



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

ESTUDIO DE LA LONGITUD DE LOS TELÓMEROS EN
UNA COHORTE DE PACIENTES CON ENFERMEDAD
INFLAMATORIA INTESTINAL

STUDY OF TELOMERE LENGTH IN A COHORT OF
PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

Autor/es

María Mata Martínez

Director/es

Miguel Ángel Torralba Cabeza

Facultad de Medicina

Curso 2017/2018

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN	6
ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.....	7
1. INTRODUCCIÓN	7
2. EPIDEMIOLOGÍA	7
3. PATOGÉNESIS	8
4. GENÉTICA.....	9
5. ANATOMÍA PATOLÓGICA.....	10
6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	11
7. DIAGNÓSTICO.....	14
8. TRATAMIENTO	16
9. MONITORIZACIÓN Y SEGUIMIENTO.....	19
MARCADORES BIOLÓGICOS DE ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL..	20
MARCADORES SEROLÓGICOS DE INFLAMACIÓN	20
OTROS MARCADORES SEROLÓGICOS.....	21
MARCADORES FECALES DE INFLAMACIÓN.....	21
TELÓMEROS Y TELOMERASA	22
ENFERMEDADES TELOMÉRICAS	23
1. INSUFICIENCIA DE MÉDULA ÓSEA	23
2. DISQUERATOSIS CONGÉNITA	23
3. ANEMIA APLÁSICA ADQUIRIDA.....	23
4. FIBROSIS PULMONAR.....	23
5. ENFERMEDAD HEPÁTICA.....	24
6. CÁNCER.....	24
7. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	25
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	26
OBJETIVOS	27
OBJETIVO PRINCIPAL	27
OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	27
MATERIAL Y MÉTODOS	28
MATERIAL	29
DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	29
PRODUCTOS QUÍMICOS	29
EQUIPOS BÁSICOS	30
MATERIAL DESECHABLE	30

ENZIMAS	31
ÁCIDOS NUCLEICOS Y NUCLEÓTIDOS.....	31
EQUIPO PARA LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	31
MÉTODOS	31
OBTENCIÓN DE LEUCOCITOS.....	31
OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA.....	32
CUANTIFICACION DEL DNA	33
PROTOCOLO AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES.....	34
MEDICIÓN DEL TAMAÑO DE LOS TELÓMEROS	35
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
RESULTADOS.....	38
ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA	39
RESULTADOS OBTENIDOS DE LA LONGITUD DE LOS TELÓMEROS	41
ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	43
DISCUSIÓN	44
APLICABILIDAD DE LA METODOLOGÍA USADA	45
UTILIDAD DE LA MEDICIÓN DE LOS TELÓMEROS EN MONOCITOS EN EII	45
IMPACTO DE NUESTRO ESTUDIO	46
CONSIDERACIONES FINALES	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48
ANEXOS.....	51

RESUMEN

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una entidad crónica de base inmunológica, con una consecuente alteración de la actividad inflamatoria a nivel gastrointestinal. El aumento del estrés oxidativo celular, y la elevada renovación de leucocitos contribuyen al acortamiento acelerado de los telómeros, lo que relaciona a la inflamación con el sistema telómeros-telomerasa. La medición de la longitud de los telómeros en los monocitos de sangre periférica y su correlación con los actuales marcadores de actividad inflamatoria podría suponer una nueva vía en el diagnóstico de pacientes con EII. **Métodos:** se realiza un estudio observacional donde se evalúa la longitud de los telómeros en monocitos de sangre periférica mediante PCR en 10 pacientes diagnosticados de EII en los últimos 6 meses, comparados con 10 controles pareados por edad y género. Se ha correlacionado la longitud de los telómeros con el valor de los biomarcadores actualmente empleados: hemoglobina, albúmina, ferritina, PCR y VSG séricas, y calprotectina fecal. Las medias de la longitud de los telómeros y los coeficientes de correlación han sido calculados mediante SPSS. **Resultados:** se seleccionaron 5 mujeres y 5 varones con Colitis ulcerosa (CU) y Enfermedad de Crohn (EC) de reciente diagnóstico. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas al comparar la longitud de los telómeros con la de 10 controles pareados por edad y género ($p > 0,05$). En el estudio de la correlación entre la longitud telomérica y los marcadores de inflamación, se ha encontrado una correlación débil con las variables estudiadas, siendo esta no estadísticamente significativa ($p > 0,05$). **Conclusiones:** el estudio de la longitud de los telómeros en monocitos de sangre periférica no es un buen marcador diagnóstico en la EII.

Palabras clave: Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), colitis ulcerosa (CU), Enfermedad de Crohn (EC), telómeros, calprotectina fecal, PCR, biomarcadores, actividad inflamatoria.

ABSTRACT

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a chronic immunological-based entity, with a dysregulation of the inflammatory activity affecting the gut. The higher cellular oxidative stress and the faster leukocyte replacement contribute to an accelerated telomere shortening, thus telomere length is related with inflammatory activity. In such circumstances, measuring of telomere length in monocytes of peripheral blood and its correlation with current inflammatory activity biomarkers could represent a new way of diagnosis for patients with IBD. **Methods:** in our observational study, peripheral blood was withdrawn from 10 patients with IBD diagnose since the last 6

months, from where lymphocytes were isolated. Telomere length was measured by PCR technique and compared with 10 age-and-sex matched healthy controls. Telomere length was correlated with current IBD biomarkers values such as: serum haemoglobin, albumin, ferritin, CRP, ESR and faecal calprotectin. Telomere length mean, and correlation coefficients were calculated using SPSS. **Results:** 5 women and 5 men recently diagnosed by ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) were selected. There were no statistically significant differences on telomere length with 10 healthy controls ($p>0,05$). In the study between telomere length and inflammatory biomarkers, a weak correlation on measured values is observed, but it is not statistically significant ($p>0,05$). **Conclusions:** the measurement of telomere length from peripheral blood lymphocytes is not a valid marker for IBD diagnosis.

Key words: inflammatory bowel disease (IBD), ulcerative colitis (UC), Crohn's Disease (CD), telomere length, faecal calprotectin, PCR, biomarkers, inflammatory activity.

INTRODUCCIÓN

ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

1. INTRODUCCIÓN

Bajo el término de Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) se engloba un diverso grupo de patologías crónicas de base inmunológica, caracterizadas por una pérdida de regulación de la función inmunitaria frente a la flora microbiana endógena intestinal en individuos genéticamente susceptibles (1). Las dos entidades más representativas son la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU).

Los primeros casos documentados de CU fueron recogidos en Europa Occidental, durante la segunda mitad del siglo XIX; fue Sir Walker Wilks quien, en el año 1859, publicó el primer caso de una mujer londinense de 42 años, que falleció tras un cuadro de fiebre y diarreas de varios meses de evolución (2). La evolución de la EII ha ido unida al desarrollo de la sociedad. El aumento de la prevalencia e incidencia de CU fue paralelo al avance de la Revolución Industrial en Europa Occidental; el desarrollo industrial produjo un aumento de la urbanización y cambios en la economía, con una transición de la agricultura a las manufacturas como principal sector labora (3).

La incidencia de CU fue creciendo paulatinamente durante el comienzo del siglo XX, al mismo tiempo que aparecieron los primeros casos de ileítis regional, tras la publicación de una serie de casos por Crohn et al. en 1932 (3). Factores como el aumento de la conciencia de enfermedad y mayor acceso a la tecnología médica, el desarrollo de sistemas de seguimiento de enfermedades y la influencia de factores ambientales relacionados con las sociedades industrializadas contribuyeron al gran aumento del número de casos.

La incidencia de EII en Norte América y Europa, fue estabilizándose hacia mediados y finales del siglo XX para CU y EC, respectivamente (4). Hacia el final del siglo XX, el inicio de la globalización hizo que ciertos países de Asia, Oriente Medio y América del Sur iniciasen una etapa de desarrollo industrial y transformación hacia una sociedad más “occidentalizada”; los cambios socioeconómicos y demográficos también afectaron a la salud de las poblaciones. Fue en el año 1956 cuando se documentó el primer caso de CU en estas regiones, en China (3). Desde entonces, la EII ha emergido en estos países con una creciente incidencia, al tiempo que han ido transformándose en industrializados.

2. EPIDEMIOLOGÍA

La incidencia de CU en Europa se sitúa entre 0.6-24.3 casos por 100.000 años-persona, mientras que la EC presenta una entre 0.3-12.7 casos por 100.000 años-persona; respecto a prevalencia, la CU presenta una tasa de 4.9-505 casos por 100.000 habitantes, frente a los 0.6-322 casos por 100.000 habitantes de la EC (1). Los países en proceso de industrialización han experimentado un aumento del número de casos, lo que demuestra el impacto de los factores ambientales en el

desarrollo de la enfermedad. Se ha observado, en estudios sobre migración, que los individuos inmigrantes desde áreas de baja prevalencia de EII hacia países con prevalencias más altas poseen un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (4).

La incidencia de la EII presenta dos picos de edad: el primero se sitúa entre los 15 y los 30 años, mientras que el segundo aparece entre los 60 y los 80 años. El principal factor de riesgo para padecer EII es tener un familiar afectado (5). La enfermedad ha demostrado tener asociación familiar en el 5-10% de los pacientes; el riesgo de padecer la enfermedad a lo largo de la vida en un individuo con un familiar de primer grado afecto es del 10%, mientras que la probabilidad de que un hijo con ambos padres afectados de EII desarrolle la enfermedad es del 36% (1). En estudios gemelares, la concordancia entre gemelos monocigotos es del 38-58% para CU, y del 6-18% para EC; y del 4% para CU y 0-2% para EC en gemelos dicigotos. En el resto de los casos, la EII se presenta como enfermedad esporádica (1).

3. PATOGÉNESIS

En condiciones fisiológicas, existe una homeostasis entre la microbiota del tubo digestivo, las células epiteliales que tapizan la luz intestinal y las células del sistema inmune. La hipótesis más aceptada sostiene que uno o varios de estos componentes se ven afectados por factores genéticos y ambientales, los cuales, en un individuo susceptible, conllevan una disrupción de la homeostasis y, en consecuencia, generan un estado crónico de inflamación (1). Aunque la activación crónica del sistema inmune intestinal podría ser consecuencia de la respuesta a un agente infeccioso, su identificación aún no ha sido posible. Actualmente, la EII debe ser considerada como una respuesta inmunológica inadecuada a la flora endógena presente en el intestino, con o sin componente de autoinmunidad.

Cabe recordar que, en situación basal, el intestino contiene un gran número de células inmunes en un estado continuo de inflamación, responsables de mantener un estado de anergia frente a la microbiota y los antígenos de la dieta (6). Ante infecciones u otros estímulos ambientales, en el huésped normal, se produce una activación del tejido linfoide asociado a mucosas, que es rápidamente compensada por la amortiguación de la respuesta inmune y la reparación tisular. En la EII, se ha observado una disfunción de la respuesta inmune innata y adaptativa, que contribuye a una respuesta inflamatoria anómala (7). Los linfocitos Th-1 son las células implicadas en la EC, incrementando la síntesis de factor de necrosis tumoral (TNF- α) y de interferón (IFN- γ) y promoviendo la formación de granulomas epiteliales. Por su parte, la respuesta inmune en la CU sugiere una activación de linfocitos Th-1 y Th-2, con un desequilibrio entre moléculas proinflamatorias y antiinflamatorias y una invasión de la mucosa intestinal (6).

Los factores ambientales tienen un importante papel en el desarrollo de la EII, siendo algunos de ellos la dieta y el tabaquismo. Una dieta pobre en proteínas, frutas y verduras, y rica en azúcares

y grasas de origen animal puede constituir un aumento del riesgo de desarrollo de EII (6). El consumo de tabaco aumenta el riesgo de EC, que se reduce con la deshabituación tabáquica. Sin embargo, se cree que el tabaco puede ejercer un efecto protector frente a la CU. Los diferentes efectos del consumo de tabaco en la EC y en la CU pueden relacionarse con los diferentes efectos de nicotina en el intestino delgado y grueso, donde aumenta y disminuye, respectivamente, la actividad de la óxido nítrico-sintetasa (NOS) y puede contribuir indirectamente a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (6).

Por otra parte, los cambios en las condiciones sanitarias del agua y del medio, o el aumento del uso de antibióticos pueden relacionarse con modificaciones en la composición de la microbiota intestinal y, en consecuencia, con respuestas inmunológicas anómalas. Existen ciertas hipótesis que sostienen que la vida urbana y una falta de exposición a antígenos animales y vegetales se asocian a un riesgo aumentado de EII (6).

