se han incluido 36 pacientes en el estudio, de los cuales se han analizado, y se presentan en este proyecto, los datos relativos a los primeros 15 pacientes, cuyo tiempo de seguimiento actualmente es de al menos un año desde la cirugía (detallado en apartado “Resultados”).

En todos los casos los pacientes fueron debidamente informados de los objetivos y metodología del estudio, habiendo firmado previamente el consentimiento preparado para tal fin.

Se diseñó un cuaderno de recogida de datos preparado para el desarrollo del estudio, donde se recogieron las características clínicas, epidemiológicas, analíticas y exploraciones complementarias realizadas, así como otros datos derivados de los protocolos experimentales o que pudieran resultar de interés.

### **Variables analizadas:**

#### 1) Variables analíticas:

Marcadores biológicos de actividad en sangre (PCR, fibrinógeno) y en heces (calprotectina fecal), estudiando su correlación con el resto de variables analizadas en las muestras de plasma de los pacientes, así como su patrón evolutivo en el tiempo.

#### 2) Determinaciones de laboratorio:

Concentraciones de distintas citoquinas (IL-2, IL-6, IL-10, IL1B, IL-12p70, IFN-g y TNF-a) en las muestras de plasma de los pacientes incluidos en el estudio.

### **Recogida y análisis de datos:**

El día previo a la intervención quirúrgica se realizaba a cada paciente una analítica ordinaria (hemograma, bioquímica y hemostasia completas con PCR), y se recogía una muestra de heces para determinación de calprotectina, con la finalidad de disponer de los valores basales pre-quirúrgicos de cada paciente y poder evaluar el perfil evolutivo de los distintos marcadores tras la cirugía.

Así mismo, se procedía a la extracción de sangre periférica del sujeto (tubo con EDTA). Para la separación de las células mononucleares y el plasma, se realizó centrifugación en gradiente de la sangre con Histopaque®, y posterior lisis de los hematíes, conservándose tanto las células como el plasma a -80 °C para las posteriores determinaciones de citoquinas.

Tras la intervención quirúrgica se ha realizado un seguimiento evolutivo de los pacientes, con determinaciones periódicas de las variables expuestas anteriormente (en los meses 1, 3, 6, 9 y 12 post-intervención), con el objetivo de analizar el perfil evolutivo de las mismas y caracterizar los cambios o alteraciones en sus niveles que pudieran acontecer en el curso de una eventual recurrencia durante el seguimiento.

### **Técnicas:**

Las técnicas empleadas para evaluar los parámetros experimentales expuestos fueron:

- Para determinar los niveles de las citoquinas de interés en las muestras de plasma se probó inicialmente con las técnicas habituales de ELISA, y posteriormente también con los kits de ELISA “High sensitivity”, de las casas comerciales Bender y R&D, utilizando el espectrofotómetro Spectra-max Plus (Molecular Devices) para medir la absorbancia (450nm). En ninguno de los dos formatos de la técnica se consiguió la determinación de las citoquinas en la mayoría de las muestras de plasma.
- Por ello, al no ser posible la cuantificación de todas las citoquinas de interés mediante ELISA, y dado que nuestro grupo de trabajo está implementando el uso de la citometría de flujo en nuestro Laboratorio de Investigación en EII, en colaboración con la Unidad de Citometría de la Facultat de Medicina (Universitat de València), se optó por probar protocolos de análisis de fluorescencia utilizando para ello un citómetro modificado: el Luminex 100 IS™, y empleando para la medición el kit de alta sensibilidad Milliplex® Map de Millipore. Con esta técnica si que se ha conseguido determinar las citoquinas en todas las muestras de plasma de pacientes y de controles.

En caso de no haber sido posible su determinación por esta vía, también se había planteado, dentro de la secuencia experimental, recurrir a la medición indirecta de sus niveles mediante la cuantificación del mRNA a través de la técnica de la RT-PCR cuantitativa. Finalmente, gracias a que se pudieron determinar mediante Luminex, no fue necesario recurrir al análisis de las muestras mediante RT-PCR cuantitativo.

### **Análisis estadístico:**

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 15.

Las variables cualitativas se expresaron como frecuencias (n) y porcentajes, y las variables cuantitativas se simplificaron en sus valores promedio y rangos. Se compararon las variables continuas mediante el test *t* de student, y si estas no se ajustaron a la normalidad, mediante el test U de Mann-Whitney. La comparación de medias se realizó mediante un test ANOVA siempre que las características de las variables a comparar permitieran los análisis paramétricos. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p \leq 0.05$ .

## RESULTADOS

Desde Junio de 2009 hasta Mayo de 2011 se intervinieron 36 pacientes con enfermedad de Crohn en nuestro centro. De estos 36 pacientes, y dado que se trata de un estudio prospectivo, se han analizado, y se presentan a continuación, los datos relativos a los primeros 15 pacientes incluidos en el estudio, cuyo tiempo de seguimiento actualmente es mayor, habiendo transcurrido al menos un año desde la cirugía (seguimiento que continúa en la actualidad, habiendo previsto un seguimiento mínimo de dos años desde la intervención). Una de las pacientes reclutadas tuvo que abandonar el estudio por embarazo.

### **- Características basales de los pacientes:**

En la tabla 1 se recogen las características basales clínicas, epidemiológicas y relativas a la enfermedad del subgrupo de pacientes analizados. La mediana de edad fue de 46 años. Casi  $\frac{3}{4}$  partes de los pacientes (un 73,3%) eran varones. Una tercera parte de los pacientes (33,3%) eran fumadores en el momento de la cirugía, y sólo un 13,3% continuaban siendo fumadores activos después de la intervención. La mayoría de los pacientes, un 73,3%, presentaba un tiempo de evolución de la enfermedad inferior a 2 años en el momento de la cirugía.

Con respecto a las características de la enfermedad, y en base a la clasificación de Montreal, la localización más frecuente fue la ileal (L1), en 10 pacientes (66,7%), seguida de la ileocólica (L3), en 4 pacientes (26,7%). Uno de los pacientes presentaba afectación de colon (L2). El patrón de enfermedad más frecuente fue el estenosante (B2), en un 73,3 % de los pacientes, seguido del patrón penetrante (B3), presente en 4 pacientes (26,7%). Tan solo 3 de los pacientes (20%) presentaba además afectación perianal asociada.

En relación al tratamiento, en el momento de la intervención 6 pacientes (40,1%) estaban en tratamiento con corticoides, uno de ellos (6,7%) llevaba tratamiento con aminosalicilatos, 5 pacientes (33,3%) con tiopurinas (concretamente azatioprina), uno con anti-TNF (6,7%), y 2 llevaban doble inmunosupresión (13,3%), consistente en tratamiento combinado de azatioprina e infliximab. Tras la intervención quirúrgica, 13 pacientes iniciaron tratamiento



para prevención de la recurrencia, de los cuales 10 pacientes (66,7%) iniciaron tratamiento con tiopurinas (azatioprina), y 3 pacientes con fármacos biológicos (20%). En 2 pacientes (13,4%) no se pautó inicialmente tratamiento preventivo al ser considerados de bajo riesgo, considerando factores como la edad avanzada, el estatus de no fumador, la localización, extensión y patrón de la enfermedad.

#### **- Características de la intervención quirúrgica:**

En la tabla 2 se recogen las características relativas a la intervención quirúrgica.

