

UNIVERSIDAD DE VALENCIA  
Facultad de Medicina y Odontología  
Departamento de Fisiología  
Programa de Doctorado R.D. 1393/2007

**MAYO 2017**



TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN DE BIOMARCADORES EN LA  
RECURRENCIA POST-QUIRÚRGICA DE LA ENFERMEDAD DE  
CROHN: VALOR PREDICTIVO E IMPLICACIÓN PATOGENICA.**

**Presentada por:** Elena Cerrillo Bataller

**Dirigida por:**

Dra. Belén Beltrán Niclós

Dra. Pilar Nos Mateu





VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA  
Programa de Doctorado R.D. 1393/2007  
Año: 2017

**TESIS DOCTORAL:**  
**CARACTERIZACIÓN DE BIOMARCADORES EN LA RECURRENCIA POST-  
QUIRÚRGICA DE LA ENFERMEDAD DE CROHN: VALOR PREDICTIVO E  
IMPLICACIÓN PATOGENICA.**

Autor: **Elena Cerrillo Bataller**

Dirigida por:

**Dra. Belén Beltrán Niclós**

**Dra. Pilar Nos Mateu**



**Dña. PILAR NOS MATEU**, Jefa del Servicio de Medicina Digestiva y Directora del Área Médico-Quirúrgica de Enfermedades Digestivas del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

**Dña. BELÉN BELTRÁN NICLÓS**, Facultativo Especialista de Área del Servicio de Medicina Digestiva y Coordinadora de Investigación Biomédica del Área de Enfermedades Digestivas del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

**D. FEDERICO V. PALLARDÓ CALATAYUD**, Catedrático del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València.

Directoras y tutor, respectivamente, **CERTIFICAN**:

Que la presente tesis doctoral titulada “**Caracterización de biomarcadores en la recurrencia post-quirúrgica de la enfermedad de Crohn: valor predictivo e implicación patogénica**”, presentada por la Licenciada en Medicina **Dña. ELENA CERRILLO BATALLER** para optar al Grado de Doctor por la Universitat de València, está finalizada y lista para ser presentada y juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firman la presente en Valencia a 10 de Mayo de 2017.

Fdo.: Dra. D<sup>a</sup>

Pilar Nos Mateu

(Directora)

Fdo.: Dra. D<sup>a</sup>

Belén Beltrán Niclós

(Directora)

Fdo.: Dr. D.

Federico V. Pallardó Calatayud

(Tutor)



## **AGRADECIMIENTOS**

Son muchas las personas a las que quiero expresar mi agradecimiento y mi cariño por su apoyo prestado durante este largo camino.

A mis directoras de tesis, por las que siento una profunda admiración:

D<sup>a</sup> Belén Beltrán Niclós, por introducirme en el mundo de la investigación, por contagiarme su pasión y entusiasmo, por creer en mí desde el principio y por todas las horas de dedicación, asesoramiento y cariño, tanto en lo profesional como en lo personal.

D<sup>a</sup> Pilar Nos Mateu, por todo cuanto me ha enseñado en estos años sobre la enfermedad inflamatoria intestinal, por su confianza y cariño constantes, por su dedicación y cercanía personal, por encontrar siempre un hueco a pesar de las apretadas agendas.

Me siento muy afortunada de haber encontrado en el camino a personas de tal calidad profesional y humana, mis maestras. Gracias por haberme dado la oportunidad de “crecer” a vuestro lado.

A la Dra. Inés Moret, por todo lo que me ha aportado y enseñado en estos años juntas en el laboratorio, por su paciencia, su cariño y su generosidad, por ese buen hacer que siempre he admirado y su buena disposición en cualquier circunstancia. Por todas las horas que me ha regalado. Sin ella, no hubiera podido llevar a cabo todo este trabajo.

A Luis Tortosa, por su ayuda, interés e implicación en el laboratorio, su admirable paciencia y buen carácter siempre con los pacientes, y por acogerme y ser un verdadero compañero desde el principio, desde que llegué al laboratorio siendo tan sólo una residente.

A mis compañeros del Servicio de Medicina Digestiva del Hospital Universitari i Politècnic La Fe, con quienes he compartido tantas vivencias, por su cariño y apoyo, y en especial a Marisa Iborra, por estar siempre a mi lado como una hermana mayor y enseñarme que, a pesar de las dificultades, “se puede”.

Al equipo de Coloproctología y Radiodiagnóstico, por su compañerismo y disponibilidad, su espíritu colaborador en cualquier proyecto y su predisposición al trabajo en equipo. Es una suerte contar con ellos en el día a día.

A David Hervás, responsable de la Unidad de Bioestadística del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, por su ayuda y asesoramiento en el análisis de los datos.

A mi gente, esos amigos incondicionales que siempre están ahí, en los buenos y malos momentos, ellos saben quiénes son y lo mucho que les quiero.

A mis padres y a mi hermano, por haberme permitido llegar hasta aquí con su apoyo y amor incondicional, por creer más en mí que yo misma, por inculcarme la cultura del esfuerzo y enseñarme que todo es posible cuando uno se lo propone. Por estar siempre ahí y ser como son, buenas personas. Todo lo que soy y lo que he conseguido os lo debo en gran parte a vosotros.

A Paco, por su cariño y apoyo constantes, por entender mis ausencias y estar siempre ahí a pesar de todo, por todas las horas que le debo... No hubiera imaginado mejor compañero de viaje. Para mí esta etapa ha sido la mayor prueba de amor.

GRACIAS.

# Índice

LISTADO DE ABREVIATURAS .....	12
LISTADO DE FIGURAS.....	14
LISTADO DE TABLAS .....	17
I. INTRODUCCIÓN .....	19
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	22
1.    Capítulo 1. Enfermedad de Crohn.....	23
1.1    Generalidades .....	23
1.2    Bases diagnósticas.....	25
1.3    Etiopatogenia.....	28
1.3.1    Factores genéticos y reguladores de la expresión génica .....	28
1.3.1.1    Epigenética y microRNAs .....	36
1.3.1.2    MicroRNAs asociados a la EC .....	38
1.3.2    Factores inmunológicos .....	39
1.3.2.1    Sistema inmune innato.....	44
1.3.2.2    Sistema inmune adaptativo.....	49
1.3.2.3    Inmunoregulación en EC precoz y tardía .....	52
1.3.3    Microbiota intestinal y ambiente .....	54
1.4    Historia natural de la enfermedad .....	59
1.5    Valoración de la actividad.....	63
1.5.1    Índices clínicos .....	64
1.5.2    Índices endoscópicos .....	66
1.5.3    Índices radiológicos .....	67
1.5.4    Marcadores serológicos y fecales .....	69
1.6    Tratamiento médico de la enfermedad .....	76
2.    Capítulo 2. Enfermedad de Crohn y recurrencia post-quirúrgica.....	78
2.1    Cirugía en la enfermedad de Crohn.....	78
2.2    Recurrencia post-quirúrgica: conceptos, patogenia y diagnóstico .....	80
2.3    Factores de riesgo de recurrencia post-quirúrgica.....	91
2.4    Tratamiento de prevención de la recurrencia post-quirúrgica.....	93
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	99
IV. MATERIAL Y MÉTODOS .....	102
1.    Selección de pacientes y controles. Criterios de inclusión y exclusión.....	103
2.    Variables clínicas, analíticas, endoscópicas y radiológicas recogidas .....	104
3.    Diseño experimental: recogida de muestras, “timing” y definiciones.....	105
4.    Evaluación de la recurrencia post-quirúrgica .....	110

4.1	Recurrencia post-quirúrgica evaluada mediante endoscopia.....	110
4.2	Recurrencia post-quirúrgica evaluada mediante entero-RM.....	112
5.	Caracterización evolutiva de marcadores serológicos y fecales.....	114
5.1	Monitorización y análisis de los valores de calprotectina fecal .....	114
5.2	Determinación y análisis del perfil de citoquinas plasmáticas .....	114
5.3	Determinación y análisis de los niveles de $\alpha$ -defensinas plasmáticas.....	116
6.	Estudio de miRNAs.....	117
6.1	Extracción del ARN a partir de las muestras de plasma.....	117
6.2	Análisis (detección) mediante PCR cuantitativa a tiempo real .....	118
7.	Análisis estadístico .....	120
V.	RESULTADOS .....	121
1.	Características basales de los pacientes incluidos .....	122
2.	Pacientes con vs. sin recurrencia post-quirúrgica precoz.....	123
3.	Marcadores fecales: análisis de la calprotectina fecal en el contexto post-quirúrgico. ....	127
3.1	Comportamiento evolutivo tras la cirugía en pacientes con vs. sin recurrencia post-quirúrgica.....	127
3.2	Capacidad para predecir la recurrencia post-quirúrgica en comparación con los marcadores serológicos.....	129
3.3	Asociación con el índice endoscópico de Rutgeerts.....	131
3.4	Asociación con el índice radiológico de Sailer .....	134
4.	Citoquinas plasmáticas: patrón evolutivo tras la cirugía.....	137
4.1	Cambios evolutivos en el patrón de expresión de citoquinas tras la cirugía en pacientes con vs. sin recurrencia post-quirúrgica.....	137
4.2	Análisis individualizado de las citoquinas plasmáticas.....	141
5.	Análisis de las $\alpha$ -defensinas plasmáticas en el contexto post-quirúrgico.....	147
6.	Índice predictivo combinado de recurrencia precoz tras la cirugía.....	148
7.	MicroRNAs: análisis inicial .....	156
7.1	Número de microRNAs detectados .....	156
7.2	Nivel de expresión de microRNAs en las muestras .....	158
7.3	Análisis de Componentes Principales o PCA plot .....	159
7.4	Expresión diferencial de microRNAs en recurrencia vs. no recurrencia .....	160
8.	Validación de los microRNAs identificados con expresión diferencial.....	164
8.1	Número de microRNAs detectados .....	164
8.2	Nivel de expresión de microRNAs en las muestras .....	166
8.3	Análisis de Componentes Principales o PCA plot .....	167
8.4	Expresión diferencial de microRNAs en recurrencia vs. no recurrencia .....	168

8.4.1 MicroRNAs con expresión diferencial pre-cirugía entre los pacientes con vs. sin recurrencia .....	168
8.4.2 MicroRNAs con expresión diferencial al año de la cirugía entre los pacientes con vs. sin recurrencia .....	171
8.4.2.1 Volcano Plot de los microRNAs con expresión diferencial al año de la cirugía entre los pacientes con vs. sin recurrencia.....	172
VI. DISCUSIÓN.....	173
1. Consideraciones previas respecto al diseño y pertinencia del estudio, así como a la metodología empleada .....	174
2. Consideraciones relacionadas con los resultados .....	179
VII. CONCLUSIONES .....	195
VIII. BIBLIOGRAFÍA .....	197

## LISTADO DE ABREVIATURAS

---

AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CAT	Catalasa
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
cDNA	Complementary DNA
CF	Calprotectina fecal
CU	Colitis ulcerosa
EC	Enfermedad de Crohn
ECCO	European Crohn's and Colitis Organization
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
Entero-RM	Enterografía mediante Resonancia Magnética
Entero-TC	Enterografía mediante Tomografía Computarizada
EPA	Enfermedad perianal
FASR	Fas-receptor
FASLG	Fas-ligando
IL	Interleucinas/Interleuquinas
IL-23R	Interleuquina-23 receptor
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IQR	Rango intercuartil
LT	Linfocitos T
mL	Mililitro
miRNA	MicroRNA
NF- $\kappa$ B	Factor de Transcripción Nuclear Kappa Beta
OR	Odds Ratio
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Proteína C Reactiva
ROC	Receiver Operating Characteristic
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RT	Retro-transcripción
RT-qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
STAT1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1

TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa
VPN	Valor Predictivo Negativo
vs.	Versus
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ g	Microgramo
$\alpha$ -Def	$\alpha$ -Defensinas

## LISTADO DE FIGURAS

---

- Figura 1. Granuloma no necrotizante submucoso
- Figura 2. Componentes del sistema inmune intestinal
- Figura 3. Liberación de calprotectina al lumen intestinal en fases tempranas de la inflamación
- Figura 4. Tasas de recurrencia clínica y endoscópica al año y a los 5 años tras la resección intestinal
- Figura 5. Algoritmo de prevención de la recurrencia post-quirúrgica en la EC
- Figura 6. Cronograma del estudio
- Figura 7. Sala de colonoscopia estándar de nuestro centro
- Figura 8. Plataforma de análisis Luminex®
- Figura 9. Nº de pacientes con desarrollo de recurrencia a lo largo del seguimiento
- Figura 10. Incidencia acumulada de recurrencia post-quirúrgica durante el seguimiento
- Figura 11. Evolución temporal (pre- y post-cirugía) de los valores de CF en los pacientes con y sin recurrencia durante el seguimiento
- Figura 12. Evolución temporal de los valores de CF (medianas, 1er y 3er cuartil, máximo y mínimo) en los pacientes con y sin recurrencia durante el seguimiento
- Figura 13. Curva ROC de la CF para predecir la presencia de recurrencia morfológica
- Figura 14. Valores de PCR y fibrinógeno (medianas, 1er y 3er cuartil, máximo y mínimo) en los pacientes con y sin recurrencia durante el seguimiento
- Figura 15. Valores de CF (medianas) en función del índice endoscópico de Rutgeerts
- Figura 16. Análisis de regresión ordinal que muestra la probabilidad estimada de cada uno de los scores del índice de Rutgeerts según los valores de CF
- Figura 17. Valores de CF (medianas) en función del índice radiológico de Sailer

- Figura 18. Análisis de regresión ordinal que muestra la probabilidad estimada de cada MR score del índice de Sailer según los valores de CF
- Figura 19. Citoquinas. Heat map con los resultados del fuzzy clustering
- Figura 20. Heat map conjunto. Evolución temporal de la concentración de citoquinas post-cirugía en ambos grupos
- Figura 21. Heat map representando los valores de concentración de citoquinas para cada paciente (grupo recurrencia) durante el seguimiento post-quirúrgico
- Figura 22. Heat map representando los valores de concentración de citoquinas para cada paciente (grupo no recurrencia) durante el seguimiento post-quirúrgico
- Figura 23. Evolución temporal de la IL-1 $\beta$  en pacientes con y sin recurrencia
- Figura 24. Evolución temporal de la IL-2 en pacientes con y sin recurrencia
- Figura 25. Evolución temporal de la IL-6 en pacientes con y sin recurrencia
- Figura 26. Evolución temporal de la IL-10 en pacientes con y sin recurrencia
- Figura 27. Evolución temporal de la IL-12p70 en pacientes con y sin recurrencia
- Figura 28. Evolución temporal de la IL-13 en pacientes con y sin recurrencia
- Figura 29. Evolución temporal del TNF- $\alpha$  en pacientes con y sin recurrencia
- Figura 30. Evolución temporal del IFN- $\gamma$  en pacientes con y sin recurrencia
- Figura 31. Concentraciones plasmáticas de  $\alpha$ -Def 1–3 entre los pacientes con vs. sin recurrencia post-quirúrgica y los controles sanos
- Figura 32. Curva ROC del modelo predictivo combinado para la predicción de la recurrencia post-quirúrgica
- Figura 33. Nomograma ajustado a partir del modelo de supervivencia multivariable para la predicción de recurrencia
- Figura 34. Efecto de la variable profilaxis en el riesgo de recurrencia según el modelo multivariable
- Figura 35. Efecto de los valores de CF en el riesgo de recurrencia según el modelo multivariable
- Figura 36. Efecto de los valores de IL-6 en el riesgo de recurrencia según el modelo multivariable
- Figura 37. Efecto de los valores de IFN- $\gamma$  en el riesgo de recurrencia según el modelo multivariable

- Figura 38. Incidencia acumulada de recurrencia post-quirúrgica a los 2 años según tipo de tratamiento preventivo
- Figura 39. Ilustración gráfica del contenido de microRNAs en las muestras
- Figura 40. Heat map y agrupación jerárquica inicial (clustering) de microRNAs
- Figura 41. MicroRNAs: PCA Plot (análisis inicial)
- Figura 42. Ilustración gráfica del contenido de microRNAs en las muestras empleadas para la validación.
- Figura 43. Heat map y agrupación jerárquica (clustering) de microRNAs (validación)
- Figura 44. MicroRNAs: PCA Plot (validación)
- Figura 45. Volcano plot de los microRNAs con expresión diferencial pre-cirugía entre los pacientes con vs. sin recurrencia
- Figura 46. Volcano plot de los microRNAs con expresión diferencial al año de la cirugía entre los pacientes con vs. sin recurrencia

## LISTADO DE TABLAS

---

- Tabla 1. Asociaciones genéticas más relevantes en la EC
- Tabla 2. Clasificación de Montreal de la EC
- Tabla 3. Opciones de tratamiento médico en la EC
- Tabla 4. Indicaciones generales de cirugía en la EC
- Tabla 5. Índice endoscópico de Rutgeerts y modificación propuesta por Domènech et al. para el score i2
- Tabla 6. Índice radiológico de Sailer et al. y su correlación con los diferentes grados del índice endoscópico de Rutgeerts
- Tabla 7. Factores de riesgo de recurrencia post-quirúrgica con mayor evidencia en los estudios
- Tabla 8. Índice de actividad clínica de Harvey-Bradshaw
- Tabla 9. Protocolo de entero-RM para la adquisición de imágenes
- Tabla 10. Características basales de los pacientes incluidos
- Tabla 11. Tasas de recurrencia endoscópica y radiológica durante el seguimiento
- Tabla 12. Descriptivo de las características clínicas de los pacientes con vs. sin recurrencia post-quirúrgica durante el seguimiento
- Tabla 13. Resultados del algoritmo de selección del análisis multivariante
- Tabla 14. Modelo multivariable final a partir de las variables identificadas, con sus respectivas OR
- Tabla 15. Total de microRNAs presentes en el kit empleado para la RT-PCR, total de microRNAs detectables en todas las muestras y promedio de microRNAs detectables por muestra
- Tabla 16. MicroRNAs con expresión diferencial pre-cirugía entre los pacientes con y sin recurrencia morfológica posterior durante el seguimiento
- Tabla 17. MicroRNAs con expresión diferencial a los tres meses de la cirugía entre los pacientes con y sin recurrencia morfológica posterior durante el seguimiento
- Tabla 18. MicroRNAs con expresión diferencial entre los pacientes con recurrencia (en el momento de la misma) y los pacientes sin recurrencia al año de la cirugía

- Tabla 19. Total de microRNAs presentes en el kit empleado para la RT-PCR, total de microRNAs detectables en todas las muestras y promedio de microRNAs detectables por muestra (validación)
- Tabla 20. MicroRNA identificado con expresión diferencial pre-cirugía entre los pacientes con vs. sin recurrencia
- Tabla 21. MicroRNAs identificados con expresión diferencial al año de la cirugía entre los pacientes con vs. sin recurrencia

# I. INTRODUCCIÓN

---

La **enfermedad de Crohn** (EC), la colitis ulcerosa (CU) y la denominada colitis indeterminada conforman el espectro de patologías crónicas que se agrupan bajo el término de enfermedad inflamatoria intestinal (EII). El conjunto de estas enfermedades se caracteriza principalmente por la inflamación crónica del tracto digestivo en diversas localizaciones, y se manifiestan clínicamente por alternar períodos de inactividad (o remisión) con períodos de actividad inflamatoria aguda (denominados brotes o recidivas), cuya frecuencia, duración y gravedad pueden ser muy variables además de imprevisibles.

La EC se caracteriza por una inflamación crónica, de carácter segmentario y transmural, que puede afectar potencialmente a cualquier tramo del tracto digestivo y cuya presentación clínica puede ser muy heterogénea. Las manifestaciones clínicas dependerán fundamentalmente del patrón de comportamiento de la enfermedad y de su localización anatómica. Puede asociar además manifestaciones extradigestivas muy diversas. Éstas incluyen la afectación cutánea, articular, ocular o hepatobiliar, entre otras, por lo que ha sido considerada como una auténtica enfermedad multisistémica. Su carácter transmural explica también el desarrollo frecuente de complicaciones locales, como abscesos, fístulas y estenosis. A pesar de los avances en el tratamiento médico, un elevado porcentaje de pacientes con EC requiere de al menos una cirugía resectiva intestinal en algún momento de su vida. Sin embargo, a pesar de la realización de una cirugía macroscópicamente “curativa” o del empleo de tratamientos profilácticos tras la misma, la **recurrencia** de la enfermedad con el tiempo es un fenómeno frecuente y constituye prácticamente la norma en estos pacientes.

En la actualidad seguimos teniendo un conocimiento limitado acerca de la **etiopatogenia** de la enfermedad. Se han postulado diferentes teorías que tratan de explicar sus bases patogénicas, aunque ninguna ha llegado a ser demostrada plenamente. Según la hipótesis más aceptada actualmente, la EC sería el resultado de una respuesta inmune exacerbada y sostenida de la mucosa intestinal frente a antígenos lumenales todavía no bien caracterizados, con probable implicación de algún componente de la propia microbiota. Esta respuesta inmune anómala podría ser facilitada por factores ambientales, que

iniciarían y perpetuarían la compleja cascada inflamatoria crónica característica de la enfermedad en individuos genéticamente predispuestos.

Esta respuesta inmunitaria aberrante involucra tanto a la inmunidad innata como a la adquirida, aunque es mediada y mantenida fundamentalmente por los linfocitos T CD4+. A partir de la evidencia disponible, sabemos que la etiología de la enfermedad se fundamenta en tres pilares esenciales, que incluyen, además del factor inmune, a factores genéticos y al factor ambiente/barrera local, aunque la fisiopatología primaria de la enfermedad y el papel que ejerce cada uno de estos elementos en la génesis y perpetuación del proceso inflamatorio intestinal-sistémico sigue estando por dilucidar.

Es probable que los mismos factores implicados en la patogenia de la enfermedad sean también los responsables de su recurrencia tras la cirugía, considerando que la enfermedad recurrente tiende a presentar el mismo fenotipo inicial previo a la cirugía. Es por ello que el escenario clínico post-quirúrgico supone una condición patogénica *de novo* que nos permite estudiar con detalle los mecanismos que conducen al desarrollo de la enfermedad. Estos pacientes constituyen el mejor modelo natural *in vivo* de la evolución de la enfermedad y de todo cuanto está aconteciendo a nivel local y sistémico. El estudio de la recurrencia y de su génesis nos proporcionará tanto un mejor entendimiento de la patogenia como la posibilidad de disponer de nuevas herramientas para su aplicación en la práctica clínica (biomarcadores). Todo ello aportará nuevos conocimientos hacia los que dirigir los estudios de investigación en el futuro.

El presente trabajo se basa en la caracterización evolutiva tras la cirugía de determinados marcadores serológicos y fecales, de los cambios que acontecen en el perfil de la respuesta inmune y de potenciales elementos genéticos reguladores. Además se estudiará su evolución en el tiempo, su potencial implicación en la patogenia de la recurrencia así como su posible utilidad como biomarcadores, tanto en su vertiente predictiva (aplicabilidad clínica) como terapéutica, al desentrañar posibles dianas clave sobre las que poder actuar para prevenir la recurrencia.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

## **1. Capítulo 1. Enfermedad de Crohn.**

### **1.1 Generalidades**

La denominación de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) engloba un conjunto de trastornos inflamatorios crónicos del intestino, unos de etiología conocida (infecciosa, química, física o por sensibilidad inmunológica específica) y otros en los que no se ha logrado evidenciar un factor causal. En este último grupo, denominado de etiología no filiada, inespecífico o idiopático se incluyen una serie de entidades clínicas cuyos exponentes principales son la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC) (1).

Ambas enfermedades se caracterizan por la cronicidad y por la heterogeneidad en su forma de presentación, curso clínico, pronóstico y desarrollo de complicaciones. Durante su evolución, se alternan períodos de actividad (denominados brotes o recidivas), de intensidad y gravedad variables, con períodos de quiescencia o inactividad (remisión). La diferencia fundamental entre ambas es que en la CU la inflamación se focaliza sólo en el colon y afecta únicamente a la capa mucosa, mientras que en la EC la afectación es transmural y puede implicar cualquier segmento del tracto gastrointestinal, de manera segmentaria, asimétrica y discontinua. Puede expresarse también con afectación inflamatoria perianal, constituyendo lo que llamamos EC perianal que, en algunos casos, es la manifestación inicial o incluso precede en el tiempo a los síntomas intestinales y se presenta con más frecuencia en caso de afectación colorrectal.

La etiología específica de la EII continúa siendo desconocida. Tanto en la patogénesis como en la evolución clínica están implicados múltiples factores, englobados, de forma amplia, como: factores de susceptibilidad genética, microbiota intestinal, aspectos relacionados con el estilo de vida / factores ambientales y características del sistema inmune. En concreto, en el momento actual, se considera que la enfermedad es el resultado de una respuesta inmune anómala, exagerada y prolongada en el tiempo, que se desarrolla en sujetos genéticamente susceptibles ante la exposición a determinados antígenos lumbinales (ambientales y/o de la propia microbiota intestinal) y que

determina tanto el inicio como la perpetuación del proceso inflamatorio intestinal (2).

En los últimos años asistimos a un aumento creciente de la incidencia de la EII en los países desarrollados respecto a décadas previas, especialmente notable para la EC. Este aumento ha sido atribuido a diversos factores, aunque en gran parte ha sido paralelo al desarrollo tecnológico, la mejora en las técnicas diagnósticas y el mayor acceso de la población a los servicios sanitarios. Sin embargo, parece que existe un aumento real de la incidencia relacionado con la industrialización de las sociedades, con el mayor nivel socio-cultural y económico, así como con los consecuentes cambios en el estilo de vida y en los hábitos dietéticos e higiénico-sanitarios de la población. Es lo que se ha denominado la “teoría de la higiene”, basada en la idea de que la exposición a patógenos desde la infancia es esencial para el correcto desarrollo y regulación del sistema inmune y, sin la cual, el contacto posterior en la edad adulta podría dar lugar a una respuesta inapropiada y exacerbada, precipitando enfermedades de base inmunológica (3).

La incidencia actual de la EC en Europa se estima entre 10-15 casos por 100.000 habitantes y año (4). Los datos epidemiológicos reflejan que existe un gradiente norte-sur, con mayores tasas de incidencia y prevalencia en los países del norte de Europa con respecto a los del sur, sugiriendo por un lado que la enfermedad se distribuye de forma paralela al nivel socio-económico de los países, y por otro, que los diferentes factores ambientales pueden desempeñar un importante papel en la etiología de estas enfermedades. Los distintos estudios realizados en España determinan una incidencia para la EC de entre 2 y 7.5 casos por 100.000 habitantes y año (5, 6).

La enfermedad afecta principalmente a individuos de raza blanca, sobre todo la etnia judía y originarios de Europa central y del este, con una menor prevalencia entre afroamericanos e hispanos y mínima en asiáticos (7). Existe un descenso progresivo de la incidencia con la edad, con un pico máximo entre los 15-34 años y un segundo pico más pequeño entre los 45-64 años, sin grandes diferencias entre ambos sexos, aunque con discreto predominio en mujeres (8).

## 1.2 Bases diagnósticas

El diagnóstico de la EC supone a menudo un reto para el clínico, debido a su gran heterogeneidad de presentación y a que no existe ninguna característica de la enfermedad que se considere patognomónica y permita el diagnóstico inequívoco de la misma. Es por ello que el diagnóstico tiene que estar respaldado por un cuadro clínico sugestivo y la combinación con hallazgos analíticos, endoscópicos, radiológicos e histológicos compatibles (9).