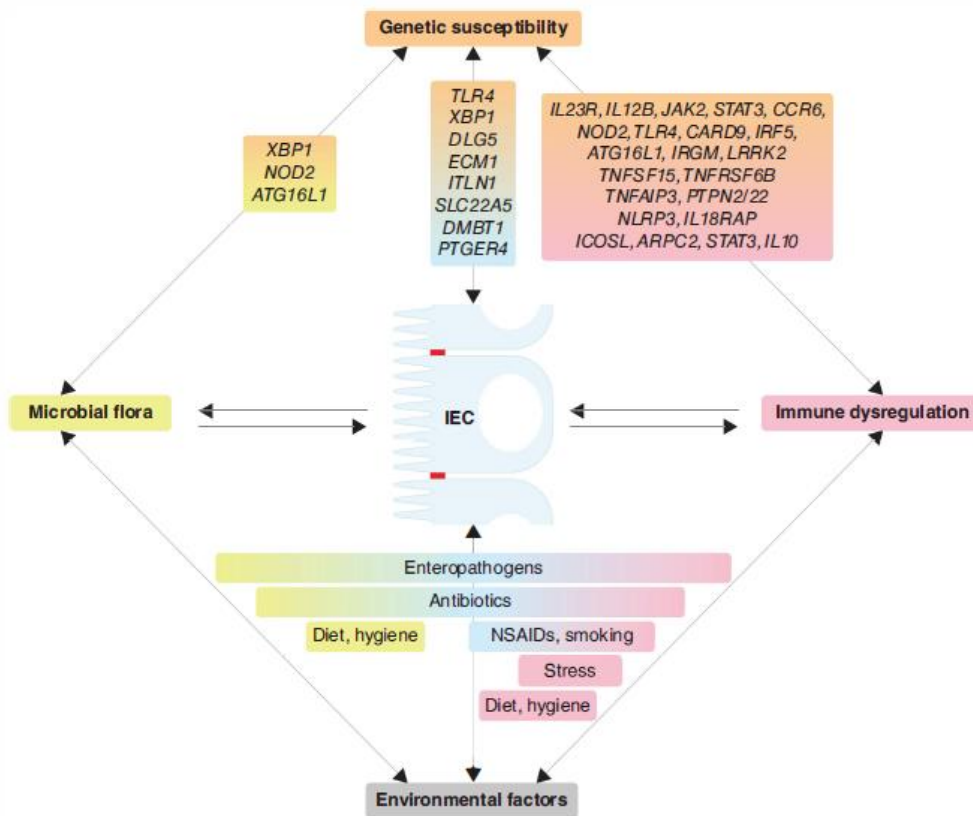


Figura 1: patogénesis de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Harrison's Principles of Internal Medicine. 19th Edition

4. GENÉTICA

En el 10% de los casos de EII, aparece un componente hereditario. Se cree que, en la mayoría de estos casos, existe una alteración poligénica que genera múltiples subgrupos clínicos en la EC y en la CU. Las alteraciones genéticas descubiertas hasta la fecha pueden englobarse en cuatro grandes grupos: genes relacionados con procesos celulares fisiológicos, responsables de la

regulación de la actividad celular en respuesta a la microbiota; genes encargados de la regulación de la respuesta inmune innata, genes que regulan la respuesta inmune adaptativa y el equilibrio entre citoquinas inflamatorias y antiinflamatorias; y genes implicados en el desarrollo y resolución de la respuesta inflamatoria (1). Recientes estudios de asociación genética con datos de más de 75.000 pacientes con EII, han identificado 163 *loci* relacionados con la EII. De esos 163, 110 confieren riesgo tanto para EC como para CU, mientras que 30 *loci* se asocian exclusivamente a EC y 23 a CU (7). Sin embargo, estas variantes descubiertas explican solo una pequeña fracción de la heredabilidad esperada.

El gen del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos tipo 2 (NOD2) fue el primer gen en el que fue descubierta una asociación a EC, en el año 2001 (7). La proteína codificada por este gen es un receptor intracelular responsable del correcto funcionamiento de las células de Paneth, encargadas de secretar proteínas antimicrobianas y citoquinas para proporcionar una autofagia eficaz (6). El receptor NOD2 posee un papel importante en la respuesta inmune inmediata contra la invasión bacteriana, gracias a su capacidad de activación del factor de transcripción NF- κ B, y, en consecuencia, de la cascada de la inflamación. Es por eso por lo que la activación anormal de dicho receptor resulta en una inflamación excesiva y descontrolada.

5. ANATOMÍA PATOLÓGICA

Colitis ulcerosa

La afectación en la CU comienza en recto, y se extiende de forma proximal, confluyente y continua a lo largo de la mucosa, alcanzando una extensión parcial o total del colon (8). El 40-50% de pacientes presenta enfermedad limitada a recto y sigma; el 30-40% muestra afectación de colon izquierdo, y un 20% tiene afectación cólica completa (1). Endoscópicamente, se observan diferentes hallazgos en función del grado de inflamación: una afectación moderada muestra congestión vascular, con el aumento de la actividad, aparecen erosiones y restos hemáticos adheridos, junto a una mucosa granular y friable; los casos más graves cursan con ulceración y sangrado espontáneo (8). Los pseudopólipos son estructuras de regeneración epitelial, las cuales pueden aparecer tras periodos de inflamación. En fases avanzadas de la enfermedad, la atrofia de la mucosa conlleva pérdida de sus pliegues y estrechamiento de la luz del colon. Pacientes con enfermedad fulminante pueden debutar con una colitis o megacolon tóxicos, en los cuales las paredes intestinales se adelgazan y la mucosa está gravemente ulcerada, con alto riesgo de perforación (1).

A nivel microscópico, la afectación de la colitis ulcerosa se limita a la mucosa y submucosa superficial, respetando las capas más profundas (con la excepción de los cuadros fulminantes) (1). Las criptas epiteliales aparecen distorsionadas y en menor número, con atrofia de la mucosa y un infiltrado inflamatorio submucoso de neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas y macrófagos.

Parte de estos neutrófilos invade el epitelio, generando inflamación de las criptas y formación de abscesos. El grado de inflamación disminuye en dirección proximal, si bien este patrón puede alterarse tras el establecimiento del tratamiento, con áreas parcheadas de recuperación de la mucosa normal y ausencia de inflamación (8).

Enfermedad de Crohn

La enfermedad de Crohn puede afectar a cualquier parte del tracto gastrointestinal, aunque, a diferencia de la CU, donde la afectación del recto es prácticamente constante, la EC suele respetarlo. El 30-40% de pacientes tiene afectación aislada de intestino delgado; en el 40-55% se afectan ambos y el 15-25% presenta únicamente afectación cólica. La región más frecuentemente afectada en la EC es el íleon terminal, presente en el 90% de pacientes con afectación de intestino delgado (1). La afectación característica de la EC es parcheada, alternando con zonas sanas de pared intestinal (9). Es frecuente la formación de fístulas, fisuras, abscesos y estenosis, consecuencia de la afectación transmural de la enfermedad. Pueden aparecer pequeñas aftas o úlceras longitudinales en la afectación leve; cuando existe mayor actividad, estas úlceras aumentan en tamaño y en profundidad, llegando a afectar la capa muscular y ocupando grandes áreas de mucosa.

Microscópicamente, la lesión más característica es el granuloma no caseificante, compuesto por agregados de monocitos y macrófagos cuyos bordes no están bien definidos (9). Junto a estos, la distorsión de la arquitectura de las criptas y la presencia de agregados linfoides parcheados son hallazgos que apoyan el diagnóstico (1). Debe tenerse en cuenta que, en el diagnóstico diferencial, la afectación parcheada puede aparecer en niños menores de 10 años con CU y en pacientes con CU y tratamiento establecido (9).

Lennard-Jones *et al.* definieron unos criterios macroscópicos y microscópicos para establecer el diagnóstico de EC, los cuales son ampliamente aceptados en la práctica clínica actual. Se considera una EC “establecida” cuando concurre el hallazgo de un granuloma intestinal (criterio mayor) y, al menos, uno de los criterios menores (discontinuidad de la enfermedad, inflamación transmural con formación de fístulas o abscesos, fibrosis con estenosis intestinal, agregados linfoides en la lámina propia intestinal y afectación discontinua de la mucosa intestinal); en ausencia de granulomas, al menos tres criterios menores deben estar presentes (10).

6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Colitis ulcerosa

La forma de presentación de la CU es altamente variable. Los síntomas más comunes son: sangre en las deposiciones, diarrea, tenesmo y sangrado rectal. Estos se manifiestan en mayor o menor medida en función de la extensión y de la gravedad de la inflamación (11). En casos de afectación

rectal (proctitis), la diarrea es infrecuente, siendo lo más habitual la presencia de rectorragia, mezclada o no con las heces, tenesmo y esputos rectales. La motilidad del colon se altera, y aumenta la velocidad de tránsito en las zonas inflamadas (1). Un dolor abdominal intenso puede aparecer ante brotes graves, colitis tóxica o megacolon tóxico, junto a un aumento del sangrado y signos de peritonitis. La intensa inflamación también provoca alteraciones sistémicas, como fiebre, taquicardia, pérdida de peso y disminución del peristaltismo (11).

Existen diversas escalas que evalúan la gravedad y la extensión del brote, por ejemplo, la clasificación de Montreal, el índice de Truelove-Witts o el índice SEO. Ninguna ha sido validada por ningún estudio como índice de referencia de la actividad clínica; actualmente, la guía clínica del GETECCU emplea la clasificación de Montreal (Tabla 1) en la evaluación de la extensión (12).

Extensión (E).	
• E 1	Proctitis ulcerosa: afección limitada al recto (el límite superior de la inflamación no supera la unión rectosigmoidea).
• E 2	Colitis izquierda (o colitis distal): afección limitada al colon izquierdo (el límite superior de la inflamación no supera el ángulo esplénico).
• E 3	Colitis extensa (pancolitis): afección que se extiende más allá del ángulo esplénico.
Gravedad (S)	
• S 0	Colitis en remisión (colitis silente): no hay síntomas de la enfermedad.
• S 1	Colitis leve: presencia de cuatro o menos deposiciones al día con sangre, sin fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia ni aumento de la VSG.
• S 2	Colitis moderada: criterios intermedios entre leve y grave, siempre con signos de afección sistémica leves.
• S 3	Colitis grave: presencia de seis o más deposiciones diarias con sangre, fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia y aumento de la VSG, a menudo con signos de afección ("toxicidad") sistémica grave.

Tabla 1: clasificación de Montreal para la Colitis ulcerosa. Fuente: Asociación Española de Gastroenterología

Enfermedad de Crohn

La diarrea crónica (más de 4-6 semanas de duración) es el signo más frecuente de presentación en el momento del diagnóstico. Puede variar en función de la región afectada, pero también debido a de diversos procesos: la actividad inflamatoria, el sobrecrecimiento bacteriano, situaciones de malabsorción o presencia de fístulas (13). El dolor abdominal aparece también de forma muy variable, siendo la localización más frecuente la fosa iliaca derecha. La astenia y la pérdida de peso son síntomas frecuentes en los periodos de actividad, provocados tanto por la situación catabólica generada por la inflamación, como por malabsorción, hiporexia y disminución de la ingesta (13). En los niños, puede conllevar un retraso pondero-estatural, así como en la maduración sexual.

El grado de obstrucción intestinal es variable: en estadios iniciales, puede deberse a edema de las paredes intestinales, mientras que en la enfermedad de larga evolución, la inflamación crónica

genera fibrosis con estenosis y estrechamiento del intestino (1). Por otra parte, la inflamación intensa de la pared también puede llevar su adelgazamiento y, en consecuencia, la aparición de microperforaciones y fístulas que se comunican con asas adyacentes u otros órganos: vejiga, vagina, piel, etc. Las más frecuentes son las fístulas íleo-ileales.

En los pacientes con Enfermedad de Crohn, la variada sintomatología depende del lugar de afectación. La afectación gastroduodenal incluye síntomas similares a los de la úlcera péptica: dolor epigástrico, náuseas y vómitos (1). En la afectación de íleon terminal, lugar más frecuente de inflamación, puede aparecer dolor en fosa iliaca derecha, que empeora después de la ingesta, diarrea y sensación de masa palpable, lo cual puede ser confundido con un cuadro de apendicitis. La colitis y enfermedad perianal en la Enfermedad de Crohn se manifiestan como un dolor abdominal acompañado de diarrea sanguinolenta, aunque menos hemorrágica que en la Colitis Ulcerosa. Si hay afectación perianal, pueden aparecer erosiones, repliegues cutáneos, fisuras, fístulas anorrectales, abscesos perirrectales o estenosis anal. Esta puede preceder a la aparición de síntomas intestinales. Son signos sugerentes de EC con afectación perianal la multiplicidad de las lesiones, la localización lateral de las fisuras, la presencia de úlceras profundas, estenosis anal o escasa sintomatología a pesar de un llamativo aspecto macroscópico (13).

Manifestaciones extraintestinales

Las manifestaciones extraintestinales están presentes hasta en un 30% de los pacientes con EII (13). Estas no siempre se correlacionan con la actividad intestinal subyacente, y, en ocasiones, es difícil la diferenciación entre manifestaciones extraintestinales primarias y complicaciones extraintestinales, provocadas por la malnutrición crónica, la actividad inflamatoria o como efecto secundario al tratamiento terapéutico (14). Debido a la gran variedad de entidades asociadas a la EII, solo se mencionarán algunas de ellas.

Las manifestaciones articulares son la afectación extraintestinal más frecuente en la EII, afectando al 20-30% de los pacientes de forma variable. La artritis periférica en la EII es una artritis no erosiva, con serologías de factor reumatoide y anticuerpos antinucleares negativas (14). Puede manifestarse de dos formas diferentes: la artritis tipo I es una oligoartritis (menos de cinco articulaciones afectadas, siendo la principal la rodilla), con un curso paralelo al de la actividad inflamatoria intestinal que presenta asociación con los HLA-B27, DRB1 y B35 (14). Por otra parte, la artritis tipo II es una poliartritis simétrica (afecta a más de cinco articulaciones), y se desarrolla de forma independiente a la actividad intestinal (1). Los HLA asociados a esta afectación son HLA-B44 y el gen A similar al CMH tipo I (*MHC class I chain-like gene A*) (14). El lugar de afectación intestinal tiene un papel importante en el desarrollo de la artritis periférica; se ha demostrado que los pacientes con afectación cólica en la EC tienen mayor riesgo de desarrollar manifestaciones articulares que aquellos con afectación aislada de intestino delgado

(14). La afectación axial también puede aparecer en la EII, en forma de artropatía axial y espondilitis anquilosante, afectando esta última al 1-6% de los pacientes. La asociación con el HLA-B27 es del 50-80%. La afectación del esqueleto axial es independiente del grado de actividad intestinal, y sus síntomas son similares a la espondilitis anquilosante idiopática (1).