En cuanto al tipo de cirugía, el tipo de resección más frecuente fue la ileocecal, realizada en 9 pacientes (60%), seguida de la resección ileal, realizada en 3 pacientes (20%). En 2 de los pacientes se realizó resección ileocólica (13,3%), mientras que en el paciente que presentaba afectación de colon se realizó una hemicolectomía derecha ampliada (6,7%). Se han analizado, y se presentan, los datos relativos al subgrupo de pacientes más homogéneo, con enfermedad de predominio ileal, que fueron sometidos a resección ileal o ileocecal.

Respecto a la indicación de la cirugía, en la gran mayoría de los pacientes (86,7%) fue por estenosis. En uno de los pacientes la indicación fue por fracaso del tratamiento previo (6,7%), y en otro paciente por patrón penetrante de la enfermedad (6,7%).

#### **- Evolución postquirúrgica y evaluación de la recurrencia:**

Ninguno de los pacientes presentó complicaciones en el curso postoperatorio. Durante el seguimiento post-intervención, se realizaron controles clínicos y analíticos en el primer mes tras la cirugía, y posteriormente de forma trimestral hasta el primer año (1, 3, 6, 9 y 12 meses), tal y como se describe detalladamente en el apartado de “material y métodos”.

En los pacientes sin recurrencia clínica durante el seguimiento se evaluó la eventual aparición de recurrencia mediante la realización de una prueba morfológica de control aproximadamente a los 6 meses post-intervención. En los pacientes que presentaron recurrencia clínica durante el seguimiento la

prueba morfológica se solicitó en el momento de aparición de la sintomatología, independientemente de la realizada por el protocolo de estudio.

En cuanto a la prueba morfológica empleada para evaluar la recurrencia, en casi la mitad de los pacientes (7/15) fue la colonoscopia. En aquellos pacientes que prefirieron la realización de entero-RMN a la colonoscopia (8/15) empleamos ésta como prueba morfológica de control. El grado de recurrencia se estableció, en el caso de la colonoscopia, mediante el Índice de Rutgeerts (IR), considerándose recurrencia un  $IR \geq 2$ . El grado de recurrencia en el caso de la entero-RMN se estableció mediante el Índice de MaRIA, considerándose recurrencia un valor  $\geq 7$ .

Durante el período de seguimiento post-intervención se detectó la aparición de recurrencia en 7 de los pacientes (46,7%), de los cuales sólo 2 habían presentado recurrencia clínica que fue confirmada mediante prueba morfológica (bien colonoscopia, bien entero-RMN). Los 5 pacientes restantes permanecían asintomáticos en los controles evolutivos, habiéndose detectado la recurrencia de la enfermedad mediante la prueba morfológica de control.

El intervalo de tiempo (en meses post-intervención) de aparición de la recurrencia en este subgrupo de pacientes osciló entre 5 y 12 meses, con una media de aparición de la recurrencia de 9,14 meses. La distribución en el tiempo de aparición de la recurrencia se expresa en la figura 1.

Del total de los 15 pacientes analizados, 8 (53,3%) no presentaron recurrencia clínica ni morfológica durante el período de seguimiento evaluado.

#### **- Comparación entre los subgrupos de pacientes con y sin recurrencia durante el primer año post-intervención:**

En función de la aparición de recurrencia se dividió a los pacientes en dos subgrupos (recurrencia vs. no recurrencia), para analizar y comparar entre ambos la evolución de las distintas variables recogidas durante el seguimiento (calprotectina fecal, PCR, fibrinógeno y citoquinas de interés).

Se detallan a continuación los resultados obtenidos al comparar ambos subgrupos de pacientes. Los valores están expresados como medias y error estándar.

### **Marcadores fecales: calprotectina**

Se analizó la evolución consecutiva temporal de los valores de calprotectina fecal obtenidos en ambos subgrupos de pacientes, calculando los valores medios de calprotectina previos a la intervención y en los meses posteriores a la cirugía (valores recogidos en la tabla 3). En aquellos pacientes que presentaron recurrencia de la enfermedad antes de los 12 meses post-intervención, y en los que, por tanto, se realizó algún tipo de intervención terapéutica para tratar la recurrencia, los valores de calprotectina fecal obtenidos a partir de ese momento fueron excluidos del análisis del conjunto.

Al comparar el comportamiento de la calprotectina fecal en ambos subgrupos tras la cirugía se apreciaron las siguientes diferencias:

En el subgrupo de pacientes sin recurrencia (NR), los valores presentan una disminución mucho más marcada durante el primer mes post-intervención que en los pacientes con recurrencia (R), manteniéndose más o menos estables en los meses posteriores (con valores en todo momento inferiores a 200 ug/g), aunque sin haber llegado a objetivar la normalización completa de los niveles (<50 ug/g) durante el seguimiento en la muestra de pacientes analizados.

Por otra parte, en el subgrupo R, aunque los valores también disminuyeron significativamente en los primeros 3 meses post-intervención, esta disminución fue mucho menos marcada que en el otro subgrupo, manteniéndose los valores medios por encima del dintel de los 200 ug/g durante todo el período de seguimiento, y con tendencia al alza a partir de los 6 meses post-intervención. Además, se aprecia un mayor aumento de sus valores a los 12 meses post-intervención en comparación con el otro subgrupo, diferencias que resultaron estadísticamente significativas.

## Marcadores serológicos: PCR y fibrinógeno

Con respecto a la evolución temporal de los marcadores serológicos analizados, se apreciaron las siguientes diferencias significativas en ambos subgrupos de pacientes:

### - **PCR:**

Partiendo de valores elevados en ambos subgrupos en el momento pre-intervención, se aprecia una mayor disminución al primer mes tras la cirugía en el subgrupo NR en comparación con el otro subgrupo (diferencia estadísticamente significativa), manteniéndose los valores dentro de los límites normales (<8 mg/l) durante todo el período de seguimiento (valores recogidos en la tabla 4).

En el subgrupo R los valores presentaron fluctuaciones durante el seguimiento, y aunque globalmente se mostraron más elevados que en el otro subgrupo, y se apreció un mayor incremento a los 6 meses post-intervención, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos subgrupos que pudieran correlacionarse con la aparición de la recurrencia ( $p=0.126$ ).

### - **Fibrinógeno:**

Al analizar la evolución de sus valores tras la cirugía, y partiendo también de valores elevados en ambos subgrupos en el momento 0 (pre-intervención), destaca una marcada disminución al primer mes tras la cirugía en el subgrupo NR en comparación con el otro subgrupo (diferencia estadísticamente significativa,  $p<0.05$ ), manteniéndose en rango normal a partir de ese momento (<435 mg/dl) y durante todo el período de seguimiento (valores recogidos en la tabla 4).

Los valores medios obtenidos en el subgrupo R se mantuvieron globalmente más elevados que en el otro subgrupo durante todo el período de seguimiento, presentando un mayor aumento entre los 6 y los 9 meses post-intervención respecto al subgrupo NR (diferencias que fueron estadísticamente significativas,  $p<0.05$ ).