La presentación clínica, como se ha comentado anteriormente, es muy heterogénea y los síntomas varían en relación a la localización, el patrón y la extensión de la enfermedad. Es frecuente la presencia de dolor abdominal, pérdida de peso y diarrea de más de 6 semanas de duración, con o sin sangre en las heces. Otros síntomas frecuentes son la astenia, anorexia, febrícula o fiebre, aftas orales y malestar general. Puede asociarse o debutar (10% de los casos) con EPA consistente en fisuras, fístulas, úlceras, estenosis o abscesos.

En la exploración física los pacientes con EC pueden presentar desnutrición, retraso del crecimiento y del desarrollo, masa abdominal palpable o afectación perianal evidenciable. Desde el punto de vista analítico pueden presentar anemia y habitualmente parámetros bioquímicos de inflamación sistémica, como aumento de proteína C reactiva (PCR), de la velocidad de sedimentación globular (VSG), del recuento plaquetario o del fibrinógeno.

La calprotectina fecal (10) es un marcador específico de inflamación intestinal, ampliamente estudiado en el contexto de la EII en la última década y con aplicación clínica en diferentes escenarios. Su determinación también resulta de utilidad al diagnóstico para diferenciar los síntomas debidos a un cuadro orgánico intestinal de los secundarios a un trastorno funcional, permitiendo seleccionar los casos en que estaría indicada la realización de pruebas endoscópicas para completar el estudio diagnóstico (11).

El primer procedimiento para el diagnóstico de la EC es la ileocolonoscopia con toma de biopsias. Permite evaluar todo el marco cólico y acceder hasta el íleon

terminal, para valorar la presencia de hallazgos endoscópicos compatibles con la enfermedad:

- En afectación de colon: presencia de aftas, ulceraciones lineales profundas o serpiginosas, aspecto en empedrado (islotas de mucosa normal entre úlceras), estenosis, orificios fistulosos, pseudopólipos y pólipos; lesiones característicamente segmentarias, de extensión variable y con recto frecuentemente indemne.
- En afectación de íleon: aftas, úlceras y/o estenosis.

Los signos de gravedad desde el punto de vista endoscópico incluyen la extensión y la profundidad de las úlceras.

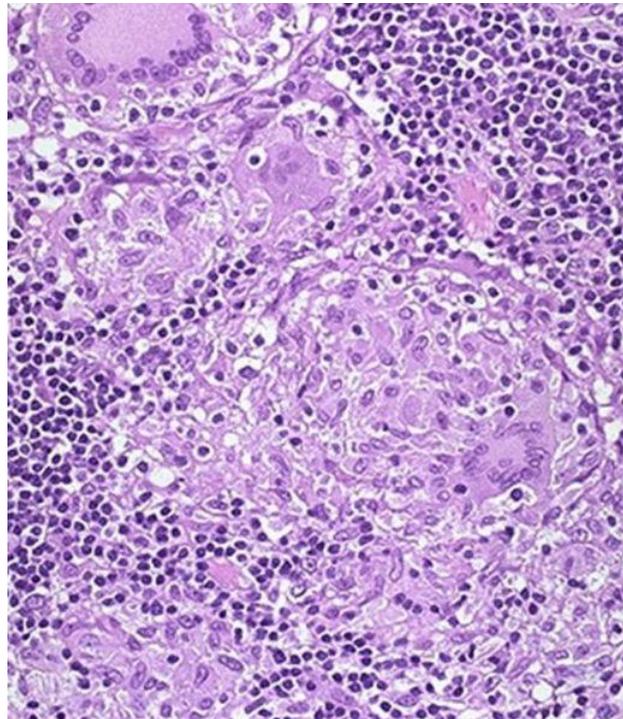
Por otro lado, dado que la EC puede afectar a cualquier tramo del tubo digestivo, se sugiere que al diagnóstico de la enfermedad se investigue el tracto digestivo superior, incluso en ausencia de síntomas. Los procedimientos recomendados para ello en la actualidad incluyen la enterografía por resonancia magnética (entero-RM) o por tomografía computarizada (entero-TC), asegurando así un mapeo de todo el tracto digestivo (extensión de la enfermedad). Otros procedimientos como la endoscopia digestiva alta (si hay sospecha de EC con afectación esofagogastroduodenal y en las colitis inclasificables para descartar afectación gástrica, que indicaría EC) o la cápsula endoscópica (especialmente útil en la colitis inclasificable y en la alta sospecha clínica de EC con colonoscopia, endoscopia oral y entero-RM normales) también pueden ser de utilidad. Una ventaja que aportan los estudios mediante entero-RM o entero-TC es que con estas técnicas es posible valorar el grado de afectación transmural, típico de la EC, y la existencia de posibles complicaciones derivadas de la propia enfermedad.

A nivel histopatológico tampoco existen lesiones patognomónicas para el diagnóstico de la EC. Sin embargo, hay hallazgos característicos que sugieren el diagnóstico de la enfermedad. Un hallazgo poco frecuente en las biopsias endoscópicas, pero específico, es la presencia de granulomas no caseificantes (Figura 1), que son el conjunto de células epitelioides, macrófagos, células gigantes multinucleadas y linfocitos T que se pueden encontrar tanto en zonas inflamadas como en no inflamadas y que se localizan habitualmente en la

submucosa. Otras características anatomopatológicas que se encuentran con frecuencia tanto en las lesiones endoscópicas como en las piezas quirúrgicas de la EC son: aumento del infiltrado linfoplasmocitario en lámina propia de forma parcheada, infiltrado inflamatorio transmural y fisurizante, fibrosis submucosa con desdoblamiento de la muscular de la mucosa, irregularidad de criptas, metaplasia pseudopilórica, hipertrofia de plexos nerviosos y agregados linfoides dispuestos de forma arrosariada.

La mayoría de expertos clínicos y patólogos coinciden en que puede considerarse el diagnóstico de EC ante la presencia de granulomas no necrotizantes en el estudio histopatológico junto a otro criterio o, en ausencia de granulomas, cuando hay otros tres criterios presentes, siempre que se excluyan causas específicas (infecciones, neoplasia, isquemia) ([12](#)).

**Figura 1.** Granuloma no necrotizante submucoso constituido por histiocitos epitelioides, células gigantes multinucleadas y linfocitos T (H&E, 20X). Imagen por cortesía del Dr. Francisco Giner.



### **1.3 Etiopatogenia**

Aunque el conocimiento de la etiopatogenia ha ido evolucionando con el tiempo y disponemos cada vez de más datos sobre los factores implicados, la etiología exacta de la enfermedad y los mecanismos que conducen al desarrollo de la misma siguen sin conocerse completamente.

La hipótesis más aceptada en la actualidad es la de una respuesta inadecuada del sistema inmune de la mucosa intestinal frente a un factor intraluminal, posiblemente un componente de la propia microbiota intestinal ([13-15](#)). Esta respuesta inmune aberrante acontece en individuos genéticamente susceptibles y posiblemente esté influenciada por otros factores medioambientales no bien caracterizados, a tenor de la diferente distribución geográfica y del rápido incremento de la prevalencia de esta enfermedad en los países desarrollados.

Así, la EC se considera una enfermedad sistémica multifactorial, y los diferentes pilares patogénicos (factores de susceptibilidad genética, inmunidad, microbiota intestinal y aspectos relacionados con el estilo de vida/ambiente) están íntimamente ligados entre sí, siendo necesaria la conjunción de distintos factores para el desarrollo de la enfermedad. Para conseguir abordar los distintos elementos patogénicos de una manera explicativa, se caracterizarán a continuación de forma independiente, subrayando las áreas de íntima relación.

#### **1.3.1 Factores genéticos y reguladores de la expresión génica**

Existen múltiples evidencias sobre la implicación de los factores genéticos en la patogenia de la EC, procedentes de estudios familiares, poblacionales y de estudios de vinculación genética.

Los estudios poblacionales han demostrado que el factor genético aumenta el riesgo de padecer EII de 8 a 10 veces ([16](#)), que el grupo étnico judío Ashkenazi tiene un riesgo entre 2 y 4 veces superior al de cualquier otra población ([17](#)), y que existe un importante grado de concordancia entre gemelos ([18](#)). En la EC, el mayor grado de concordancia en los gemelos monocigotos (> 30.3%) que en los dicigotos (3.6-7%), indica la fuerte contribución de los factores genéticos.

En la CU el grado de concordancia es menor, tanto en gemelos monocigotos como dicigotos (10-15.4% y >3%, respectivamente), lo que sugiere una menor influencia de los factores genéticos para el desarrollo de esta enfermedad ([18](#), [19](#)).

Los estudios familiares también han mostrado una importante agregación familiar, lo que sugiere claramente la existencia de una predisposición genética. De hecho, un antecedente familiar de EC sigue siendo el mayor factor de riesgo independiente para el desarrollo de la enfermedad ([20](#)). Este riesgo es mayor en los familiares de primer grado, que presentan un riesgo de 3 a 20 veces mayor de padecer la enfermedad que la población general. Así, aproximadamente un 5-10% de los familiares van a desarrollar la enfermedad; el riesgo es mayor en los hijos (1.3-8.8%) y hermanos (1.5-8.9%) de los pacientes que en los padres (0.2-3.5%) ([21](#), [22](#)).

Los estudios epidemiológicos realizados en familias con múltiples miembros afectados de EII muestran una elevada concordancia con el tipo de enfermedad (EC o CU), con la localización (86%) e incluso con el patrón de comportamiento (82%) ([23-25](#)). Sin embargo, en estas familias también se ha demostrado el fenómeno de la anticipación genética, o aparición de la enfermedad en los hijos a una edad más temprana que en los progenitores, evento conocido en diversas enfermedades monogénicas (como las enfermedades neurodegenerativas), aunque en el caso de la EII también podría ser debido al incremento en estos pacientes de la sospecha diagnóstica, que facilitaría un diagnóstico más precoz ([26](#)).

De todas maneras, y aunque los datos disponibles sugieren que el bagaje genético es responsable de, al menos, el 50% de la susceptibilidad para desarrollar EC, los estudios también han demostrado que la alteración genética no se centra en un solo gen, sino en alteraciones poligénicas complejas.

Diversos estudios de correlación genética han identificado un importante número de regiones (o *locus*) generadoras de susceptibilidad para la EII, localizadas en los cromosomas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 16, 19 y X. Sólo siete locus de susceptibilidad (denominados IBD1-IBD7) cumplen criterios de

reproducibilidad en estudios independientes ([27-33](#)). La presencia de mutaciones en estos genes no garantiza que se vaya a desarrollar una EII, sino que contribuyen a incrementar el riesgo individual de padecerla.

Uno de los mayores logros en el estudio de la patogenia de la EC fue el descubrimiento del gen NOD2, también conocido como CARD15 (*Caspase-Recruitment-Domain-15*), localizado en la región pericentromérica del brazo largo del cromosoma 16 (16q12) y que se ha identificado como el gen IBD1. Constituye el gen de susceptibilidad más importante detectado para la raza caucásica. Justifica solamente un 20% de la predisposición genética a padecer EC, y no se asocia con un incremento de susceptibilidad para la CU ([34](#)).

El gen NOD2/CARD15 se expresa en las células presentadoras de antígenos, macrófagos y linfocitos, así como en las células epiteliales, fibroblastos y células de Paneth. Es un gen altamente implicado en el reconocimiento intracelular de microorganismos o sus productos, y por tanto, en la regulación de la respuesta inmune innata. En concreto, codifica una proteína implicada en el reconocimiento del muramil dipéptido (MDP), un componente de la pared celular de las bacterias tanto gram positivas como gram negativas. La activación del NOD2/CARD15 por reconocimiento de este ligando microbiano, induce la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) como señal de transducción, que conllevará a su vez una determinada expresión de defensinas y citoquinas pro-inflamatorias.

Existen estudios donde se ha observado que otras proteínas reguladoras de la apoptosis, que son miembros de la familia de proteínas CARD, también funcionan activando la vía de señalización del NF- $\kappa$ B. Todo ello sugiere la posible relación entre el factor genético en la EC y la regulación de la apoptosis ([35](#)). Asimismo, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), citoquina con importante papel en la enfermedad, tiene un efecto directo sobre el gen CARD15, induciendo su expresión ([36](#)).

En el año 2001 se descubrieron las tres variantes genéticas del NOD2 asociadas con la susceptibilidad a padecer EC: R702W, G908R y L1007Fs ([27](#), [30](#), [34](#), [37-39](#)). Estas mutaciones consisten en polimorfismos de un solo

nucleótido o SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), es decir, una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base de una secuencia del genoma. La deficiencia de NOD2 induce a un desarrollo anormal de las placas de Peyer, lo que determina una respuesta inmune exagerada y un aumento de la permeabilidad de la barrera epitelial (40).

Se estima la existencia de un riesgo relativo de desarrollar EC en portadores de una mutación de 2-3 veces mayor y hasta 20-40 veces superior en el caso de dos mutaciones simultáneas (heterocigoto compuesto u homocigoto), lo que sugiere un efecto de dosis génica para las tres mutaciones (30). En la población europea el riesgo de EC aumenta más de 17 veces cuando el sujeto es homocigoto para la mutación NOD2 (41), sin embargo esto no ocurre en otras áreas geográficas como en Asia (42) y en África subsahariana(42, 43). La penetrancia es reducida, menos del 10% de los pacientes portadores de dos alelos de riesgo NOD2/CARD15 desarrollará la enfermedad, ello implica que otros genes y estímulos medioambientales están también implicados en el desarrollo de la misma.

Los estudios iniciales observaron además que las mutaciones en el gen NOD2/CARD15 se asociaban con diferentes factores de la EC como: la edad de debut más temprana, la localización ileal, la tendencia a desarrollar patrones más agresivos (estenosantes-fistulizantes) y a un mayor riesgo de resecciones intestinales. Además, en un estudio reciente, las variantes del NOD2 se han asociado con una mayor traslocación de DNA bacteriano y con mayores niveles de TNF- $\alpha$  en sangre periférica, observándose una necesidad incrementada de intensificar el tratamiento biológico para controlar la respuesta inflamatoria en estos pacientes (44).

Tras la descripción de este primer gen de susceptibilidad, el análisis de SNPs en grandes poblaciones mediante sistemas bioinformáticos sofisticados, los denominados “genome-wide association studies” (GWAS) o estudios de asociación de genoma completo, han supuesto un gran avance en el conocimiento de los factores genéticos de la EC. Estos estudios han permitido conocer un número cada vez mayor de genes asociados a la EII, así como profundizar en aspectos de su naturaleza poligénica y de su patogenia.

Hasta la fecha, el número conocido de regiones (loci) de susceptibilidad para la EII se ha expandido a 163, de las cuales 110 están asociadas tanto a la CU como a la EC (IL23R, IL18RAP, IL12/p40, JAK2 y STAT3, entre otras), 30 son específicas de la EC (NOD2, GCKR, ATG16L1, etc.) y 23 de la CU (IL10, IL22, IL26, IFN- $\gamma$ , etc.) (45). Estos estudios han permitido analizar miles de SNPs y han aportado datos relevantes sobre los mecanismos patogénicos implicados, entre los que destacan la importancia de mecanismos como la autofagia, el reconocimiento de receptores que interactúan en la respuesta inmune innata y la respuesta Th17/IL23 (46, 47).

La autofagia es un proceso de regeneración celular fundamental que permite eliminar determinadas proteínas y orgánulos (48, 49). Se ha relacionado con la proliferación y diferenciación celular, la respuesta inmune frente a patógenos y como una herramienta que permite a la célula obtener energía permitiendo su supervivencia en condiciones adversas. La autofagia aumenta la supervivencia celular en estados de privación de nutrientes o de factores de crecimiento y de estrés del retículo endoplásmico, así como en el caso de infecciones (46, 47, 50). Es importante en el mantenimiento de la homeostasis de las células T, clave para el mantenimiento de la tolerancia inmune. Las interrelaciones entre la autofagia, que funciona primariamente como mecanismo de supervivencia celular, y la apoptosis, que es una ruta que conduce inevitablemente a la muerte celular, son complejas. Los dos mecanismos son regulados por factores comunes, comparten componentes e interactúan entre sí. Muchas señales de activación de apoptosis inducen también autofagia y existen señales que inhiben ambos procesos. Hasta ahora los intrincados mecanismos moleculares entre ambos están por dilucidar.

En lo referente a los genes que regulan la autofagia en la EC, recientemente, se ha descrito un gen que codifica una proteína implicada en la autofagia, la ATG16L1 (*autophagy-related 16-like 1*) (49, 50). Esta proteína se expresa en los linfocitos, macrófagos y en las células de Paneth del intestino delgado donde se produce la exocitosis o eliminación de los gránulos de secreción que contienen péptidos antimicrobianos (51). La sustitución Thr300Ala en ATG16L1 (rs2241880) ha sido relacionada con la EC. No existen diferencias en los niveles de expresión de proteína ATG16L1 en la mucosa de pacientes con EC

vs. controles sanos, con lo que se asume que esta mutación confiere una alteración únicamente en la función de la proteína. Estudios experimentales demuestran que esta alteración se relaciona con una respuesta anormal de las células de Paneth frente a patógenos, una respuesta exagerada frente a agresiones y un aumento de la susceptibilidad para desarrollar lesiones ileales (52). En este sentido se ha demostrado un vínculo funcional entre NOD2 y ATG16L1, ambas se consideran proteínas de inducción de autofagia y están codificadas por genes que aumentan el riesgo de EC (53, 54). La activación de NOD2 por el MDP de los lipopolisacáridos bacterianos desencadena la formación de vacuolas autofágicas en las células dendríticas y epiteliales, para lo que se requiere el contacto directo de NOD2 con ATG16L1. En los pacientes con EC asociada a mutaciones en NOD2 y en ATG16L1 no existe este mecanismo de eliminación por autofagia de patógenos intracelulares, lo cual apoya la idea de la autofagia como posible mecanismo desencadenante de la EC.

Otro mecanismo que relaciona estrechamente a la autofagia y la inmunidad innata es la respuesta al desplegamiento de proteínas inducida por estrés en el retículo endoplásmico debido al acúmulo de proteínas mal plegadas (55). Recientemente estudios GWAS han encontrado una relación genética entre este mecanismo y la EC a través de los genes XBP1 y ORMDL3 los cuales participan en esta respuesta (56, 57).

Los estudios GWAS han relacionado también a la EC con otros genes codificantes de proteínas reguladoras de la autofagia como la IRGM (*immunity-related guanosine triphosphatase M*) y la LRRK2 (*leucine-rich repeat kinase 2*) (57-59). La IRGM es una proteína estimuladora de la autofagia que se requiere durante la fase de inicio de la misma. El polimorfismo del gen IRGM rs13361189 produce una delección de 20kb que se ha relacionado simultáneamente con la reducción de la expresión de este gen y con la EC (60). Esta proteína participa en la eliminación de patógenos intracelulares por autofagia mediada por interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (59). Respecto a la LRRK2 se conoce que está localizada en el cromosoma 12q12 y que su deficiencia

provoca en la célula un deterioro de los autofagosomas y un incremento de la apoptosis, la respuesta inflamatoria y el daño oxidativo ([61](#), [62](#)).

Los estudios GWAS han establecido una fuerte correlación entre los genes que regulan la vía de la IL-23 y el desarrollo de la EC ([63](#)). Entre los múltiples genes que se encuentran involucrados en la señalización IL23/Th17 se encuentran el receptor de IL-23, IL-12B, JAK2, Tyk2 y STAT3 ([46](#)). La variante asociada de forma más significativa con la EC, después del NOD, codifica el cambio de Arg381Gln en el gen del receptor de la IL-23, localizado en el cromosoma 1p31. Este polimorfismo en el receptor de IL-23 se ha asociado también con la psoriasis ([64](#)) y la espondilitis anquilosante ([65](#)).

En este sentido, en el año 2009 fue aprobado el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la subunidad p40 de la IL-12 y la IL-23 (Ustekinumab) para el tratamiento de la psoriasis, y posteriormente también para la artritis psoriásica. Igualmente, el uso de estos anticuerpos mostró en estudios preliminares su potencial utilidad para el tratamiento de la EC ([66](#)), y muy recientemente, en Noviembre de 2016, ha sido aprobado para el tratamiento de la EC moderada a grave que no haya respondido a otros tratamientos.

Finalmente, existen estudios genéticos focalizados en el conocimiento de posibles moléculas de señalización celular que pueden estar implicadas en la patogenia de la enfermedad. El objetivo de estos estudios es establecer si existen diferencias en los niveles de expresión (cantidad de RNAm) de estos genes y/o mutaciones, lo cual nos proporciona información sobre posibles rutas implicadas en la patogenia así como posibles dianas terapéuticas. En este sentido, el STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription1*) implicado en la respuesta de fase aguda, es un gen incluido dentro de los genes inducibles por IFN- $\gamma$  y produce la activación de la vía Th1 mediada por IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-23 ([67](#)). En este grupo se incluyen también STAT3 y otras proteínas transmembrana IFN-inducibles, IFITM1 e IFITM3, que actúan en la activación de macrófagos. Además del IFN- $\gamma$ , existen otras citoquinas que pueden activar el STAT1 como factores de crecimiento epidermal, factores de crecimiento derivados de las plaquetas, la IL-6 o el factor 1 estimulador de colonias ([68](#),

69). La activación específica de STAT1 ha sido demostrada en enfermedades inflamatorias crónicas como el asma (70) y la artritis reumatoide (71), así como en la EII. Un estudio realizado en biopsias de mucosa intestinal de pacientes con EC y CU encontró diferencias en los patrones de expresión de los genes inducibles por IFN- $\gamma$ , observándose sólo en la EC una expresión génica aumentada de STAT1 respecto a los controles sanos (72). Sin embargo, existe un estudio que encontró un aumento de la expresión y activación de STAT1 en la mucosa intestinal tanto en los pacientes con CU como en los pacientes con EC, aunque en estos últimos en menor medida (73).

En la tabla 1 se resumen las asociaciones genéticas más relevantes vinculadas con la EC.

**Tabla 1.** Asociaciones genéticas más relevantes en la EC (modificada de Abraham y Cho (74)).

Gen	Descripción	Funciones
Respuesta inmune innata		
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain 2	Reconocimiento intracelular de microorganismos para activar la señalización celular
ATG16L1	Autophagy-related 16-like 1	Componente del complejo de la autofagia y función de las células de Paneth frente a patógenos
IRGM	Immunity-related GTPase M	Rol en la autofagia, fundamental para la eliminación de patógenos intracelulares mediada por interferón gamma
LRRK2	Leucine-rich repeat kinase 2	Rol en la autofagia
CARD9	Caspase recruitment domain family, member 9	Integración de señales de receptores de la inmunidad innata. Estrés oxidativo
XBP1	X-Box Binding Protein 1	Rol en la autofagia, regulación de la respuesta al desplegamiento de proteínas inducida por estrés en el retículo endoplásmico
Vía de señalización IL23-Th17		
IL23R	<i>Interleukin-23 receptor</i>	Componente único del receptor de la IL-23, activa la vía Th17
IL12B	<i>Interleukin-12B, p40 subunit</i>	Componente común de la IL-12 e IL-23

STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>	Común para varias citoquinas (IL-6, 10, 17, 21, 22 y 23)
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>	Fundamental para la respuesta a interferón gamma
Otros genes		
SLC22A4	<i>Solute-carrier family 22, organic-cation transporter</i>	Proteína de membrana poliespecífica de transporte
PTPN2	<i>T-cell protein tyrosine phosphatase</i>	Múltiples interacciones con las proteínas STAT
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>	Clase I y II: modulan las vías de presentación de antígenos en la EC
MST1	<i>Macrophage stimulating 1</i>	Rol en la quimiotaxis y activación de macrófagos en respuesta a señales proinflamatorias
FASLG	<i>Fas ligand (TNF superfamily, member 6)</i>	Rol en la apoptosis

### 1.3.1.1 Epigenética y microRNAs

El término epigenética hace referencia a los cambios heredables que se producen en la expresión del genoma como resultado de la interacción del individuo con el medio ambiente. Aunque las bases moleculares de la epigenética son complejas, en síntesis su objetivo principal es modular la expresión o actuación de ciertos genes sin alterar la secuencia básica del ADN. Determinados factores no genéticos hacen que los genes se comporten de distinta forma y se expresen de forma diferente (75-77). La metilación del ADN y la modificación de histonas son los dos mecanismos epigenéticos más representativos y estudiados (78). Sin embargo, hay otros mecanismos que pueden provocar modificaciones genéticas a nivel post-transcripcional como el *splicing* alternativo de RNAm y los microRNAs (miRNAs), una nueva clase de reguladores de la función de los genes de reciente descubrimiento.

Un gran número de factores ambientales ha demostrado inducir cambios epigenéticos, incluyendo el tabaco, la polución ambiental, los asbestos, los metales, el sílice y los bencenos (79). Estos cambios epigenéticos podrían ser el vínculo entre el genoma, el medio ambiente y el desarrollo fenotípico de la EC y podrían explicar también la herencia no conocida de la enfermedad. Uno de los aspectos más llamativos, como se mencionó con anterioridad, es el

rápido incremento de la incidencia de la enfermedad en las últimas décadas, sobre todo en países desarrollados, lo que sugiere que los factores ambientales también deben estar ejerciendo un papel clave en la patogenia (80). En este sentido, y como elemento conector entre ambos factores, genético y ambiental, ha surgido un gran interés en el estudio y caracterización de los miRNAs como mecanismo epigenético de regulación de la expresión génica en el contexto de las EII.

Los miRNAs son pequeños fragmentos de RNA monocatenario no codificante (de 18-24 nucleótidos) que son capaces de regular la expresión génica a nivel post-transcripcional, inhibiendo la traducción a proteínas mediante su unión a la región 3'UTR del RNAm y provocando la degradación del mismo o la inhibición de la transducción (81). Estos elementos están implicados en la regulación de múltiples procesos biológicos, como el ciclo celular, la diferenciación y proliferación celular, la apoptosis o la fibrosis. Presentan, además, la peculiaridad de que un determinado miRNA es capaz de unirse a diferentes RNAm y que un gen puede estar a su vez regulado por diversos miRNAs (82), por lo que se ha llegado a estimar que los miRNAs son capaces de regular más de un 60% de los RNAm codificantes de proteínas (83).

Se ha demostrado que los cambios en la expresión del miRNA actúan sobre la respuesta inflamatoria en humanos y que la sobre-expresión y/o la inhibición de estas moléculas regulan la liberación de muchas citoquinas inflamatorias (82-84). Son elementos presentes en tejido, suero, plasma y otros fluidos biológicos en una forma estable, libres o en exomas. Sus niveles en suero y plasma son estables, reproducibles y consistentes entre individuos de una misma especie, razón por la cual dichos niveles están siendo utilizados como marcadores no invasivos en diferentes patologías (tales como el cáncer, las enfermedades autoinmunes o la inflamación) (85, 86).

Los primeros hallazgos de miRNAs vinculados a la EII aparecen en el año 2008 (87). Desde entonces, ya se han publicado numerosos estudios descriptivos de patrones de expresión de miRNAs en CU y en EC, tanto en sangre periférica como en mucosa. También se ha valorado la implicación de

estas moléculas en la patogenia de la enfermedad, regulando las distintas vías inflamatorias y se ha sugerido su uso como biomarcadores ([88](#), [89](#)) ([90](#)) ([91](#)).