El eritema nodoso, el pioderma gangrenoso y las aftas orales son las manifestaciones mucocutáneas más frecuentes en la EII. El primero de ellos aparece en el 15% de pacientes con EC y 10% con CU. La aparición del brote coincide con un aumento de la actividad a nivel intestinal, apareciendo tras el desarrollo de la sintomatología digestiva. Se caracteriza por la afectación de la grasa subcutánea, con aparición de nódulos eritematosos, calientes, de 1-5 cm de diámetro, localizados en la cara anterior de las extremidades inferiores de forma característica (1). Su pronóstico es bueno, llegando a presentar una curación espontánea en el 25% de los casos. En el resto de casos, el tratamiento consiste en controlar la enfermedad de base (14). Otro hallazgo dermatológico es el pioderma gangrenoso, menos frecuente que el eritema nodoso (0,5-25% pacientes con EII). Esta entidad lleva un curso independiente de la EII, y su aparición puede ser anterior al desarrollo de síntomas intestinales. Comienza como una pústula, que se extiende de forma concéntrica y afecta rápidamente a la piel sana. Posteriormente, aparecen úlceras de bordes violáceos y rodeadas de eritema. En la zona central, existe un área de tejido necrótico con restos sanguíneos y exudado. La localización preferente es la superficie dorsal del pie, aunque también pueden aparecer en brazos, pecho, e incluso afectar a la cara. Su tratamiento es difícil; algunos requieren antibióticos y corticoides por vía intravenosa, inmunosupresores o anticuerpos monoclonales (1).

La colangitis esclerosante primaria es la afectación hepática más importante en la CU. La inflamación crónica del árbol biliar provoca la deformación de los conductos y la aparición de estenosis, tanto intra como extrahepática, que puede observarse por colangiografía resonancia magnética. La biopsia pone de manifiesto la presencia de fibrosis e infiltrados de células inflamatorias, que pueden afectar al tracto portal. El tratamiento con ácido ursodesoxicólico no es curativo, aunque retrasa la progresión de la enfermedad y disminuye el riesgo de displasia colorrectal. Se ha observado un riesgo de cáncer colorrectal aumentado en pacientes con CU y colangitis esclerosante primaria concomitante, frente a aquellos con CU aislada (14). Esta entidad también se considera una condición premaligna en el desarrollo de colangiocarcinoma.

7. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de Enfermedad Inflamatoria Intestinal es, en muchas ocasiones, complejo, y debe estar basado en la combinación de datos clínicos y pruebas de laboratorio, hallazgos radiológicos, estudio histológico y evaluación endoscópica.

Colitis ulcerosa

Los síntomas presentes en un brote agudo pueden variar en función de la gravedad y la extensión de la inflamación. Ante un paciente con diarrea, debe excluirse etiología infecciosa, isquémica o irradiación, antes de establecer el diagnóstico de CU (15)(15). Aunque la forma más común de aparición de los síntomas es insidiosa, en un 15% de los casos, el paciente debuta con un brote grave con afectación sistémica: fiebre, taquicardia, pérdida de peso o distensión abdominal, entre otros (8).

En todo paciente con sospecha de CU debe realizarse una analítica sanguínea con hemograma completo, bioquímica, parámetros de función renal, enzimas hepáticas, perfil del hierro y marcadores de inflamación aguda (proteína C reactiva, PCR, y velocidad de sedimentación globular, VSG). Con frecuencia, aparecen anemia, leucocitosis y trombocitosis. La asociación de anemia, hipoalbuminemia y elevación de VSG es sugestiva de actividad inflamatoria intensa y, por tanto, la necesidad de colectomía urgente (8). También se tomarán muestras de heces para la realización de coprocultivo y la detección de calprotectina fecal como marcador de inflamación intestinal aguda.

La elevación de marcadores serológicos y fecales es un hallazgo inespecífico en el diagnóstico de CU, por lo que en todo paciente se debe realizar una endoscopia digestiva con toma de múltiples biopsias a lo largo del intestino para confirmar el diagnóstico (15)(15). La imagen endoscópica, junto con la histología, no solo establecen el diagnóstico, sino que también informan sobre el grado de afectación y la extensión de la enfermedad, lo cual es determinante a la hora de establecer el tratamiento en cada paciente. De acuerdo con el grado de extensión, los pacientes pueden clasificarse en tres grupos de presentación: proctitis si la afectación queda limitada al recto; colitis izquierda, y pancolitis en caso de afectación total (15).

Las pruebas de imagen, como la radiografía simple, la TC abdominal o la enterorresonancia magnética no están incluidas como técnicas de rutina (8), sin embargo, se recomienda la realización de una radiografía abdominal simple en la evaluación inicial de pacientes con sospecha de CU grave, junto con sigmoidoscopia para confirmar enfermedad activa (16).

Enfermedad de Crohn

La Enfermedad de Crohn es una entidad heterogénea que comprende diversos fenotipos en términos de edad de desarrollo, localización y comportamiento de la enfermedad. Una historia clínica completa debe incluir preguntas sobre el inicio y desarrollo de los síntomas, así como antecedentes de viajes recientes, intolerancias alimentarias, toma de fármacos, etc. Debe ponerse especial atención a los factores de riesgo: consumo de tabaco, historia familiar de EII e infecciones gastrointestinales recientes.

En la analítica sanguínea inicial pueden aparecer anemia y trombocitosis como alteraciones más frecuentes. El análisis puede incluir marcadores de inflamación intestinal, como la calprotectina fecal, los cuales han demostrado ser de utilidad en el diagnóstico. Sin embargo, ninguno de estos parámetros ha demostrado suficiente especificidad para la diferenciación de la EC con la CU o la infección entérica. Para el diagnóstico diferencial, así como para descartar infección por *C. difficile*, se recomienda realizar un examen microbiológico de heces (9).

La realización de una ileocolonoscopia con toma de múltiples biopsias está establecida como procedimiento de primera línea en el diagnóstico de EC (9). Cuando hay una enfermedad grave y activa, el valor de la colonoscopia completa está limitado por un mayor riesgo de perforación intestinal. En estas circunstancias, la sigmoidoscopia flexible inicial es más segura, y la ileocolonoscopia debe posponerse hasta que mejore la situación clínica. Tras la valoración endoscópica, es recomendable ampliar el estudio con técnicas de imagen, como ecografía abdominal, resonancia magnética o tomografía computarizada, para realizar un diagnóstico preciso de la extensión de la enfermedad y la presencia de obstrucción o fístulas en el tracto digestivo (9).

8. TRATAMIENTO

Colitis ulcerosa

En el tratamiento de la colitis ulcerosa, el grado de extensión y la gravedad del brote constituyen dos puntos clave para el manejo del paciente, ya que influyen en la modalidad de tratamiento y en la vía de administración de los fármacos, así como en el inicio y seguimiento de los pacientes (16).

Los aminosalicilatos constituyen la terapia de primera línea en brotes leves-moderados de CU. Se trata de una familia de fármacos que incluye en su estructura mesalazina (5-ASA), molécula que interviene en la disminución de la inflamación a nivel intestinal. La fórmula de administración varía en función de la extensión de la enfermedad: en los casos de proctitis, la administración de 5-ASA en forma de supositorios es más eficaz que los enemas, puesto que presentan mejor liberación a nivel local y son mejor tolerados por el paciente (17). La administración conjunta de salicilatos por vía oral puede considerarse en pacientes con proctitis ulcerosa y escasa respuesta al tratamiento tópico (18). La afectación del colon izquierdo hasta el ángulo esplénico (colitis izquierda) y la afectación extensa del colon (pancolitis) deben tratarse con salicilatos tópicos en forma de enema, junto con salicilatos por vía oral, siendo más efectiva la combinación de ambas formas que la monoterapia (12). La duración del tratamiento será de 6-8 semanas en los casos que presenten una respuesta favorable precoz, mientras aquellos en los que no exista una respuesta rápida serán tratados con esteroides por vía oral (18).

Los esteroides por vía oral serán empleados en casos de colitis ulcerosa moderada refractaria al tratamiento con salicilatos. Los corticoides de segunda generación, como el dipropionato de beclometasona, serán de elección ante estas situaciones, ya que se ha demostrado un efecto y un perfil de seguridad similares a la prednisona (17). La pauta de administración es de 5 mg/24h durante 4 semanas, junto a un descenso progresivo de la dosis en las 4 semanas posteriores. Es importante recordar que estos fármacos nunca deben ser empleados en terapia de mantenimiento, debido a sus efectos secundarios: reacciones por hipersensibilidad (necrosis avascular, cataratas), infecciones, miopatía, osteoporosis o exacerbación de patología de base (diabetes mellitus, psicosis, hipertensión) (19); por tanto, su uso queda limitado a la inducción de la remisión ante un brote de enfermedad activa (20).

Los pacientes con brote grave de CU requieren ingreso hospitalario para el manejo terapéutico. Tras la exclusión de la etiología infecciosa como causante del cuadro intestinal, el tratamiento inicial de los pacientes se basa en esteroides por vía intravenosa durante 3 días (prednisona 1 mg/kg/día), junto a tratamiento tópico con salicilatos (17). Será necesario evaluar el estado nutricional y electrolítico de estos pacientes, adoptando en cada caso las medidas de soporte adecuadas. Se recomienda también la administración de heparina de bajo peso molecular por vía subcutánea, como profilaxis de enfermedad tromboembólica venosa (17). La evaluación de la respuesta al tratamiento esteroideo se realiza a las 72 horas del inicio de la terapia. Si, tras este periodo, se ha alcanzado la remisión, el paciente podrá pasar paulatinamente al tratamiento de mantenimiento; en caso contrario, existen diversos índices que pueden predecir la probabilidad de respuesta al tratamiento y la decisión de instaurar un tratamiento alternativo (12).

Existen dos conceptos que nacen del empleo de esteroides en el tratamiento de la EII: el primero de ellos es la corticodependencia, definido como la imposibilidad de reducir la dosis de corticoides por debajo de 10 mg/día de prednisona (o equivalentes), o la recidiva dentro de los 3 primeros meses tras la suspensión del tratamiento con corticoides (12); otra situación es la de corticorresistencia, que aparece ante un brote de enfermedad que se mantiene activo incluso con dosis plenas de corticoides (prednisona 1 mg/kg/día o prednisolona 0,75 mg/kg/día) durante 4 semanas en brotes leves-moderados, y 7 días en brotes graves (12)(13). Es importante descartar, en casos refractarios de CU, la sobreinfección cólica por citomegalovirus (CMV), mediante biopsia rectal. De confirmarse dicha infección, se mantendrán los corticoides sistémicos junto a ganciclovir intravenoso durante 7 días, junto a valganciclovir vía oral las posteriores 2-3 semanas (18).

En situaciones de corticorresistencia en CU, los fármacos empleados en segunda línea son la ciclosporina A intravenosa 2-4 mg/kg/ día durante 7-14 días, y el infliximab intravenoso en dosis de 5mg/kg en tres infusiones: inicial, a los 14 días y a los a los 42 días (12). Un estudio reciente

sobre la comparativa entre estos fármacos demuestra que ambos son igual de eficaces, con similares perfiles de seguridad, por lo que se elegirá uno u otro según cada paciente (18). El empleo de ciclosporina A se limita a los brotes graves de CU corticorresistentes, debido a la posibilidad de inducir toxicidad renal irreversible, por lo que será necesario el empleo de otros inmunomoduladores en el tratamiento de mantenimiento de la enfermedad (12). Infliximab y adalimumab son anticuerpos monoclonales quiméricos contra el TNF- α empleados en la CU. Una complicación grave en la terapia con fármacos biológicos es la posibilidad de reactivación de infecciones latentes, por lo que, antes de comenzar la terapia biológica, será indispensable realizar en todo paciente una serología de VIH, VHB y VHC, así como radiografía simple de tórax y prueba de Mantoux (21).

El tratamiento quirúrgico debe considerarse tras el fracaso del tratamiento médico en todos los pacientes, salvo situaciones concretas, en las que se trata de una indicación absoluta: perforación, hemorragia masiva o megacolon tóxico de más de 3 días de evolución (12).

Tras la inducción de la remisión en un brote agudo de CU, es necesario un tratamiento de mantenimiento, para evitar la aparición de nuevos brotes y detener la progresión de la enfermedad. En aquellos pacientes con remisión conseguida con salicilatos, está indicado el tratamiento de mantenimiento con salicilatos de forma prolongada, siendo la sulfasalazina 2 g/día y la mesalazina 1,5 g/día igual de eficaces (12). Se recomienda el empleo de salicilatos tópicos de forma conjunta, especialmente en proctitis ulcerosa, a dosis de 1 g 2 o 3 veces por semana. En casos corticodependientes, se iniciará azatioprina 2,5-3 mg/kg/día, en sustitución de la ciclosporina, para evitar posibles recidivas. Si la remisión se consiguió con infliximab, se establecerá una pauta de mantenimiento a dosis de 5 mg/kg cada 8 semanas (12). En ocasiones, la aparición de brotes ocurre sobre pacientes con tratamiento de mantenimiento de CU. Ante esta situación, se valorará la posibilidad de pasar al siguiente escalón terapéutico, o de la realización de cirugía como tratamiento terapéutico; la decisión dependerá de las características individuales de cada paciente, y siempre con la valoración del equipo de cirugía.

Enfermedad de Crohn

A la hora de iniciar una terapia farmacológica en pacientes con EC, es necesario demostrar la presencia de actividad inflamatoria antes de iniciar cualquier tratamiento. Además, deben excluirse otras posibles causas que puedan cursar con síntomas similares (infecciones intestinales, abscesos, situaciones de malabsorción, etc.). El tratamiento de la EC se establece de forma individualizada en cada paciente, en función del grado de inflamación que presente, así como de la edad y fenotipo de enfermedad, la localización, las complicaciones y las manifestaciones extraintestinales.