## Citoquinas

Se determinaron los valores en plasma de las citoquinas de interés (IL1B, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF-a e IFN-g) y se analizaron los patrones evolutivos de cada una de ellas tras la cirugía, comparando los niveles obtenidos en ambos subgrupos de pacientes entre sí, y con los obtenidos en el grupo control. Los valores están expresados en medias y error estándar de la media. A continuación se exponen los resultados obtenidos para cada una de las distintas citoquinas analizadas (representados al final en las figuras 5-11):

- **IL-1B:** (Figura 5)

Respecto a los resultados obtenidos con la IL-1B el hallazgo más significativo fue que, en el subgrupo de pacientes que presentaron recurrencia (R), se apreció un notable aumento de sus niveles, estadísticamente significativo, a los 6 meses post-intervención (30.13 +/- 8.7), respecto al subgrupo de pacientes sin recurrencia (NR) (8.19 +/- 1.64).

Destacar también que ambos subgrupos presentaban niveles elevados al año post-intervención.

- **IL-2:** (Figura 6)

Al analizar los niveles de IL-2 se aprecian fluctuaciones continuas de sus niveles a lo largo de todo el período de seguimiento, destacando sobre todo las tendencias opuestas observadas en ambos grupos.

Así, en el subgrupo R, se detectan niveles pre-quirúrgicos de IL-2 más elevados que en el subgrupo NR (20.18 +/- 5.09 vs. 10.25 +/- 4.71), presentando una marcada disminución de los mismos al primer y tercer mes post-intervención. Posteriormente, a los 6 meses post-intervención, se observa de nuevo un marcado aumento de los niveles en comparación con el otro subgrupo (22.93 +/- 5.18 vs. 9.14 +/- 1.24), aunque estas diferencias no llegaron a alcanzar la significación estadística ( $p=0.09$ ).

En cambio, en el subgrupo NR, se observa un aumento inicial de los niveles al primer mes post-intervención, con tendencia a disminuir

posteriormente de forma progresiva en los meses posteriores, hasta alcanzar los valores normales.

Destacar que ambos subgrupos presentaban niveles elevados de IL-2 al año post-intervención.

- **IL-6:** (Figura 7)

Respecto a la IL-6 destacar las diferencias observadas entre ambos grupos al primer mes post-intervención, en el que se aprecia una importante disminución de sus niveles en el subgrupo R, frente al subgrupo NR en el que, por el contrario, los niveles aumentan inicialmente tras la cirugía (7.05 +/- 2.14 vs. 17.90 +/- 8.41) ( $p < 0.05$ ).

Posteriormente se observa una disminución progresiva de los niveles en ambos subgrupos hasta los 6 meses post-intervención, momento en el que se aprecia un aumento de los niveles en el subgrupo R.

Destacar que, también en este caso, ambos subgrupos presentaban niveles elevados a los 12 meses post-intervención.

- **IL-10:** (Figura 8)

A pesar de que los niveles se mantienen elevados en ambos subgrupos, se apreciaron diferencias en la evolución de los mismos tras la cirugía. Así, en el subgrupo NR los niveles tienden a mantenerse relativamente estables a lo largo del tiempo, mientras que en el subgrupo R los niveles presentaron fluctuaciones importantes, con una disminución progresiva de los niveles en los 3 primeros meses post-intervención, y un llamativo aumento posterior a los 6 meses (89.1 +/- 22.8 vs. 47.8 +/- 8.7) aunque sin llegar a alcanzar la significación estadística ( $p = 0.46$ ).

- **TNF-a:** (Figura 9)

Al comparar los niveles en ambos subgrupos se apreció un comportamiento similar al de la IL-1B, presentando un aumento importante de sus niveles a los 6 meses post-intervención en el subgrupo R (35.3 +/- 7.5), frente al subgrupo NR (13.65 +/- 3.62), y al grupo control (23.56 +/- 9.65).

Paralelamente a lo observado en las anteriores, ambos subgrupos presentaban niveles elevados de TNF-a al año post-intervención.

- **IFN-g:** (Figura 10)

En el subgrupo NR se observó un aumento de los niveles en el primer mes post-intervención (44.03 +/- 18.19), con un descenso progresivo posterior hasta su normalización a los 6 meses, y una tendencia a equipararse a los valores control (23.23 +/- 10.57) entorno al año de la intervención.

En el subgrupo R, por el contrario, los niveles se mantenían similares a los controles en los primeros 3 meses post-intervención (24.73 +/- 7.33), presentando un significativo aumento posterior a los 6 meses tras la cirugía (71.18 +/- 17.77) ( $p < 0.01$ ).

- **IL-12p70:** (Figura 11)

En ambos subgrupos se aprecia una disminución de sus valores en los primeros 3 meses tras la intervención. Posteriormente, en el subgrupo R se observa un aumento posterior a los 6 meses respecto al otro subgrupo, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Destacar también que, al igual que en el resto de citoquinas, se aprecia un aumento de sus niveles en ambos subgrupos al año post-intervención.

## DISCUSIÓN

La enfermedad de Crohn (EC) es una patología de curso crónico, recidivante, y que precisa con frecuencia de tratamiento quirúrgico a lo largo de su evolución. Dado que la resección quirúrgica no es curativa, la recurrencia postquirúrgica (RP) de la enfermedad es prácticamente la norma en estos pacientes, y suele producirse en un alto porcentaje durante el primer año tras la cirugía (porcentaje que oscila entre el 20 y el 80% en los diferentes estudios, según los criterios diagnósticos utilizados), aumentando de forma progresiva con el tiempo de seguimiento (1-5). En nuestro estudio, aproximadamente la mitad de los pacientes (46,7%) presentaron recurrencia durante el primer año tras la cirugía, con una distribución variable de aparición en el tiempo, comprendida entre los 5 y los 12 meses post-intervención.

En la actualidad no disponemos de una pauta terapéutica eficaz establecida para su prevención, y aunque la tendencia actual es a instaurar tratamiento preventivo de la recurrencia tras la intervención, algunos autores propugnan el seguimiento estrecho, clínico y endoscópico, como una alternativa válida en los pacientes considerados de muy bajo riesgo, instaurando el tratamiento precozmente si se produce la recurrencia endoscópica.

Aunque, hasta la fecha, la ileocolonoscopia continúa siendo el patrón “oro” en la evaluación de la RP, recientemente se están evaluando técnicas alternativas que ofrezcan la posibilidad de detectar precozmente la recurrencia de un modo no invasivo, permitiendo aplicar el tratamiento más adecuado en cada momento de forma individualizada.

Entre los métodos alternativos no invasivos que podrían ser de gran utilidad en la práctica clínica se encuentran los marcadores biológicos de inflamación intestinal (fecales y serológicos), aunque existen pocos estudios hasta la fecha que evalúen la utilidad de estos marcadores para detectar la RP en la EC. En relación a los marcadores fecales como la calprotectina, en un estudio realizado en 50 pacientes para detectar RP endoscópica al año de la intervención se observó que niveles por encima de 200 mg/L a los 3 meses tras la cirugía muestran una sensibilidad del 63% y una especificidad del 75%, estimándose que este punto de corte podría utilizarse para indicar una



endoscopia en estos pacientes (15), aunque hay resultados contradictorios al respecto, ya que Scarpa y cols. observaron posteriormente que la calprotectina fecal se mantenía elevada a largo plazo en los pacientes intervenidos, independientemente de la existencia o no de recurrencia clínica posterior durante el seguimiento (25).