#### 1.3.1.2 MicroRNAs asociados a la EC

En el contexto de la EC, se han podido identificar perfiles diferenciales de expresión de miRNAs en muestras de sangre periférica ([88](#), [92](#)), siendo los hsa-miR-16, hsa-miR-106a, y hsa-miR-140-3p los miRNAs que mostraron un mejor poder de discriminación entre pacientes con EC y controles sanos.

Varios estudios en mucosa intestinal han demostrado que existe una expresión diferencial según el estado de actividad (actividad o quiescencia) y la localización (ileal o colónica) de la enfermedad ([93-95](#)). Se ha identificado un miRNA, el hsa-miR-106a, que está permanentemente aumentado independientemente de la actividad de la enfermedad. Mediante estudios *in silico* e *in vitro*, se demostró que este miRNA está implicado en la regulación de la IL-10, citoquina que desempeña importantes funciones antiinflamatorias y por tanto debe ejercer un papel importante en la enfermedad ([96](#)). Además, se han identificado otros miRNAs: miR-19b, miR-106a y miR-629, que presentan un perfil de expresión diferencial entre la EC y la CU. En estos estudios se ha sugerido que el miR-191 puede ser un biomarcador diagnóstico muy útil para diferenciar ambas enfermedades ([97](#), [98](#)).

En otro estudio ([89](#)), se identificó el hsa-miR-16 como miRNA diferencialmente expresado entre pacientes con diagnóstico confirmado de EC y otros con sospecha diagnóstica inicial pero en los que el diagnóstico final no fue de EC. Estos resultados fueron validados posteriormente en una cohorte mayor de sujetos donde se pudo comprobar la utilidad de este miRNA, junto con otros previamente analizados, para poder discriminar la enfermedad.

Algunos de estos estudios también han explorado otros aspectos concretos de la enfermedad, como el grado de actividad, comparando pacientes con EC activa frente a inactiva ([88](#), [89](#)). En este sentido, se ha observado que los

miRs-199a-5p, -362-3p, -532-3p y miRplus-E1271 aumentan en los pacientes activos, a diferencia de los pacientes inactivos o los controles sanos.

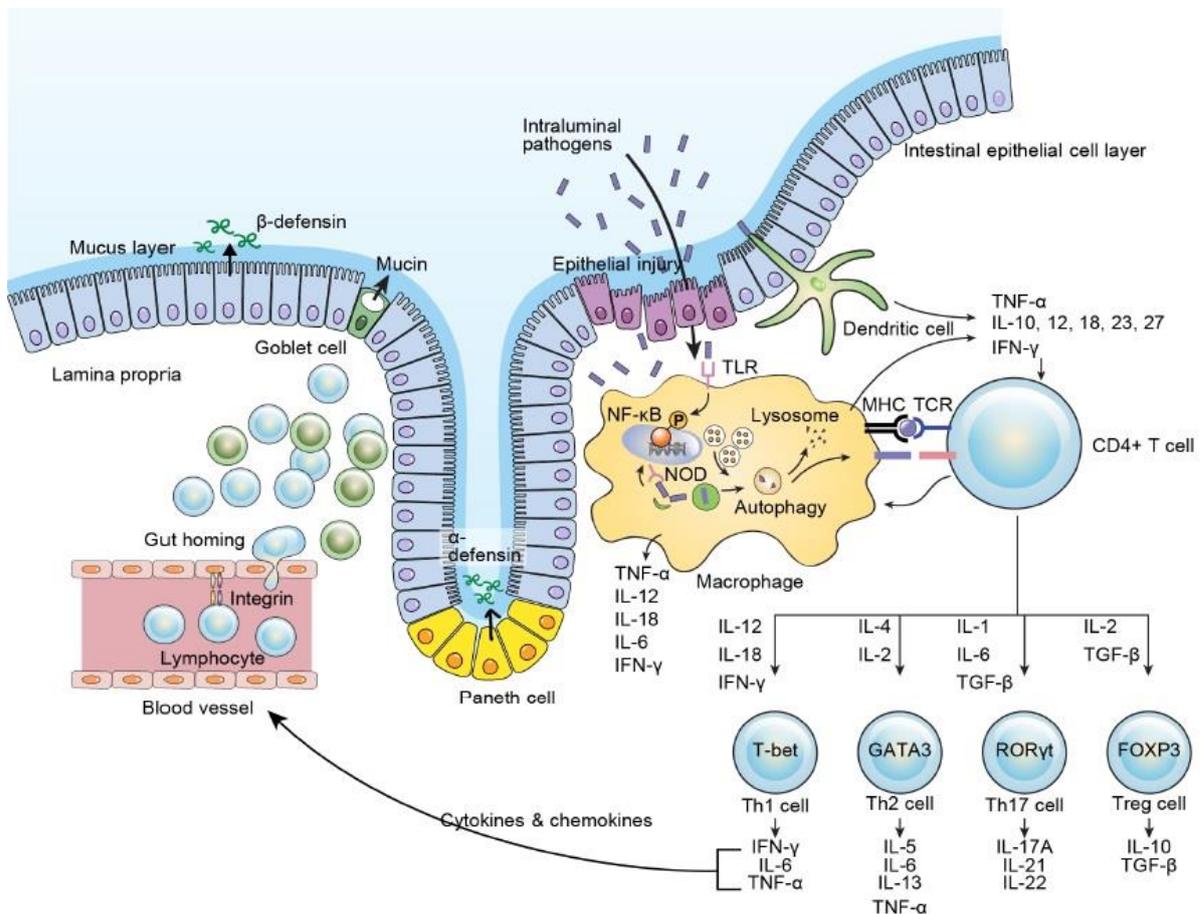
En un artículo reciente (90) se ha identificado por primera vez perfiles concretos de miRNAs que pueden servir para identificar el comportamiento y la progresión de la EC. Un patrón de enfermedad fibro-estenotante conduce con frecuencia a cuadros de obstrucción intestinal, con indicación de cirugía. En pacientes con este fenotipo se ha observado una disminución significativa del miR-29, observándose también que tras la cirugía los niveles de este miRNA tienden a permanecer disminuidos. En otros estudios, se han llegado incluso a identificar cambios en la expresión de miRNAs durante el tratamiento de los pacientes con terapias biológicas (91).

Actualmente no existen estudios publicados que aborden el análisis y determinación de los perfiles de miRNAs en el contexto de la recurrencia postquirúrgica en la EC. Por ello, no hay información disponible sobre qué miRNAs, o perfiles de miRNAs, se modifican cuando el paciente desarrolla la recurrencia. En la práctica clínica, sería de gran utilidad disponer de este tipo de biomarcadores con capacidad predictiva para identificar a los pacientes de alto riesgo de desarrollar una recurrencia temprana tras la cirugía.

### **1.3.2 Factores inmunológicos**

El sistema inmune intestinal constituye el escenario principal donde se orquestan los fenómenos patogénicos que conducirán al desarrollo de la enfermedad, aunque su funcionamiento parece estar condicionado por el bagaje genético del individuo y su interacción con factores ambientales. Está constituido por diferentes elementos (Figura 2) que están íntimamente relacionados entre sí: la mucosa intestinal, el microbioma y el sistema vascular (74).

**Figura 2.** Componentes del sistema inmune intestinal (tomado de Kim DH et al. (99)).



La **mucosa intestinal** representa una de las superficies de contacto más extensas con el medio externo. Está formada por una cobertura de moco y la membrana epitelial subyacente.

La capa de moco constituye la primera barrera física que cubre el epitelio en su totalidad, limitando el contacto entre microorganismos y células epiteliales. Está compuesta por altas concentraciones de moléculas antimicrobianas como la inmunoglobulina A (IgA) o las defensinas. Esta capa de moco es simple en el intestino delgado y doble en el colon. Permite la generación de un microhábitat donde las bacterias están en proximidad y sintropía, compartiendo nutrientes y evitando el efecto lavado que supone el peristaltismo intestinal continuo (100).

El epitelio intestinal está constituido por una monocapa de células epiteliales, conforma la siguiente barrera física que separa el microbioma del sistema inmune intestinal y está considerada la segunda línea de defensa frente a la

invasión microbiana. La integridad de la barrera epitelial depende de las uniones intercelulares que sellan el espacio entre células epiteliales vecinas (espacio paracelular). Estas uniones estrechas (o *tight junctions*) son estructuras dinámicas, esenciales para impedir el tráfico de macromoléculas con capacidad antigénica o de microorganismos, pero a la vez, poder permitir el paso de nutrientes y la absorción de agua e iones hacia la circulación (101). La impermeabilización del subepitelio (o lámina propia) se completa con las uniones adherentes (o *adherent junctions*) y los desmosomas, uniones de anclaje que conectan el citoesqueleto de cada célula con los de células vecinas, y que permiten mantener la integridad estructural necesaria para llevar a cabo sus funciones específicas.

En el epitelio coexisten distintas estirpes celulares, que se dividen en dos grupos especializados: las de linaje absorptivo (o enterocitos, que suponen alrededor del 80%) y las de linaje secretor, dentro de las cuales se encuentran las células caliciformes (o células de Goblet) especializadas en la secreción de moco, las células enterocromafines, especializadas en la secreción de hormonas y neuropéptidos, y las células de Paneth. Estas últimas se localizan exclusivamente en la base de las criptas de Lieberkühn, junto con las células madre epiteliales pluripotentes (o *stem cells*) que dan lugar a los diferentes tipos de células epiteliales especializadas. Las células de Paneth son exclusivas del intestino delgado y el colon ascendente, y están especializadas en la secreción de péptidos antimicrobianos, como las  $\alpha$ -defensinas y las lisozimas.

En la región subepitelial se encuentra la lámina propia, que alberga una compleja población de células inmunes encargadas de mantener el equilibrio necesario para la inmunotolerancia frente a la microbiota presente en la luz. La respuesta inmune inicial está estrechamente regulada puesto que de esta regulación dependerá que se genere una respuesta de “tolerancia” o una respuesta inflamatoria defensiva. Esta respuesta inicial es inespecífica y constituye la **respuesta inmune innata**. Las células que conforman el sistema inmune innato (células epiteliales, células dendríticas, macrófagos y células natural killer) expresan receptores para el reconocimiento de patrones

antigénicos asociados a patógenos (*pattern recognition receptors*, PRRs), sobre todo microbianos, a diferencia del reconocimiento específico de antígenos por los receptores del sistema inmune adaptativo. Estos receptores de la inmunidad innata, además de constituir la primera línea de defensa, condicionan a las células presentadoras de antígenos (CPA) subepiteliales para inducir mecanismos de tolerancia y permitir el mantenimiento de la homeostasis intestinal. La familia de los receptores de patrones antigénicos engloba a los receptores tipo Toll (*toll-like receptors*, TLR) y a las proteínas del dominio de oligomerización de nucleótidos (*nucleotide oligomerization domain receptors* o NOD) entre otros.

Los mecanismos regulados por la activación de los TLR y NOD limitan en condiciones normales el proceso inflamatorio y permiten la tolerancia inmune, diferenciando entre las señales derivadas de microorganismos patógenos o comensales y de antígenos inocuos, para la generación de una respuesta inflamatoria local adecuada ([102](#)). Para ello, estos receptores tienen una función dual, con capacidad de respuesta diferencial por parte de las células epiteliales entre la estimulación por su parte apical frente a la estimulación basolateral ([103](#), [104](#)). Así, en condiciones normales, la activación apical de los PRRs por parte de las bacterias comensales ayuda a la secreción de sustancias antibacterianas y a mantener cierta tolerancia a la inflamación ([105](#)). Cuando existe una alteración estructural en la barrera epitelial, las bacterias pueden penetrar y es necesaria una respuesta pro-inflamatoria que se da a través de la activación de los PRRs de la parte basolateral y a través de la activación de los PRRs de las células del sistema inmune innato ([106](#)). Por su parte, las células dendríticas están continuamente sensando bacterias y otros antígenos que internalizan en fagosomas y procesan para su presentación mediante el complejo principal de histocompatibilidad tipo II. Estas células determinarán el desarrollo de respuestas inmunitarias tanto celulares como humorales por parte del sistema inmune adaptativo ([107](#)).

Cuando se activan las CPA (sobre todo las células dendríticas, que actúan como centinelas en la primera línea de defensa), éstas presentan antígenos a las células T *naïve* (*T helper* 0, Th0) en los órganos linfoides secundarios del

intestino como son las placas de Peyer, los ganglios linfáticos o los folículos linfoides aislados. Esta interacción inicia la **respuesta inmune adaptativa**, que generará la activación de los linfocitos especializados en distintas funciones inflamatorias o reguladoras. La inmunidad adquirida induce una respuesta rápida, específica y que genera memoria inmunológica frente a ciertos antígenos. Sus principales efectores son los linfocitos B y T, generadores de respuestas humorales y celulares respectivamente. Las células B, cuando se activan, se diferencian en células plasmáticas capaces de generar anticuerpos específicos. Las células T CD4+ o T helper (Th) se distribuyen en la lámina propia y los folículos linfoides del intestino. Tanto las células efectoras Th1 como las Th17 se encuentran en el intestino en condiciones homeostáticas ([108](#)). Sus propiedades pro-inflamatorias son normalmente contrarrestadas por las células T reguladoras (T reg) que expresan Foxp3, ayudando al mantenimiento de una inflamación fisiológica controlada. En respuesta a diferentes señales y estímulos, el sistema inmune adaptativo desarrollará un tipo de respuesta u otra. Los linfocitos encargados de dirigir estas respuestas se clasifican en diferentes tipos, según el perfil de citoquinas secretado, dando lugar a: Th1, Th2, Th17, Th25 y/o Treg ([109](#)).

Otro de los elementos que forman parte del sistema inmune intestinal es el **microbioma**, conformado por la población de microorganismos que habitan en la luz intestinal y sus elementos genéticos. Además de ser componente esencial de la barrera intestinal, la microbiota participa de funciones cruciales para el huésped, como la adquisición de nutrientes y la regulación del metabolismo energético, e influye en procesos tales como la respuesta inflamatoria o la reparación epitelial ([110](#), [111](#)). Existen múltiples evidencias que demuestran la implicación de la microbiota en la patogenia de la EC, entre ellas la composición microbiana anormal en estos pacientes en comparación con sujetos sanos, o la indudable influencia de las bacterias como componentes fundamentales para que se produzca la respuesta inflamatoria, como se describe más adelante en detalle (ver apartado 1.3.3).

Por último, el **sistema vascular** también es parte integrante del sistema inmune intestinal, en particular el endotelio, que además de mantener un

adecuado flujo sanguíneo es capaz de regular la entrada de los leucocitos al intestino. El acceso de las células hacia el tejido intestinal está modulado por moléculas de adhesión (selectinas e integrinas) y quimiocinas (sustancias celulares secretadas que atraen a otras células).

Así, se ha detallado cómo el sistema inmune intestinal, en el desarrollo de su función defensiva, puede ejercer dos tipos de respuesta: la innata y la adaptativa o adquirida. Ambas actúan de forma integrada y sinérgica. A continuación se resumen las principales alteraciones en cada tipo de respuesta que se han descrito como implicadas en la patogenia de la EC.

#### 1.3.2.1 Sistema inmune innato

Clásicamente se ha considerado que el elemento inmunológico fundamental en la patogenia de la EC era una alteración en la respuesta inmune adquirida, mediada principalmente por los linfocitos T (LT) CD4+ de la lámina propia (y cuyos mecanismos se detallan ampliamente en el siguiente apartado). Sin embargo, más recientemente, existen evidencias que apuntan a la existencia de alteraciones relevantes en la inmunidad innata (defectos de la función barrera y del procesamiento de antígenos, expresión anormal de péptidos, alteraciones en las células de la inmunidad innata...) que, probablemente, estén condicionando la respuesta de la inmunidad adquirida. Es por ello que, en los últimos años, se ha producido un cambio conceptual en la patogenia de la EC, con mayor focalización en los fenómenos patogénicos dependientes de la inmunidad innata y su posible implicación en el desarrollo de la disregulación inmune.

Los estudios GWAS, comentados previamente, han identificado numerosos genes altamente implicados en la regulación de la inmunidad innata y en la función de la barrera epitelial, entre ellos el más destacado es el NOD2 ([57](#), [112](#), [113](#)), implicado en el reconocimiento intracelular de patógenos, y por tanto, en la regulación de la respuesta inmune innata. Las mutaciones en este gen inducen a un desarrollo anormal de las placas de Peyer, lo que determina una respuesta inmune exagerada y un aumento de la permeabilidad de la barrera epitelial ([40](#)), facilitando la entrada de elementos bacterianos que

activan la respuesta inmune de la lámina propia y contribuyen a perpetuar la inflamación crónica.

Estos estudios han identificado también mutaciones de proteínas como la IRGM y ATG16L1 implicadas en el proceso de la autofagia (50), así como mutaciones de genes que codifican para proteínas del epitelio intestinal (como OCTN y DLG5) y que se asocian con un aumento de la susceptibilidad a la EC.

Respecto al gen ATG16L1, los estudios muestran que no solo juega un papel importante en la autofagia, sino también en la función secretora de las células de Paneth y en la regulación de la respuesta pro-inflamatoria. En pacientes con EC homocigotos para el alelo de riesgo de la ATG16L1, las células de Paneth presentan alteraciones en la vía de exocitosis granulocitaria, lo que se relaciona con una respuesta anormal de estas células frente a patógenos y con un aumento de la susceptibilidad a lesiones ileales (52). El estudio de biopsias intestinales de pacientes pediátricos con EC también han mostrado que la autofagia está específicamente activada en las células de Paneth, y que esta activación se asocia con una disminución significativa en el número de gránulos secretores, lo cual ocurre independientemente de las variantes genéticas de ATG16L1 o IRGM (114). Además, las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con la variante de riesgo Thr300Ala del ATG16L1 presentan una mayor producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-6 tras la estimulación con ligandos del NOD2 (115).

La evidencia disponible demuestra el vínculo funcional existente entre NOD2 y ATG16L1, ambas se consideran proteínas de inducción de autofagia y están codificadas por genes que aumentan el riesgo de EC (53, 54). En los pacientes con EC asociada a mutaciones en ambos genes está alterado el mecanismo de eliminación por autofagia de patógenos intracelulares, lo que demuestra la implicación de este proceso celular en la patogenia de la EC.

Otro mecanismo que relaciona estrechamente la autofagia y la inmunidad innata es la respuesta al acúmulo de proteínas mal plegadas inducida por estrés en el retículo endoplásmico (55). Los estudios GWAS han encontrado

una relación genética entre este mecanismo y la EC a través de los genes XBP1 y ORMDL3 los cuales participan en esta respuesta ([56](#), [57](#)).

Por otro lado, las *tight junctions* o uniones estrechas, esenciales también para el mantenimiento de la integridad de la barrera, han mostrado diferentes patrones de expresión y de distribución entre los pacientes con EC y la población sana ([116](#)). En la mucosa intestinal no inflamada de pacientes con EC se han observado alteraciones e irregularidades en la organización de las *tight junctions* y se ha visto que son más vulnerables a los estímulos luminales, con el consecuente aumento de la permeabilidad ([117](#), [118](#)). Además los pacientes con EC en remisión con alteración de la permeabilidad intestinal tienen más riesgo de sufrir recaída de la enfermedad ([119](#), [120](#)). De la misma forma, se sugiere que este fenómeno podría contribuir al desarrollo de neo-inflamación intestinal o recurrencia en la EC.

Los pacientes con EII presentan en el epitelio intestinal un elevado número de bacterias intracelulares y moléculas de adhesión que pueden alterar la permeabilidad de la barrera intestinal mediante la síntesis de diferentes enzimas alfa-hemolisinas ([121](#)). Sin embargo, poco se sabe de los mecanismos involucrados y de cómo contribuyen a la inflamación intestinal. Se ha informado de un aumento de la permeabilidad epitelial a las proteínas que precede al brote de la inflamación ileal en la EC, lo que indica una disfunción de la barrera como evento temprano en la inflamación de la mucosa ([122](#)).

El efecto del TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$ , citoquinas importantes en la patogenia de la EC, sobre la barrera intestinal también se ha evaluado en estudios experimentales. Ambas citoquinas regulan y aumentan la permeabilidad transcelular y paracelular ([123](#)). Además, el tratamiento con anti-TNF- $\alpha$  ha demostrado mejorar las propiedades de la barrera, así como disminuir la permeabilidad debido a la activación de la apoptosis epitelial, siendo muy efectivo en mejorar la función de la barrera intestinal en los pacientes con EC ([124](#)).

Otro hallazgo relevante en relación a la inmunidad innata es la alteración en la secreción de péptidos antimicrobianos por las células epiteliales intestinales

que se ha descrito en los pacientes con EC y que también se ha relacionado con mutaciones en el NOD2 ([125](#), [126](#)). Dentro de los péptidos antimicrobianos endógenos, las defensinas desempeñan un papel importante como parte de la respuesta inmune innata contra patógenos ([127](#)). Estos péptidos se expresan predominantemente en los neutrófilos y en las células epiteliales, y se clasifican en dos categorías principales:  $\alpha$ - y  $\beta$ -defensinas, dependiendo del patrón de los enlaces entre los residuos de cisteína. En el tracto gastrointestinal, las  $\alpha$ -defensinas ( $\alpha$ -Def) son secretadas específicamente por las células de Paneth ileales, mientras que las  $\beta$ -defensinas se expresan predominantemente en las células epiteliales del colon ([128](#)).

Estos péptidos comparten una fuerte homología estructural y una actividad antibacteriana, tanto in vitro como in vivo, de amplio espectro ([129](#)). Hasta la fecha, se han identificado 6 subtipos de  $\alpha$ -Def: los subtipos 1-4, producidos por los neutrófilos, y las defensinas entéricas 5 y 6, secretadas específicamente por las células caliciformes y las células de Paneth ([130](#)), formando una barrera semi-impenetrable que recubre la superficie luminal ([131](#)). En los neutrófilos, las  $\alpha$ -Def están almacenadas en los gránulos azurófilos, donde constituyen la principal proteína (60% del total), y pueden actuar directamente sobre las bacterias fagocitadas o ser excretadas al medio extracelular.

Las defensinas desempeñan un papel en la interrelación entre la inmunidad innata y adaptativa, atrayendo células dendríticas inmaduras, ayudando en su maduración y promoviendo la activación posterior de las células T ([132](#)). Las defensinas podrían ser factores clave en la modulación de la respuesta inmune en diversas enfermedades intestinales. Hasta la fecha, las asociaciones más consistentes entre los péptidos antimicrobianos y la EII son para las  $\alpha$ -Def en el intestino delgado de los pacientes con EC ([133](#)). En particular, se ha observado una disminución de la expresión de  $\alpha$ -Def 5 y 6 en la mucosa ileal de estos pacientes. También se ha demostrado que las variantes en los genes que codifican las defensinas están inversamente asociadas con los anticuerpos anti-glicano, relacionados con el fenotipo de la EC, apoyando el papel de estos péptidos en la patogenia ([134](#)). La hipótesis actual en relación con este hallazgo es que la expresión deficitaria de defensinas resulta en una menor

capacidad de defensa antimicrobiana de la mucosa y / o en alteraciones en la composición de la microbiota comensal, permitiendo una mayor adherencia e invasión bacteriana de la mucosa, que acaba desencadenando una respuesta inflamatoria (135).

Existe cierta controversia en los estudios acerca de si este defecto en la expresión de  $\alpha$ -Def es primario y permanente, como característica intrínseca de la enfermedad (125, 135), o si podría ser secundario a la destrucción del epitelio (con la consecuente pérdida de células de Paneth) que se produce como resultado de la inflamación crónica (136). En sangre periférica, en cambio, se ha evidenciado un aumento de los niveles de  $\alpha$ -Def producidas por los neutrófilos en pacientes activos con EC (137). Probablemente, esta respuesta inflamatoria sistémica es también una parte crucial de la reacción inmune del huésped a los diversos eventos que acontecen en la EC y que está facilitada por el aumento de la permeabilidad intestinal (como la translocación de DNA bacteriano) (138). Es por ello que los niveles circulantes de  $\alpha$ -Def se ha sugerido que podrían ser biomarcadores útiles para identificar la actividad de la enfermedad (137), aunque su especificidad y utilidad real en la práctica clínica no ha sido explorada en profundidad.

En este sentido, en un trabajo reciente de nuestro grupo, hemos estudiado la potencial utilidad de estos péptidos, íntimamente relacionados con la respuesta inmune innata, como posibles biomarcadores de la enfermedad. En este trabajo, realizado en pacientes con EC ileal, hemos caracterizado que existe un aumento de las concentraciones plasmáticas de  $\alpha$ -Def 1-3 en los pacientes activos (al debut), en comparación con los pacientes inactivos o los controles sanos. Para evaluar la especificidad de este hallazgo, se introdujo un segundo grupo control constituido por pacientes con ileítis terminal de etiología distinta a la EC, confirmada tras el estudio diagnóstico (incluyendo ileocolonoscopia con biopsias ileales). Se constataron concentraciones plasmáticas de  $\alpha$ -Def 1-3 significativamente más elevadas en los pacientes con EC ileal que en los pacientes con ileítis-no Crohn, en los que las concentraciones no diferían significativamente de las de los controles. Estos resultados, a falta de ser contrastados en cohortes más amplias, sugieren a priori una implicación de las

$\alpha$ -Def en la patogenia, así como su capacidad para diferenciar el grado de actividad y su utilidad como biomarcadores en la EC ileal al diagnóstico ([139](#)). Su posible utilidad como biomarcadores en el contexto post-quirúrgico de la EC, para diferenciar a los pacientes con recurrencia de aquellos que se mantienen en remisión, es otro aspecto que no ha sido caracterizado hasta el momento.

#### 1.3.2.2 Sistema inmune adaptativo

La respuesta inmune en la EC está polarizada principalmente hacia la activación de LT CD4+ con un perfil de respuesta Th1, donde las principales citoquinas implicadas son la IL-2, la IL-12, el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  ([140](#)). De hecho, el TNF- $\alpha$  se ha sugerido como el elemento patogénico fundamental en el trastorno inmune y los esfuerzos terapéuticos de las últimas décadas se han centrado en contrarrestar esta alteración de la inmunidad adquirida, consiguiendo el bloqueo de su efecto mediante anticuerpos monoclonales expresamente dirigidos frente a esta citoquina, los denominados fármacos anti-TNF- $\alpha$  (el primer grupo de fármacos biológicos empleados en el tratamiento de la EII).

Estos fármacos se ha visto que consiguen su efecto terapéutico, al menos en parte, facilitando la inducción de la apoptosis de los LT de la lámina propia, proceso celular que está dificultado en las células inmunes de estos pacientes. De hecho, hay estudios que sugieren que la medida de la apoptosis inducida por estos fármacos puede ser útil para predecir la respuesta al tratamiento anti-TNF, con valores inferiores en pacientes con mala respuesta en comparación con los pacientes respondedores ([141-143](#)).

La muerte celular por apoptosis constituye un mecanismo de aclaramiento de linfocitos activados de la mucosa intestinal sana, que permite evitar una respuesta inmune excesiva o prolongada. Los niveles de apoptosis de los LT de la lámina propia de la mucosa sana son muy superiores a los que tienen las células de sangre periférica, tanto de manera espontánea como tras la estimulación in vitro ([144](#)), en un proceso mediado por la vía Fas/Fas-ligando. Estudios realizados a finales de los años 90 sugerían que la EC presenta una

resistencia a la apoptosis de los LT (145) que contribuye a su acumulación en la lámina propia y a la consecuente perpetuación y cronificación del proceso inflamatorio. Esta resistencia a la apoptosis se ha relacionado con un ratio anormal de proteínas pro y anti-apoptóticas (Bax y Bcl-2, respectivamente) (146) y con un exceso de survivina (otra proteína anti-apoptótica) (147).