En pacientes con brotes leves de EC y afectación del colon, el tratamiento inicial es la administración de salicilatos a dosis altas, entre ellos, la mesalazina (19). Los antibióticos no están indicados de forma rutinaria en estos pacientes, y se reservan como tratamiento coadyuvante en casos de fístulas o masas abdominales, donde la infección juega un papel importante (19).

La budesonida administrada por vía oral durante 8 semanas es el fármaco de primera línea empleado en pacientes con brotes leves y/o moderados de EC con afectación ileocecal (8)(19). Se trata de un corticoide de acción intraluminal, que se libera a nivel ileocecal. Presenta baja tasa de absorción sistémica y, a pesar de mostrar una efectividad inferior a otros esteroides, la menor frecuencia de efectos secundarios la convierte en el fármaco de elección. Otros esteroides utilizados por vía oral en brotes moderados con diferente localización son la prednisona o la prednisolona. Ante brotes graves de enfermedad, la administración de corticoides por vía intravenosa durante 3 días es la primera opción terapéutica, junto con las medidas de soporte necesarias para cada paciente. En estos casos, los corticoides empleados incluyen prednisolona e hidrocortisona (8).

En casos refractarios al tratamiento con esteroides, existen otros fármacos disponibles, entre ellos, los inmunomoduladores y los fármacos biológicos. Dentro del primer grupo, la Azatioprina es el tratamiento de elección para el brote grave en la EC, así como para la terapia de mantenimiento (19). También es una terapia eficaz ante casos de enfermedad fistulizante. Una alternativa en casos de toxicidad, intolerancia o refractariedad a Azatioprina es el metotrexato (21). La utilización de Infliximab y adalimumab incluye a pacientes con EC refractaria grave, patrón fistulizante y corticodependencia (19). Al igual que en la CU, será necesario el despistaje de virus hepatotropos (VHB, VHC), tuberculosis y VIH. Si las medidas farmacológicas comentadas fueran insuficientes o tuvieran contraindicaciones a su uso, la cirugía puede ser una opción terapéutica en algunos pacientes. Sin embargo, no se trata de un tratamiento curativo, ya que la EC es una entidad que recurre habitualmente (21). Es frecuente la asociación de terapia de mantenimiento tras la cirugía en pacientes seleccionados.

9. MONITORIZACIÓN Y SEGUIMIENTO

El seguimiento periódico de los pacientes con EII persigue varios objetivos: evaluar el grado de actividad inflamatoria y la normalización de los parámetros analíticos (*ver Marcadores biológicos de EII*), así como reacciones adversas a ciertos fármacos; conocer el grado de reparación de la mucosa, y la detección precoz de complicaciones a largo plazo, entre ellas la carcinogénesis. Se ha comprobado que un tiempo de evolución mayor de 8-10 años en la EII está asociado a un riesgo aumentado de cáncer colorrectal (CCR) (22). Este riesgo es superior a mayor extensión anatómica y duración de la enfermedad (23).

Actualmente, la prueba considerada como “patrón oro” en la prevención del CCR es la endoscopia. Se indicará una colonoscopia para establecer el riesgo de CCR a todos los pacientes con CU y EC colónica antes de los 8 años del inicio de los síntomas de EII, a los pacientes con colangitis esclerosante primaria al diagnóstico, y a todos los pacientes con más de 50 años (23). Quedarán excluidos del programa de vigilancia endoscópica los pacientes con proctitis aislada y EC cólica con un solo segmento de colon afecto. Se tomarán biopsias para determinar el grado de extensión y actividad; en función de estos, se determinará el riesgo y, por tanto, el intervalo hasta la próxima endoscopia.

MARCADORES BIOLÓGICOS DE ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

La EII es una entidad que cursa con periodos de remisión interrumpidos por brotes de actividad inflamatoria. El propósito de la terapia es inducir de forma mantenida la remisión, así como evitar la progresión de la enfermedad, ya que un fallo en el control de la actividad inflamatoria puede provocar el empeoramiento en la calidad de vida de los pacientes, así como complicaciones a largo plazo (24).

A pesar de un tratamiento médico efectivo que consiga dicha remisión, ciertos individuos pueden persistir con un grado subclínico de inflamación de la mucosa intestinal, contribuyendo a un mayor riesgo de aparición de brotes sintomáticos de inflamación intensa (25). La identificación de marcadores precisos de esta actividad subclínica puede suponer una mejora en el manejo de la EII. Los marcadores biológicos son sustancias derivadas de muestras de tejidos y/o fluidos biológicos, las cuales pueden ser detectadas y cuantificadas. Actualmente, el empleo de biomarcadores de EII en la práctica clínica está ampliamente extendido, sin embargo, ninguno de ellos puede usarse como un marcador diagnóstico preciso de EII, ni tampoco para subclassificar a los pacientes en CU o EC. Su papel actual se limita a evaluar, junto con otros datos clínicos, la gravedad y evolución de la enfermedad (26).

MARCADORES SEROLÓGICOS DE INFLAMACIÓN

Los marcadores de inflamación miden la gravedad de la inflamación aguda, y pueden tener un papel importante en la predicción de nuevos brotes en la EII. Los principales biomarcadores estudiados son la Proteína C reactiva (PCR) y la velocidad de sedimentación globular (VSG), aunque existen otros como el recuento leucocitario y plaquetario, concentraciones de hemoglobina y albúmina, lactoferrina, β 2-microglobulina o α 1-glicoproteína ácida, entre otros. La elevación de varios de estos marcadores, no sólo en la fase aguda de la enfermedad, sino también en periodos de remisión, puede asociarse a un estado de inflamación subclínica, y el riesgo de nuevos brotes es mayor que en aquellos pacientes con marcadores no elevados (25). Por

otra parte, valores séricos normales de PCR se asocian a remisión de la enfermedad y curación de la mucosa intestinal (26). Sin embargo, no es posible la utilización aislada de PCR o VSG como biomarcador de diagnóstico o tratamiento, dado que son marcadores inespecíficos, que pueden elevarse en multitud de procesos de distinta etiología, y que no permiten su utilización como sustitutos de otras técnicas como la endoscopia o la radiografía simple (26).

Se ha estudiado el valor de la PCR como marcador adyuvante de resección quirúrgica en EII. En CU, la elevación constante de la PCR, junto con niveles bajos de albúmina, se asocian con una afectación extensa y, por tanto, la necesidad de colectomía (26); la elevación de la PCR en EC es sugestiva de resección intestinal de íleon terminal (25).

OTROS MARCADORES SEROLÓGICOS

Además de los marcadores de inflamación, en el estudio del paciente con EII también pueden ser útiles una serie de marcadores serológicos asociados con formas específicas de la enfermedad. Entre ellos, tienen especial importancia los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) y los anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA). La determinación conjunta de ambos anticuerpos permite la diferenciación de pacientes con CU y pacientes con EC; se ha relacionado la presencia de p-ANCA en sangre periférica con CU, mientras que títulos elevados de ASCA aparecen con más frecuencia en pacientes con EC (25) (26). Ambos anticuerpos determinan un fenotipo más agresivo de la enfermedad: la positividad para ASCA se ha asociado a un desarrollo precoz de EC, así como mayor actividad fibrótica y de estenosis; por otra parte, pacientes con CU y p-ANCA positivos muestran un curso más grave de la enfermedad y la necesidad de cirugía.

La determinación de estos marcadores posee una alta especificidad, aunque su sensibilidad es baja, por lo que no se recomienda la realización rutinaria de la técnica en todos los pacientes con EII; su papel quedaría limitado a la diferenciación entre CU y EC en casos de colitis no clasificadas (13).

MARCADORES FECALES DE INFLAMACIÓN

Los marcadores fecales se han convertido en una herramienta muy útil en el diagnóstico de la EII gracias a su bajo coste, facilidad de aplicación, seguridad y comodidad para el paciente. Las sustancias detectadas son resistentes a la degradación por bacterias intestinales, y permanecen estables en las muestras fecales a temperatura ambiente por un periodo de hasta 7 días.

La calprotectina fecal es una proteína fijadora de calcio, presente en neutrófilos, monocitos y macrófagos. Su presencia en heces es consecuencia de una migración de estas células inflamatorias a través de la pared, hasta llegar a la mucosa y a la luz intestinal. Los estudios sobre la calprotectina fecal han demostrado que los niveles detectados en heces están correlacionados con los hallazgos endoscópicos e histológicos de inflamación presentes en la EII (25). Se han demostrado también valores basales de calprotectina fecal mayores en pacientes con EII que

padecieron un brote de actividad en los últimos 6 meses posteriores, frente a aquellos que permanecieron en remisión durante el mismo periodo (24). Estos hallazgos demuestran que la medida de calprotectina fecal en fase de remisión puede ser útil en la identificación de pacientes con alto riesgo de recidiva.

TELÓMEROS Y TELOMERASA

Los telómeros constituyen la parte distal de los cromosomas lineales. Se trata de secuencias específicas de DNA cuya finalidad es señalar el fin de cada cromosoma, evitando la fusión de estos y manteniendo así la integridad y estabilidad del material genético durante los procesos de división celular (27). En las células humanas, los telómeros están compuestos por cientos de miles de repeticiones de la secuencia de nucleótidos TTAGGG (28).

Con cada división celular, el material genético obtenido en el proceso de replicación se acorta, como consecuencia del mecanismo de acción de la DNA polimerasa (29). La presencia de los telómeros en los extremos de los cromosomas disminuye esta pérdida, puesto que permite el alargamiento de la cadena original para poder completar la replicación de las cadenas hijas. Este proceso es llevado a cabo por la enzima telomerasa, una transcriptasa inversa dependiente de RNA que reconoce la secuencia telomérica y la alarga mediante la adición de nucleótidos al extremo 3'. Junto a esto, existe un complejo de proteínas denominadas shelterinas, que cubren la secuencia telomérica y generan una señal molecular para evitar la activación del sistema de reparación del DNA durante el alargamiento de los telómeros (29).

De este modo, la telomerasa mantiene la longitud de los telómeros a lo largo de las sucesivas divisiones celulares, y constituye una especie de “reloj biológico” sobre los diferentes tipos celulares; cuando los telómeros son excesivamente cortos, las señales de división celular se detienen, y la célula entra en un estado de senescencia replicativa y apoptosis de forma fisiológica (29). Si embargo, existen diversos mecanismos que pueden llevar a un acortamiento precoz de los telómeros; la presencia de mutaciones en el gen de la telomerasa y, en ocasiones, el trasplante de tejidos, pueden provocar la disfunción de la enzima y generar un acortamiento precoz de los telómeros. Estas alteraciones condicionan la aparición de las denominadas enfermedades teloméricas. El denominador común de todas estas entidades es la pérdida acelerada de los telómeros y una consecuente pérdida de la estabilidad e integridad del material genético de la célula (29).

ENFERMEDADES TELOMÉRICAS

1. INSUFICIENCIA DE MÉDULA ÓSEA

Las alteraciones en la estructura y reparación de los telómeros provocan una disfunción hematopoyética con un amplio espectro clínico, que varía tanto en la edad de presentación como en la gravedad, produciendo desde anomalías leves a pancitopenia extrema. Se trata de una enfermedad hereditaria, pero de penetrancia variable, incluso entre miembros de una misma familia. Puede presentarse asociada a otras anomalías, como la disqueratosis congénita (29).

2. DISQUERATOSIS CONGÉNITA

Se trata de una displasia ectodérmica caracterizada por la tríada: uñas distróficas, hiperpigmentación parcheada de la piel y leucoplasia oral. Las alteraciones mucocutáneas aparecen en la infancia, mientras que la insuficiencia de médula ósea comienza a manifestarse entre la primera y segunda décadas de la vida. La enfermedad puede afectar otros órganos y sistemas, con manifestaciones neurológicas en la infancia (síndrome Hoyeraal-Hreidarsson) y fibrosis pulmonar.

Las mutaciones se localizan en el gen DKC1, en el cromosoma X, que codifica una proteína conocida como disquerina. Esta molécula es una proteína nucleolar que se une al RNA celular (incluyendo el RNA de la telomerasa) para la regulación de diversas funciones celulares, entre ellas, la longitud de los telómeros. Los pacientes afectados, mayoritariamente varones, presentan unos telómeros muy cortos como resultado de una replicación y reparación deficitarias. La presencia de telómeros muy cortos en los linfocitos, detectado mediante citometría de flujo e hibridación in situ por técnica de fluorescencia, permite distinguir la disqueratosis congénita de otros síndromes que cursan con insuficiencia de la médula ósea (29).

3. ANEMIA APLÁSICA ADQUIRIDA

En el estudio de pacientes trasplantados con anemia aplásica adquirida, se descubrieron unos telómeros más cortos en sus leucocitos respecto a los de sus donantes. Inicialmente, este hecho fue atribuido a situaciones de estrés proliferativo en un número de células madre hematopoyéticas. Sin embargo, los posteriores estudios sistemáticos a pacientes con insuficiencia adquirida de médula ósea mostraron mutaciones en los genes TERC y TERT, genes de la telomerasa, en aproximadamente el 10% de los pacientes con anemia aplásica adquirida. Estas alteraciones precipitarían el acortamiento de los telómeros, así como una disminución de la actividad telomerasa (29).

4. FIBROSIS PULMONAR

Las manifestaciones clínicas de la fibrosis pulmonar son tos seca, disnea, alteración del intercambio gaseoso y disminución del volumen pulmonar. A nivel pulmonar, se produce una

fibrosis parcheada, alternando zonas sanas con áreas de inflamación intersticial y depósito de fibras de colágeno.