Sin embargo, en un estudio más reciente, Lamb y cols. observaron que los marcadores fecales, tanto la calprotectina como la lactoferrina, se normalizan en los dos primeros meses tras la cirugía (en el curso de un postoperatorio sin complicaciones), elevándose posteriormente en aquellos pacientes en los que reaparece la actividad inflamatoria, y permitiendo por tanto discriminar, en los pacientes sintomáticos, la presencia de recurrencia de la enfermedad. Además, ambos marcadores fecales presentaron una mejor correlación con la actividad clínica de la enfermedad (evaluada mediante el índice de Harvey-Bradshaw), que otros parámetros como la proteína C reactiva (PCR) o el recuento plaquetario (23).

En el presente estudio, a pesar de que los valores de calprotectina se mantenían siempre elevados tras la cirugía, sin haberse llegado a objetivar la completa normalización de los mismos, observamos dos aspectos relevantes en su evolución: por un lado, que los valores se mantuvieron globalmente más elevados en el subgrupo de pacientes con recurrencia frente al otro subgrupo, y por otra parte, que se apreció una tendencia al aumento a partir de los 5-6 meses post-intervención en el subgrupo de pacientes con recurrencia, que fue mayor a los 12 meses tras la cirugía, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Esta tendencia se interpreta como confirmatoria de la recurrencia en estos pacientes, considerando siempre que se trata de resultados preliminares, que esperamos se confirmen posteriormente al analizar un mayor número de pacientes.

Por otra parte, en relación a los marcadores serológicos de inflamación intestinal, hasta el momento se han utilizado en este contexto la proteína C reactiva (PCR) y la velocidad de sedimentación globular, presentando niveles elevados en los pacientes con RP endoscópica (26), pero dado su carácter inespecífico, su utilidad de forma aislada sería discutible. En el citado estudio de Lamb y cols. se observó que existía una pobre correlación entre la PCR y la

actividad clínica de la enfermedad (evaluada mediante el índice de Harvey-Bradshaw) en los pacientes con recurrencia sintomática de la enfermedad.

En nuestro estudio, comparando la evolución de los parámetros bioquímicos analizados (PCR y fibrinógeno), se aprecia una mayor elevación de los valores de fibrinógeno en el subgrupo de pacientes con recurrencia entre los 6 y los 9 meses post-intervención, siendo estas diferencias entre ambos subgrupos estadísticamente significativas. En cambio, los resultados obtenidos con la PCR no permitieron encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ambos subgrupos que pudieran correlacionarse con la aparición de la recurrencia. Todo ello sugiere que, a pesar de la utilidad que tiene la PCR en la práctica clínica habitual como marcador de actividad en los pacientes con enfermedad establecida, probablemente el fibrinógeno sea más útil que la PCR en el contexto postquirúrgico para predecir la aparición de recurrencia, dato que habrá que validar en estudios posteriores.

En el presente proyecto se analiza también el perfil evolutivo de diversas citoquinas, seleccionadas en base al patrón predominante en la EC, donde el perfil característico (y particularmente en estadios precoces de la enfermedad) es de tipo Th1, con producción de altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1B, IL-12, IL-6 e IFN- $\gamma$ . Por otro lado, hemos analizado también el perfil de otras citoquinas de carácter opuesto, por su actividad anti-inflamatoria e importante papel inmunorregulador de la respuesta inflamatoria, como son la IL-10 y la IL-2 (27,28).

En esta misma línea, nuestro grupo ya ha trabajado anteriormente en identificar la expresión de citoquinas en sangre periférica de pacientes con EC, sugiriendo que pueda existir un perfil diferente dependiendo del estado de actividad de la enfermedad (19,20). En consonancia con otros trabajos publicados (28,29) nuestro grupo ha confirmado que existe un incremento en la producción de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-6 en los pacientes con EC, tanto en mucosa como en sangre periférica, que se correlaciona con la actividad inflamatoria de la enfermedad. Hemos observado que la expresión de IFN- $\gamma$  disminuye en los pacientes en remisión, permaneciendo en valores normales en los períodos de inactividad de la enfermedad, resultados que son concordantes a su vez con los de otros trabajos previos (27,32). En contraste con el TNF- $\alpha$ , la IL-12 y el IFN- $\gamma$ , hemos observado que existe una

sobreexpresión de IL-6 en los pacientes con EC, en los que ésta se encuentra permanentemente aumentada en comparación con los controles sanos, independientemente de la actividad de la enfermedad.

En el presente estudio, en consonancia con lo referido en los trabajos previos, todos los pacientes presentaban niveles incrementados de TNF-a, IFN-g e IL-6 antes de la cirugía, resultados que apoyan la producción de citoquinas de tipo Th1 en estos pacientes. Los niveles de IFN-g tienden a normalizarse con el tiempo tras la cirugía, observación concordante también con los resultados previos expuestos anteriormente, considerando que tras la cirugía (y hasta el momento de aparición de la recurrencia) los pacientes no presentan enfermedad activa. Posteriormente, se observa un aumento importante de sus valores, estadísticamente significativo, a los 6 meses post-intervención en aquellos pacientes que recurren, lo que sugiere que esta citoquina podría resultar útil para detectar a los pacientes que están desarrollando recurrencia de la enfermedad.

Con respecto a la IL-6, los resultados del presente estudio también apoyan los previamente publicados en la literatura, dado que permanece elevada de forma permanente en ambos subgrupos de pacientes, independientemente de la aparición de recurrencia, sin haber objetivado su normalización en ningún momento durante el período de seguimiento. No obstante, dentro de esta elevación permanente observada durante el seguimiento, se aprecia un mayor aumento a partir del sexto mes tras la cirugía en el subgrupo de pacientes que desarrollan recurrencia, lo que sugiere el importante papel que esta citoquina debe desempeñar tanto en promover como en perpetuar la respuesta inflamatoria.

La IL-1B es otra citoquina con acción pro-inflamatoria, tanto a nivel local como sistémico, producida principalmente por los granulocitos y macrófagos de la lámina propia, y que comparte muchos efectos con el TNF-a (30). El perfil de sus niveles observado en el presente proyecto es concordante con los que presenta el TNF-a, presentando una disminución inicial tras la cirugía, y presentando un aumento significativo posterior en el subgrupo de pacientes con recurrencia en comparación con el otro subgrupo, diferencias que fueron estadísticamente significativas y que, paralelamente a lo que sucede con el

IFN-g, sugieren que la IL-1B también podría resultar de utilidad para predecir la aparición de recurrencia en estos pacientes.

Otro aspecto llamativo al analizar los resultados del presente estudio, es el hallazgo de que todos los pacientes (tanto los que presentaron recurrencia durante el seguimiento como los pertenecientes al subgrupo sin recurrencia), e independientemente de la evolución consecutiva temporal de los valores tras la cirugía, presentaban niveles elevados de las citoquinas analizadas al año post-intervención, lo que sugiere el papel etiopatogénico importante que este perfil de citoquinas desempeña en el desarrollo de la enfermedad. El hecho de que estos niveles elevados se observen en ambos subgrupos (también en los pacientes que no presentaron recurrencia), se interpreta como secundario al decalaje que presumiblemente existe entre la aparición de actividad inflamatoria a nivel de la mucosa intestinal, y la aparición de la clínica y las lesiones endoscópicas, de forma que el aumento de sus niveles en plasma pueda preceder en el tiempo al desarrollo de la actividad clínica y endoscópica de la enfermedad. Esta conclusión se basa también en los resultados previos obtenidos por nuestro grupo de trabajo y referidos anteriormente (19,20). Dado que se presentan los resultados preliminares de un estudio prospectivo, el seguimiento en el tiempo de los pacientes pertenecientes al subgrupo sin recurrencia permitirá confirmar esta interpretación, comprobando la correlación entre este aumento y el desarrollo posterior de RP.