En un estudio previo de nuestro grupo caracterizamos esta resistencia a la apoptosis en LT CD4+ de sangre periférica de pacientes con EC, no relacionada con las vías clásicas de apoptosis (ratio Bax / Bcl-2 y actividad de las caspasas 3, 8 y 9 similares a los controles) y, en cambio, ligada a una inhibición de la actividad de la catalasa detectada en estos pacientes. Esta enzima, implicada en la regulación de la capacidad apoptótica, podría estar relacionada con esta resistencia a la apoptosis, dado que la inhibición in vitro de la catalasa en linfocitos sanos mediante AMT (3-amino-1,2,4-triazol) también desencadena una resistencia a la apoptosis en estas células (148).

Otros estudios han mostrado que esta resistencia a la apoptosis no parece ser única de la EC, sino que también se da en otras formas de inflamación intestinal, incluyendo la CU, la colitis isquémica y la colitis infecciosa (149, 150). Por tanto, parece que la resistencia a la apoptosis de los LT es una característica propia e inespecífica del tejido inflamado más que una característica intrínseca de la EC. En este sentido, un estudio que comparó el porcentaje de apoptosis de muestras de intestino sano e inflamado de EC y CU demostró que la reducción de la apoptosis se limita a las zonas inflamadas, mientras que las zonas no afectas se comportaron exactamente igual que las de los controles sanos (151).

Otro estudio mostró que la resistencia a la apoptosis de los LT se presentaba únicamente en los pacientes con mala respuesta a corticoides (corticodependientes y corticorrefractarios) tras 15 días de tratamiento, pero no en las muestras basales pre-tratamiento, lo que sugirió que no se trataba de una alteración primaria de la EC. Además, no era una característica única de los LT sino que también se observó, y de manera más exagerada y en fases más iniciales, en los linfocitos B (152). A pesar de estas evidencias que irían en

contra de un defecto intrínseco de la apoptosis en la EC, una excelente revisión publicada muy recientemente aboga todavía por la existencia de una resistencia a la apoptosis de los LT en la EC ([153](#)).

El descubrimiento reciente de nuevos subtipos celulares, como las células Th17 y las Treg ([154](#)), así como de su importante función en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune y de los procesos de inmunotolerancia (los cuales se pierden en la EC), han aportado evidencia de su implicación en esta enfermedad y han cambiado el paradigma clásico de la EC como una enfermedad de tipo “Th1”. En este sentido, existe amplia evidencia de que el perfil de células inmunes y de citoquinas que están mediando el proceso inflamatorio en la EC no solo es complejo, sino que además va cambiando con el transcurso del tiempo, paralelamente a la evolución de la enfermedad.

Esto es congruente con el comportamiento dinámico que presenta la EC, que evoluciona desde un patrón predominantemente inflamatorio al inicio, hacia el desarrollo progresivo de complicaciones estenosantes y penetrantes, como consecuencia de la inflamación crónica transmural y del daño tisular progresivo y acumulativo que es característico de la enfermedad ([155](#)). Por tanto, es razonable pensar que en las diferentes fases de la enfermedad predominen diferentes respuestas celulares desde el punto de vista inmunológico, que estén dirigiendo las manifestaciones fenotípicas de cada momento evolutivo. Es lo que se ha diferenciado en la literatura como EC temprana y tardía (“*Early and Late Crohn’s disease*”). Este concepto también ha sido bien caracterizado en pacientes con otras enfermedades inmunomediadas, como la artritis reumatoide, condición patogénica en la que la diferenciación entre una fase precoz y una fase tardía está bien establecida. En estos pacientes se ha visto que la enfermedad se caracteriza inicialmente por un perfil de citoquinas de las células T sinoviales único pero transitorio (IL-2, IL-4, IL-13, IL-15 e IL-17 elevadas), que desaparece posteriormente en la artritis reumatoide establecida de larga evolución ([156](#)).

En la práctica clínica se considera un paciente con EC precoz a aquel con un diagnóstico reciente de la enfermedad. Sin embargo, esta definición es arbitraria y puede ser inadecuada, ya que entre un 10 y un 40% de pacientes adultos presentan una complicación estenosante o penetrante durante el proceso diagnóstico o en los primeros meses tras el mismo ([157](#)). Para unificar la definición de EC precoz, se propuso inicialmente incluir en este concepto a aquellos pacientes con EC de menos de 2 años de diagnóstico, con parámetros clínicos, biológicos y endoscópicos de actividad pero sin haber presentado complicaciones estenosantes o penetrantes. Además, sin requerimientos previos de intervención quirúrgica o endoscópica, de tratamiento con inmunomoduladores o biológicos, o criterios de corticodependencia ([158](#)). Posteriormente, con la finalidad de establecer una definición consensuada para su utilización en ensayos clínicos, esta definición fue revisada por un grupo internacional de expertos en EII. Se propuso finalmente la definición de EC precoz como aquella de  $\leq 18$  meses desde el diagnóstico y sin requerimiento (previo o actual) de inmunomoduladores o biológicos (definición de París) ([159](#)).

#### 1.3.2.3 Inmunoregulación en EC precoz y tardía

Los datos experimentales, tanto de modelos animales como de estudios en humanos, demuestran que la inflamación crónica en la EII presenta cambios temporales en los patrones de expresión de citoquinas y en el de sus receptores con el curso evolutivo de la enfermedad ([160-164](#)).

Las observaciones procedentes de modelos experimentales de EII, como la colitis crónica de ratones *knockout* para IL-10 y la ileítis de ratones SAMP1 / YitFc, han demostrado patrones distintos de citoquinas entre las fases tempranas y tardías de la enfermedad. Estos modelos murinos, ambos Th1-mediados al inicio, han evidenciado que la IL-12 parece jugar un papel pivotal en la colitis temprana, así como un marcado incremento de las citoquinas de perfil Th2 en la enfermedad tardía, como la IL-4 e IL-13 en la colitis y la IL-5 e IL-13 en la ileítis ([164](#), [165](#)). Estos datos sugieren que los mecanismos

inmunes responsables de perpetuar la inflamación crónica en fases avanzadas son distintos a los que rigen el inicio de la enfermedad.

Un interesante estudio realizado en pacientes pediátricos demostró que el patrón de expresión de receptores para la IL-12 cambia con la duración de la inflamación (162). Este estudio, realizado en tejido (biopsias de mucosa intestinal), mostró claras diferencias, tanto en el perfil de producción de citoquinas como en la respuesta a las mismas por las células T de la mucosa, entre los niños con EC de debut y aquellos con EC de larga evolución. En los pacientes al debut se observó una producción elevada de IFN- $\gamma$  en respuesta a la IL-12 (que no se evidenció en los pacientes con EC avanzada), mediada por un aumento de expresión en las células T de la cadena  $\beta 2$  del receptor (IL12R $\beta 2$ ), que es exclusiva de las células Th1. La IL-12 es esencial para la diferenciación de las células T naïve hacia células Th1, perfil de respuesta que se observa en las colitis infecciosas agudas, pero que también es típica de condiciones de autoinmunidad. El aumento de expresión de IL12R $\beta 2$  y de la producción de IFN- $\gamma$  en los pacientes al debut (a diferencia de los pacientes con EC de larga evolución) demuestra por tanto que los eventos inflamatorios iniciales en la mucosa de estos pacientes están mediados fundamentalmente por una respuesta de tipo Th1. Es probable que por esta razón, el empleo de anticuerpos anti-IL-12 en pacientes adultos con EC evolucionada no haya mostrado tener un efecto potente y sostenido para el control de la enfermedad, únicamente respuestas parciales.

Otro de los hallazgos diferenciales del estudio fue un aumento significativo en la producción de IL-4 y de IL-10 en los niños con EC tardía vs. EC precoz. Ambas son citoquinas con potencial anti-inflamatorio y capacidad de inhibir la producción de IL-12, lo que sugiere que las células T en la EC temprana todavía son capaces de responder a las señales endógenas anti-inflamatorias y prevenir potencialmente una respuesta Th1 completa.

En otro estudio se caracterizó una mayor producción de IL-8 en las lesiones ileales crónicas de larga evolución (pre-cirugía) en comparación con las lesiones ileales tempranas (tras recurrencia post-quirúrgica) (166). Además, las principales fuentes celulares de IL-8 en las lesiones recurrentes tempranas

fueron neutrófilos, mientras que en las lesiones crónicas la mayoría de las células marcadas con IL-8 fueron células T CD31 y macrófagos. Estos resultados confirman que la naturaleza del infiltrado inflamatorio y la expresión de perfiles de citoquinas difieren entre las fases precoz y tardía de la EC.

Más recientemente, otro estudio determinó las respuestas Th1 y Th17 tanto en mucosa como en sangre periférica y también se reportaron diferencias entre los pacientes con EC precoz y tardía ([167](#)). Los autores evidenciaron un aumento en la producción de IL-17 en la mucosa inflamada de pacientes con EC tardía, así como un porcentaje significativamente mayor de células CD4+ Th17 en sangre periférica en comparación con controles sanos, pacientes en remisión y pacientes con EC precoz. Además, las células CD4+ Th17 de sangre periférica en la EC tardía mostraban un incremento significativo en la producción de IL-17 e IL-22. Estos hallazgos sugieren que en fases avanzadas de la enfermedad aparece en periferia una respuesta exacerbada de tipo Th17, que podría constituir uno de los mecanismos responsables de perpetuar la respuesta inflamatoria crónica.

### **1.3.3 Microbiota intestinal y ambiente**

Como se ha comentado al inicio del capítulo, estamos asistiendo en los últimos años a un rápido incremento de la incidencia de la enfermedad en países desarrollados, lo que sugiere que además de la contribución genética, los factores ambientales (incluida la composición de la microbiota intestinal), deben estar ejerciendo un papel clave en la patogenia.

#### Microbiota intestinal

Existen muchas evidencias que apoyan el papel fundamental que juega la microbiota en la patogenia de la EII, entre ellas, el efecto beneficioso de los antibióticos y probióticos en la pouchitis tras la cirugía de la CU o su papel para la prevención de la recurrencia post-quirúrgica en la EC ([168-170](#)). Además se ha observado que la mayoría de modelos experimentales de EII fracasan en el desarrollo de inflamación cuando se encuentran en condiciones exentas de bacterias ([171](#)). Otra prueba de ello es la respuesta clínica que se produce ante

la derivación del contenido fecal y la recidiva tras la re-exposición a la materia fecal en pacientes con EC.

Los mecanismos a través de los cuales la microbiota intestinal participa en la génesis o perpetuación del proceso inflamatorio no están claramente establecidos, aunque se han postulado diferentes hipótesis que tratan de dar explicación a su papel en la patogenia ([171](#)).

La primera de ellas se basa en la evidencia de que los pacientes con EII presentan una **mayor reactividad inmunológica** hacia la flora comensal, por lo que alteraciones en el sistema inmune innato de la mucosa, como por ejemplo las modificaciones funcionales en el *NOD2* o en el gen *ATG16L1* (variantes identificadas como de susceptibilidad para la EII), producirían una respuesta inapropiada frente a la flora comensal (que actuaría como patógena en este contexto) e iniciarían la respuesta inflamatoria en la mucosa intestinal.

Este posible vínculo entre genética y microbiota ha sido confirmado en un interesante estudio publicado muy recientemente, que demuestra cómo las mutaciones en estos genes, *ATG16L1* y *NOD2*, alteran la respuesta frente a las bacterias comensales como *Bacteroides fragilis* ([172](#)). Estas bacterias comensales liberan moléculas que modulan la acción de las células inmunes del intestino. Concretamente, las moléculas liberadas por las bacterias de la especie *Bacteroides fragilis* activan una ruta de autofagia mediada por *ATG16L1* y *NOD2* en las células dendríticas de la mucosa intestinal, que inducen a su vez una respuesta supresora anti-inflamatoria a través de las células T reg. En modelos murinos, estas moléculas pueden proteger de la colitis inducida. Así, los autores del estudio plantean que la presencia de mutaciones o variantes de riesgo en ambos genes, alteraría las rutas de procesamiento de antígenos y la señalización entre las células dendríticas y los linfocitos T, lo que conduce al desarrollo de una respuesta inflamatoria inadecuada frente a la flora comensal.

La segunda hipótesis se basa en la presencia de cambios anómalos en la composición de la microbiota intestinal. Estos cambios (conocidos como **disbiosis**) no solo generan un medio ideal para la expansión de

microorganismos patógenos, sino que producirían una respuesta inmune patológica en pacientes susceptibles que conduciría al desarrollo de inflamación en la mucosa intestinal ([171](#), [173](#)).

De hecho, se ha visto que los pacientes con EC presentan un desequilibrio en la composición de su microbiota respecto a los individuos sanos, caracterizado por una disminución en la biodiversidad de especies, sobre todo las asociadas a la mucosa, como *Firmicutes* (bacterias gram positivas que incluyen a la familia de *Clostridium* y *Bacillus*) y *Bacteroides* ([174](#)). Otras especies que se encuentran disminuidas en estos pacientes son *Faecalibacterium prausnitzii* y *Bifidobacterium*. Por el contrario, presentan un aumento de *Enterobacteriaceae*, *Proteobacteria* y *Fusobacteria* ([175](#)). Actualmente se sabe que esta disbiosis característica de los pacientes con EC existe incluso en ausencia de inflamación, y se ha implicado igualmente en el desarrollo de la recurrencia post-quirúrgica, como se verá más adelante (capítulo 2). Por otra parte, parece que la disbiosis podría ser otro de los vínculos entre genética y microbiota, ya que se ha visto que los familiares sanos de pacientes con EC también presentan cierto grado de disbiosis, a diferencia de sujetos sanos sin antecedentes familiares de EC ([176](#)).

### Ambiente

Uno de los factores que más influyen en la composición del microbioma es la **dieta**, aunque hasta el momento no se ha demostrado que ningún tipo de alimento en particular desencadene, perpetúe o agrave la EC, por lo que a todos los pacientes se les debe aconsejar una dieta variada y equilibrada ([177-179](#)). Sí que existe buena evidencia en la literatura acerca de la influencia de la nutrición enteral en el tratamiento de la EC pediátrica, siendo altamente efectiva en estos pacientes para inducir la remisión. Además de su efecto sobre la inmunidad intestinal, la nutrición enteral ha demostrado modular el microbioma de forma directa, produciendo cambios significativos en su composición ([180](#), [181](#)). De todos modos, la información disponible acerca de este tema sigue siendo escasa y la relación causal no ha sido del todo establecida.

Existen otros factores ambientales que también han sido implicados en la patogenia de la EC, muchos de los cuales también pueden condicionar cambios en la microbiota, aunque ninguno ha sido demostrado de forma consistente.

El **tabaco** ha sido uno de los más estudiados y que ha generado un mayor interés. Un metaanálisis confirma que el hábito tabáquico actúa como factor protector en la CU y como factor de alto riesgo para la EC (182). Además, su consumo se correlaciona en la EC con una mayor probabilidad de un curso clínico más agresivo, mayor necesidad de tratamiento, de cirugía y con tasas más elevadas de recurrencia post-quirúrgica (183). El mecanismo que explica esta diferencia en la influencia del tabaco en la EC y la CU sigue siendo desconocido. Está demostrado que fumar afecta a la inmunidad sistémica, aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal y altera el correcto funcionamiento del sistema inmune innato y adaptativo (184). Por otro lado, se ha demostrado que tras el cese del hábito tabáquico se producen cambios cualitativos en la composición de la microbiota intestinal, con incremento de las familias de *Firmicutes* y *Actinobacteria* y disminución de *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*, aunque se desconoce el impacto patogénico que estos cambios pueden ejercer sobre el curso clínico de la EII (185). El papel del fumador pasivo, especialmente en niños, como factor de riesgo o factor protector, sigue siendo también controvertido y ningún estudio ha podido confirmar este aspecto (186).

Respecto a otros factores que se ha sugerido que pueden modificar la respuesta inmune se encuentra el antecedente de **apendicectomía previa**, que podría tener un papel protector en el desarrollo de EC, aunque no todos los estudios lo confirman. Se piensa que podría ser debido a que el tejido linfóide del apéndice sería el punto de partida de las células que participarían en el desarrollo de la inflamación intestinal (187).

Respecto a la toma de fármacos, el uso de **antiinflamatorios no esteroideos** (AINES) se ha sugerido en múltiples estudios como un probable factor desencadenante de reactivaciones de la enfermedad en estos pacientes, probablemente por una reacción de tipo idiosincrásico, pero los datos

disponibles no son completamente concluyentes. No queda claro si los inhibidores de la COX-2 son más seguros que los AINES convencionales, siendo la inhibición de la síntesis de prostaglandinas el punto clave para explicar los efectos secundarios de estos fármacos (188). Los estudios de mejor calidad no apoyan el hecho de que sean un factor etiológico en la inducción de recidivas (189, 190). Por tanto, el tratamiento antiinflamatorio no está contraindicado en la EII, sobre todo en pacientes en remisión clínica, no obstante se debe ajustar a indicaciones definidas y bien establecidas. Una historia previa personal de exacerbación relacionada con la ingesta de AINES constituye probablemente el mejor indicador de riesgo individual.

Existen estudios que reportan que el **estrés psicosocial** es capaz de modificar las manifestaciones de la enfermedad, el curso clínico y la respuesta al tratamiento (191, 192). Además estudios experimentales han identificado que los neurotransmisores y neurohormonas producidos en el sistema nervioso central y en el sistema gastrointestinal son similares, y que las inervaciones neuronales de ambos sistemas están interconectadas (193). También se ha visto que el estrés aumenta la permeabilidad intestinal y la consecuente mayor entrada de antígenos lumbinales a través de la mucosa, facilitando la activación de las células T pre-sensibilizadas de la lámina propia y el desarrollo de inflamación (192).

Otro de los factores de riesgo potenciales que se han propuesto en la etiopatogenia de la EII incluye la disrupción transitoria del epitelio en el contexto de **infecciones entéricas**, con iniciación de una respuesta inflamatoria que se auto-perpetuaría en un huésped susceptible, incluso después de que la infección inicial se haya resuelto.

Son muchos los microorganismos que han sido propuestos como potenciales agentes etiológicos en la EC, aunque ninguno de ellos ha logrado demostrar su papel patogénico en la misma. Entre ellos destacan: *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis*, *Citomegalovirus* y *Saccharomyces cerevisiae*, entre otros. No obstante el que mayor controversia ha provocado ha sido el *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP). En varios estudios se ha postulado que este agente

infeccioso, presente en la leche de vaca tras su pasteurización, pudiera ser el desencadenante de la respuesta inmunológica desproporcionada y permanente que desarrolla la enfermedad, aunque esta teoría sigue siendo controvertida y no totalmente demostrada. El MAP ha sido identificado en la mucosa intestinal de pacientes con EC por distintos métodos de microscopía y se ha encontrado también en sangre periférica (194). Se sugiere que este microorganismo podría infectar a las células endoteliales y los adipocitos, haciendo que proliferen, dando lugar a la obstrucción de vasos ya existentes (formación de granulomas), y provocando el desarrollo de nuevos vasos (neoangiogénesis y linfangiogénesis) y de la grasa del mesenterio (195). Las células T con fenotipo Th1 o Th1/Th17 de los pacientes con EC presentan una mayor reactividad frente a MAP, lo que puede sugerir un posible papel de las micobacterias en el desarrollo de la inflamación (196).

#### **1.4 Historia natural de la enfermedad**

La EC es una enfermedad compleja, caracterizada por una gran heterogeneidad genética e inmunológica desde el punto de vista etiopatogénico, y esto se traduce en distintas formas de presentación fenotípica, es decir, en distintos patrones de comportamiento que puede presentar la enfermedad, con una amplia variabilidad de manifestaciones clínicas diferentes.

Es por ello que la clasificación fenotípica de los pacientes es importante, ya que no solo va a tener una utilidad directa en la práctica para la toma de decisiones terapéuticas, sino que permite unificar criterios entre los clínicos para categorizar mejor a estos pacientes.

El grupo de la Cleveland Clinic Foundation fue el primero en establecer, en el año 1975, y en base a la experiencia en su centro, una clasificación anatómica de la EC en ileal, colónica e ileocolónica (197). Además de ser la primera clasificación propuesta de la enfermedad, en este estudio (que incluyó un total de 615 pacientes) los autores ya sugieren que la EC no es una entidad homogénea, sino que se pueden diferenciar distintos patrones en base a su

localización, con manifestaciones clínicas, curso evolutivo, complicaciones y pronóstico muy diferentes.

Unos años más tarde, el grupo del Hospital Mount Sinai de Nueva York mostró la importancia de distinguir los diferentes patrones de comportamiento de la enfermedad, ya que independientemente de su distribución anatómica, observaron que la enfermedad penetrante presentaba un curso más agresivo y un peor pronóstico (en términos de necesidad de reintervenciones y de un desarrollo más rápido de recurrencia post-quirúrgica) en comparación con la enfermedad no penetrante, que presentaba un curso más indolente y más benigno ([198](#)).

Después de estos dos estudios de referencia, se han propuesto a lo largo de los años diversas clasificaciones de la enfermedad, siendo la Clasificación de Montreal de 2005 la que se utiliza actualmente ([199](#)), estratificando a los pacientes según la edad al diagnóstico, la localización anatómica y el comportamiento de la enfermedad (Tabla 2).

**Tabla 2.** Clasificación de Montreal de la EC (modificada de Silverberg *et al.* ([199](#))).

Edad al diagnóstico (A)		
A1: Menor de 16 años		
A2: 17-40 años		
A3: Mayor de 40 años		
Localización de la enfermedad (L)	Modificada por GI alta (L4)*	
L1: Íleon terminal	L1 + L4	Íleon terminal + GI alta
L2: Colon	L2 + L4	Colon + GI alta
L3: Íleo-colon	L3 + L4	Íleo-colon + GI alta
L4: GI alta		
Patrón de comportamiento (B)	Modificada por enfermedad perianal (p)**	
B1: Inflamatorio	B1p	Inflamatorio + perianal
B2: Estenosante	B2p	Estenosante + perianal
B3: Penetrante	B3p	Penetrante + perianal

\* De L1 a L3 se puede añadir el modificador "L4" si existe simultáneamente afectación de tracto digestivo alto.

\*\* A cada uno de los diferentes patrones de comportamiento (B1, B2, B3) se puede añadir el modificador “p” si existe enfermedad perianal asociada.

Esta clasificación fenotípica tiene un papel importante para la decisión del abordaje terapéutico y la predicción del curso clínico de la enfermedad ([200](#)).

Aproximadamente un 40-50% de los pacientes debutan con afectación ileo-cólica, alrededor de un 30% lo hacen exclusivamente a nivel ileal y el 30% restante a nivel cólico ([201-204](#)). La localización de la enfermedad tiende a permanecer estable en el tiempo y únicamente un 10-15% de pacientes presentarán un cambio de localización a los 10 años del diagnóstico, habitualmente de ileal (50%) o cólico (50%) a ileo-cólico ([205](#)).

Por el contrario, el patrón de comportamiento de la enfermedad es más susceptible de presentar cambios a largo plazo. A pesar de que la mayoría de los pacientes debuta con un comportamiento inflamatorio, el riesgo de desarrollar estenosis o fístulas aumenta a lo largo del tiempo, siendo lo habitual evolucionar de un patrón inflamatorio al diagnóstico (en el 90% de los casos) a uno estenosante (29-35%) o penetrante (18-27%) en los 5 primeros años tras el diagnóstico ([199](#), [202](#), [204](#)). Más de la mitad de los pacientes desarrollarán manifestaciones estenosantes o penetrantes en los primeros 10 años de evolución de la enfermedad ([206](#)). Los patrones estenosantes y penetrantes son considerados como complicaciones evolutivas en la EC y, por tanto, constituyen patrones más agresivos dado que requieren tratamiento quirúrgico en mayor proporción que el patrón inflamatorio. Además, cuando reaparece la enfermedad después de una intervención quirúrgica, suele evolucionar de nuevo hacia el mismo patrón que ocasionó la necesidad de cirugía previa.

La edad al diagnóstico también determina el fenotipo de la enfermedad de manera directa. La EC de inicio precoz (antes de los 16 años) se considera asociada con una mayor predisposición genética y con presentaciones clínicas diferentes. Por ejemplo, en los pacientes con EC de debut antes de los 20 años, es más frecuente la afectación del tracto digestivo alto, mientras que la afectación cólica tiene una mayor incidencia en los pacientes que debutan por

encima de los 60 años ([199](#)). Para la EC pediátrica se ha propuesto recientemente una nueva clasificación fenotípica, la denominada clasificación de París, que consiste en una modificación para la población pediátrica de la clasificación de Montreal, y que considera factores específicos de este grupo etario, como la existencia de retraso del crecimiento, puntualización fundamental a la hora de tratar a pacientes pediátricos con EC ([207](#)).

Respecto al curso clínico de la enfermedad, se han descrito diferentes patrones evolutivos en relación con la gravedad de los síntomas y la frecuencia de recidivas ([206](#)). Hasta un 40% de los pacientes presenta una mayor actividad y gravedad de los síntomas durante el primer año del diagnóstico, con un curso relativamente más benigno en los años siguientes. El segundo patrón en frecuencia (un tercio de los pacientes) mantiene una actividad crónica fluctuante a lo largo de los años. En otros casos (< 5%) la actividad y gravedad de los síntomas es menor al diagnóstico y se incrementa con el tiempo de evolución. Otro subgrupo de pacientes (entorno a un 20%), en cambio, puede presentar una actividad crónica mantenida, de forma continua, a pesar del tratamiento.

Se ha visto que la actividad de la enfermedad en el año previo puede predecir el curso clínico en años posteriores ([208](#), [209](#)). Así, un paciente que alcanza la remisión clínica durante el primer año, tiene un 80% de posibilidades de mantener la remisión, mientras que en aquellos en que sólo se logra un control clínico parcial esta proporción se reduce a un 30% en años posteriores ([210](#)). Además, la EC presenta una elevada probabilidad acumulada de riesgo de complicaciones y de cirugía en los primeros 10 años tras el diagnóstico, que se ha observado que son mayores, especialmente, en los 5 primeros años ([206](#)).

A pesar de que el curso de la enfermedad difiere de manera importante entre pacientes, se han descrito algunos factores de riesgo predictivos de enfermedad más agresiva, definida como aquella que requiere de cirugía resectiva ([202](#), [211-213](#)), presenta progresión de un patrón inflamatorio a otro estenosante o penetrante ([214](#), [215](#)), desarrolla corticodependencia (incapacidad para reducir la dosis de corticoides por debajo de los 10 mg/día

de prednisona o reaparición de la actividad de la enfermedad antes de los 3 meses tras suspender los corticoides) ([212](#), [214](#)) o requiere del uso de inmunomoduladores, fármacos biológicos u hospitalizaciones ([212](#), [215](#)). Entre los factores de riesgo identificados se incluyen el hábito tabáquico ([211](#), [216](#), [217](#)), la edad de debut precoz ([211](#), [212](#)), la afectación de intestino delgado ([213-215](#), [218](#)), la necesidad de corticoides al diagnóstico ([212-214](#)) y la presencia de enfermedad perianal al diagnóstico ([212](#), [213](#), [215](#)). Por el contrario, apenas hay evidencia de factores predictivos de un curso más benigno o indolente. Recientemente, en uno de los pocos estudios que ha explorado este aspecto en la EC, se observó que la afectación cólica exclusiva era la única característica basal de mejor pronóstico ([219](#)).