El 20% de los pacientes con disqueratosis congénita desarrolla complicaciones respiratorias derivadas del desarrollo de fibrosis pulmonar. También aparecen tras el trasplante de células madre hematopoyéticas en pacientes con disqueratosis congénita. Estas asociaciones llevaron al estudio de los genes de la telomerasa, con el descubrimiento de mutaciones en un 15% de los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática familiar, así como en casos esporádicos de fibrosis pulmonar. A pesar de esto, existen muchos más pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y acortamiento de los telómeros que los asociados a las mutaciones descritas, lo que sugiere la existencia de anomalías genéticas aún no descubiertas. El tabaquismo, presente en gran parte de los pacientes afectados, parece tener importancia dentro de los factores ambientales que influyen en el desarrollo de la enfermedad (29).

5. ENFERMEDAD HEPÁTICA

Algunos pacientes con disqueratosis congénita presentan anomalías o complicaciones hepáticas mortales tras el trasplante de médula ósea. Los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y acortamiento de telómeros pueden desarrollar una cirrosis hepática criptogenética; en ambos procesos está implicada la pérdida de telómeros. Se ha observado que los familiares de pacientes con anemia aplásica y mutación telomérica desarrollan enfermedad hepática. Las enfermedades hepáticas asociadas a mutaciones en los genes TERT y TERC consisten en fibrosis con inflamación e hiperplasia nodular regenerativa, lo que conlleva al desarrollo de hipertensión portal de origen no cirrótico. La base genética de la asociación entre enfermedad pulmonar, hepática y de médula ósea es la erosión y las mutaciones teloméricas (29).

6. CÁNCER

La inestabilidad cromosómica fue postulada inicialmente por Boveri, en 1914, como un suceso fundamental en el origen de los tumores. Estudios con modelos celulares y animales llevaron a la propuesta de que el desgaste de los telómeros es un mecanismo para la pérdida o ganancia de cromosomas.

Estudios de asociación genómica han mostrado polimorfismos en el gen TERT en una frecuencia superior a la normal en pacientes con cáncer, aunque el riesgo es mucho menor que en enfermedades individuales o en seguimientos en serie de afecciones malignas que se desarrollan en el contexto de inflamación. Un estudio genómico masivo de más de 30.000 pacientes europeos con cáncer y 45.000 muestras control de DNA mostró asociación entre el locus del gen TERT y 5 de 16 cánceres, en los que se incluían el carcinoma basocelular de la piel, carcinomas de pulmón, vejiga, próstata y cuello de útero (tumores producidos, en parte, por los factores ambientales). Los

polimorfismos en el locus TERT se han asociado con susceptibilidad a gliomas y carcinoma de células renales.

El acortamiento de los telómeros puede estar relacionado con el riesgo de cáncer, que puede ir desde altas tasas de cánceres específicos en la disqueratosis congénita hasta pequeñas contribuciones al proceso general de oncogénesis (29).

7. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Las diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes presentan un aumento desproporcionado de la actividad del sistema inmunitario. Estas entidades comparten una situación común de inflamación, con el consiguiente estrés oxidativo celular y una renovación acelerada de los leucocitos; la suma de estos factores ambientales contribuye al acortamiento acelerado de los telómeros (27), lo que sugiere una asociación entre el sistema telómeros-telomerasa y el desarrollo de enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes.

Los estudios realizados sobre la longitud de los telómeros en linfocitos de sangre periférica han mostrado un tamaño menor en pacientes con EII y colangitis esclerosante primaria frente a las personas libres de enfermedad, junto a una mayor tasa de agregados teloméricos (30). Estos hallazgos estarían en relación con una situación de disfunción telomérica, la cual se traduciría en inestabilidad genética y posibilidad de fusión y recombinación de cromosomas, aumentando el riesgo de oncogénesis en estos pacientes.

Además de esta inestabilidad genética, el acortamiento de los telómeros en las células de la mucosa del colon se asocia una enfermedad de curso más prolongado. El tiempo de evolución de la enfermedad es uno de los factores de riesgo para la oncogénesis en la EII; por tanto, el acortamiento de los telómeros puede suponer un marcador de situaciones de pre-malignidad en estos pacientes (30).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal cumple las características de enfermedad telomérica.

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar el tamaño de los telómeros de los monocitos en sangre periférica, a partir de muestras de pacientes diagnosticados de Enfermedad Inflamatoria Intestinal, y compararlos con los de sujetos sanos.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

Evaluar la utilidad de la medición de los telómeros de los monocitos en sangre periférica como marcador biológico de seguimiento de la enfermedad.

Comprobar si existe correlación entre el tamaño de los telómeros y la actividad inflamatoria medida por los biomarcadores: PCR, VSG sérica, hemoglobina sérica, albúmina sérica, ferritina sérica y calprotectina fecal.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Se ha considerado como objeto de este estudio a 10 pacientes controlados en el Servicio de Digestivo del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” de Zaragoza que fueron diagnosticados de Enfermedad Inflamatoria Intestinal por criterios clínicos, analíticos, endoscópicos e histológicos en los últimos 6 meses.

De los 10 pacientes incluidos, se seleccionaron 5 mujeres y 5 hombres. Todos los individuos participaron de voluntariamente, tras obtenerse el correspondiente consentimiento informado (*ANEXO I*). De acuerdo con la normativa del HCULB, se utilizó el “procedimiento de solicitud y autorización de estudios de investigación en el sector III” (*ANEXO II, ANEXO III*). Cada uno de los enfermos fue estudiado con sus respectivos controles sanos pareados por edad y género, procedentes del Banco de Sangre y Tejidos de Aragón. Para cada paciente se elaboró una ficha con un conjunto de datos clínicos donde se hicieron constar entre otros la edad, el género y los parámetros analíticos más relevantes.

PRODUCTOS QUÍMICOS

- Aceite mineral (Sigma)
- Ácido acético (Merck)
- Ácido clorhídrico (Merck)
- Agarosa (Bio-Rad o Sigma)
- Acetato sódico (Merck)
- Ácido Bórico (Merck)
- Agua destilada.
- Azul Triptan (Sigma)
- Azul de Bromofenol (Sigma)
- Bromuro de Etidio (Sigma)
- Buffer saturado-fenol (Life Technologies)
- Cloruro de Magnesio (Merck)
- Cloruro de sodio (Merck)
- Cloruro de potasio (Merck)
- Cloroformo (Merck)
- Dimetilsulfóxido. DMSO (Merck)
- Etanol absoluto (Merck)
- EDTA (Merck)
- Fenolcloroformo (Life Technologies)
- Ficoll 400 (Sigma)
- Formamida (Sigma)

- Formamida solución Stop (U.S. Biochemical Corp)
- Kit Green PCR (Roche LightCycler® 480)
- Mercaptoetanol 2-beta (Merck)
- Persulfato amónico (APS) (Bio-Rad)
- SDS (Dodecil sulfato sódico-sal disódica) (Merck).
- Solución Fosfato Buffer (PBS) (Sigma)
- Suero Fetal Bovino (Sigma)
- Suero salino 0,9% (Braun-Palex)
- TEMED (Sigma)
- Tris ClH (Sigma)
- Urea (Merck)

EQUIPOS BÁSICOS

- Analizador hematológico automático (Sysmex XT-4000i)
- Arcón congelador de -20°C y -80 °C (Forma Scientific)
- Autoclave (Amerex Instruments)
- Baño húmedo con temperatura y agitación regulables (Fisher Scientific)
- Microcentrífuga (Beckman)
- Nevera de fabricación constante de hielo (Forma Scientific)
- Nevera de 4 ° (Zanussi)
- Secadora por vacío "Speed-Vac" RVT 4104 (Savant)
- Vortex REAX 2000 (Heidolph)
- Espectrofotómetro (Beckman)
- Módulo Nucleic Acid Soft-Pac, programa 10 (Warburg)
- Vasos graduados de 2000ml, 1000ml, 500ml y 200ml.
- Probetas graduadas de 2000ml, 1000ml, 500ml, 200ml, 50ml y 20ml.
- Gradillas para tubos de 50ml
- Gradillas para tubos eppendorf de 1,5ml y eppendorf de PCR
- Pipetas graduables de 200-100mcrl, 100-500mcrl, 10-50mcrl y 0,5-10mcrl (Oxford).
- Contador de células (Fisher Scientific)
- Campanas.
- Reactivo SYBR Green (Roche).

MATERIAL DESECHABLE

- Agujas iv.
- Cinta adhesiva de papel.
- Cinta adhesiva de plástico.
- Jeringuillas de 2, 5, 10 y 20 ml.

- Guantes.
- Papel secante.
- Papel transparente de plástico.
- Pipetas Pasteur.
- Puntas con y sin filtro para distintos volúmenes (Pipetas Oxford).
- Puntas de pato.
- Tubos eppendorf de 1,5 ml.
- Tubos para PCR.
- Placas de Petri.
- Tubos Falcom 2059. -Tubos de PCR.

ENZIMAS

- Proteinasa K (Promega).
- Taq DNA polimerasa (Boehringer-Mannheim).

ÁCIDOS NUCLEICOS Y NUCLEÓTIDOS

- dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Farmacia).
- Marcadores de pesos moleculares: Lambda Hind I, Hae III y DNA Ladder
- Oligonucleótidos: todas las secuencias se especifican en el capítulo correspondiente.

EQUIPO PARA LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

- Equipo de PCR en tiempo real “Light Cycler 480” (Roche).

MÉTODOS

OBTENCIÓN DE LEUCOCITOS

Fundamento

Debido a que, dentro de las líneas celulares de sangre periférica, únicamente los leucocitos presentan núcleo, éstas son las células necesarias para poder realizar el análisis enzimático y molecular de los pacientes.

Para poder extraer los leucocitos, separaremos los elementos formes del plasma mediante centrifugación. En pasos sucesivos, y aprovechando los distintos pesos moleculares de los componentes celulares de la sangre, obtendremos un pellet de leucocitos por medio de centrifugación y resuspensiones sucesivas.

Procedimiento

- Se cogen 4ml de Dextrano 6% en salino con una jeringuilla de 20 ml y se añaden 14 ml de sangre con EDTA, teniendo cuidado de no formar burbujas.
- Se invierte la jeringuilla unas 10 veces y se coloca en una gradilla con la aguja hacia arriba.

- Se deja decantar durante unas 2 horas (durante la decantación, limpiar la jeringuilla de restos de sangre subiendo y bajando el émbolo con cuidado).
- A las 2 horas, quitar la aguja y limpiarla con agua; limpiar también la boca de la jeringuilla con papel absorbente. Doblar la aguja con unos alicates.
- Decantar el sobrenadante de color pajizo, que contiene linfocitos y algunos hematíes, en tubos falcon de 15 ml, presionando la jeringuilla invertida que tiene la aguja curvada hacia abajo.
- Centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos y desechar el sobrenadante a lejía; resuspender el pellet en 1 ml de NaCl 0,9% mediante succión con una pipeta Pasteur.
- Añadir 5 ml de NH₄Cl 0,83% a temperatura ambiente y mezclar bien.
- Dejar reposar la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- A los 5 minutos centrifugar a 2000 rpm durante 10 min. Se obtienen tres fases: un sobrenadante rojizo, una banda de restos de hematíes y un pellet de leucocitos.
- Resuspender la banda de hematíes en el líquido superior con una pipeta Pasteur y decantar el sobrenadante.
- Si el pellet no está limpio de hematíes: resuspenderlo en 5 ml de NaCl 0,9% con una pipeta Pasteur y centrifugar a 2000 rpm durante 10 min. Resuspender la banda de hematíes en el líquido superior con una pipeta Pasteur y decantar el sobrenadante.
- Si el pellet está limpio de hematíes: resuspenderlo en 3 ml de NaCl 0,9% con una pipeta Pasteur, y repartirlo en tres tubos eppendorfs. Centrifugar en la microcentrífuga a 11.000 rpm durante 30 segundos, decantar el sobrenadante y quitar la última gota con una pipeta.
- Congelar los pellets a -20°C para el posterior uso.

OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA

Fundamento

El DNA es el material hereditario que se encuentra en el núcleo de las células, siendo necesaria su obtención para poder realizar el análisis de los telómeros. La fuente de obtención de este DNA es, en nuestro caso, el núcleo de los leucocitos presentes en la sangre periférica.

Para poder extraer el DNA debemos romper primero las membranas celulares, lo cual se realiza por medio de un tampón de fuerza iónica baja. Este tampón va a penetrar en el interior de los leucocitos, produciendo una hiperhidratación, rompiendo la membrana celular y liberando el material que está presente en el interior de las células. De todo el material obtenido nos va a interesar únicamente el genético, de tal manera que debemos separar éste del resto de las proteínas (31).

Para liberar el DNA de las proteínas, se debe someter a la mezcla a la acción proteolítica de la proteinasa K y, posteriormente, precipitar las proteínas mediante concentraciones salinas elevadas.

Finalmente, conseguiremos la precipitación de los ácidos nucleicos utilizando etanol absoluto y eliminaremos el exceso de sales lavando con etanol al 70%.

Procedimiento

- Añadir 0,5 ml del tampón de lisis al pellet de leucocitos obtenido de la sangre periférica.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 30 segundos.
- Decantar el sobrenadante y eliminar el exceso de líquido presente en la boca y paredes del tubo.
- Añadir 1ml del tampón de lisis al pellet obtenido anteriormente.
- Repetir los pasos anteriores tantas veces como sea necesario hasta que el sobrenadante sea claro.
- Una vez conseguido un sobrenadante claro, decantarlo.
- Añadir al "pellet" 470 µl del tampón PCR y disolver y resuspender el "pellet".
- Añadir 30 µl de proteinasa K (1mg/ml) e incubar a 65°C durante 60 minutos.
- A continuación, introducir el tubo eppendorf en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos.
- Precipitar el DNA extraído añadiendo 67 µl de acetato amónico 10M y 534 µl de etanol.
- Enfriar a -70°C durante varias horas.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos, decantar el sobrenadante y lavar el "pellet" con 500 µl de etanol al 70%.
- Por último, se seca el "pellet" de DNA durante 15 minutos en la "speed-vac" y se resuspende en 100 µl de TE1x.