Con respecto a las citoquinas inmunorreguladoras, se ha visto que tanto la expresión de IL-10 como de IL-2 se encuentra disminuida en las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con EC en comparación con controles sanos (33,34). De manera similar, ambas citoquinas desarrollan un papel importante en el control de la respuesta inmune. La IL-10 es una citoquina anti-inflamatoria característica de la respuesta inmune de tipo Th2, que regula la proliferación de las células Th1 y la función de células presentadoras de antígenos como las células dendríticas, atenuando la respuesta inflamatoria de la mucosa. La IL-2, de manera similar, ejerce un papel regulador importante, controlando la proliferación y diferenciación de células T efectoras como las CD4+ Th17 y CD4+ Treg. La IL-2 es capaz de inhibir la diferenciación y proliferación de las células Th17, disminuyendo por tanto los niveles de IL-17, mientras que por otra parte promueve la expansión

clonal de las células Treg, importantes en el proceso de reconocimiento de los antígenos propios para evitar fenómenos de autoinmunidad y permitir la tolerancia inmune (27,35). De acuerdo con los resultados previos de nuestro grupo de trabajo, y acordes con los publicados por otros grupos, se ha observado que existe una infraexpresión de IL-10 e IL-2 en los pacientes con EC, lo que sugiere que existe un desequilibrio entre los distintos subtipos de células T, favoreciendo una respuesta inmune exacerbada mediada por las Th17 y Th1.

Los resultados obtenidos en el presente estudio en relación con las IL 10 y 2 son contradictorios. Por un lado, se observa que sus niveles en plasma disminuyen inicialmente tras la cirugía en el subgrupo de pacientes que presentaron recurrencia durante el seguimiento, acorde con la infraexpresión referida anteriormente en otros trabajos, pero por otra parte se aprecia un aumento posterior a los 6 meses post-intervención en este subgrupo de pacientes, en contra de lo que cabría esperar al reaparecer la actividad inflamatoria de la enfermedad. Dicho aumento se observa sólo en un subgrupo de los pacientes que recurren, pudiendo ser debido bien a un error metodológico, o bien a una característica patogénica propia de estos pacientes, lo cual queda por estudiar.

## CONCLUSIONES

La recurrencia de la enfermedad de Crohn tras la cirugía es relativamente frecuente ( $\approx 50\%$  de los pacientes intervenidos en nuestro estudio). Disponer de marcadores biológicos que nos ayuden a identificar el 50% restante de pacientes que no van a recurrir tras la cirugía sería de gran utilidad en la práctica clínica diaria para realizar un manejo terapéutico individualizado, haciendo posible la aplicación de un tratamiento preventivo, quizá más intensivo, sólo en el subgrupo de pacientes que realmente lo precise, evitando la prescripción de una terapia de mantenimiento generalizada.

Además, disponer de un compendio de parámetros fiable que permita identificar a los pacientes que van a presentar recurrencia de la enfermedad sería también de mucha utilidad para evitar la realización de exploraciones invasivas y costosas.

En este contexto, y de acuerdo con nuestros resultados, marcadores fecales y serológicos como la calprotectina fecal y el fibrinógeno (+/- la PCR), en conjunto con la medición de citoquinas como la IL-1B y el IFN-g, podrían conformar un panel de parámetros predictivos de recurrencia, útiles para detectar a los pacientes que van a presentar recurrencia de la enfermedad tras la intervención. Serían necesarios más estudios posteriores que permitan validar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de dicho panel de marcadores.

Por otra parte, el incremento de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF-a, IFN-g, IL-1B e IL-6, y la disminución de citoquinas de carácter opuesto, con acción anti-inflamatoria e inmunorreguladora, como IL-10 e IL-2, podría tener una implicación patogénica importante en el desequilibrio de la homeostasis inmune que acontece en el desarrollo de la actividad inflamatoria de la enfermedad. Dado que nuestros resultados sugieren un perfil similar de citoquinas tanto en la mucosa como en el plasma de los pacientes afectados, la monitorización en plasma de las citoquinas implicadas al inicio de la enfermedad podría ser de utilidad para detectar de un modo sencillo y precoz el desarrollo de la RP en los pacientes intervenidos.

## TABLAS Y GRÁFICOS

Tabla 1: Características basales de los pacientes

	n=15
Edad (años)*	46 (17-74)
Sexo ratio (H:M)	11:04
Sexo (% hombres)	73,30%
Tiempo de evolución <2 años hasta la cirugía	11 (73,3%)
Estatus tabaquismo (pre-cirugía):	
• Exfumador	2 (13,3%)
• Fumador	5 (33,3%)
• No fumador	8 (53,3%)
Localización de la enfermedad:	
• Ileal (L1)	10 (66,7%)
• Ileocólica (L3)	4 (26,7%)
• Cólica (L2)	1 (6,7%)
Patrón de enfermedad:	
• Estenosante (B2)	11 (73,3 %)
• Penetrante (B3)	4 (26,7%)
• Enfermedad perianal asociada	3 (20%)
Tratamiento (pre-cirugía):	
• Aminosalicilatos	1 (6,7%)
• Corticosteroides	6 (40,1%)
• Azatioprina	5 (33,3%)
• Anti-TNF	1 (6,7%)
• Doble inmunosupresión	2 (13,3%)
Tratamiento (post-cirugía):	
• Azatioprina	10 (66,7%)
• Anti-TNF	3 (20%)
• No tratamiento	2 (13,4%)
Prueba morfológica de control (6-12m post-cirugía):	
• Recurrencia	7 (46,7%)
• No recurrencia	8 (53,3%)

\*Mediana (rango).

Tabla 2: Características relativas a la intervención

	n=15
Indicación de la cirugía:	
• Estenosis	13 (86,7%)
• Fracaso del tratamiento	1 (6,7%)
• Patrón penetrante	1 (6,7%)
Tipo de resección:	
• Ileal	3 (20%)
• Ileocecal	9 (60%)
• Ileocólica	2 (13,3%)
• Hemicolectomía	1 (6,7%)

Tabla 3. Evolución de los valores de calprotectina fecal

Tiempo post-cirugía (meses)	Pacientes con recurrencia (n=7)	Pacientes sin recurrencia (n=8)
0	534.5 (125.4)	650.9 (212.7)
1	491.4 (173)	191.8 (39.13)
3	267 (80.86)	164.9 (27.55)
6	362.6 (136.1)	99.6 (44.38)
9	222.3 (45.18)	129.20 (25.13)
12	571.8 (131.80)	119.2 (32.00)

Valores expresados como medias (error estándar).