### **1.5 Valoración de la actividad**

En la EC no siempre existe una adecuada correlación entre la semiología clínica, los parámetros de laboratorio y los exámenes endoscópicos y radiológicos. Es decir, la actividad inflamatoria y la gravedad clínica no siempre van parejas; ello obedece al hecho de que pueden aparecer complicaciones (estenosis, enfermedad perianal) y síntomas (por ejemplo, dolor por cuadro oclusivo o diarrea postoperatoria) en ausencia de actividad inflamatoria.

La cuantificación de la actividad de la enfermedad ha sido imprescindible para definir los objetivos primarios de los ensayos clínicos ([220](#)). La valoración de la actividad inflamatoria puede realizarse atendiendo a diferentes criterios: clínicos, bioquímicos, endoscópicos, histológicos y de pruebas de imagen. Algunos de estos aspectos se agrupan en los denominados índices de actividad. Existen diferentes índices (clínicos, endoscópicos, histológicos, radiológicos y, en ocasiones, mixtos), que si bien no se utilizan con frecuencia en la práctica diaria, pueden ser útiles en circunstancias concretas, como la evaluación de la respuesta a un tratamiento, la recidiva del paciente operado, la enfermedad fistulizante o la enfermedad perianal. Como se ha comentado previamente, estos índices sí que son especialmente útiles, como herramienta de medida consensuada, en el contexto de los ensayos clínicos controlados, para cuantificar el grado de actividad, definir la inclusión de pacientes y establecer el concepto de recidiva, remisión y éxito terapéutico. Su uso en la

práctica clínica empieza también a ser mayor al considerarse actualmente el control de la enfermedad más allá de los síntomas y considerar la curación mucosa un buen predictor de enfermedad menos agresiva y menos demandante de recursos sanitarios ([221](#)).

En la EC los índices clínicos más utilizados son el CDAI (Crohn's disease activity index), el índice de Harvey-Bradshaw y el de Van Hees. Existen también índices cuantitativos endoscópicos, radiológicos e histológicos para gradar las lesiones detectadas en la endoscopia, en la entero-RM y en el estudio anatomopatológico. La valoración de la actividad inflamatoria también puede realizarse mediante parámetros bioquímicos, uno de los más clásicos es la proteína C reactiva (PCR). En los últimos años, también se ha establecido y consolidado en la práctica clínica el uso de marcadores fecales, especialmente la calprotectina, cuya monitorización ha demostrado ser muy útil en diversos escenarios clínicos de la enfermedad.

A continuación se realiza una breve descripción de los índices más empleados, así como de los diferentes biomarcadores de los que disponemos, tanto serológicos como fecales, en la valoración de la actividad de la EC.

### **1.5.1 Índices clínicos**

Existen diferentes índices de actividad específicos para cada situación clínica. Así, para la valoración del patrón inflamatorio destacan el CDAI, el índice de Harvey-Bradshaw y el de Van Hess. En la enfermedad perianal (EPA) los más empleados son el PDAI y el índice de Present.

El índice de Best o CDAI (*Crohn's disease activity index*) es el único que ha sido validado y, pese a que han transcurrido más de 30 años desde su diseño, sigue siendo el más utilizado en los ensayos clínicos controlados ([222](#)). Incluye ocho variables, siete de ellas clínicas (número de deposiciones, dolor abdominal, estado general, presencia de manifestaciones extraintestinales, ingesta de antidiarreicos, masa abdominal, peso) y solo un parámetro analítico (el hematocrito). Por ello, es un índice más de severidad clínica que de actividad inflamatoria. Una de sus principales limitaciones es que presenta una

elevada subjetividad y, por ello, una elevada variabilidad interobservador (aspectos muy subjetivos, como la intensidad del dolor abdominal y el estado general, suponen el 39% del valor de la ecuación). Además, precisa de siete días de cumplimentación antes de la evaluación, por lo que no es práctico para ser aplicado en la consulta diaria. La puntuación final obtenida abarca un espectro muy amplio, considerándose enfermedad inactiva o remisión por debajo de los 150 puntos, brote leve entre 150-219, brote moderado entre 220-450, y brote grave por encima de los 450 puntos.

El índice de Harvey-Bradshaw es un índice más sencillo y cómodo de calcular, y por ello, es el más utilizado en la práctica clínica (223). Incluye cinco variables, todas ellas clínicas: estado general, dolor abdominal, número de deposiciones líquidas diarias, presencia de masa abdominal y complicaciones. La actividad de la enfermedad se clasifica según la puntuación sea: <5 (remisión), 5-7 (brote leve), 8-16 (brote moderado) o >16 (brote grave). Fue diseñado de forma prospectiva con una muestra de 112 pacientes y presenta una correlación positiva con el CDAI. Por ello y por su mayor simplicidad, también se emplea con frecuencia para la evaluación estandarizada de la actividad en el contexto de estudios clínicos, permitiendo la comparación entre diferentes centros (224).

El índice de Van Hees evalúa 8 variables clínico-analíticas (albúmina sérica, VSG, presencia de masa abdominal, sexo, temperatura, consistencia de las heces, manifestaciones extraintestinales e índice de masa corporal) y además valora la existencia de resección intestinal previa (225). Este índice presenta 2 objeciones importantes: su diseño fue retrospectivo y el tamaño de la muestra pequeño (68 pacientes). Además, es complejo en su cálculo.

El índice de actividad más utilizado en los ensayos clínicos que valoran la EPA es el PDAI (*Perianal Disease Activity Index*) (226). El PDAI supone un índice funcional de actividad que valora aspectos esenciales de la calidad de vida. Evalúa 5 categorías que pueden verse afectadas por la presencia de fístulas: drenaje, dolor, restricción de la vida sexual, tipo de enfermedad perianal y grado de induración. Cada categoría está graduada con una escala de 5 puntos (no síntomas= 0; síntomas severos= 5). A mayor puntuación, mayor gravedad.

El índice de Present es útil en pacientes cuya clínica predominante sea el drenaje de fístulas enterocutáneas o perianales, ya que a menudo presentan un CDAI bajo (la variable “drenaje fistuloso” solo contribuye 20 puntos en el CDAI). Fue el índice utilizado por Present en 1999 para la valoración de la respuesta terapéutica al infliximab en la EC fistulizante (227). Es un índice sencillo, que clasifica la respuesta al tratamiento con infliximab a lo largo de 4 semanas en función de si las fístulas se cierran por completo, es decir, ausencia de drenaje a pesar de compresión digital (remisión), si drenan menos de la mitad de las que drenaban (mejoría) o si siguen drenando más de la mitad de las que drenaban (sin respuesta).

El CDAI en el patrón inflamatorio y los dos índices comentados en la enfermedad fistulizante son los recomendados para la inclusión de pacientes y para la valoración de eficacia en los ensayos clínicos controlados (220).

### **1.5.2 Índices endoscópicos**

La cicatrización o curación mucosa se ha propuesto actualmente como objetivo terapéutico a alcanzar en la enfermedad, dados los beneficios clínicos que supone lograrla, como la remisión clínica sostenida libre de esteroides y unas menores tasas de hospitalización y de resección quirúrgica (221). Para la valoración de la respuesta endoscópica o la cicatrización mucosa, el índice endoscópico validado para la EC con afectación cólica es el CDEIS (*Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity*) (228). El cálculo del índice incluye la valoración de la extensión y longitud de los tramos afectados por úlceras, la profundidad de éstas y la presencia de estenosis en los distintos segmentos intestinales explorados (recto, sigma y colon descendente, colon transverso, colon ascendente e íleon). Puesto que el CDEIS requiere de un cálculo complejo, recientemente se ha desarrollado un índice más simple, reproducible, fácil de aplicar y con una adecuada correlación con el CDEIS, el SES-CD (*Simplified Endoscopic Activity Score for Crohn's Disease*) (229). Actualmente, estos índices no tienen especial aplicabilidad clínica y su utilidad se limita a la

valoración de la actividad endoscópica y de la remisión en el contexto de ensayos clínicos controlados.

En la valoración de la recurrencia post-quirúrgica en los pacientes intervenidos se emplea el índice endoscópico de Rutgeerts ([230](#)), que permite valorar la presencia y gravedad de las lesiones en el neoíleon y que tiene, además, importantes implicaciones pronósticas (explicación detallada en el capítulo 2).

### **1.5.3 Índices radiológicos**

Se han descrito diversos índices radiológicos que permiten evaluar el grado de actividad de la enfermedad. Las técnicas de imagen seccionales, como la enterografía por resonancia magnética (entero-RM) o por tomografía (entero-TC), permiten discriminar la actividad inflamatoria en zonas no accesibles por endoscopia ([131](#)) o en casos de estenosis o enfermedad penetrante, al detectar edema, diferencias en la captación de contraste, engrosamiento de la pared o ulceración de la mucosa. Además, estas técnicas permiten evaluar también la presencia de posibles complicaciones extraluminales asociadas.

La entero-TC presenta como limitación principal la exposición a radiación, siendo su mayor ventaja la accesibilidad y la mejor tolerabilidad del paciente a la prueba (menor tiempo de exploración y menos pausas de respiración). Existe solo un índice radiológico de actividad basado en la TC descrito en la literatura, que valora el engrosamiento de pared, el tipo de realce mucoso, la estratificación de la pared, la congestión de vasos mesentéricos (o signo del peine) y la presencia de adenopatías ([231](#)). Los autores de este estudio propusieron una clasificación por TC de las lesiones correlacionando los hallazgos con la histología de piezas quirúrgicas, para determinar las principales variables radiológicas que se asociaban con el grado histológico de inflamación o de fibrosis. Así, establecieron un índice de puntuación (la clasificación de Chiorean) que incluye dos *scores* diferenciados, para clasificar, por un lado, el componente de inflamación (en leve, moderada o grave) y, por otro, el componente de fibrosis (en ausente, leve-moderada o grave). En el estudio, la precisión de la entero-TC fue cercana al 80% para diferenciar entre lesiones inflamatorias y fibróticas.

En los últimos años, la entero-RM se ha posicionado como una excelente técnica para valorar la extensión y la actividad inflamatoria de la EC de intestino delgado. Además, la posibilidad de realizar estudios dinámicos de captación de contraste parece conferir superioridad a esta técnica para distinguir la inflamación de la afectación fibrótica. La entero-RM tiene la desventaja de ser una técnica costosa, no disponible en todos los centros y que requiere un entrenamiento por personal cualificado que establezca los protocolos y consensúe la aplicación de los mismos. Sin embargo, presenta como ventaja principal respecto a la TC la ausencia de radiación ionizante, que la convierte en la técnica de elección en los pacientes jóvenes, dado que son pacientes que por su EC van a precisar de múltiples estudios de imagen a lo largo de la vida.

Se han descrito diferentes índices radiológicos basados en los hallazgos de la entero-RM para evaluar la actividad y gravedad de la EC. Entre ellos destaca el desarrollado por Rimola *et al.* (232), el denominado por sus siglas índice MaRIA (*Magnetic Resonance Index of Activity*), que ha sido validado por los autores en 2 cohortes independientes mostrando una buena correlación con el CDEIS (232). El índice realiza una estimación cuantitativa de la actividad en cada segmento considerando la presencia de edema, de úlceras, el engrosamiento parietal y la captación del contraste, según la siguiente fórmula:

$$\text{MaRIA (segmento)} = 1,5 * \text{Grosor parietal (mm)} + 0,02 * \text{CRC} + 5 * \text{Edema} + 10 * \text{Úlceras}$$

CRC: Captación relativa de contraste o *relative contrast enhancement* (RCE), se calcula aplicando una fórmula específica que considera la intensidad de señal en la pared antes y después de la administración del contraste intravenoso.

Este índice ha mostrado una elevada fiabilidad en la determinación de la actividad de la enfermedad (sensibilidad 0.81 y especificidad 0.89) así como en la detección de lesiones ulcerosas (sensibilidad 0.95 y especificidad 0.91). El valor obtenido para cada segmento, según la fórmula anterior, se encuentra en un rango de 3.4 a 35. Los puntos de corte establecidos por los autores para considerar enfermedad activa y enfermedad grave fueron valores de MaRIA  $\geq 7$  y valores  $\geq 11$ , respectivamente. Además, este mismo grupo de trabajo ha

comprobado que la RM es un método preciso para evaluar la respuesta terapéutica en la EC, ya que los valores del índice MaRIA son sensibles a los cambios en la gravedad de la lesión, y son capaces de determinar la curación de la mucosa ([233](#)).

Para la valoración de la recurrencia post-quirúrgica se ha propuesto otro índice radiológico basado en la entero-RM, el índice de Sailer, que presenta una adecuada correlación con la endoscopia y que se describirá con más detalle en el capítulo 2.

Finalmente, no hay que olvidar que otras técnicas de imagen menos costosas e invasivas, como la ultrasonografía, siguen siendo útiles para localizar el tramo de afectación y la actividad inflamatoria en los mismos, aunque no ofrecen índices validados que nos permitan una valoración tan ajustada de la inflamación como la RM y además son técnicas muy explorador-dependientes, que requieren de gran experiencia por parte del radiólogo que las realiza.

#### **1.5.4 Marcadores serológicos y fecales**

Con el paso de los años, el manejo de la EII ha pasado de basarse únicamente en el control de los síntomas a fundamentarse en la valoración objetiva de la presencia de inflamación y de lesiones. Esto es así por dos razones: por un lado, porque la clínica no refleja fielmente ni la presencia ni la gravedad de las lesiones endoscópicas y, por otro, porque como se ha comentado previamente, hoy sabemos que la resolución o cicatrización de las lesiones mucosas comporta un mejor pronóstico para estos pacientes. A pesar de la indudable utilidad de las técnicas endoscópicas y radiológicas en la valoración de la extensión, gravedad y actividad de la enfermedad, estas exploraciones son costosas e invasivas, y difícilmente se pueden realizar con frecuencia para monitorizar la actividad de la enfermedad. De ahí la importancia y la necesidad de disponer de marcadores no invasivos que podamos emplear en la práctica diaria para realizar una evaluación objetiva y monitorizar la actividad en estos pacientes.

## **Marcadores serológicos**

Entre los marcadores serológicos clásicos de actividad destaca la proteína C reactiva (PCR), proteína de fase aguda sintetizada por el hígado que se eleva de forma precoz tras el comienzo del proceso inflamatorio y que disminuye también rápidamente tras su resolución, debido a su vida media corta (19 h). Esta propiedad hace que sea útil para estimar la evolución de la actividad inflamatoria en el tiempo y monitorizar la respuesta al tratamiento.

En la EC, la PCR ha mostrado una buena correlación con el CDAI, aunque hasta un 10% de los pacientes con brote tienen una PCR normal. También se ha sugerido su utilidad como predictor de recidiva, aunque no se ha podido establecer un valor predictivo, ya que 1/3 de los pacientes tienen una PCR normal antes de un brote de actividad y 1/3 de los pacientes con un aumento de PCR no presentan recidiva. Por otro lado, se ha indicado su valor para diferenciar pacientes activos en los ensayos clínicos controlados que valoran la eficacia de fármacos biológicos. De hecho, se ha comprobado que una PCR elevada (>5 mg/L) se asocia a una mayor respuesta a cualquiera de los tratamientos biológicos, probablemente porque evita la inclusión de pacientes con síntomas que no son secundarios a la propia actividad ([234-237](#)).

Otro de los marcadores serológicos clásicos es la velocidad de sedimentación globular (VSG), aunque tiene una utilidad más limitada en la práctica clínica debido a que es inespecífica y tiene una vida media prolongada (con una mayor latencia desde que se produce el evento inflamatorio hasta que se eleva y un descenso lento, de varios días, tras resolverse la inflamación). Depende también de otros factores, como el número y tamaño de los hematíes, por lo que la presencia concomitante de anemia afectará a sus valores. Por otra parte, se ha descrito una elevación de la VSG con la edad, el hábito tabáquico o el empleo de algunos fármacos, como los salicilatos. A pesar de sus limitaciones, la VSG dispone también de algunas ventajas, como su sencillez de determinación, su disponibilidad y su reducido coste.

Existen otros parámetros de laboratorio generalmente empleados como marcadores de actividad, como el recuento de leucocitos, plaquetas y

albúmina. El recuento de leucocitos aumenta como parte de la respuesta de fase aguda, por lo que la leucocitosis no es una característica específica de la EII y puede aparecer en el contexto de otros procesos inflamatorios o patológicos agudos. El recuento leucocitario también está influenciado por algunos tratamientos empleados en la enfermedad, como los corticoides (que lo aumentan) o las tiopurinas (lo disminuyen). El recuento de plaquetas tampoco es un marcador específico de inflamación y dispone de un amplio rango de valores normales, por lo que este parámetro es menos útil. La albúmina es un ejemplo típico de un reactante de fase aguda negativo y se pueden encontrar niveles disminuidos durante la inflamación. Sin embargo, otras condiciones como la malnutrición y la malabsorción también cursan con niveles bajos de albúmina.

Otros reactantes de fase aguda incluyen el ácido siálico, el orosomucoide (o  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida), el fibrinógeno, la  $\beta$ 2 microglobulina, la proteína sérica amiloide A, la  $\alpha$ 2 globulina y la  $\alpha$ 1-antitripsina. La mayoría de estos marcadores no han sido ampliamente estudiados en la EII y muchos han mostrado resultados contradictorios. Además, su uso en la EII no ha demostrado ser superior a la PCR en general, debido principalmente a la mayor vida media de estas proteínas. Se ha demostrado que el orosomucoide se correlaciona bien con la actividad de la enfermedad, pero su vida media de 5 días hace que sea un marcador menos útil en la práctica clínica ([238](#)).

### **Marcadores fecales**

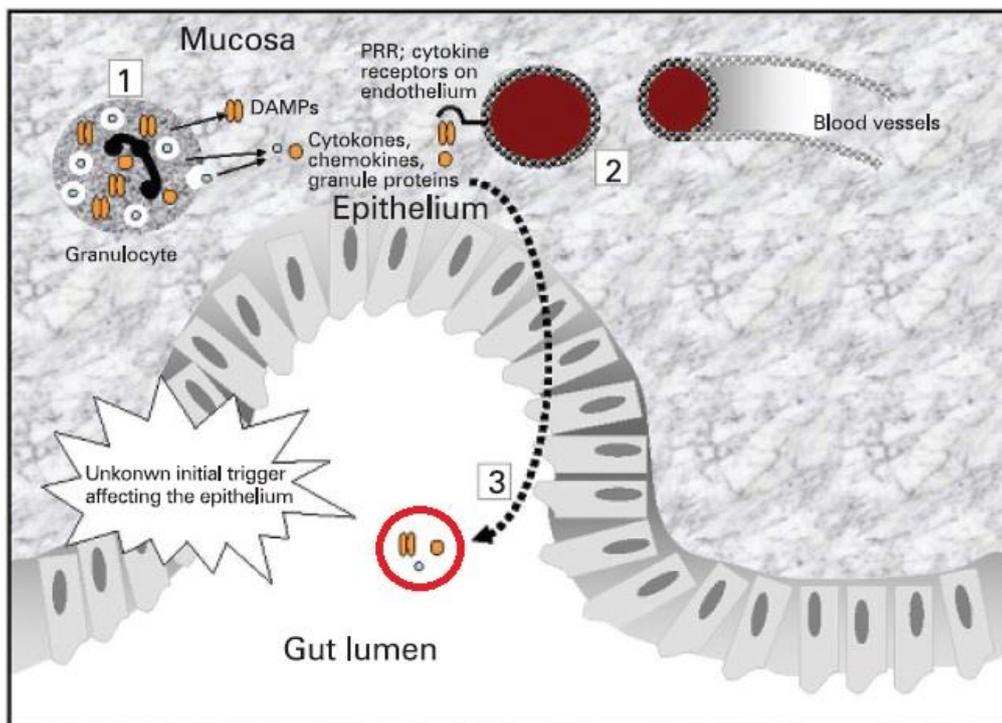
La facilidad de acceso a los marcadores fecales, el hecho de que sean más específicos de inflamación intestinal que los marcadores serológicos y la posibilidad de que puedan ahorrar en ciertos contextos pruebas endoscópicas, han posicionado en los últimos años a la calprotectina fecal (CF) en la práctica clínica.

La CF constituye la proteína más abundante en el citoplasma de los neutrófilos (representa el 60% de las proteínas citosólicas) y su presencia en las heces es directamente proporcional a la migración de los neutrófilos hacia el tracto intestinal. Además, es un marcador muy temprano de inflamación y su

elevación en las heces es detectable muy precozmente en fases iniciales, antes incluso de que aparezcan las lesiones endoscópicas (239).

En la fase inicial de la inflamación hay una migración e infiltración de la mucosa por los granulocitos, que secretan citoquinas y quimiocinas. Estas moléculas pro-inflamatorias activan las células endoteliales intestinales y sirven como quimioatrayentes, resultando en un reclutamiento adicional de leucocitos (especialmente monocitos, macrófagos y células T) en la mucosa. Además de secretar moléculas quimiotácticas, la degranulación de los granulocitos en esta fase inicial libera las proteínas citosólicas hacia la luz intestinal, entre las que se encuentra la CF (Figura 3).

**Figura 3.** Liberación de calprotectina al lumen intestinal en fases tempranas de la inflamación (modificado de Foell D, et al. (239)).



La CF es resistente a la actividad proteolítica y, por ello, muy estable en las heces a temperatura ambiente (por períodos prolongados, de hasta una semana), lo que la ha convertido en el biomarcador de elección frente a otros marcadores fecales como la lactoferrina.

Su determinación requiere de una única muestra de heces de escasa cuantía (5 gr) y puede realizarse fundamentalmente por dos métodos: mediante una técnica de enzimoimmunoanálisis (ELISA), la más empleada, que es una técnica sencilla, barata, que está perfectamente estandarizada (es el procedimiento de referencia) y es muy precisa. Aporta un valor cuantitativo de CF en un rango muy amplio (que va de 30 hasta 3000  $\mu\text{g/g}$ ). También puede cuantificarse con técnicas de inmunocromatografía, conocidas como “test rápidos”, cuyo resultado está disponible en pocos minutos, aunque supone un mayor coste respecto al ELISA y son menos precisas en cuanto al resultado. Las técnicas semicuantitativas solo indican un valor de CF superior o inferior a un punto de corte establecido y las cuantitativas disponen de un rango de valores más limitado que el ELISA, que suele ir de 30-50 hasta 300  $\mu\text{g/g}$ .

Como se ha comentado previamente, la CF es más específica de inflamación intestinal que los marcadores serológicos (puesto que no se eleva en otros procesos extradigestivos), aunque no es específica de EII y puede también elevarse en el contexto de otros procesos inflamatorios como infecciones gastrointestinales, neoplasias, enfermedad celíaca, colitis microscópica, poliposis o tras la ingesta de fármacos enterolesivos como los AINEs.

Su papel en el contexto de la EII ha sido ampliamente estudiado en los últimos años, demostrando su utilidad clínica en diferentes escenarios de la enfermedad.

La CF es un marcador útil para monitorizar la actividad inflamatoria, habiendo demostrado una excelente correlación con la actividad endoscópica e incluso con la histológica ([240-242](#)). Los estudios acumulados hasta la fecha demuestran su estrecha correlación con la actividad endoscópica en la EC evaluada por diversos índices validados (CDEIS ([243](#)), SES-CD ([244](#))), que oscila entre  $r=0.48$  y  $r=0.75$ . Esta correlación es mucho mejor que la que presenta el CDEIS con el índice de actividad clínica (CDAI) y con la PCR. De este modo, la CF puede considerarse el mejor biomarcador candidato a sustituir la endoscopia para la evaluación de la actividad endoscópica, así como para monitorizar la respuesta al tratamiento. Además, la CF ha sido el único marcador que ha mostrado capacidad para discriminar la remisión frente

a la actividad leve, moderada y grave ([244](#)). El punto de corte no está claramente establecido, entre otros motivos porque tampoco está bien definido el concepto de remisión endoscópica para cada uno de los índices. Los estudios realizados proponen diferentes puntos de corte, considerándose globalmente valores que oscilan entre 150-250 µg/g para considerar enfermedad endoscópicamente activa. En todos los casos se consigue una sensibilidad en torno al 70-80% y una especificidad alrededor del 80-97%. Recientemente se ha evaluado el valor de la CF en pacientes incluidos en ensayos clínicos donde se ha considerado la curación mucosa como objetivo primario del estudio. En este contexto se ha sugerido el punto de corte de 250 µg/g, tanto para EC como para CU, para determinar la existencia de lesiones endoscópicas clínicamente relevantes ([240](#), [245](#)).

Respecto a la localización de las lesiones, la mayoría de los estudios iniciales parecían indicar que la correlación entre la CF y la actividad endoscópica es mayor en los pacientes con afectación colónica e ileocolónica que en los pacientes con afectación exclusivamente ileal ([243](#), [244](#), [246](#)). Sin embargo, estos estudios incluían un número muy limitado de pacientes con afectación ileal pura y muchos de ellos con patrón estenosante. Un estudio realizado para clarificar este aspecto evalúa las concentraciones de CF al diagnóstico de la EC, demostrando que no hay diferencias significativas entre la afectación ileal y la afectación ileocolónica cuando el patrón es inflamatorio ([247](#)). Aunque los estudios a este respecto son todavía escasos, se ha propuesto el punto de corte de 150 µg/g como indicativo de remisión endoscópica en la EC ileal, con una sensibilidad del 85% y una especificidad del 81% ([247](#)).

En relación con la EC con afectación ileal, los valores de CF también han mostrado correlación con el grado de actividad inflamatoria en la entero-RM (evaluada mediante el índice de MaRIA), así como con las curvas de captación de tipo inflamatorio en los estudios dinámicos de captación de contraste. Del mismo modo, los valores de CF se correlacionaron con el grado histológico de inflamación en las lesiones de la pieza quirúrgica tras la resección, lo que confirma la utilidad de la CF (en combinación con otros parámetros) también para distinguir en estos pacientes la presencia de actividad que pudiera

beneficiarse de una escalada terapéutica o una intensificación del tratamiento ([248](#)).

Por otro lado, la CF también ha demostrado ser un marcador fiable de respuesta al tratamiento y de curación mucosa en los pacientes con EC. Se ha visto que la monitorización de sus valores durante los primeros meses tras el inicio del tratamiento anti-TNF es útil para predecir la respuesta terapéutica al año ([249](#), [250](#)). Igualmente, en los pacientes que alcanzan la curación mucosa tras el tratamiento, puede objetivarse la normalización de los valores de CF, a diferencia de aquellos que no consiguen la cicatrización de las lesiones y en los que la CF permanece elevada ([240](#), [251](#), [252](#)).

Otro escenario en el que la CF ha demostrado utilidad es como predictor de recidiva, ya que el incremento progresivo de sus valores en pacientes en remisión se ha asociado con un aumento del riesgo de presentar recidiva clínica ([253](#), [254](#)). Un meta-análisis reciente que incluyó 6 estudios con un total de 672 pacientes con EII (354 con EC y 318 con CU), mostró una sensibilidad y especificidad globales de la CF para predecir la recidiva a 12 meses del 78% y 73% respectivamente, comparable tanto en EC como en CU ([253](#)). Estos datos confirman el valor de las determinaciones seriadas de CF durante el seguimiento clínico de los pacientes.