CUANTIFICACION DEL DNA

Fundamento

El espectro de absorción del DNA presenta una curva con un valor máximo de longitud de onda de 258 nm y mínimo de 234 nm. En la práctica se toman los valores de 260 nm y 230 nm. El espectro de absorción de las proteínas es de 280 nm.

El valor de la absorbancia a 260 nm sirve para calcular la concentración de DNA de la muestra, de tal manera que una absorbancia de una unidad de densidad óptica (OD), corresponde a una concentración de 50 µl/ml de DNA de doble cadena. En el caso del DNA diluido, se debe calcular la concentración real de la muestra multiplicando por el factor de dilución (Fd). Donde $Fd = \text{volumen total final} / \text{volumen de DNA}$.

Para conocer el grado de pureza del DNA se debe realizar el cociente entre la absorbancia leída a 260 y 280 nm, de tal manera que dicho cociente debe estar comprendido entre 1,8 y 2. Si dicho

cociente fuera inferior a 1,8 se debería proceder a la purificación del DNA para eliminar proteínas contaminantes.

Procedimiento

Para medir la concentración del DNA empleamos un espectrofotómetro Beckman con el módulo "Nucleic Acid Soft-Pac" y el "programa 10 (Warburg)". Se calibra el espectrofotómetro con 350 μ l de TE 1x, y la medición de las muestras se lleva a cabo añadiendo 2 μ l de DNA a 350 μ l de TE 1x en la misma cubeta. La concentración del DNA se obtuvo multiplicando la lectura por el factor de dilución ($Fd = (350+2) / 2$).

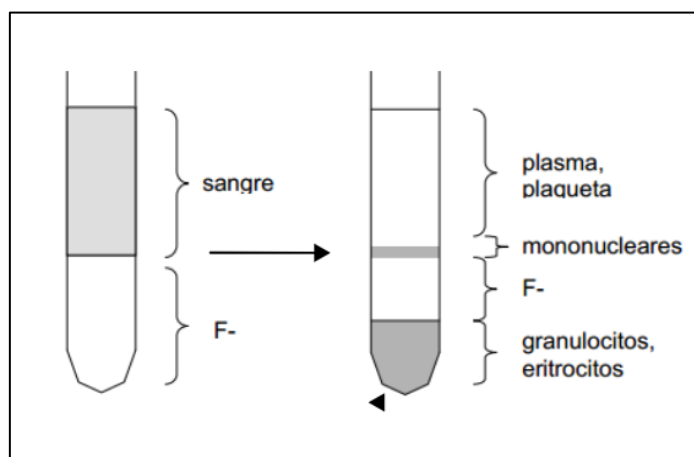
PROTOCOLO AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

Fundamento

Este protocolo describe el procedimiento para aislar Células Mononucleares (MN) por medio del gradiente de Ficoll (Lymphocytes isolation solution).

Las células mononucleares se separan de las demás debido a diferencias de densidad. El ficoll aglutina los eritrocitos, por lo que estos pasan a través del medio y sedimentan al fondo. Los granulocitos también sedimentan por su tamaño y densidad, y por su tendencia a formar agregados. Los mononucleares (linfocitos y monocitos), por su menor densidad, se quedan en la interfase entre el plasma y el medio (con densidad 1,007 g/mL), con una contaminación relativamente baja de plaquetas y otros tipos celulares.

Al final de la centrifugación, los mononucleares se recogen del anillo blanco que se forma en la interfase entre el plasma y el Ficoll.



Procedimiento

- En un tubo de centrifugación de 10 mL, pipetear 3 mL de Ficoll a temperatura ambiente.
- Hacer una dilución 1/3 de sangre EDTA o ACD con PBS. Para ello utilizamos 3 mL de sangre

+ 6 mL de PBS. Homogeneizar.

- Pipetear muy cuidadosamente sobre el medio Ficoll la sangre previamente diluida. Evitar que el medio de separación y la sangre se mezclen.
- Tapar los tubos y llevarlos a la centrífuga.
- Centrifugar a 800 g, 30 minutos a temperatura ambiente y sin freno al final de la centrifugación.
- Sacar cuidadosamente de la centrífuga. Extraer la capa de células mononucleares utilizando pipetas Pasteur de vidrio y depositar las células en un tubo limpio.
- Lavar las células agregando ~8-10 mL de PBS y resuspendiendo suavemente. Centrifugar 5 minutos a 250 g.
- Decantar el sobrenadante y repetir el paso 8 para hacer otro lavado.
- Decantar el sobrenadante y resuspender las células con 0.5 mL de suero fetal bovino (FBS) con DMSO al 10%.
- Pasar las células resuspendidas en FBS a un Eppendorf.
- Realizar recuento celular en un analizador hematológico automático (Sysmex XT-4000i) para saber la concentración de monocitos final y verificar que el aislamiento ha sido correcto.
- Porcentaje de las células viables con Azul Tripán: mezclar 10 μ L de la suspensión de células + 10 μ L de Azul Tripán y observar al microscopio para contarlas.

MEDICIÓN DEL TAMAÑO DE LOS TELÓMEROS

Fundamento

La técnica utilizada para el estudio de la longitud de telómeros es la cuantificación mediante PCR a tiempo real de la longitud media de los Telómeros, comparándolo con la amplificación de un gen control (32). Se obtiene así una medida relativa, determinando la ratio del telómero con un gen de copia única (ratio T/S) (33).

La medida de la longitud de los telómeros se realiza en DNA de monocitos de sangre periférica, tras la cuantificación de DNA obtenido. La amplificación de la región telomérica se lleva a cabo utilizando el SYBR Green PCR como marcador fluorescente. Según la longitud media de los telómeros que tenga una persona, la amplificación será mayor o menor y el Ct (valor umbral de ciclo) también. En la realización de la técnica PCR de amplificación en tiempo real, cuanto mayor sea el tamaño de los telómeros, antes se producirá la amplificación del DNA y se acercará más la curva a la del gen 36B4. Las lecturas de los Ct obtenidos para los casos y los controles han sido corregidas dividiendo los valores obtenidos por los alcanzados por el gen de copia única, de tal

forma que se ha considerado al valor del mencionado gen como el 1. Por ello, cuanto más próximo al uno se hallan obtenidos las lecturas más largo es el tamaño de los Telómeros y viceversa.

En cada placa de PCR existen una serie de patrones que nos servirán para crear una recta de calibración a partir de la cual hallaremos la longitud media de los telómeros de cada muestra, poniendo cada muestra por duplicado.

Aparte de la amplificación de la región telomérica, paralelamente, se hará otra PCR a tiempo real utilizando cebadores que amplifican un gen de copia única (36B4), y que nos servirá como control de la técnica para compensar las posibles diferencias inherentes a la propia muestra.

Procedimiento

Determinación de la longitud de telómeros: mediante SYBR Green PCR (Roche LightCycler® 480). Los cebadores utilizados son:

1. Telómeros:

- a. Telo R: CGGTTTGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGG TTTGGGTT
- b. Telo F: GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCC TTACCCTTACCCT

2. Gen de copia única:

- a. 36B4F: CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC
- b. 36B4R: CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA

Las Tablas 2 y 3 recogen las preparaciones de PCR para la determinación de la longitud de los telómeros y el gen de copia única:

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN POR MUESTRA
Power SYBR Green Master Mix x2		5 µL
DNA	10 ng/µL	1,5 µL
Primer Telo F	10 µM	0,6 µL
Primer Telo R	10 µM	1,8 µL
H ₂ O		1.1 µL
VOLUMEN FINAL		10 µL

Tabla 2: Preparación PCR para los telómeros

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN POR MUESTRA
Power SYBR Green Master Mix x2		5 μ L
DNA (10 ng/ μ L)	10 ng/ μ L	1 μ L
Primer 36B4 F	10 μ M	0,3 μ L
Primer 36B4 R	10 μ M	0,5 μ L
H ₂ O		3,2 μ L
VOLUMEN FINAL		10 μ l

Tabla 3: Preparación PCR para el gen de copia única

La Tabla 4 recoge las condiciones de amplificación de las muestras:

FASE	NÚMERO CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (s)
Preincubación	1	95	15
Preamplificación	2	94 49	15 60
Amplificación previa	3	94 59	15 30
Amplificación	46	94 59 84 85	15 30 10 15
Melting curve	1	95 59 97	5 60

Tabla 4: condiciones de amplificación de las muestras de DNA

En cada placa se realiza una recta de control interno con un DNA de referencia (5 puntos de diluciones seriadas).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar, se realizó un estudio descriptivo de la muestra. Las variables cualitativas se han expresado en forma de porcentaje, y las cuantitativas se han expresado mediante la media o mediana (en función de si seguían una distribución normal mediante el test de Kolmogórov-Smirnov), con desviación estándar y rango. La correlación entre variables cuantitativas se realizó mediante los test de correlación parcial (el test de la r de Pearson para variables que seguían una distribución normal, o mediante el coeficiente rho de Spearman si no seguían dicha distribución). Se realizó un contraste de hipótesis (prueba de Mann-Whitney) para la correlación de la longitud de los telómeros entre los casos y controles, así como en el grupo de casos entre los fenotipos de enfermedad inflamatoria intestinal. El análisis estadístico se ha llevado a cabo mediante el programa SPSS versión 23.0.

RESULTADOS

ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA

De los 10 pacientes de nuestra muestra, 5 eran mujeres y 5 eran varones. De las mujeres, el 20% fueron diagnosticadas de EC frente al 30% diagnosticadas de CU; de los varones, el 30% se diagnosticó de EC y el 20% de CU. El siguiente gráfico muestra las frecuencias de EC y CU en función del sexo del paciente:

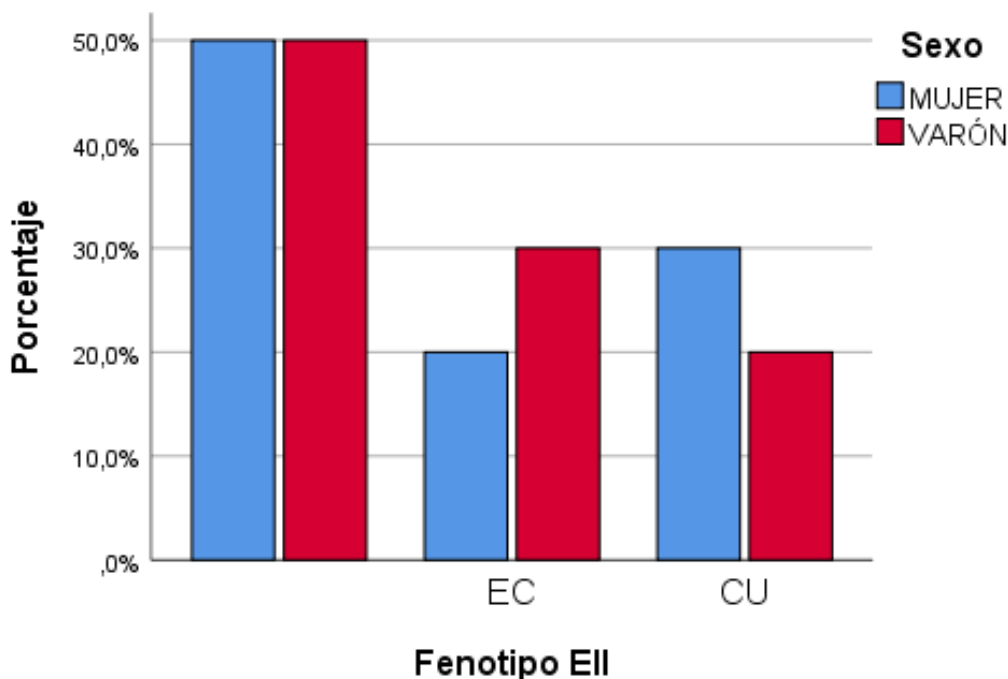


Gráfico 1: distribución de frecuencias del fenotipo de EII en total y según el sexo

A continuación, se presenta el conjunto de datos clínicos obtenidos para cada paciente:

El paciente número 1 (EII01) es una mujer de 26 años diagnosticada de EC el 26/12/2017. La analítica más próxima al diagnóstico (23/01/2018) reveló los siguientes valores analíticos: hemoglobina (Hb) sérica 13,1 g/dL, albúmina sérica 3,41 g/L, ferritina sérica 140 ng/mL, Proteína C Reactiva (PCR) sérica 2,08 mg/L, Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) sérica 69 mm/h, sin análisis de calprotectina fecal.

El paciente número 2 (EII02) es una mujer de 35 años diagnosticada de CU el 13/12/2017. La analítica posterior al diagnóstico (23/01/2018) aportó estos valores analíticos: hemoglobina (Hb) sérica 12,4 g/dL, albúmina sérica 3,5 g/L, ferritina sérica 28 ng/mL, Proteína C Reactiva (PCR) sérica 0,15 mg/L, Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) sérica 6 mm/h. No se encontraron valores de calprotectina fecal.

El paciente número 3 (EII03) es una mujer de 30 años diagnosticada de EC el 5/9/2017. En la analítica más próxima al diagnóstico (3/10/2017) se encontró: hemoglobina (Hb) sérica 12,4 g/dL, albúmina sérica 3,34 g/L, ferritina sérica 21 ng/mL, Proteína C Reactiva (PCR) sérica 1,36 mg/L,

Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) sérica 17 mm/h, y un valor de calprotectina fecal de 155 mg/g.