Tabla 4. Evolución de los valores de PCR y fibrinógeno

Tiempo post-cirugía (meses)	Pacientes con recurrencia (n=7)		Pacientes sin recurrencia (n=8)	
	PCR	Fib	PCR	Fib
0	20.35 (10.29)	452 (30.29)	35.36 (16.47)	495.4 (60.95)
1	14.02 (4.41)	500.3 (28.80)	1.72 (0.29)	336.5 (30.76)
3	4.46 (1.41)	422.6 (38.90)	2 (0.57)	288 (18.97)
6	12.86 (5.35)	441.2 (55.10)	2.1 (0.44)	353.4 (33.40)
9	3.76 (1.53)	506.5 (70.62)	2.32 (0.52)	328 (20.79)
12	5.8 (1.93)	433.3 (30.77)	2.5 (0.71)	355.2 (24.04)

Valores expresados como medias (error estándar).

Figura 1. Distribución en el tiempo de aparición de la recurrencia.

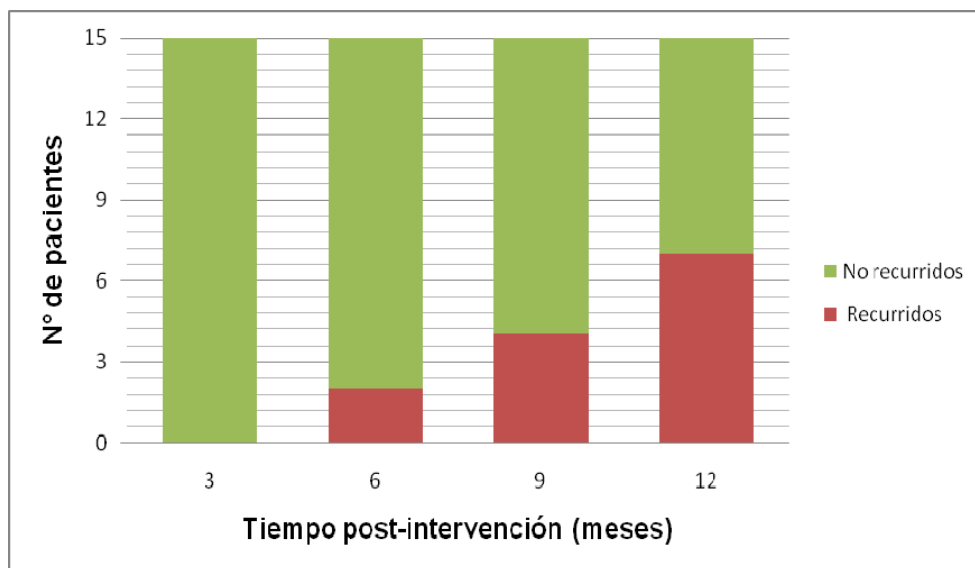
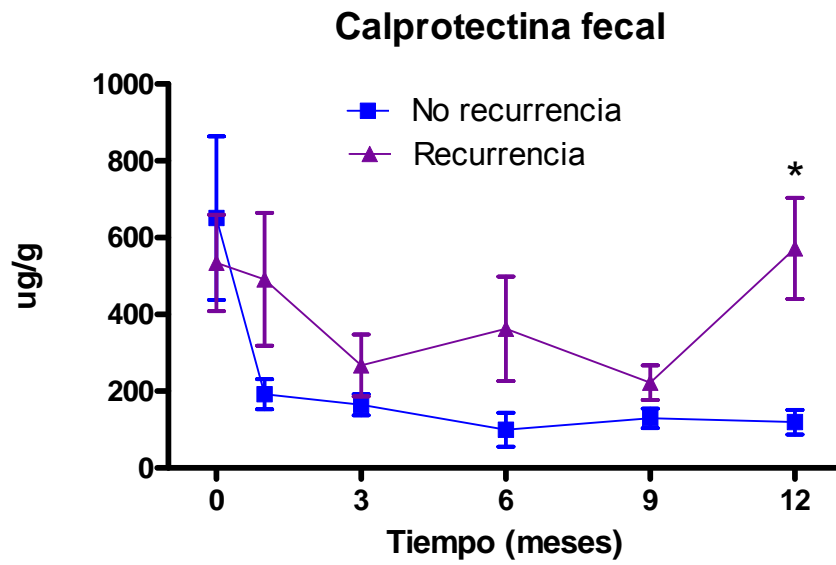
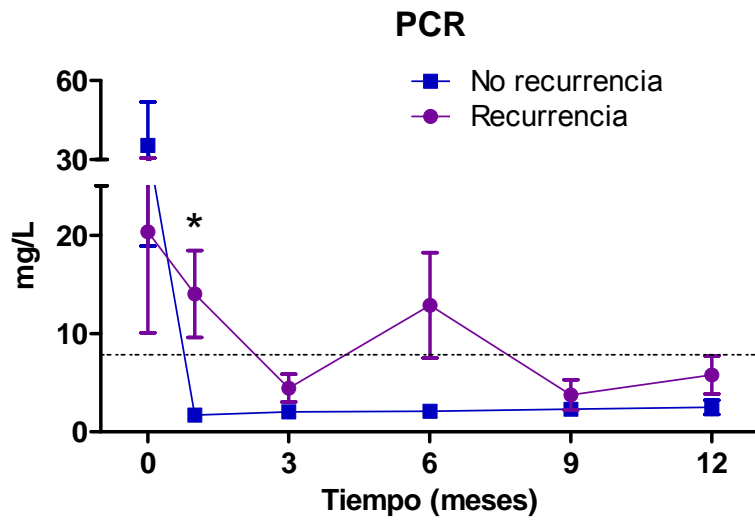


Figura 2. Evolución temporal de la calprotectina fecal en ambos subgrupos (recurrencia vs. no recurrencia).

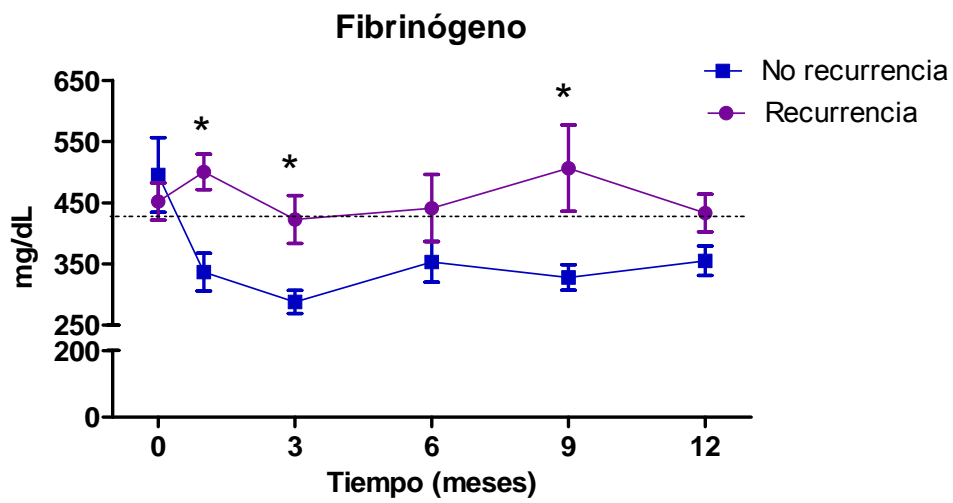


\*  $p < 0.05$

Figuras 3 y 4. Evolución temporal de la PCR y el fibrinógeno en ambos subgrupos (recurrencia vs. no recurrencia).