En los últimos años, ha habido un creciente interés por evaluar también el papel de este marcador en el contexto post-quirúrgico y su posible utilidad como marcador de recurrencia. En este sentido, aunque quedan por definir con claridad algunos aspectos, la evidencia disponible hasta el momento también sugiere la utilidad de la CF en este escenario. Los datos disponibles de los dos principales estudios prospectivos realizados hasta la fecha se resumen con detalle en el capítulo 2 (ver apartado 2.2 recurrencia post-quirúrgica: conceptos, patogenia y diagnóstico).

## 1.6 Tratamiento médico de la enfermedad

Los objetivos fundamentales del tratamiento médico en la EII son inducir y mantener el estado de remisión (libre de esteroides), para evitar las complicaciones derivadas de la enfermedad a largo plazo y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

El tratamiento médico en la EC va a depender de diversos factores, entre ellos la localización de la enfermedad, el grado de actividad inflamatoria, la presencia de complicaciones o manifestaciones extraintestinales, la edad, la respuesta y tolerancia previas a los tratamientos recibidos, así como del balance entre la eficacia terapéutica y los potenciales efectos adversos (Tabla 3) (255). Es por ello que la decisión del tratamiento más adecuado en cada momento debe de hacerse de manera individualizada y siempre consensuada con el paciente.

**Tabla 3.** Opciones de tratamiento médico en la EC.

Grupo	Fármacos	Indicaciones
<b>Aminosalicilatos</b>	Aminosalicilatos Sulfasalazina	-Inducción en EC leve, de afectación cólica. -Prevención de recurrencia en pacientes de bajo riesgo.
<b>Antibióticos</b>	Ciprofloxacino Metronidazol	-Tratamiento de complicaciones penetrantes o enfermedad perianal. -Metronidazol: prevención de recurrencia.
	Clásicos (prednisona y prednisolona)	-Inducción en EC moderada-grave.
	Budesonida	-Inducción en EC leve-moderada de íleon terminal y colon derecho.
	Tiopurinas (azatioprina, 6-mercaptopurina)	-Mantenimiento de EC crónicamente activa, corticodependiente o corticorrefractaria. -Co-tratamiento con biológicos. -EC fistulizante. -Prevención de recurrencia.

Metotrexate	- EC refractaria a inmunomoduladores tiopurínicos, o en pacientes intolerantes a los mismos.
Infliximab Adalimumab	-Inducción y mantenimiento de EC activa moderada-grave, corticodependiente o corticorrefractaria, con intolerancia o refractariedad al tratamiento con inmunomoduladores. -Complicaciones penetrantes o enfermedad perianal moderada-grave. -Prevención de recurrencia en pacientes de alto riesgo o con intolerancia a tiopurinas.
Certolizumab	-En España puede emplearse mediante el procedimiento de indicación fuera de ficha técnica como anti-TNF de tercera línea.
Ustekinumab Vedolizumab	- Inducción y, especialmente, mantenimiento de EC moderada-grave en pacientes refractarios o con pérdida de respuesta al tratamiento convencional o a los anti-TNF.

Dado que no existe hasta el momento un tratamiento curativo para la EC, el objetivo primordial de la terapia farmacológica es inducir y mantener en el tiempo el estado de remisión. Actualmente, se considera importante el control de la enfermedad más allá de los síntomas, al existir evidencia de que alcanzar la curación mucosa podría cambiar el curso de la EC, disminuyendo la frecuencia de recidivas y hospitalizaciones, así como la necesidad de cirugía (objetivo importante en esta enfermedad para la preservación intestinal). Es por ello que la curación mucosa se considera un objetivo terapéutico importante en el momento actual, con el que se pretende prevenir la aparición de complicaciones estenosantes y penetrantes a largo plazo y, por tanto, evitar la necesidad de resección quirúrgica. Sin embargo, a pesar de disponer de tratamientos farmacológicos eficaces en la cicatrización de las lesiones, ningún estudio que haya comparado estrategias de tratamiento ha podido demostrar por el momento tal impacto en cambiar la historia natural de la EC.

## 2. Capítulo 2. Enfermedad de Crohn y recurrencia post-quirúrgica.

### 2.1 Cirugía en la enfermedad de Crohn

A pesar de que la incorporación de los fármacos biológicos al arsenal terapéutico de la EI ha supuesto una mejoría en el pronóstico de los pacientes, la probabilidad acumulada de cirugía en la EC continúa siendo elevada. De hecho, en un estudio reciente se constata que, en la última década, a pesar del uso creciente y más precoz de inmunomoduladores y fármacos biológicos, las tasas de cirugía se han mantenido estables ([256](#)).

Aproximadamente el 50% de los pacientes con EC se someten a una resección intestinal en los primeros 10 años tras el diagnóstico y un 25% de éstos acabarán requiriendo de una segunda cirugía dentro de los 5 años siguientes ([257](#)). La probabilidad de requerir cirugía es significativamente mayor en la EC de localización ileocecal (hasta un 90%) ([258-260](#)). El hábito tabáquico, el patrón estenosante o penetrante, la necesidad de corticoides al diagnóstico, la afectación yeyunal y la edad de debut temprana también se han descrito como factores de riesgo independientes para requerir cirugía en la EC ([202](#), [206](#), [261](#), [262](#)).

Existen tres preceptos básicos a tener en cuenta en relación a la cirugía en la EC: establecer el momento idóneo para la intervención, lograr las mejores condiciones pre-operatorias y optimizar los resultados post-operatorios ([263](#)). A pesar de que el momento idóneo para el abordaje quirúrgico sigue siendo un tema a debate ([264](#)), en el último consenso de la *European's Crohn's and Colitis Organisation* (ECCO) recientemente publicado, se recomienda valorar la indicación de manera individualizada, en función de factores como la gravedad de los síntomas, el grado de actividad inflamatoria, la localización y extensión de la enfermedad o la presencia de complicaciones ([265](#)). En una proporción no desdeñable de casos, sentar la indicación de cirugía puede ser complicado, y el manejo más adecuado en cada caso deber ser valorado por el equipo multidisciplinar y consensuado con el paciente.

No obstante, la cirugía debe considerarse como una opción más de tratamiento, siendo sus indicaciones principales el fracaso del tratamiento médico convencional y el manejo de las complicaciones derivadas de la EC (Tabla 4).

**Tabla 4.** Indicaciones generales de cirugía en la EC.

<b>Indicaciones quirúrgicas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Fracaso del tratamiento médico o intratabilidad:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Intolerancia o complicaciones del tratamiento médico</li> <li>- Corticodependencia / Corticorrefractariedad</li> <li>- Compromiso de la calidad de vida del paciente</li> <li>- Retraso del crecimiento en niños</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Complicaciones específicas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Obstrucción</li> <li>- Abscesos intraabdominales</li> <li>- Fístulas (entero-entéricas o entero-orgánicas)</li> <li>- Hemorragia masiva</li> <li>- Perforación intestinal</li> <li>- Uropatía obstructiva</li> <li>- Megacolon tóxico</li> <li>- Enfermedad perianal</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Displasia o cáncer:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fundamentalmente en EC con afectación de colon de larga evolución</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Manifestaciones extraintestinales:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Únicamente en aquellas dependientes del curso de la EC</li> </ul> </li> </ul>

En algunos estudios que han evaluado el impacto del momento de la cirugía en la evolución de la EC, se ha demostrado que cuanto más precoz es la cirugía, menor morbi-mortalidad y mayor tiempo en remisión ([264](#), [266](#)). Por tanto,

cuando existe indicación quirúrgica es probable que demorar la intervención pueda derivar en un mayor número de complicaciones. La visión conjunta de la situación clínica del paciente y el resto de los factores descritos nos permitirá adoptar la estrategia más adecuada en cada momento y decidir el momento óptimo para la cirugía.

## **2.2 Recurrencia post-quirúrgica: conceptos, patogenia y diagnóstico**

### **Conceptos**

A pesar del papel importante que tiene la cirugía en la EC, ésta no supone un tratamiento curativo. La reaparición de nuevas lesiones propias de la enfermedad tras una resección quirúrgica considerada “curativa”, es decir, con márgenes macroscópicamente libres de enfermedad, es lo que se conoce como **recurrencia post-quirúrgica**. La recurrencia post-quirúrgica es un fenómeno habitual en el seguimiento a largo plazo, siendo la vertiente ileal de la anastomosis (neo-íleon terminal), la zona donde aparecen las nuevas lesiones ([267](#)).

El concepto de recurrencia en la EC puede definirse atendiendo a diferentes criterios. La **recurrencia histológica** (lesión estructural) se estima que puede aparecer tan precozmente como desde la primera semana post-cirugía. La reanudación del tránsito intestinal tras la resección se ha visto que induce, a los pocos días, cambios histológicos en el neo-íleon, con infiltración de monocitos, eosinófilos y linfocitos polimorfonucleares en la lámina propia, así como cambios ultraestructurales con incremento de expresión de moléculas de adhesión, transformación epitelioide y reclutamiento linfocitario transendotelial ([268](#)).

Posteriormente, la aparición de nuevas lesiones macroscópicas en el neo-íleon, detectables mediante radiología o endoscopia, hace referencia a la **recurrencia morfológica**. Dentro de ésta, la aparición de lesiones mucosas detectadas mediante ileocolonoscopia define la recurrencia endoscópica ([230](#)). La presencia de inflamación en el neo-íleon evidenciada mediante técnicas de imagen como la ecografía, la enterografía por tomografía computarizada

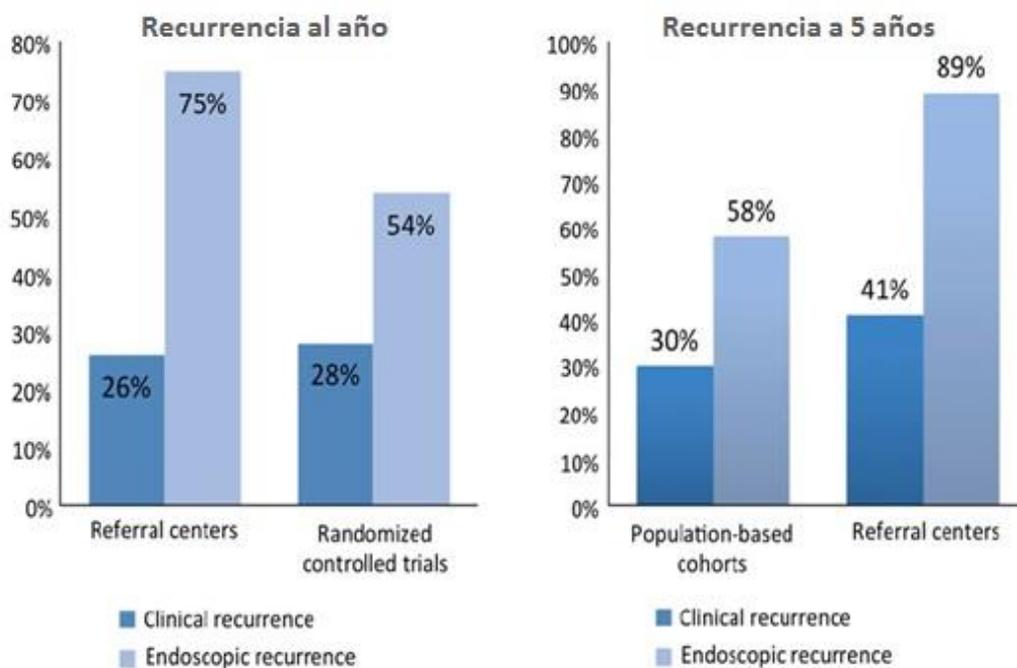
(entero-TC) o la enterografía por resonancia magnética (entero-RM), define la recurrencia radiológica ([269-271](#)).

La reaparición de síntomas atribuibles a la presencia de estas lesiones es lo que define la **recurrencia clínica**. Se debe tener en cuenta que estos pacientes frecuentemente pueden presentar síntomas tras la resección intestinal que no sean debidos a recurrencia de la enfermedad (como dolor abdominal por síndrome adherencial, dismotilidad, diarrea post-quirúrgica o diarrea debida a malabsorción de sales biliares o sobrecrecimiento bacteriano), lo que justifica la necesidad de descartar, en los pacientes sintomáticos, la presencia de lesiones atribuibles a una verdadera recurrencia ([272](#)).

La **recurrencia quirúrgica** constituye la consecuencia final de la recurrencia, ya que se define como la necesidad de una nueva resección intestinal y es por ende la de mayor impacto sobre la función intestinal y la calidad de vida del paciente ([273](#)).

Las tasas de recurrencia post-quirúrgica varían entre los diferentes estudios y en función del criterio empleado para su definición. Se ha estimado que, en ausencia de tratamiento, al año de una resección intestinal el 60-80% de los pacientes presenta recurrencia endoscópica, y hasta un 25-30% ha presentado recurrencia clínica, tasas que pueden ascender hasta el 90% y el 40%, respectivamente, a los 5 años (Figura 4) ([230](#), [274](#), [275](#)).

**Figura 4.** Tasas de recurrencia clínica y endoscópica al año y a los 5 años tras la resección intestinal (modificado de Buisson A, et al. (274)).



## Patogenia

La recurrencia post-quirúrgica constituye una condición patogénica *de novo* (276, 277) que nos permite estudiar los mecanismos que conducen al desarrollo de la enfermedad, particularmente en etapas precoces tras la intervención (268). Así, los pacientes con EC intervenidos representan el mejor modelo natural “in vivo” de la evolución de la enfermedad desde el inicio y el seguimiento de estos pacientes tras la resección intestinal nos ofrece el mejor escenario para estudiar los cambios que se producen a nivel sistémico e inmunológico, con impacto directo sobre la patogenia, así como las posibles interacciones con factores genéticos o ambientales, la mayoría de ellos sólo parcialmente conocidos.

Desde un punto de vista inmunológico, como se ha comentado en el capítulo anterior, la mucosa inflamada de los pacientes con EC presenta un patrón típico de respuesta Th1/Th17, con abundancia de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Estudios recientes muestran que la inflamación en etapas tempranas está dirigida por citoquinas de la vía Th1, mientras que en áreas con lesiones ya establecidas o en la EC de mayor tiempo de evolución la respuesta inmune suele comprender

una combinación de componentes de las vías Th1/Th17 ([162](#), [167](#)). También se ha descrito un patrón de citoquinas distinto en el neo-íleon macroscópicamente sano, con elevadas concentraciones de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12, y en el neo-íleon tras la aparición de recurrencia endoscópica, con un marcado incremento en IL-17A, así como la inducción de IL-6 e IL-23, dos citoquinas implicadas en el control de las respuestas celulares Th17 ([278](#)). La IL-6 es una citoquina pro-inflamatoria conocida en la cascada inflamatoria de la EII y que podría ser relevante en la recurrencia precoz ([279](#)). También se ha demostrado que la IL-10, importante citoquina anti-inflamatoria, se encuentra disminuida en el tejido ileal en el momento de la resección intestinal, siendo la persistencia de concentraciones bajas de esta citoquina en tejido un buen predictor de recurrencia en los 3 primeros meses tras la cirugía ([280](#)).

Todavía se desconoce por qué la EC recurre en el íleon inmediatamente proximal a la anastomosis quirúrgica. Un hallazgo relevante en la recurrencia post-quirúrgica precoz es la plexitis mientérica, como se describe más adelante al analizar los factores de riesgo de recurrencia. Esta alteración histológica se ha encontrado incluso en zonas macroscópicamente sanas del intestino, siendo más frecuente en el borde proximal de una resección ileocecal, hecho que podría explicar por qué la inflamación empieza en el neo-íleon ([281](#), [282](#)). Se ha especulado que este hallazgo podría representar la respuesta neuronal frente a un estímulo antigénico luminal o frente a la alteración de la integridad neuronal ([281](#)).

Otro fenómeno histológico que se ha relacionado con la recurrencia post-quirúrgica de la EC es la disminución de vasos linfáticos en el borde proximal de la pieza de resección, incluso en ausencia de inflamación, lo que hace de este fenómeno un evento precoz ([283](#)). Se ha demostrado que el tráfico de la linfa desde los lugares de inicio de la inflamación y los ganglios linfáticos de drenaje es fundamental para limitar la progresión de la inflamación ([284](#)). Es posible, por tanto, que los vasos linfáticos sean importantes para la curación mucosa y el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal.

El tabaco, factor de riesgo bien establecido para la EC, y en particular en la patogenia de la recurrencia post-quirúrgica, parece ejercer su influencia actuando directamente sobre la inmunidad celular y humoral, pero también produciendo isquemia de la pared intestinal por microtrombosis (por sus componentes oxidantes) y alterando la capa superficial de moco del epitelio ([285](#)).

El rol de los factores microbianos en el contexto de la recurrencia también es un tema a estudio. Actualmente sabemos que la disbiosis característica de los pacientes con EC existe incluso en ausencia de inflamación y también se ha implicado en el desarrollo de la recurrencia post-quirúrgica. Tras la resección, la mucosa ileal permanece indemne hasta el nuevo contacto con el contenido fecal ([286](#)). Casi inmediatamente después de restablecerse el tránsito, se han observado una serie de cambios histológicos en la mucosa del neo-íleon (como se ha descrito anteriormente en el concepto de recurrencia histológica) que preceden al desarrollo de las lesiones macroscópicas y que se han asociado con el contenido bacteriano, ya que se ha demostrado que la infusión de contenido ileal ultrafiltrado (exento de bacterias) no ocasiona lesión histológica ([287](#)). De hecho, las tasas de recurrencia son menores cuando no se realiza una anastomosis ileocecal ([288](#)) o cuando se administran antibióticos nitroimidazólicos inmediatamente después de la resección quirúrgica ([289](#)).

Después de una resección intestinal, la ausencia de válvula ileocecal, así como la estasis y el sobrecrecimiento bacteriano secundarios, producen cambios ecológicos debido al reflujo del contenido cólico ([277](#)). Estas bacterias neocolonizadoras podrían ser reconocidas como “extrañas” y desencadenar una respuesta inmune local, responsable de los cambios histológicos que posteriormente conducirían a la recurrencia de la EC ([276](#)).

En un estudio muy reciente se ha caracterizado que la diversidad de poblaciones bacterianas asociada a la mucosa intestinal (característicamente menor en los pacientes con EC) aumenta tras la cirugía resectiva, pero continúa siendo diferente a la de los sujetos sanos ([290](#)). Además, se observó una composición cualitativamente distinta en los pacientes que desarrollaban

recurrencia endoscópica precoz, a los 6 meses tras la cirugía. Estos pacientes presentaban una microbiota proclive a la fermentación proteolítica y a la producción de ácido láctico, incluyendo *Enterococcus* y *Veillonella spp.*, mientras que aquellos que se mantenían en remisión a los 6 meses presentaban predominantemente *Bacteroides*, *Prevotella* y *Parabacteroides spp.*, así como *Firmicutes* sacarolíticos y productores de butirato. Así, los autores plantean que la composición de la microbiota en el momento de la cirugía puede aportar información pronóstica, permitiendo identificar a los pacientes con mayor riesgo de recurrencia.

A partir de estos datos se puede deducir que los pacientes con EC presentan un tipo de microbiota que favorece la fermentación a partir de proteínas, así como la producción de ácido láctico. Estas especies proteolíticas se han asociado a la acumulación de productos finales del metabolismo que son tóxicos para los colonocitos (291). En cambio, los pacientes que se mantienen en remisión tras una resección presentan una microbiota que fermenta fundamentalmente hidratos de carbono produciendo butirato, que es el sustrato energético preferido de los colonocitos (292) y que, de hecho, se ha implicado en la prevención de la colitis y ha demostrado que ayuda a mantener la integridad de la barrera epitelial (293).

También se ha caracterizado que existe una mayor disminución de *Faecalibacterium prausnitzii* en el tejido inflamado de los pacientes fumadores, en comparación con los no fumadores (294). En la misma línea, los pacientes con características de mayor riesgo de recurrencia (fumadores, patrón penetrante, más de una resección intestinal) tienen menor cantidad de *Bifidobacterias* tanto en el tejido inflamado como en el no inflamado, y tanto en el momento de la cirugía como en el seguimiento posterior, comparados con los pacientes considerados de bajo riesgo de recurrencia. Parece, por tanto, que los factores de riesgo de recurrencia podrían estar estrechamente relacionados con la disbiosis (295). Los pacientes que no desarrollan recurrencia presentan una microbiota diversa, estable y más parecida a la de los controles sanos que los pacientes que desarrollan recurrencia precoz (175, 290).

## Diagnóstico

El diagnóstico de la recurrencia puede basarse en síntomas clínicos, marcadores séricos y fecales o en los hallazgos radiológicos y endoscópicos. Los síntomas clínicos, como se ha comentado previamente, no siempre son sinónimo inequívoco de recurrencia y en ocasiones son difíciles de distinguir de otras condiciones post-operatorias, por lo que los índices clínicos como el CDAI presentan una sensibilidad muy baja a la hora de discriminar a los pacientes con recurrencia.

La ileocolonoscopia continúa siendo el patrón oro para el diagnóstico, ya que permite establecer la presencia y gravedad de la recurrencia morfológica, así como predecir el curso clínico de la enfermedad. Se recomienda su realización dentro del primer año tras la cirugía, momento en que resulta fundamental para la toma de decisiones terapéuticas ([265](#)).

Los estudios clásicos de Rutgeerts y colaboradores en los años 90 permitieron conocer más detalladamente la historia natural de la recurrencia. Así, ahora sabemos que la aparición de lesiones mucosas en la vertiente neo-ileal de la anastomosis precede al desarrollo de las manifestaciones clínicas, y que, a mayor gravedad de las lesiones detectadas en la endoscopia, mayor probabilidad de que el paciente desarrolle síntomas. El **índice de Rutgeerts** permite establecer el grado de recurrencia morfológica en función de la gravedad de las lesiones detectadas en la endoscopia, estratificando a los pacientes en 5 grupos (i0: sin lesiones; i1: <5 lesiones aftosas; i2: >5 aftas con mucosa normal entre lesiones, áreas salteadas de lesiones más grandes o úlceras confinadas a <1 cm de la anastomosis; i3: ileítis aftosa difusa sobre mucosa inflamada; i4: inflamación difusa con úlceras grandes, nódulos y/o estenosis) (Tabla 5). Como se ha comentado previamente, este índice se correlaciona a su vez con la evolución clínica a largo plazo (a mayor gravedad de las lesiones, mayor riesgo de recurrencia clínica). Así, la recurrencia clínica a los 5 años en pacientes sin lesiones endoscópicas o con lesiones leves (i0-i1) es menor del 10%; en pacientes con un score de Rutgeerts i2 del 20-25% y en

aquellos con lesiones graves (i3-i4) es del 50-100%, con gran frecuencia de reintervención quirúrgica ([230](#)).

Desde un punto de vista práctico, los índices de Rutgeerts i3 e i4 son fácilmente clasificables en la endoscopia y su valor predictivo de recurrencia clínica es muy elevado. Sin embargo, el índice de Rutgeerts i2 (punto de corte considerado en los ensayos clínicos para definir la presencia de recurrencia post-quirúrgica) abarca diferentes tipos de lesiones en su definición. Dentro de este *score* se incluyen las úlceras confinadas a la anastomosis quirúrgica, cuyo significado de verdadera recurrencia morfológica ha sido cuestionado por algunos autores, dado que estas lesiones pueden estar más relación con fenómenos locales de isquemia que con una auténtica reaparición de la enfermedad. Este tipo de úlceras anastomóticas relacionadas con un origen isquémico han sido descritas en la literatura en otro tipo de intervenciones quirúrgicas, como las de enterocolitis necrotizante en niños, intervenciones de obesidad mórbida o intervenciones gástricas (Billroth) ([296](#)).

En este sentido, Domènech *et al.* ([297](#)), en un estudio prospectivo en el que se evaluaba el impacto a largo plazo del tratamiento con azatioprina sobre la recurrencia clínica y endoscópica, observaron que los pacientes que presentaban úlceras limitadas a la anastomosis en el control endoscópico presentaban una menor probabilidad de progresión de las lesiones mucosas y de desarrollar recurrencia clínica en el corto plazo. Por ello, los autores propusieron una modificación del índice de Rutgeerts, subdividiendo el *score* i2 en: i2a (úlceras confinadas a <1cm de la anastomosis) e i2b (>5 aftas con mucosa normal entre lesiones o áreas salteadas de lesiones más grandes) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Índice endoscópico de Rutgeerts y modificación propuesta por Domènech et al. (297) para el score i2. Imágenes del servicio de M.Digestiva (cedidas con permiso del paciente).

Grado	Índice de Rutgeerts	Índice de Rutgeerts modificado (Domènech et al.)	
i0	No lesiones	No lesiones	 i0
i1	<5 lesiones aftosas	<5 lesiones aftosas	 i1
i2	>5 aftas con mucosa normal entre lesiones, áreas salteadas de lesiones más grandes o úlceras confinadas a la anastomosis (<1 cm)	i2a Lesiones (úlceras) en la anastomosis (<1 cm)	 i2a
		i2b >5 aftas con mucosa normal entre lesiones o áreas salteadas de lesiones más grandes	 i2b
i3	Ileítis aftosa difusa sobre mucosa inflamada	Ileítis aftosa difusa sobre mucosa inflamada	 i3
i4	Inflamación difusa con úlceras grandes, nódulos y/o estenosis	Inflamación difusa con úlceras grandes, nódulos y/o estenosis	 i4

Por otro lado, aunque la endoscopia sigue siendo el patrón oro, las técnicas de imagen también pueden ser de gran utilidad en este contexto y complementarias a la endoscopia.

En la valoración de la recurrencia morfológica, la entero-RM ha demostrado correlacionarse con el grado de recurrencia endoscópica, ya que, comparada con la ileoscopia, presenta una buena correlación con el índice de Rutgeerts. Para la valoración morfológica de la recurrencia basada en entero-RM se emplea un protocolo distinto de adquisición de imágenes y se ha desarrollado y validado un índice radiológico específico, el **índice de Sailer**, que establece

cuatro categorías (MR0-MR4) en función de los hallazgos en la entero-RM (Tabla 6) ([270](#), [298](#)). Este índice, aunque es relativamente poco sensible para estadíos “precoces” (Rutgeerts i1-i2), ha mostrado una fuerte correlación con los grados i3 e i4 del índice endoscópico de Rutgeerts. Por ello, la entero-RM constituye una alternativa muy útil, al igual que la cápsula endoscópica, en la valoración morfológica de la recurrencia cuando no sea posible acceder y/o evaluar correctamente el neo-íleon por endoscopia (por ejemplo, por el tipo de anastomosis o por la presencia de estenosis post-quirúrgicas).

**Tabla 6.** Índice radiológico de Sailer *et al.* y su correlación con los diferentes grados del índice endoscópico de Rutgeerts.