El paciente número 4 (EII04) es una mujer de 37 años diagnosticada de CU el 3/10/2017. La analítica previa al diagnóstico (2/10/2017) reveló los siguientes valores analíticos: hemoglobina (Hb) sérica 11,4 g/dL, albúmina sérica 2,82 g/L, ferritina sérica 450 ng/mL, Proteína C Reactiva (PCR) sérica 2,71 mg/L, Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) sérica 34 mm/h, y un valor de calprotectina fecal de 188 mg/g.

El paciente número 5 (EII05) es una mujer de 23 años diagnosticada de CU el 5/9/2017. La analítica más próxima al diagnóstico (29/12/2017) reveló los siguientes valores analíticos: hemoglobina (Hb) sérica 10,7 g/dL, albúmina sérica 3,32 g/L, ferritina sérica 15 ng/mL, Proteína C Reactiva (PCR) sérica 1,39 mg/L, Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) sérica 17 mm/h, y un valor de calprotectina fecal de 2534 mg/g.

El paciente número 6 (EII06) es un varón de 32 años diagnosticado de CU el 17/1/2018. La analítica más próxima al diagnóstico (17/4/2018) muestra los siguientes valores analíticos: hemoglobina (Hb) sérica 15,5 g/dL, albúmina sérica 4,44 g/L, ferritina sérica 129 ng/mL, Proteína C Reactiva (PCR) sérica 0,12 mg/L, Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) sérica 3 mm/h, y un valor de calprotectina fecal <27 mg/g.

El paciente número 7 (EII07) es un varón de 37 años diagnosticado de EC el 16/11/2017. La analítica más próxima al diagnóstico (28/2/2018) aportó los siguientes valores analíticos: hemoglobina (Hb) sérica 15,1 g/dL, albúmina sérica 4,08 g/L, ferritina sérica 254 ng/mL, Proteína C Reactiva (PCR) sérica 0,84 mg/L, Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) sérica 10 mm/h, y un valor de calprotectina fecal de 34 mg/g.

El paciente número 8 (EII08) es un varón de 72 años diagnosticado de CU el 31/10/2017. La analítica más próxima al diagnóstico (17/11/2017) muestra los siguientes valores analíticos: hemoglobina (Hb) sérica 10,1 g/dL, albúmina sérica 2,66 g/L, ferritina sérica 205 ng/mL, Proteína C Reactiva (PCR) sérica 12 mg/L, Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) sérica 83 mm/h, y un valor de calprotectina fecal <27 mg/g.

El paciente número 9 (EII09) es un varón de 58 años diagnosticado de EC el 20/12/2018. La analítica más próxima al diagnóstico (13/2/2018) muestra los siguientes valores analíticos: hemoglobina (Hb) sérica 15,7 g/dL, albúmina sérica 3,56 g/L, ferritina sérica 97 ng/mL, Proteína C Reactiva (PCR) sérica 0,14 mg/L, Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) sérica 16 mm/h, y un valor de calprotectina fecal de 172 mg/g.

El paciente número 10 (EII10) es un varón de 58 años diagnosticado de EC el 20/11/2017. En la analítica más próxima al diagnóstico (7/3/2018) se encontraron: hemoglobina (Hb) sérica 16,7

g/dL, albúmina sérica 3,99 g/L, ferritina sérica 200 ng/mL, Proteína C Reactiva (PCR) sérica 1,04 mg/L, Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) sérica 25 mm/h, y un valor de calprotectina fecal de 43 mg/g.

La mediana de edad de los pacientes es de 36 años (DE 15,73; rango 23-72). La media de hemoglobina sérica fue de 13,31 mg/dL (DE 2,3; rango 10,1-16,7). La albúmina sérica media fue de 3,51 g/L (DE 0,54; rango 2,66-4,44). La media de ferritina sérica fue de 141,30 μ g/dL (DE 141,3; rango 3-450). La mediana de la PCR sérica fue de 141,3 mg/L (rango 0,12-12). La media de la VSG sérica fue de 28 mm/h (DE \pm 27,02; rango 3-83), y la media de calprotectina en heces fue de 38,50 mg/g (rango 0-2534). Respecto a la ratio de la longitud de los telómeros, la media en los casos fue 1,447 (DE 0,053) y en los controles fue de 1,448 (DE 0,059) (Gráfico 2).

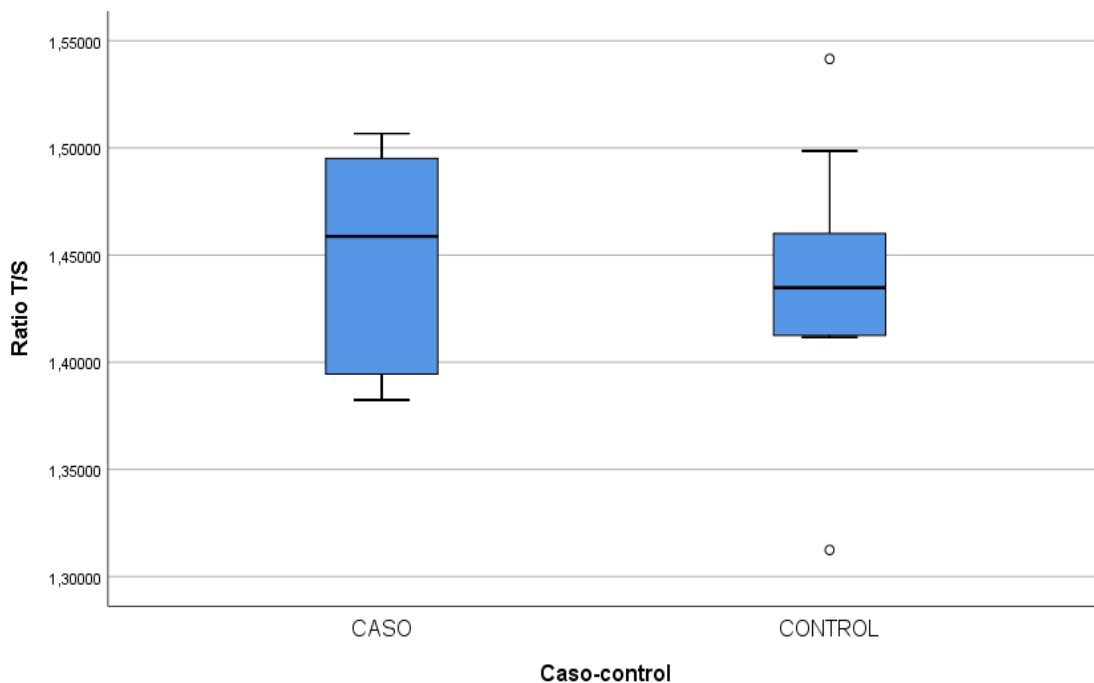


Gráfico 2: distribución de la media de la longitud de los telómeros en casos y controles.

RESULTADOS OBTENIDOS DE LA LONGITUD DE LOS TELÓMEROS

Las siguientes imágenes muestran las curvas del espectro de absorción y amplificación en tiempo real de los genes 36B4 (gen control) y del gen de los telómeros.

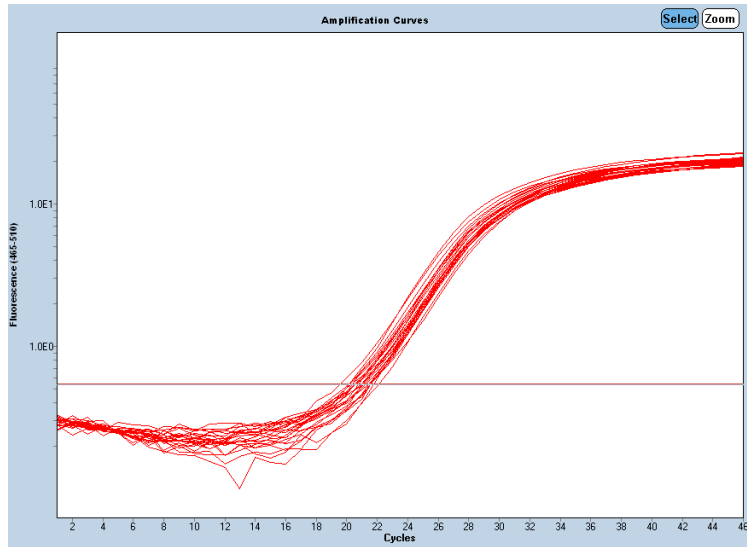


Ilustración 1: curva del espectro de absorción del gen de los telómeros

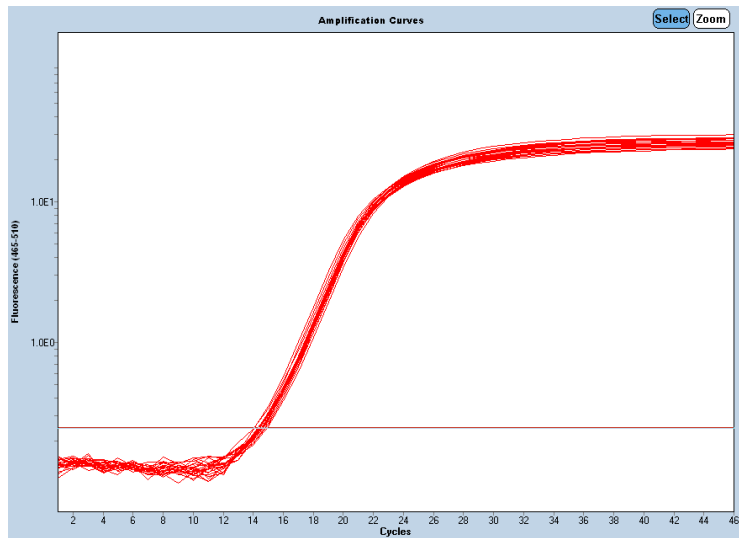


Ilustración 2: curva del espectro de absorción del gen control 36B4

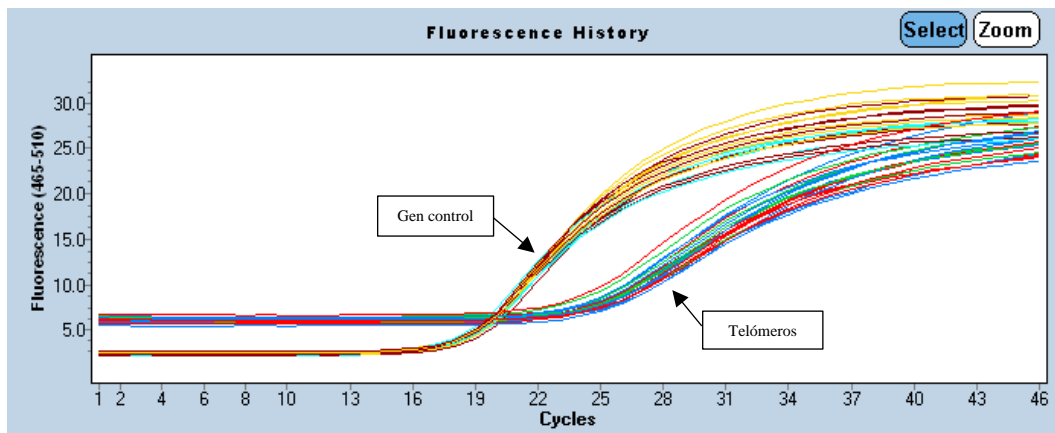


Ilustración 3: curvas de amplificación del DNA del gen de los telómeros y el gen control 36B4

ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Al comparar la longitud de los telómeros entre casos y controles mediante la prueba de Mann-Whitney, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre sus ($p>0,05$), por lo que no podemos afirmar que los pacientes con EII tengan los telómeros más cortos respecto a individuos sanos pareados por edad y género. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) al realizar la prueba de Mann-Withney para comparar las medias de la longitud de los telómeros en función del fenotipo de EII (EC, CU).

Se analizó la correlación entre la longitud de los telómeros y los marcadores de actividad seleccionados (Hb, albúmina, ferritina, PCR, VSG séricas y calprotectina fecal), mediante los coeficientes de correlación de Pearson (para distribuciones normales) y de Spearman (para distribuciones no normales). Se observó una correlación débilmente positiva entre la longitud de los telómeros y las variables Hb, ferritina, VSG, PCR séricas y calprotectina fecal, y débilmente negativa con los niveles de albúmina, siendo dicha correlación no estadísticamente significativa ($p>0,05$).

VARIABLE	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	SIGNIFICACIÓN
Hemoglobina sérica	0,141	$p>0,05$
Albúmina sérica	-0,107	$p>0,05$
Ferritina sérica	0,328	$p>0,05$
VSG sérica	0,222	$p>0,05$
PCR sérica	0,230	$p>0,05$
Calprotectina fecal	0.275	$p>0,05$

Tabla 5: coeficientes de correlación entre la longitud de los telómeros y los marcadores de inflamación

DISCUSIÓN

APLICABILIDAD DE LA METODOLOGÍA USADA

Presentamos un trabajo de investigación acerca de otros aspectos fisiopatológicos presentes en la EII, poco conocidos en la actualidad. Los estudios acerca de la longitud de los telómeros realizados hasta la fecha están enfocados hacia el estudio de la relación entre el acortamiento telomérico y el desarrollo de cáncer (30); sin embargo, no se encuentran trabajos sobre la evaluación de la medición de los telómeros como marcador biológico en la EII.