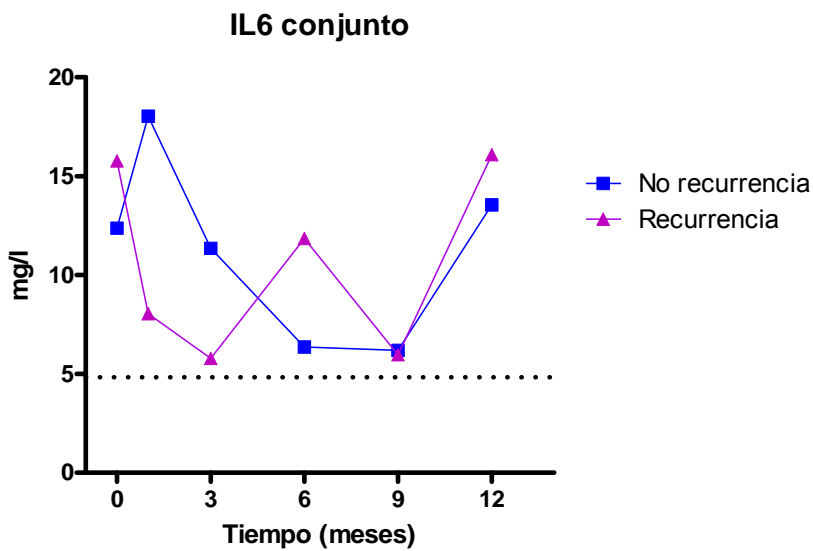
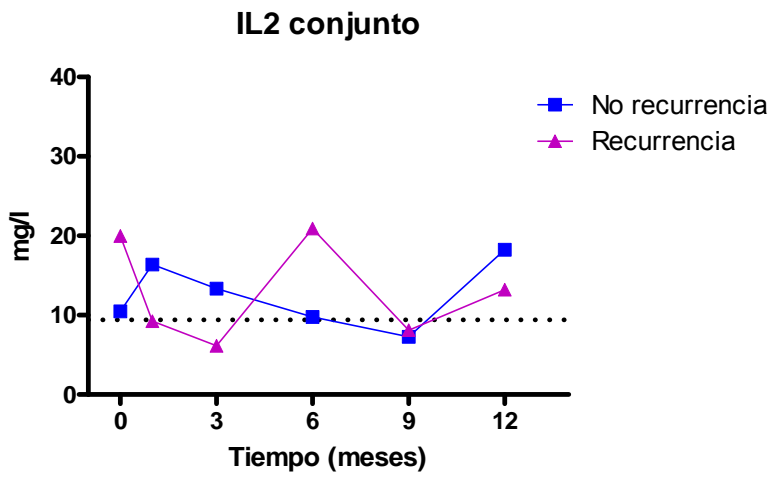
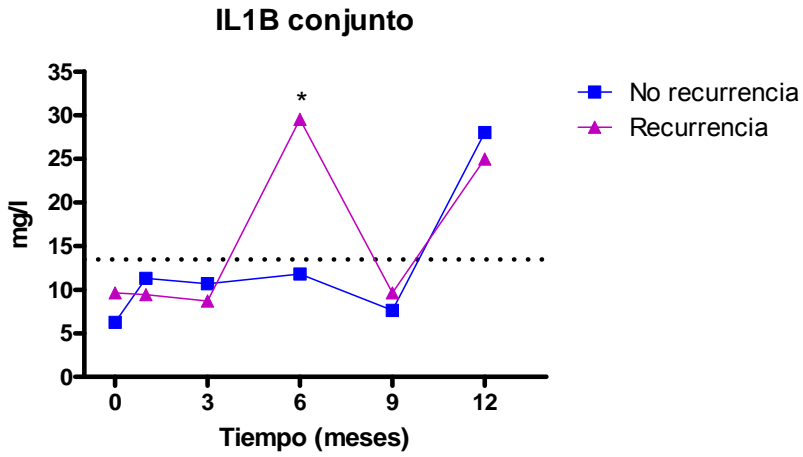


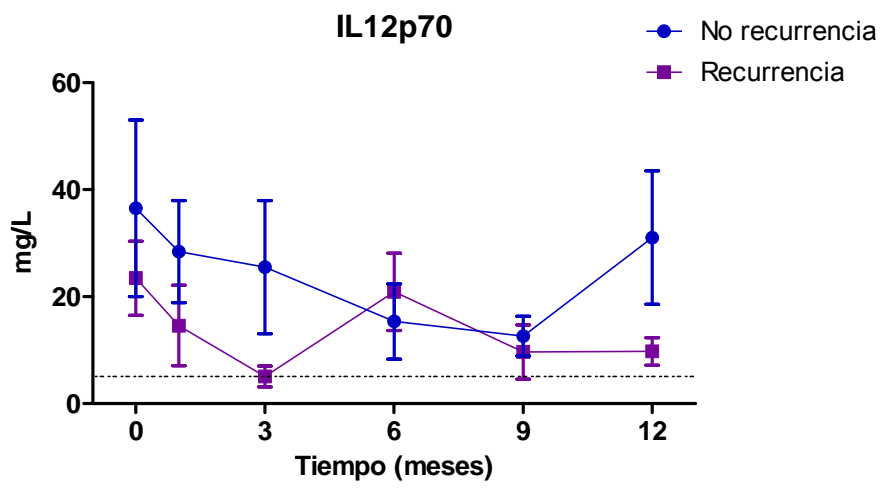
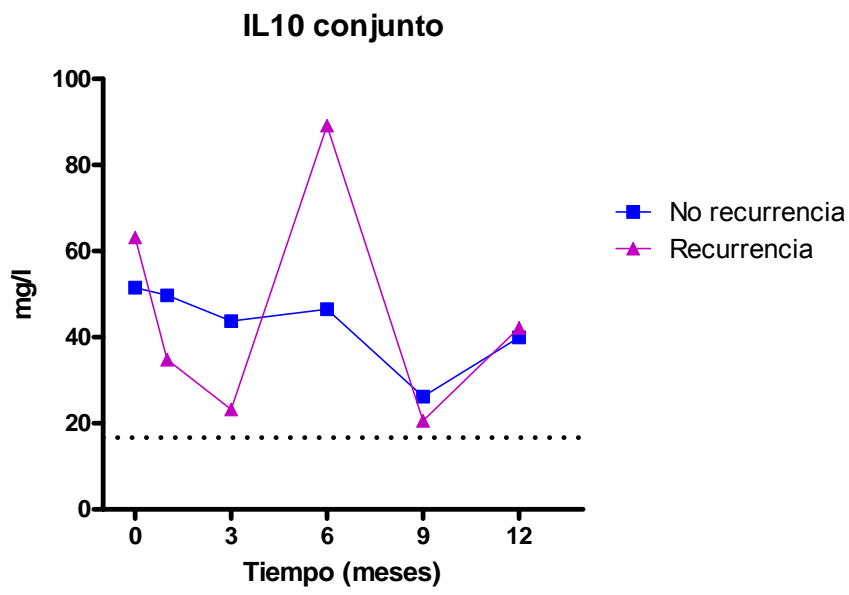
\*  $P < 0.05$