Índice de Sailer	Hallazgos en la entero-RM	Índice de Rutgeerts
<b>MR0</b>	No lesiones	<b>i0</b>
<b>MR1</b>	Irregularidades mucosas menores: leve engrosamiento de la pared y ligero realce del contraste mural, sin estenosis	<b>i1</b> <b>i2</b>
<b>MR2</b>	Anormalidades mucosas mayores: engrosamiento significativo de la pared intestinal, hipercaptación de contraste, estenosis de bajo grado sin dilatación pre-estenótica	<b>i3</b>
<b>MR3</b>	Mismos hallazgos que MR3 más: edema transmural con incremento de la señal T2w y realce de la grasa perientérica, estenosis de alto grado con dilatación pre-estenótica, complicaciones extramurales (fístula, absceso, plastrón de asas intestinales)	<b>i4</b>

Respecto al papel de los marcadores fecales en este contexto, existe un interés creciente en los últimos años en la utilidad de la CF para monitorizar a los pacientes tras la cirugía. Existen pocos estudios hasta la fecha que hayan evaluado adecuadamente el papel de la CF en el contexto de la recurrencia post-quirúrgica, la mayoría de los cuales incluye un número limitado de pacientes y con diferencias metodológicas que podrían explicar los resultados inconsistentes entre estudios ([299-303](#)). Sin embargo, los datos disponibles procedentes de los dos principales estudios prospectivos y bien diseñados

hasta la fecha, incluyendo un número suficiente de pacientes, apoyan su utilidad en este escenario.

Recientemente, los resultados del estudio POCER, ensayo clínico prospectivo, randomizado y que incluye el mayor número de pacientes hasta la fecha (n=135), mostraron la correlación de los valores de CF con la presencia y gravedad de la recurrencia endoscópica, definida por el índice de Rutgeerts, y su superioridad a la PCR o al CDAI en este contexto (304). El otro estudio prospectivo más amplio disponible (n=86), publicado recientemente, confirma también estos resultados (305).

La CF permanece elevada en algunos pacientes tras la cirugía y, posteriormente, dada la correlación de sus niveles con la gravedad de la recurrencia endoscópica mostrada en estos estudios, puede ser una herramienta útil para la monitorización de los pacientes intervenidos y el diagnóstico de recurrencia. No queda claro el momento post-quirúrgico a partir del cual es de utilidad empezar a monitorizar sus niveles (se ha sugerido que probablemente a partir del tercer mes tras la resección (300)), ni los puntos de corte a emplear en la práctica clínica para definir la presencia de recurrencia morfológica. Por tanto, aunque la evidencia disponible apoya su uso en este escenario, son necesarios más estudios prospectivos en esta línea, metodológicamente bien diseñados y que incluyan un amplio número de pacientes, para caracterizar estos aspectos con mayor precisión.

Respecto al punto de corte óptimo en este escenario, en los estudios disponibles hasta el momento hay variabilidad, habiéndose propuesto diferentes puntos de corte para la predicción de la recurrencia endoscópica (Rutgeerts  $\geq 2$ ), la mayoría de los cuales se sitúan entre 100-200 ug/g (301-304, 306). En el estudio POCER, los valores de CF >100 ug/ug fueron indicativos de recurrencia endoscópica con una suficiente sensibilidad (89%) y un valor predictivo negativo elevado (91%) que hubiera permitido evitar potencialmente la colonoscopia en más del 40% de los pacientes (304). Ratificando estos resultados, el estudio de Boschetti *et al.* (305) reporta una sensibilidad del 95% y un valor predictivo negativo del 93% para el mismo

punto de corte, que hubiera permitido evitar en su cohorte de pacientes hasta un 30% de colonoscopias.

Quedan por definir con claridad algunos aspectos importantes de cara a su aplicación en la práctica clínica: el momento más adecuado tras la cirugía para iniciar la monitorización de los valores de CF (dado que la inflamación inherente a la cicatrización de la anastomosis quirúrgica puede elevar la CF en estos pacientes), si aporta suficiente sensibilidad en la detección de lesiones tempranas para cribar la realización de endoscopia en base a sus valores, o los puntos de corte óptimos en estos pacientes para identificar con fiabilidad la actividad inflamatoria *de novo*.

### **2.3 Factores de riesgo de recurrencia post-quirúrgica**

Numerosos estudios han tratado de identificar factores predictivos de un mayor riesgo de recurrencia post-quirúrgica que permitan estratificar a estos pacientes. Se han estudiado múltiples factores de riesgo clínicos y epidemiológicos (sexo, edad al diagnóstico, tiempo de evolución de la EC hasta la cirugía, patrón de la EC, presencia de EPA, historia familiar de EC), factores relacionados con la cirugía (tipo de anastomosis, medida del segmento intestinal resecado, complicaciones post-operatorias), características histológicas (presencia de granulomas, plexitis mientérica, afectación de los márgenes de resección), marcadores serológicos (PCR, anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae*, niveles de IL-10), polimorfismos genéticos (NOD2-CARD15) e incluso la microbiota intestinal (presencia de *Firmicutes*) ([274](#), [276](#), [307](#)).

Los resultados entre los diferentes estudios son muy heterogéneos y a menudo contradictorios, probablemente en relación con las diferentes definiciones empleadas de recurrencia post-quirúrgica (lo cual introduce sesgos) y con la naturaleza retrospectiva de la mayoría de ellos. Otro factor a tener en cuenta es el tiempo de seguimiento, ya que para que un paciente con patrón estenosante presente recurrencia clínica es necesario un seguimiento más largo, por lo que en la mayoría de estudios no se ha identificado el patrón estenosante como

factor de riesgo y sí en cambio el patrón penetrante, siendo este resultado probablemente un sesgo de seguimiento.

Con todo, entre los factores clínicos que se han considerado predictivos de un mayor riesgo de recurrencia post-quirúrgica precoz se encuentran el tabaquismo activo, antecedentes de cirugía intestinal previa ([308](#), [309](#)), la ausencia de tratamiento profiláctico, el patrón penetrante ([198](#), [310](#)), la presencia de enfermedad perianal ([261](#), [311](#), [312](#)) y el antecedente de una resección previa extensa de intestino delgado (>50 cm) ([260](#)).

Por otro lado, aunque son necesarios más estudios que clarifiquen el valor real de la histología en la predicción de la recurrencia, un meta-análisis encontró tasas significativamente mayores de recurrencia y de necesidad de reintervención en los pacientes que presentan granulomas en la pieza quirúrgica ([313](#)). Tres estudios han identificado la plexitis mientérica como un factor predictivo independiente ([282](#), [309](#), [314](#)).

Los datos disponibles no son definitivos respecto a otros factores, como la edad al diagnóstico ([315](#), [316](#)), el tiempo de evolución de la enfermedad ([317](#), [318](#)), los márgenes de resección ([319-321](#)) o el tipo de cirugía ([322](#), [323](#)).

El factor de riesgo más establecido en la mayoría de estudios y confirmado en los ensayos clínicos controlados es el tabaquismo activo, que además es un factor de riesgo modificable, presentando los pacientes fumadores un riesgo 2 veces superior de recurrencia clínica y 2.5 veces superior de recurrencia quirúrgica en los 10 primeros años en comparación con los pacientes no fumadores ([324](#), [325](#)).

En la tabla 7 se recogen los principales factores de riesgo de recurrencia post-quirúrgica (con mayor evidencia en los estudios disponibles).

**Tabla 7.** Factores de riesgo de recurrencia post-quirúrgica con mayor evidencia en los estudios.

<b>Factor de riesgo</b>	<b>OR</b>	<b>Grado de evidencia</b>
Tabaquismo activo	2 (1.3 - 3.4)	B
Patrón fistulizante	1.5 (1.2 – 1.9)	B
>1 resección previa o resección previa extensa (>50 cm)	1.8 (1.1 – 2.9)	B
Plexitis mientérica	1.9 (1 – 3.5)	C

## 2.4 Tratamiento de prevención de la recurrencia post-quirúrgica

Diversos estudios han evaluado la eficacia de diferentes fármacos en la prevención de la recurrencia. Entre ellos la mesalazina, los inmunomoduladores tiopurínicos (azatioprina y mercaptopurina), los anti-TNF (infliximab y adalimumab), la budesonida, los antibióticos imidazólicos como el metronidazol, y los probióticos.

Los resultados procedentes de los estudios con aminosalicilatos no han mostrado un beneficio clínicamente relevante en la prevención de la recurrencia. Un meta-análisis, publicado en 2009, incluyendo los cinco ensayos clínicos controlados hasta ese momento que evaluaban la administración de mesalazina, concluye que ésta es eficaz frente a placebo en la prevención de la recurrencia clínica, aunque el número necesario de pacientes a tratar para conseguir un éxito (NNT) es elevado (de 12) ([326](#)). El riesgo relativo de recurrencia endoscópica grave (score de Rutgeerts  $\geq$  i3) fue significativamente menor con mesalazina, con un NNT de 8, aunque el riesgo relativo global de recurrencia endoscópica no se redujo de manera significativa. En el último consenso de la *European's Crohn's and Colitis Organisation* (ECCO), se contempla esta opción para la prevención de recurrencia en pacientes de bajo riesgo con una resección ileal aislada, recomendándose en este caso el empleo de dosis altas de mesalazina ([265](#)).

Por otro lado, dos ensayos clínicos controlados frente a placebo han demostrado la eficacia de dos antibióticos nitroimidazólicos, metronidazol y ornidazol, en la prevención de la recurrencia (nivel de evidencia 1b, lo que sugiere un grado de recomendación A, a favor de la intervención terapéutica) administrados durante 3 y 12 meses post-cirugía, respectivamente. Aunque el efecto beneficioso no persiste tras la interrupción del tratamiento y el uso de estos fármacos está limitado por los posibles efectos adversos cuando se administran durante períodos prolongados.

La budesonida, a dosis de 3 mg/día y 6 mg/día, no ha ofrecido beneficio significativo frente a placebo excepto, quizás, en el subgrupo de pacientes que se intervienen en situación de enfermedad activa. Un reciente meta-análisis que analiza conjuntamente los estudios que han valorado la budesonida tampoco ha demostrado diferencias frente a placebo en la prevención de la recurrencia ([327](#)). Los probióticos tampoco han mostrado, de momento, en la formulación analizada (lactobacilos) y a las dosis empleadas, ser eficaces.

Los fármacos tiopurínicos, azatioprina y mercaptopurina, han mostrado ser más eficaces que el placebo o los aminosalicilatos en la prevención de la recurrencia, pero con una eficacia limitada fundamentalmente para prevenir la recurrencia endoscópica grave (índice de Rutgeerts i3-i4) ([328](#)). En este sentido, los fármacos anti-TNF han mostrado superioridad a las tiopurinas en diferentes estudios realizados en los últimos años. El primer anti-TNF evaluado, infliximab, ha mostrado en tres ensayos clínicos aleatorizados y controlados con placebo su eficacia para prevenir la recurrencia endoscópica ( $i \geq 2$ ), con tasas elevadas de remisión endoscópica al año de la cirugía (entre el 80-90%), aunque no fue superior a placebo respecto a las tasas de recurrencia clínica.

Los datos iniciales con adalimumab, procedentes de estudios observacionales, mostraron también buenos resultados respecto a la prevención de la recurrencia endoscópica al año, superponibles a los de infliximab. Más recientemente, tres ensayos clínicos han evaluado su eficacia en comparación con azatioprina y/o mesalazina, aunque con resultados dispares. En el primero se comparó la eficacia de tres pautas de tratamiento: adalimumab, azatioprina

y aminosalicilatos (n=51), siendo el porcentaje de recurrencia endoscópica a los dos años de la cirugía significativamente superior en los grupos de tratamiento con azatioprina y aminosalicilatos (6.3%, 64.7% y 83.3% respectivamente) ([329](#)). En el segundo ensayo, sub-análisis del estudio POCER, se incluyeron pacientes con factores de riesgo asociados a recurrencia precoz. Se comparó la eficacia entre adalimumab y azatioprina a los 6 meses de la cirugía (n=101), y adalimumab resultó ser superior a azatioprina para la prevención de la recurrencia endoscópica precoz (21% en el grupo adalimumab vs 45% en el grupo azatioprina) ([330](#)). En cambio, los resultados del estudio APPRECIA, ensayo clínico aleatorizado fase III, multicéntrico y ciego evaluador, que comparaba la eficacia entre adalimumab y azatioprina (ambas ramas con 3 meses de metronidazol) en la prevención de la recurrencia (n=84), no mostró que adalimumab fuera superior a azatioprina en prevenir la recurrencia morfológica al año en pacientes no seleccionados por riesgo (42.2% vs. 59%) ([331](#)). Por otro lado, el tratamiento con azatioprina se asoció a una importante tasa de retirada debido a efectos adversos, significativamente mayor que con adalimumab.

Por tanto, aunque el tratamiento de prevención de la recurrencia no está universalmente establecido y el tipo de fármaco más adecuado para cada paciente aún sigue siendo controvertido, es probable que los pacientes de alto riesgo, especialmente si han presentado previamente toxicidad a tiopurinas, sean los mejores candidatos a tratamiento con anti-TNF. La duración del mismo es una incógnita y podría valorarse en función de los resultados de las pruebas morfológicas de control que se realicen durante el seguimiento.

Actualmente, la estrategia más recomendada para prevenir o retrasar la aparición de la recurrencia comprende una estratificación del riesgo, la instauración de un tratamiento preventivo en función de dicho riesgo y la monitorización endoscópica a fin de modificar la actitud terapéutica según los hallazgos ([307](#), [332](#), [333](#)). Son estrategias que se encuadran en el concepto de tratamiento por objetivos terapéuticos (“treat-to-target”). Una de las limitaciones de estas estrategias es que no se ha comprobado su teórico beneficio de modificar el curso natural de la enfermedad ([334](#)). Sin embargo, en el caso de

la prevención de la recurrencia post-quirúrgica en la EC, la evidencia disponible hasta el momento, procedente de dos ensayos clínicos ([324](#), [335](#)) y un estudio retrospectivo ([336](#)), apoya estas estrategias.

El primero de los ensayos, el estudio POCER ([324](#)), fue diseñado para valorar la recurrencia endoscópica (índice de Rutgeerts  $\geq 2$ ) a los 18 meses tras la intervención. Se incluyeron 174 pacientes que se estratificaron en bajo o alto riesgo de recurrencia, estableciendo un tratamiento basal según el riesgo, y se aleatorizaron en un brazo de tratamiento activo (colonoscopia a los 6 meses, según la cual se intensificaba el tratamiento basal) y un brazo de tratamiento estándar (no se realizaba colonoscopia hasta el final del estudio). Los pacientes con recurrencia clínica se retiraban del estudio. Los pacientes en tratamiento activo presentaron una menor tasa de recurrencia endoscópica que en el tratamiento estándar (49% vs. 67%,  $p=0.03$ ). Sin embargo, el porcentaje de pacientes retirados por recurrencia sintomática fue similar en ambos grupos (tratamiento activo 11% vs. 17% en tratamiento estándar) y el porcentaje con recurrencia clínica (definido por CDAI  $>200$ ) no alcanzó diferencias estadísticamente significativas (27% en tratamiento activo vs. 40% en tratamiento estándar,  $p=0.08$ ).

En el segundo ensayo clínico ([335](#)) se comparó, en pacientes con factores de riesgo de recurrencia, la eficacia del tratamiento sistemático con azatioprina (administrado a todos los pacientes) frente al tratamiento dirigido por los hallazgos endoscópicos a las 26 y 52 semanas, valorándose la remisión endoscópica (i0-i1) en la semana 102. El estudio tuvo que ser suspendido prematuramente debido a la baja tasa de reclutamiento (63 pacientes aleatorizados frente a un tamaño muestral calculado de 100 por brazo). En el brazo de tratamiento dirigido por endoscopia, 14 pacientes de 31 (45,1%) iniciaron azatioprina. La tasa de remisión endoscópica fue similar en los dos brazos (50% en el tratamiento sistemático vs. 42% en el tratamiento dirigido por endoscopia,  $p=0,52$ ). Tampoco se apreciaron diferencias en la tasa de remisión clínica definida por un CDAI  $<150$  (62% con tratamiento sistemático vs. 55% en tratamiento dirigido,  $p=0,54$ ). Entre los 46 pacientes que recibieron azatioprina

(32 en el brazo de tratamiento sistemático y 14 en el tratamiento dirigido), 6 (13%) presentaron efectos adversos.

En un estudio retrospectivo (336) se incluyeron 132 pacientes estratificados según el riesgo de recurrencia y se valoró la recurrencia clínica en dos grupos: los que se les había realizado colonoscopia de control a los 6-12 meses con ajuste de tratamiento según un protocolo preestablecido, frente a los que no se les había realizado colonoscopia de control. Un 25% de los pacientes con manejo guiado por endoscopia presentaron recurrencia clínica, frente al 54% de los pacientes a los que no se realizó colonoscopia de control. Los pacientes controlados endoscópicamente presentaron un mayor tiempo hasta la recurrencia clínica (31 vs. 25 meses) y una menor probabilidad de recurrencia a los 3 y 5 años (21% vs. 31% y 26% vs. 52%, respectivamente,  $p=0,001$ ).

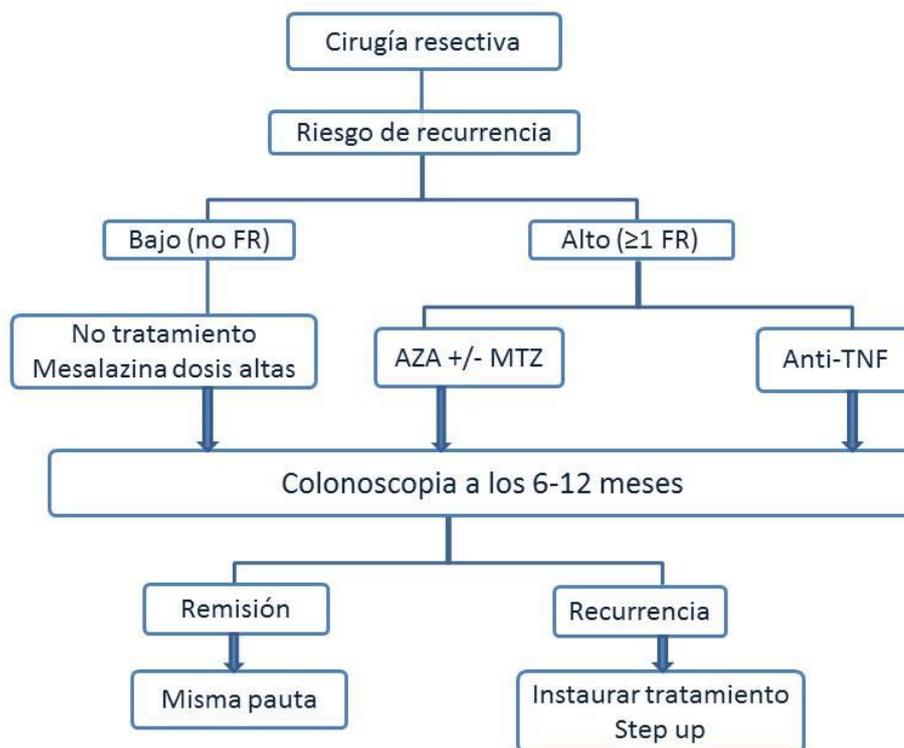
A falta de otra estrategia mejor en el momento actual, estos datos apoyan la utilidad del manejo ajustado por los hallazgos endoscópicos en este escenario, bien porque disminuye la recurrencia endoscópica (324) y clínica (336, 337) o bien porque permite evitar el tratamiento inmunosupresor en un porcentaje importante de pacientes sin influir negativamente en la evolución (335). Sin embargo, todavía quedan algunos aspectos de gran interés por resolver. El manejo guiado por los hallazgos endoscópicos implica una escalada de tratamiento en pacientes asintomáticos, con la consiguiente exposición a riesgo de desarrollo de efectos secundarios y el impacto farmacoeconómico. En segundo lugar, es necesario esperar a los resultados del seguimiento a largo plazo de los pacientes incluidos en los ensayos clínicos mencionados, para confirmar la mejor evolución clínica descrita en los estudios retrospectivos. Finalmente, sería interesante conocer si la diferenciación del grado i2 en dos subgrupos con diferente riesgo de recurrencia debería aplicarse al manejo guiado por endoscopia y su impacto en la evolución clínica posterior.

Aunque de momento esta es la mejor estrategia disponible, no hay que olvidar que la endoscopia es una técnica invasiva, costosa, no exenta de riesgos y en general mal tolerada por los pacientes. La utilización de marcadores no invasivos, como la CF, que permitan una monitorización fiable de estos

pacientes tras la cirugía, podría ser de utilidad para cribar la realización de exploraciones endoscópicas, ahorrando no solo colonoscopias sino el sobret ratamiento de pacientes asintomáticos en muchos casos. Establecer con claridad los puntos de corte óptimos en este escenario, para identificar o predecir con fiabilidad la aparición de recurrencia, es un aspecto esencial para su aplicación en la práctica clínica, y permitirá probablemente en un futuro cercano establecer nuevas estrategias de seguimiento y manejo de la EC post-quirúrgica.

En la figura 5 se presenta un algoritmo basado en la evidencia disponible hasta el momento, “según riesgo”, para la prevención de la recurrencia (ECCO Guidelines 2016).

**Figura 5.** Algoritmo de prevención de la recurrencia post-quirúrgica en la EC.



### III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

La cirugía resectiva juega un papel importante en el manejo de la EC, fundamentalmente cuando fracasa el tratamiento médico y para el manejo de sus complicaciones estenosantes o penetrantes. Sin embargo, la resección intestinal no supone un procedimiento curativo y la enfermedad suele reaparecer a nivel de la anastomosis y/o proximalmente, fenómeno conocido como **recurrencia post-quirúrgica**.

A pesar de los avances en las medidas preventivas y en los tratamientos disponibles, ninguna de las estrategias actuales ha mostrado capacidad para modificar la historia natural de la enfermedad y la recurrencia es un fenómeno habitual en el seguimiento a largo plazo. El tratamiento médico busca prevenir la aparición de la recurrencia, intentando identificar aquellos pacientes en los que el riesgo de recurrencia sea mayor y que, por tanto, se beneficiarían de una intervención terapéutica más temprana. La ileocolonoscopia continúa siendo el “gold standard” para el diagnóstico y seguimiento de la recurrencia post-quirúrgica, sobre todo porque, aunque es una técnica invasiva, no disponemos de buenos marcadores predictores de recurrencia tras la cirugía, y porque la utilidad de la valoración clínica y analítica para el diagnóstico de la recurrencia es limitada.

La recurrencia post-quirúrgica de la EC supone, a su vez, una condición patogénica *de novo* que nos permite estudiar con detalle los mecanismos que conducen al desarrollo de la enfermedad. Estos pacientes constituyen el mejor modelo natural *in vivo* de la evolución de la enfermedad y de todo cuanto está aconteciendo a nivel local y sistémico. El estudio de la recurrencia y de su génesis nos proporcionará un mejor entendimiento de la patogenia, nuevas herramientas para su aplicación en la práctica clínica (biomarcadores) y nos conferirá nuevos conocimientos hacia los que dirigir los estudios de investigación en el futuro.

El presente trabajo pretende profundizar en la caracterización de marcadores no invasivos que permitan identificar y monitorizar los cambios que acontecen en el desarrollo de la inflamación *de novo* tras la resección en la EC. Además, pretende conocer el perfil de la respuesta inmune que dirige este proceso y los potenciales elementos epigenéticos reguladores, así como su implicación

patogénica en la génesis de la recurrencia y su potencial utilidad como biomarcadores, tanto en su vertiente predictiva (aplicabilidad clínica) como terapéutica, al desentrañar posibles dianas clave sobre las que poder actuar para prevenir la recurrencia de la EC tras la cirugía.

### **Objetivos:**

- Caracterizar el comportamiento evolutivo de la calprotectina fecal en los pacientes intervenidos y definir: su capacidad predictiva de recurrencia, el momento más adecuado tras la cirugía para iniciar la monitorización de sus valores, su sensibilidad en la detección de lesiones tempranas para poder cribar la realización de endoscopia y los puntos de corte óptimos en estos pacientes para identificar con fiabilidad la actividad inflamatoria *de novo*.
- Caracterizar los cambios evolutivos en el patrón de expresión de citoquinas tras la cirugía e identificar posibles perfiles diferenciales que se correlacionen con el desarrollo de la recurrencia post-quirúrgica.
- Analizar la utilidad de las  $\alpha$ -defensinas plasmáticas como biomarcadores en el contexto post-quirúrgico de la EC, para diferenciar a los pacientes que desarrollan recurrencia temprana de aquellos que se mantienen en remisión.
- Identificar perfiles de microRNAs con expresión diferencial entre los pacientes con vs. sin recurrencia post-quirúrgica precoz y estimar su capacidad predictiva como biomarcadores para determinar el riesgo de recurrencia en estos pacientes, así como explorar las vías patogénicas implicadas.
- Desarrollar una herramienta de predicción (índice predictivo combinado) empleando los biomarcadores identificados para su aplicación en la práctica clínica.

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

---

Este estudio se inició tras la aprobación por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, a fecha 24 de abril de 2011 (Nº Registro: 2010/0342), de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes y controles dieron su consentimiento informado por escrito para la inclusión en el estudio.

## **1. Selección de pacientes y controles. Criterios de inclusión y exclusión.**

### Criterios de inclusión:

- Ser mayor de edad.
- Firmar el consentimiento informado.
- Diagnóstico previo de enfermedad de Crohn.
- Requerir de una resección intestinal como parte del tratamiento de su enfermedad de Crohn. No era necesario que fuera la primera cirugía resectiva.
- En el caso de los controles, no presentar ninguna enfermedad conocida ni estar bajo ninguna medicación. Se incluían tras comprobar que sus parámetros analíticos (incluyendo reactantes de fase aguda) se ajustaban a la normalidad.

### Criterios de exclusión:

- Embarazo.
- Requerir de una cirugía resectiva con ileostomía definitiva.
- Presentar otra enfermedad inflamatoria crónica concomitante.

En base a estos criterios, se incluyeron de manera prospectiva 67 pacientes con EC, de los cuales 61 finalizaron el seguimiento completo (2 años). En 6 de ellos no fue posible completar el seguimiento post-quirúrgico por diversas causas: 1 falleció por causas no relacionadas con la enfermedad, 1 fue excluida a los 6 meses por embarazo, 1 presentó un diagnóstico de neoplasia pulmonar durante el seguimiento y 3 dejaron de acudir voluntariamente al seguimiento durante el primer año.

## **2. Variables clínicas, analíticas, endoscópicas y radiológicas recogidas**

Para el registro de los datos de los pacientes incluidos se generó una base de datos anonimizada en Access (Office 2010) donde se recogieron todas las variables contempladas:

- Características basales de los pacientes: sexo, edad en el momento de la cirugía, años de evolución de la enfermedad hasta la cirugía, localización de la enfermedad y comportamiento clínico según la clasificación de Montreal, hábito tabáquico, tratamiento inicial y resecciones previas.
- Características de la cirugía: indicación, tipo de resección y complicaciones.
- Datos relativos a la recurrencia post-quirúrgica y a su evaluación: tratamiento preventivo, tiempo (meses) hasta la aparición de recurrencia desde la cirugía, tipo de recurrencia, tratamiento de la recurrencia, e índice endoscópico de Rutgeerts o índice radiológico de Sailer según la prueba morfológica realizada para la evaluación de la recurrencia (ileocolonoscopia o entero-RM, respectivamente).
- Para la evaluación de la actividad clínica se empleó el índice de Harvey-Bradshaw, que se calculó para todos los pacientes en el momento de la realización de la prueba morfológica de control destinada a evaluar la presencia de recurrencia.
- Dentro de las variables analíticas, se recogieron todos los valores de las variables analizadas (en las muestras de sangre y heces) en cada uno de los tiempos considerados, pre- y post-cirugía (detallados en el apartado siguiente): calprotectina fecal (CF), parámetros bioquímicos de fase aguda (proteína C reactiva [PCR], fibrinógeno), citoquinas plasmáticas (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) y  $\alpha$ -defensinas plasmáticas 1-3.
- Los datos relativos al estudio de microRNAs en plasma se recogieron en una base de datos aparte, para su análisis y posterior selección de aquellos diferencialmente expresados (en el subgrupo de pacientes con recurrencia

vs. el subgrupo de pacientes sin recurrencia durante el seguimiento) para su validación final.