Respecto a la técnica aplicada en este estudio, consideramos que esta es precisa y fácilmente reproducible, dado su carácter poco invasivo y la necesidad de pequeñas muestras de sangre para su realización, lo cual podría suponer un buen método para contribuir a cuantificar el fenotipo de los pacientes con EII, tanto al diagnóstico de esta como en el seguimiento de los pacientes. A pesar de estos aspectos, la aplicabilidad de la técnica debe seguir investigándose, ya que el tamaño muestral de nuestro estudio ha sido pequeño, y no fue realizado en el momento del diagnóstico, sino tiempo después del mismo; la evaluación de la técnica en la fase activa de la enfermedad podría mostrar cambios significativos en la longitud de los telómeros. Junto a esto, sería importante establecer una correlación con la influencia de factores fisiopatológicos presentes en la EII, como el TGF- β , que está en íntima relación con la fibrosis y que no hemos determinado en nuestro estudio (34), así como las concentraciones de hormonas sexuales, encargadas de regular en mayor o menor medida el tamaño de los telómeros y la actividad de las Telomerasas (35).

Una de las limitaciones principales de la técnica empleada es el uso de variables cualitativas y no cuantitativas. De esta forma, únicamente estudiamos si los telómeros son cortos o largos, puesto que se comparan con una medida conocida y con sujetos control pareados por edad y género; sin embargo, no somos capaces de cuantificar el tamaño de estos. A pesar de ello, sí podríamos obtener medidas comparativas entre variables de un mismo paciente por ser una técnica fácil, barata y reproducible.

UTILIDAD DE LA MEDICIÓN DE LOS TELÓMEROS EN MONOCITOS EN EII

Los hallazgos obtenidos en nuestro estudio acerca de la determinación de la longitud de los telómeros no muestran diferencias importantes entre nuestros pacientes y la población sana. Estos resultados pueden ser consecuencia de factores como el tamaño muestral y la selección de 5 mujeres y 5 varones, lo que podría no ser representativo de la población. En el momento de la realización del estudio, todos nuestros pacientes tenían ya establecida una pauta de tratamiento según el fenotipo de EII, el grado de actividad y el nivel de extensión; esto determina que los parámetros de inflamación clásicos estuvieran ya normalizados cuando aconteció su inclusión en el estudio.

Complementariamente, los hallazgos acerca de la longitud de los telómeros deben relacionarse con la actividad de la telomerasa, la enzima encargada de mantener una longitud adecuada de los telómeros tras cada ciclo celular. Sabemos que los telómeros actúan como un “reloj biológico” a nivel celular: cuando son lo suficientemente cortos, la división celular se detiene y la célula entra en un estado de senescencia (28). La telomerasa retrasa la entrada de la célula en dicha condición, alargando su potencial de división. El problema aparece cuando la actividad de la telomerasa se encuentra aumentada de forma descontrolada: la detención de la división celular no ocurriría, con el consecuente acúmulo de daño a nivel del material genético y el riesgo de malignidad (36). Ante una alteración en la longitud de los telómeros, deberíamos investigar cuál es la actividad de la telomerasa, para conocer la situación del paciente y sus implicaciones en el diagnóstico.

	Telomerasa aumentada	Telomerasa disminuida
Telómeros cortos	Predisposición cáncer	Senescencia celular
Telómeros largos	Activación celular relacionada con la inflamación	Predisposición a cáncer por activación vía complementaria (distinct kinases-dependent DNA)

IMPACTO DE NUESTRO ESTUDIO

Debido al número de pacientes de nuestro estudio, no pueden establecerse hallazgos relevantes según los resultados obtenidos. No obstante, de confirmarse nuestra hipótesis de trabajo en una muestra más grande y representativa de la población, y coincidiendo con el momento diagnóstico, podríamos encontrarnos ante una nueva vía para cuantificar la enfermedad y proceder al seguimiento de los pacientes con EII, proporcionando una alternativa a la realización de los procedimientos invasivos actuales como la colonoscopia, la cual requiere una preparación previa a su realización, es costosa y, como toda técnica invasiva, no está exenta de riesgos para el paciente. Además, proporcionaría un marco muy importante para el conocimiento fisiopatológico de la enfermedad, el cual permitiría detectar de una manera precoz a aquellos sujetos que están estables (longitud de los telómeros normal) y distinguirlos de los que presentan monocitos activados como señal de inflamación activa (telómeros largos con telomerasa elevada), o de aquellos que están evolucionando a cáncer por cualquiera de las vías anteriormente expuestas.

Por otra parte, el estudio de la correlación entre la longitud de los telómeros en EII y los marcadores actuales de diagnóstico y seguimiento podría suponer un diagnóstico más preciso, ya que estos marcadores presentan alta sensibilidad en procesos inflamatorios, pero su especificidad es escasa, ya que pueden aparecer alterados ante cualquier respuesta inflamatoria sistémica (en el caso de los marcadores séricos) o intestinal (respecto a los marcadores fecales) (26).

Además, el estudio de la actividad de la telomerasa en el contexto de una alteración de la longitud de los telómeros puede aportar información importante sobre el contexto clínico del paciente. El hallazgo de una actividad telomérica aumentada en un paciente con un acortamiento de la longitud de los telómeros podría indicar predisposición al desarrollo de malignidad; por el contrario, una menor actividad de la telomerasa supone un estado de senescencia celular en pacientes con los telómeros más cortos.

CONSIDERACIONES FINALES

Respecto a las perspectivas de futuro en EII, y en relación con nuestro estudio, el diagnóstico precoz resulta un aspecto fundamental en esta entidad. La prevención de brotes agudos de inflamación, potencialmente peligrosos en función de la gravedad, la limitación de la extensión de la enfermedad, evitando alteraciones estructurales o necesidad de tratamiento quirúrgico, y la disminución de complicaciones a largo plazo, entre ellas el desarrollo de malignidad, son los principales objetivos a conseguir en estos pacientes; todos ellos se verán influidos por un diagnóstico precoz de la enfermedad, incluso en estadios iniciales con presencia de actividad inflamatoria en ausencia de sintomatología. Para ello, es necesario contar con técnicas de diagnóstico precisas, rápidas y no invasivas, que además no requieran extracción de grandes muestras de tejidos y/o fluidos biológicos para poder llevarse a cabo.

El estudio de la longitud de los telómeros en monocitos de sangre periférica cumple las características anteriormente mencionadas. Serían necesarios trabajos adicionales para considerar esta prueba como el “patrón oro” en el seguimiento de EII y relegar el papel de la colonoscopia. Su importancia podría ser clave en estadios precoces de la enfermedad, en los que existen graves alteraciones a nivel fisiopatológico y aumento de la actividad inflamatoria, pero no aparecen manifestaciones clínicas y el paciente permanece asintomático. Una muestra de pacientes mayor, con el estudio de los telómeros y la actividad de la telomerasa en el momento diagnóstico de la EII, será clave en el manejo de esta, de poderse confirmar nuestra hipótesis de trabajo que, estamos convencidos, será la base principal para el manejo individualizado del paciente con EII en un futuro próximo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kasper DL, Hauser SL, Jameson L, Loscalzo J, Fauci AS, and Longo DL. Harrison's principles of Internal Medicine. 19th Edition. Vol. 2. McGraw Hill Education; 2012. 1947-65 p.
2. Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol.* 2001;7(2):175–84.
3. Kaplan GG, and Ng SC. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology.* 2017;152(2):313–21.
4. Molodecky NA, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, and Kaplan GG. Challenges associated with identifying the environmental determinants of the inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(8):1792–9.
5. Farreras P, Rozman C, Cardellach F, Agustí A, Bayés de Luna A, Brugada J, et al. Farreras-Rozman: Medicina Interna. Farreras-Rozman: Medicina Interna. Barcelona: Elsevier; 2012. 1759-1791 p.
6. Sobczak M, Fabisiak A, Murawska N, Wesołowska E, Wierzbicka P, Wlazłowski M, et al. Current overview of extrinsic and intrinsic factors in etiology and progression of inflammatory bowel diseases. *Pharmacol Reports.* 2014;66(5):766–75.
7. Bincy P A, Tasneem A, and Tauseef A. Inflammatory Bowel Disease: Pathophysiology and Current Therapeutic Approaches. *Handb Exp Pharmacol.* 2017;239:251–63.
8. Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, Ardizzone S, Armuzzi A, Barreiro-de Acosta M, et al. Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 1: Definitions, diagnosis, extra-intestinal manifestations, pregnancy, cancer surveillance, surgery, and ileo-anal pouch disorders. *J Crohn's Colitis.* 2017;11(6):649–70.
9. Gomollón F, Dignass A, Annese V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, et al. 3rd European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016: Part 1: Diagnosis and medical management. *J Crohn's Colitis.* 2017;11(1):3–25.
10. Reinisch S, Schweiger K, Pablik E, Collet-Fenetrier B, Peyrin-Biroulet L, Alfaro I, et al. An index with improved diagnostic accuracy for the diagnosis of Crohn's disease derived from the Lennard-Jones criteria. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016;44(6):601–11.
11. Leone S, Samhan-arias A, Ben-shachar I, Derieppe M, Dinc F, Grosu I, et al. ECCO-

- EFCCA ulcerative colitis guidelines for patients. *J Crohn's Colitis*. 2017;11(6):649–70.
12. Gomollón F, García-López S, Sicilia B, Gisbert JP, and Hinojosa J. Guía clínica GETECCU del tratamiento de la colitis ulcerosa elaborada con la metodología GRADE. *Gastroenterol Hepatol*. 2013;36(8):e1–47.
 13. Ferrer Bradley I, and Hinojosa Del Val J. Definiciones, manifestaciones clínicas y diagnóstico de la enfermedad de Crohn. *Medicine (Baltimore)*. 2012;11(5):257–65.
 14. Rothfuss KS, Stange EF, and Herrlinger KR. Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2006;12(30):4819–31.
 15. Conrad K, Roggenbuck D, and Laass MW. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4–5):463–6.
 16. Dignass A, Eliakim R, Magro F, Maaser C, Chowers Y, Geboes K, et al. Segundo Consenso Europeo basado en evidencia sobre el diagnóstico y tratamiento de la colitis ulcerosa crónica idiopática. *Rev Gastroenterol México*. 2014;79(4):263–89.
 17. Harbord M, Eliakim R, Bettenworth D, Karmiris K, Katsanos K, Kopylov U, et al. Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 2: Current management. *J Crohn's Colitis*. 2017;11(7):769–84.
 18. Nos Mateu P, and Aguas Peris M. Tratamiento médico de la colitis ulcerosa. *Medicine (Baltimore)*. 2012;11(5):275–83.
 19. Esteve M. Tratamiento en la Enfermedad de Crohn. *EMC - Tratado Med*. 2002;1(7):1–8.
 20. Kúsululas-Delint, Deyanira; González-Regueiro, José A.; Rodríguez-Aldama, Juan C; García-Miranda, Fernanda S; García-Santos, Raúl A.; Lizardo, Adolfo E.; Gutiérrez-Grobe Y. Crohn's disease. Review and current concepts. *Rev Investig Médica Sur Mex*. 2016;23(1):10–20.
 21. Gomollón F, and Sans M. Enfermedad inflamatoria intestinal. *Enfermedad de Crohn. Rev Española Gastroenterol y Hepatol*. 2010;33:443–58.
 22. Kinouchi Y, Hiwatashi N, Chida M, Nagashima F, Takagi S, Maekawa H, et al. Telomere shortening in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol*. 1998;33(3):343–8.
 23. Hinojosa J, Nos Mateu P, Alós R, Chaparro M, Barreiro M, Clofent J. Conductas de actuación en la Enfermedad Inflamatoria Crónica Intestinal: manual práctico. 6th ed. Ergón Creación; 2014. 159-172 p.

24. Kostas A, Siakavellas S, Kosmidis C, Takou A, Nikou J, Maropoulos G, et al. Fecal calprotectin measurement is a marker of short- term clinical outcome and presence of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2017;23(41):7387–96.
25. Liverani E, Scaioli E, John Digby R, Bellanova M, and Belluzzi A. How to predict clinical relapse in inflammatory bowel disease patients. *World J Gastroenterol*. 2016;22(3):1017–33.
26. Norouzinia M, Chaleshi V, Alizadeh AHM, and Zali MR. Biomarkers in inflammatory bowel diseases: Insight into diagnosis, prognosis and treatment. *Gastroenterol Hepatol from Bed to Bench*. 2017;10(3):155–67.
27. Georgin-Lavialle S, Aouba A, Mouthon L, Londono-Vallejo JA, Lepelletier Y, Gabet AS, et al. The telomere/telomerase system in autoimmune and systemic immune-mediated diseases. *Autoimmun Rev*. 2010;9(10):646–51.
28. Wong JMY, and Collins K. Telomere maintenance and disease. *Lancet*. 2003;362:983–8.
29. Calado RT, and Young NS. Telomere Diseases. *N Engl J Med*. 2009;361:2353–65.
30. Laish I, Katz H, Stein A, Liberman M, Naftali T, Kitay-Cohen Y, et al. Telomere dysfunction in peripheral blood lymphocytes from patients with primary sclerosing cholangitis and inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis*. 2015;47(9):790–6.
31. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
32. O’Callaghan NJ, Dhillon VS, Thomas P, Fenech M. A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length. *Biotechniques*. 2008;44(6):807–9.
33. O’Callaghan NJ, Fenech M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biol Proced Online*. 2011;13(1):3.
34. Razani B, Zhang XL, Bitzer M, Von Gersdorff G, Böttinger EP, Lisanti MP. Caveolin-1 Regulates Transforming Growth Factor (TGF)- β /SMAD Signaling through an Interaction with the TGF- β Type I Receptor. *J Biol Chem*. 2001;276(9):6727–38.
35. Bayne S, Liu JP. Hormones and growth factors regulate telomerase activity in ageing and cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2005;240(1–2):11–22.
36. Hoeijmakers JHJ. DNA Damage, Aging, and Cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(15):1475–85.

ANEXOS

ANEXO I: Consentimiento informado para la realización de análisis genéticos diagnósticos

ANEXO II: Solicitud de autorización para la realización de proyectos de investigación dentro del sector Zaragoza III

ANEXO III: Acuerdo de confidencialidad y de finalidad de uso en estudios de investigación