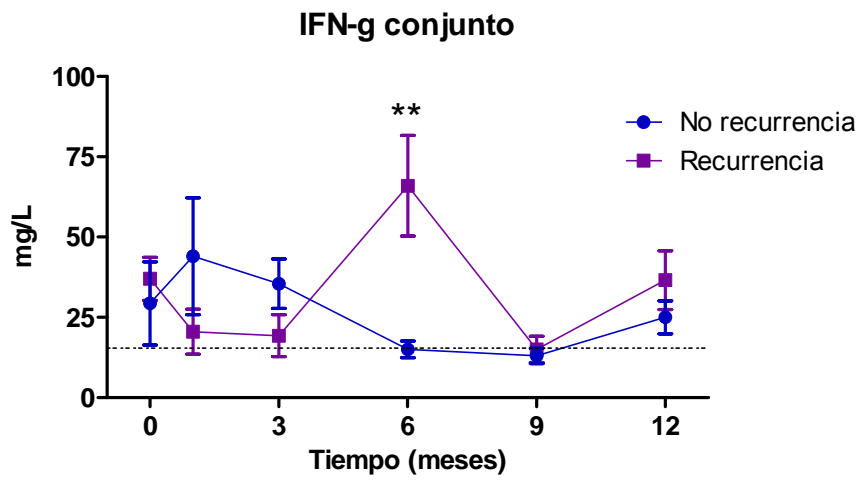
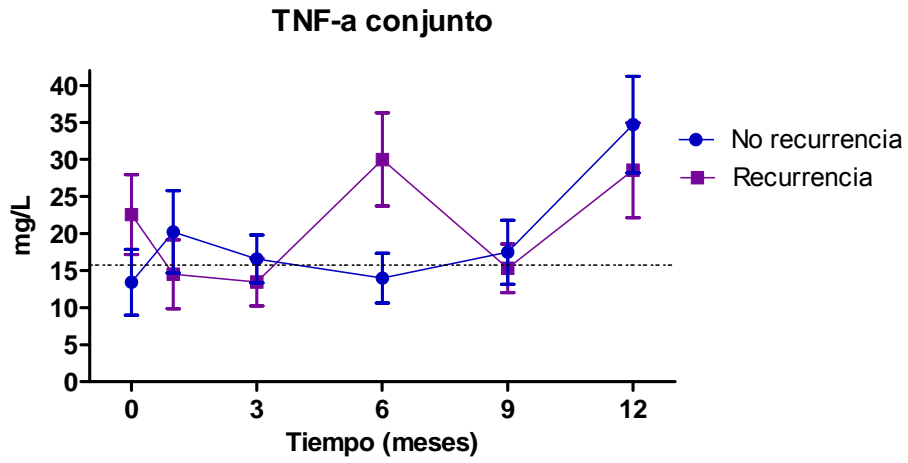


\*  $P < 0.05$

Figuras 5-11. Evolución temporal de las diversas citoquinas en ambos subgrupos (recurrencia vs. no recurrencia). La línea punteada representa el grupo control.







\*\* P<0.01

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Caprilli R, Gassull MA, Escher JC et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: special situations. *Gut* 2006; 55 Suppl 1:i36-i58.
- (2) G. Van Assche et al. The second European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *JCC* 2010; 4: 7-27.(2) Ng SC, Kamm MA. Management of postoperative Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1029-35.
- (3) Terdiman JP. Prevention of postoperative recurrence in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 616-20.
- (4) Rutgeerts P, Geboes K , Vantrappen G et al. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease . *Gastroenterol* 1990; 99: 956-63.
- (5) Olaison G, Smedh K , Sjodahl R . Natural course of Crohn's disease after ileocolic resection: endoscopically visualised ileal ulcers preceding symptoms. *Gut* 1992; 33: 331-5.
- (6) Rutgeerts P. Protagonist: Crohn's disease recurrence can be prevented after ileal resection. *Gut* 2002; 51: 152-153.
- (7) Ryan WR et al. Crohn's disease patients who quit smoking have a reduced risk of reoperation for recurrence. *Am J Surg* 2004; 187: 219-25.
- (8) Onali S et al. Frequency, pattern, and risk factors of postoperative recurrence of Crohn's disease after resection different from ileo-colonic. *J Gastrointest Surg* 2009; 13(2): 246
- (9) G. Van Assche et al. The second European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: special situations. *JCC* 2010; 4: 63-101.
- (10) Bordeianou L et al. Immediate versus tailored prophylaxis to prevent symptomatic recurrences after surgery for ileocecal Crohn's disease? *Surgery*. 2011 Jan;149(1):72-8.
- (11) Tibble JA, Bjarnason I. Fecal calprotectin as an index of intestinal inflammation. *Drugs Today (Barc)*. 2001; 37: 85-96.
- (12) Tibble JA et al. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterol*. 2000; 119: 15-22.
- (13) Costa F et al. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease. *Gut*. 2005; 54: 364-8.

- (14) Sipponen T et al. Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 40-46.
- (15) Orlando A et al. The role of calprotectin in predicting endoscopic post-surgical recurrence in asymptomatic Crohn's disease: a comparison with ultrasound. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2006; 10: 17-22.
- (16) Swidsinski A et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol.* 2002; 122: 44-54.
- (17) Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* 2000; 51: 289-298.
- (18) Hue S et al. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 2006; 203: 2473-2483.
- (19) Beltrán B, Nos P, Iborra M. Cytokines mRNA expression at onset of Crohn's disease: differential patterns in activity, clinical remission and mucosal healing. *JCC* 2008; 2 (1): 89.
- (20) Nos P, Beltrán B, Iborra M et al. Cytokines mRNA expression at onset of ulcerative colitis: differential patterns in activity, clinical remission and mucosal healing. *JCC* 2008; 2 (1): 90.
- (21) Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103(33): 12481-6.
- (22) O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA et al. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med.* 2008; 205(3):585-94.
- (23) Lamb CA et al. Faecal calprotectin or lactoferrin can identify postoperative recurrence in Crohn's disease. *Br J Surg* 2009; 96: 663-674.
- (24) Roseth AG, Aadland E, Grzyb K. Normalization of faecal calprotectin: a predictor of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 1017-1020.
- (25) Scarpa M, D'Inca R, Basso D, et al. Fecal lactoferrin and calprotectina after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 861-9.
- (26) Regueiro M. Management and prevention of postoperative Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009; 15: 1583-90.
- (27) Brand S et al. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* 2009; 58: 1152-1167.



- (28) Sánchez-Muñoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14(27): 4280-4288.
- (29) Fuss IJ, Becker C, Yang Z, et al. Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti IL-12p40 monoclonal antibody. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12(1): 9-15.
- (30) Rugtveit J et al. Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. *Gastroenterol* 1997; 112: 1493-505.
- (31) Ramadori G, Armbrust T. Cytokines in the liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 777-784.
- (32) Heller F et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterol* 2005; 129: 550-564.
- (33) Correa I, Veny M, Esteller M, et al. Defective IL-10 production in severe phenotypes of Crohn's disease. *J Leukoc Biol* 2009; 85: 896-903.
- (34) Raddatz D et al. Quantitative measurement of cytokine mRNA in inflammatory bowel disease: relation to clinical and endoscopic activity and outcome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 547-557.
- (35) Laurence A et al. Interleukin-2 signalling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation." *Immunity* 2007; 26: 371-381.