### **3. Diseño experimental: recogida de muestras, “timing” y definiciones**

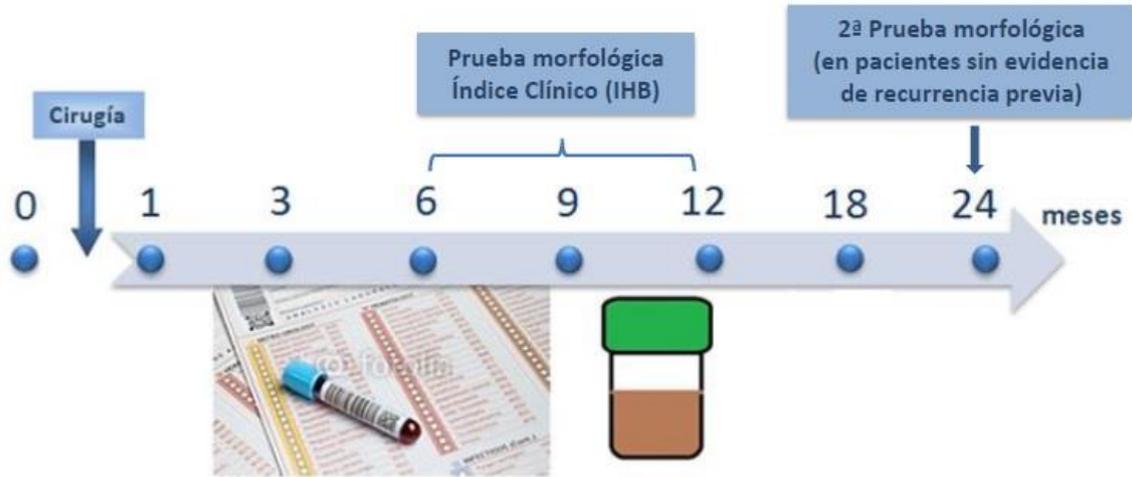
Todos los pacientes fueron incluidos, consecutivamente, en el momento de la cirugía resectiva (resección ileocecal o ileocolónica por motivo de su enfermedad de Crohn), realizándose un seguimiento prospectivo de 2 años tras la intervención (o hasta el momento de evidenciarse la aparición de recurrencia morfológica).

Se obtuvieron muestras seriadas de sangre periférica y de heces en todos los pacientes, realizándose una primera determinación basal pre-cirugía (en la semana previa a la misma) y posteriores determinaciones seriadas tras la intervención, a los 1, 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses (o hasta el momento de confirmarse la aparición de recurrencia post-quirúrgica).

Dentro de los 6-12 primeros meses tras la cirugía se realizó la prueba morfológica de control en todos los pacientes para evaluar la presencia de recurrencia (mediante ileocolonoscopia o, en su defecto, entero-RM, en los casos en que no fue posible una valoración adecuada del neo-íleon por endoscopia o en aquellos pacientes asintomáticos que rechazaron someterse a la endoscopia). En todos los casos, se calcularon los índices correspondientes validados para la valoración de la recurrencia post-quirúrgica (índice endoscópico de Rutgeerts o índice radiológico de Sailer, respectivamente).

En la figura 6 se resume el cronograma del protocolo diseñado para el estudio.

**Figura 6.** Cronograma del estudio. Puntos considerados para la obtención seriada de las muestras biológicas (pre- y post-cirugía), así como para la valoración morfológica y clínica de la recurrencia durante el seguimiento.



La actividad clínica se evaluó mediante el índice de Harvey-Bradshaw (IHB), que se calculó en todos los pacientes en el momento de la realización de la prueba morfológica de control, considerándose según la puntuación obtenida: <5 remisión clínica, 5-7 actividad leve, 8-16 actividad moderada o >16 actividad grave (Tabla 8).

**Tabla 8.** Índice de actividad clínica de Harvey-Bradshaw (223).

<b>Variables (nº de puntos)</b>
---------------------------------

1. Estado general: Muy bueno (0); Regular (1); Malo (2); Muy malo (3);  
Terrible (4 puntos).
2. Dolor abdominal: No (0); Ligero (1); Moderado (2); Intenso (3).
3. Número de deposiciones líquidas diarias (n puntos)
4. Masa abdominal: No (0); Dudosa (1); Definida (2); Definida y dolorosa (3).
5. Complicaciones: Artralgia (1)  
Uveítis (1)  
Eritema nodoso (1)  
Úlceras aftoides (1)  
Pioderma gangrenoso (1)  
Fístula anal (1)  
Otras fístulas (1)  
Absceso (1)

---

Puntuación total:

<5 remisión clínica

5-7 actividad leve

8-16 actividad moderada

>16 actividad grave

---

## **Obtención y procesado de las muestras biológicas**

Para la determinación de los valores de calprotectina fecal (CF), se solicitó a todos los pacientes que proporcionaran una muestra de heces (unos 5 gr) en la semana previa a la cirugía y, posteriormente, en cada uno de los tiempos considerados. Se indicaba que fuera recogida hasta un máximo de 5 días antes y almacenada en nevera hasta su entrega en el laboratorio. Se explicó previamente a los pacientes las condiciones de recogida de las heces (con el fin de evitar contaminaciones con orina o agua del inodoro) y se les proporcionó un recipiente con tapa enroscada y una espátula para la recogida de la muestra. Se informó de las condiciones a evitar los días previos a la recogida (como la toma de AINEs o AAS) y en caso de tener prevista una colonoscopia coincidiendo con alguna de las tomas, se indicó la recogida de la muestra antes de iniciar la preparación para la misma (nunca durante la preparación o tras la colonoscopia), con el fin de evitar alteraciones en los niveles de CF.

El resto de variables analizadas se determinaron en las muestras de sangre periférica obtenidas de cada paciente en cada uno de los tiempos considerados. En cada extracción se obtenían tres tubos de analítica ordinaria (bioquímica con PCR, hemograma y hemostasia) para la determinación de parámetros analíticos, y un tubo extra de EDTA (unos 10 ml) para la determinación de parámetros experimentales (perfil de citoquinas plasmáticas, concentración de  $\alpha$ -defensinas y estudio de microRNAs).

Estos protocolos experimentales fueron realizados en plasma. Para la obtención del plasma, se procesaban las muestras de sangre periférica (el tubo de EDTA) tras su obtención, mediante centrifugación en gradiente con Histopaque® (Sigma-Aldrich) y posterior separación de las células mononucleares y el plasma. Para ello, 5 ml de sangre total se vertían sobre 8 ml de Histopaque® en un tubo de plástico de 15 ml. Se realizaba una primera centrifugación a temperatura ambiente durante 30 minutos a 1300 rpm, de forma que la serie roja sedimenta en el fondo. El plasma y la interfase blanca, donde se localizan los linfocitos y otras células mononucleares (fases superiores) se recogían y alicuotaban en tubos eppendorf aparte.

Posteriormente, se realizaba una segunda centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos para separar el plasma de las células. El sobrenadante final (plasma) se separaba en otro tubo eppendorf y era almacenado a -80°C para los análisis posteriores de citoquinas,  $\alpha$ -defensinas y microRNAs.

El resumen del protocolo para el procesado de las muestras de sangre y obtención del plasma se expone a continuación:

1. Cinco ml de sangre periférica se añaden a un tubo con 8 ml de Histopaque® atemperado. Verter la sangre lentamente por la pared del tubo.
2. Centrifugar durante 30 minutos a 1300 rpm.
3. Recoger la fase superior (plasma y células mononucleares) y separar en un tubo aparte. Repartir en eppendorfs.
4. Centrifugar durante 10 minutos a 5000 rpm.
5. Separar el sobrenadante final (plasma) de las células y almacenar ambos eppendorfs a -80°C hasta su análisis.

Todas las muestras fueron debidamente codificadas (anonimizadas), para permitir su correcta identificación pero manteniendo la confidencialidad de los pacientes y controles incluidos en el estudio. Las muestras fueron custodiadas y almacenadas como colección privada a los efectos oportunos, según establece la normativa vigente sobre biobancos.

#### **4. Evaluación de la recurrencia post-quirúrgica**

La prueba morfológica de control para evaluar la presencia de recurrencia se realizó en todos los pacientes dentro de los 6-12 primeros meses tras la cirugía. La valoración morfológica se realizó mediante ileocolonoscopia o, en su defecto, mediante entero-RM, en aquellos pacientes asintomáticos que rechazaron someterse a la endoscopia durante el primer año o en los que, por cualquier motivo, no fue posible la adecuada valoración del neo-íleon mediante endoscopia. En aquellos pacientes sin evidencia de recurrencia en la prueba morfológica realizada durante el primer año, se realizó una segunda evaluación al final del seguimiento (a los 24 meses) o en el momento de presentar recurrencia clínica.

Se definió la presencia de recurrencia clínica como un índice de Harvey-Bradshaw (IHB) superior a 5 puntos. Los criterios considerados para definir la presencia de recurrencia morfológica se exponen a continuación.

##### **4.1 Recurrencia post-quirúrgica evaluada mediante endoscopia**

Las colonoscopias se realizaron en la Unidad de Endoscopias de nuestro Servicio, de acuerdo al protocolo estandarizado de preparación previa y empleando para ello soluciones no basadas en fosfatos, puesto que pueden producir aftas en el tubo digestivo (en nuestro centro se emplea CitraFleet®, o Moviprep® en caso de insuficiencia renal). Las exploraciones se realizaron en salas de colonoscopia estándar equipadas con un brazo quirúrgico donde se sitúa el procesador Exera II (Olympus), fuente de luz, fuente de diatermia (ERBE ICC 200), bomba de CO<sub>2</sub> y bomba de lavado (Figura 7). Para la valoración endoscópica de los pacientes se emplearon endoscopios de la marca Olympus (colonoscopia alta definición CF-H180AL).

**Figura 7.** Sala de colonoscopia estándar de nuestro centro.



Todas las exploraciones fueron realizadas por un endoscopista experto (con más de 10 años de experiencia), grabadas e interpretadas por un segundo endoscopista experto de la Unidad. En caso de discrepancia en algún aspecto, la valoración final fue decidida por consenso entre ellos. En cada caso, se examinaron al menos 15 cm de neóleon y se especificó en el informe la longitud explorada y la explicación detallada de los hallazgos, con especial hincapié en las variables endoscópicas necesarias para calcular el índice de Rutgeerts, que también se especificó en el informe.

Se consideró que un paciente presentaba recurrencia post-quirúrgica si en el momento de la **endoscopia** presentaba un índice endoscópico de **Rutgeerts  $\geq$  i2b**, que corresponde a la modificación propuesta por Domènech *et al.* ([297](#)) al índice clásico de actividad de Rutgeerts (Tabla 5, pág. 89) ([230](#)).

Esta modificación subdivide el grado i2 (>5 aftas con mucosa normal entre lesiones, áreas salteadas de lesiones más grandes o úlceras confinadas a <1 cm de la anastomosis) en: i2a si la lesión comprende únicamente úlceras confinadas a <1cm de la anastomosis (y cuyo origen puede ser isquémico tras la cirugía, no por recurrencia de la enfermedad propiamente dicha), e i2b en caso de evidenciarse >5 aftas con mucosa interlesional sana o áreas salteadas de lesiones más grandes.

## **4.2 Recurrencia post-quirúrgica evaluada mediante entero-RM**

Las entero-RM se realizaron de acuerdo al protocolo estandarizado de preparación y adquisición de imágenes para la valoración morfológica de la recurrencia establecido en el Servicio de Radiología del Hospital Universitari i Politècnic la Fe, en equipos de RM de 1,5T o 3T indistintamente (GE MedicalSystems, Milwaukee, WI).

El procedimiento se realizaba tras un mínimo de 6 horas de ayuno. Se administraba un contraste oral (1500 ml de una solución de manitol al 5%) inmediatamente antes de la RM, para la distensión de las asas del intestino delgado, así como 10 mg de N-butilbromuro de hioscina (Buscopan®; Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany) por vía intravenosa antes de empezar la prueba y otros 10 mg antes de la administración de gadolinio, para reducir el peristaltismo intestinal. En caso de contraindicación (glaucoma, arritmia, hiperplasia benigna de próstata) se administraba 1 mg de glucagón (Glucagen®; Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) por vía intravenosa en dosis única al principio de la prueba. En todos los casos se administraba contraste intravenoso para la realización de estudio dinámico en fases, para lo que se usó gadobenato de dimeglumina (MultiHance®; Bracco Diagnostics Inc., Milan, Italy), a dosis de 0,2 ml / kg de peso corporal y administrados a una velocidad de 2 ml / seg. Las imágenes se obtienen con el paciente en decúbito prono. El tiempo medio de realización de la prueba es de aproximadamente 40 minutos.

Las secuencias y parámetros del protocolo de entero-RM se detallan en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Protocolo de entero-RM para la adquisición de imágenes.

Secuencias	Plano	Espesor corte/gap (mm)	RT/ET (ms)	FOV	Matrix	Flip angle	Receiver Bandwidth
T2-SSFSE	Coronal	4/0	1500/120	440x440	384 x 224	90	50
FIESTA	Coronal	4/0	4.60/1.54	440x440	384 x 224	65	125
T2-SSFSE	Axial	5/1	1500/120	Variable	384 x 224	90	50
T2-SSFSE-FS	Axial	5/1	1500/120	Variable	384 x 224	90	50
DWI (b:0, 800)	Axial	5/1	ET Mínimo	Variable	132 x 132	90	-
LAVA-XV	Coronal	2/0	4.9/1.8	440x440	320 x 224	12	62.5
In Phase FS	Axial	5/1	185/2.1	Variable	256 x 180	70	31.25

SSFSE, Single-Shot Fast Spin Echo; FIESTA, Fast Imaging Employing Steady State Acquisition; FS, Fat Saturation; DWI, Diffusion-Weight Imaging (b values, 0 and 800 s/mm<sup>2</sup>); LAVA-XV, Liver Acquisition with Volume Acceleration-Extended Volume; RT/ET, repetition time/echo time; FOV, field of view.

Todas las exploraciones eran revisadas por dos radiólogos con más de 10 años de experiencia en RM, pertenecientes al área de abdomen de nuestro grupo multidisciplinar. En caso de discrepancia en algún aspecto, la valoración final fue decidida por consenso entre ellos. Las variables radiológicas analizadas para el cálculo del score radiológico de cada paciente eran recogidas en una hoja de recogida de datos diseñada a tal efecto.

En los pacientes que fueron evaluados mediante prueba de imagen, se consideró que un paciente presentaba recurrencia post-quirúrgica si en el momento de la **entero-RM** presentaba un índice de **Sailer  $\geq$  MR2** (Tabla 6, pág. 90) ([270](#), [298](#)).

## **5. Caracterización evolutiva de marcadores serológicos y fecales**

### **5.1 Monitorización y análisis de los valores de calprotectina fecal**

Las muestras de heces se emplearon para determinar y monitorizar los valores de calprotectina fecal (CF) en todos los pacientes tras la cirugía, evaluar la correlación de sus valores con los hallazgos morfológicos (en la endoscopia o entero-RM) y definir su capacidad predictiva de recurrencia en comparación con los marcadores serológicos.

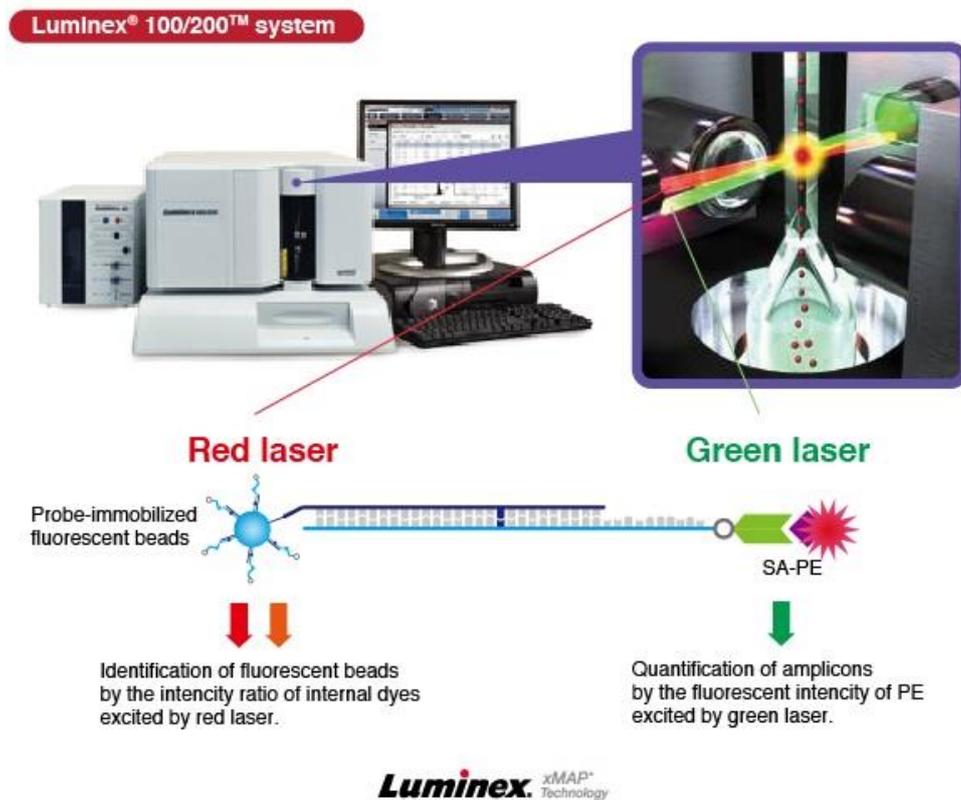
Para ello, las concentraciones de CF en las muestras de heces se determinaron mediante un test comercialmente disponible de enzoinmunoanálisis cuantitativo basado en anticuerpos policlonales (Calprest®, Eurospital, Trieste, Italia), empleando un analizador de ELISA Best 2000 totalmente automatizado. Las muestras de heces se procesaban tras su recepción, con una primera dilución en tampón de extracción. El homogeneizado obtenido se centrifugaba durante 20 minutos a 10000 g y el extracto sobrenadante (1 ml) se congelaba a -20°C hasta su posterior análisis. Las concentraciones de CF en las muestras de heces se calculaban posteriormente siguiendo los pasos establecidos en el protocolo del fabricante. La sensibilidad analítica es de 6,25 ng/ml. Todos los resultados se normalizaban con respecto al peso húmedo de las heces (en gramos), expresándose las concentraciones de CF resultantes en µg/g de heces.

### **5.2 Determinación y análisis del perfil de citoquinas plasmáticas**

La determinación de citoquinas plasmáticas se realizó, en primer lugar, para evaluar si el patrón de citoquinas pre-operatorio cambia tras la cirugía (y regresa al perfil típico de la EC temprana); en segundo lugar, para monitorizar sus niveles plasmáticos durante el curso postoperatorio y caracterizar los cambios que acontecen en el perfil de producción de citoquinas y, por último, para comparar los cambios que tienen lugar en la respuesta inmune entre los pacientes con vs. sin recurrencia durante el seguimiento y evaluar si los pacientes que desarrollan recurrencia precoz presentan un patrón diferenciado de citoquinas durante el curso postoperatorio que se relacione con el desarrollo de la recurrencia.

Para la determinación de las citoquinas (IL1- $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, IL-12p70, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) en las muestras de plasma de los pacientes y de los controles sanos incluidos (n=21) se emplearon kits comerciales de alta sensibilidad y la plataforma de análisis multiplexado Luminex®. Esta técnica, basada en el análisis de fluorescencia por citometría de flujo modificada, es más sensible que una técnica convencional de ELISA y aporta la ventaja añadida del análisis “multiplex”, es decir, permite el análisis simultáneo de varias citoquinas en un volumen reducido de muestra. Para ello, se emplea un citómetro de flujo modificado: el Luminex 100 IS™ (Figura 8) y además, kits específicos de alta sensibilidad Milliplex® Map de Millipore (pg/ml). Para el propósito de este estudio se empleó el kit *MILLIPLEX MAP High Sensitivity Human Cytokine Panel* (Cat # HSCYTO-60SK), de Millipore.

**Figura 8.** Plataforma de análisis Luminex®, tecnología basada en el análisis de fluorescencia por citometría de flujo modificada (con permiso del proveedor).



Previamente, el protocolo de análisis fue puesto a punto en nuestro laboratorio, comprobándose la utilidad de estos kits comerciales de alta sensibilidad para la determinación de citoquinas en muestras plasmáticas humanas.

Este sistema se basa en una técnica de ELISA modificada, de tal forma que existe un reconocimiento antígeno-anticuerpo, donde el antígeno es la citoquina de interés presente en la muestra y el anticuerpo (reactivo del kit comercial) está acoplado a una esfera (bead) que permite incrementar el tamaño final del complejo antígeno-anticuerpo. De esta forma, el complejo es detectado por el Luminex® que además de identificar, puede también cuantificar la cantidad de citoquina presente en la muestra gracias a la intensidad de señal de fluorescencia recogida y a la interpolación en la curva estándar.

A partir de volúmenes de plasma que son constantes para todas las muestras, los resultados obtenidos son un fiel reflejo de las cantidades de citoquinas presentes en cada sujeto y, por tanto, permite una valoración real de cómo oscila la expresión de cada citoquina según la evolución de la enfermedad e, igualmente, permite comparar diferencias de expresión de citoquinas entre pacientes.

Los datos resultantes obtenidos (valor de fluorescencia) de cada una de las citoquinas son interpolados en una curva de calibrado estándar que se analiza conjuntamente a tal fin. Esto permite expresar los resultados como cantidad de citoquina por volumen de muestra empleada.

### **5.3 Determinación y análisis de los niveles de $\alpha$ -defensinas plasmáticas**

En base a los hallazgos previos de nuestro grupo, respecto al aumento de las concentraciones plasmáticas de las  $\alpha$ -defensinas 1-3 en los pacientes con EC ileal activa (al debut) y su potencial utilidad como biomarcadores para identificar la actividad de la enfermedad en este contexto, se realizó la determinación de  $\alpha$ -defensinas en el presente estudio para evaluar su posible utilidad también en los pacientes intervenidos para identificar el desarrollo de actividad inflamatoria de *novο*, en el seno de la recurrencia post-quirúrgica.

La determinación de sus concentraciones en las muestras de plasma se realizó mediante técnica de ELISA, empleando para ello un kit comercialmente disponible (Hycult Biotech HNP1–3, Human, ELISA kit Catalog # HK317-01; Netherlands). Previamente a la realización de los experimentos, el protocolo del fabricante fue puesto a punto en el laboratorio, probándose diferentes diluciones hasta encontrar la dilución óptima de las muestras para la determinación (en nuestro caso fue 1/100). La medición espectrofotométrica de la cantidad de defensinas se realizó a 450 nm. La concentración de cada proteína en las muestras de plasma se calculó de acuerdo con una curva estándar.

## **6. Estudio de miRNAs**

Para el análisis inicial de los microRNAs (miRNAs) en plasma se emplearon 20 muestras de pacientes por cada grupo (recurrencia y no recurrencia), empleándose una cantidad de 50µL de muestra por paciente. Posteriormente, para la validación final, se emplearon un total de 64 muestras (explicación detallada en el apartado de resultados). Para el primer análisis se hicieron “pooles” de muestra de 1mL para cada grupo analizado, mientras que para la validación posterior se utilizaron muestras individuales de 200-300µL por paciente.

### **6.1 Extracción del ARN a partir de las muestras de plasma**

Para la extracción del ARN se utilizó el kit comercial: miRCURY™ RNA Isolation Kit – Biofluids, partiendo de 200 µl de plasma por muestra. Este kit presenta la ventaja de que está optimizado para la obtención de ARN de alta calidad a partir de muestras de biofluidos (como plasma) donde se espera un bajo rendimiento de extracción por la poca cantidad de ARN presente en la muestra.

Se añadieron 3 spike-in de ARN (UniSp2, UniSp4 y UniSp5) a diferentes concentraciones (incrementos de 100 veces) como controles de la extracción.

## **6.2 Análisis (detección) mediante PCR cuantitativa a tiempo real**

Se emplearon 19 µl del volumen de ARN extraído para hacer la retrotranscripción (RT) utilizando para la reacción: miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, poliadenilación y el kit de síntesis de cDNA, todo de Exiqon. Se añadió un spike-in (UniSp6) para confirmar que la retrotranscripción, y posteriormente la amplificación, se daba con la misma eficiencia en todas las muestras.

El cDNA resultante se diluyó 50 veces y la reacción de PCR se realizó en un volumen final de 10 µl, siguiendo las indicaciones del protocolo de miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR. Se emplearon los paneles I y II de ExiLENT SYBR® Green master mix, analizando cada miRNA individualmente. Estos paneles cuentan además con el spike-in UniSp3 (en combinación de la muestra de ADN y los oligos) y que permite detectar inhibiciones a este nivel. Como controles negativos se utilizaron productos de la RT donde no se había añadido muestra y que se procesaron de manera idéntica al resto de productos de la RT.

Se empleó el LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche) para la reacción de PCR cuantitativa y placas de 384 pocillos.

El análisis de los resultados se realizó con el software de Roche LC, para determinar las C<sub>q</sub> (método de la segunda derivada) y para el análisis de las curvas de melting.

Para conocer la eficiencia de la amplificación se calculó utilizando algoritmos similares a los empleados en el software LinReg. Se analizaron las curvas de melting de todos los ensayos y se comprobó si las T<sub>m</sub> estaban dentro de las especificaciones del ensayo. Se estableció como punto de corte 5 C<sub>q</sub>s menos que el control negativo, y además que la C<sub>q</sub> < 37 para que el resultado fuera incluido en el análisis.

Utilizando el NormFinder software (Andersen CL, 2004), se observó que el normalizador más adecuado se obtenía de la media de los resultados detectados en todas las muestras. De tal forma, todos los datos fueron

normalizados con la media de los ensayos detectados en todas las muestras (media – Cq de la muestra).

Otro aspecto que se consideró fue la presencia de hemólisis en las muestras, factor a evitar pues induce contaminación con miRNAs que no deberían estar presentes en las muestras de plasma. Se analizaron dos miRNAs: miARN-451 que está presente en los eritrocitos y el miARN-23a que es bastante estable en plasma aún en presencia de hemólisis. El ratio de estos dos miRNAs se correlaciona con el grado de hemólisis de la muestra.

## 7. Análisis estadístico

Los datos se han resumido mediante media (desviación estándar) y mediana (1er y 3er cuartil) en el caso de variables continuas y mediante frecuencias relativas y absolutas en el caso de variables categóricas. La recurrencia se ha modelizado mediante un análisis de supervivencia en el que el evento se ha considerado la recurrencia post-quirúrgica. Dado que las determinaciones de los distintos parámetros analíticos se han realizado en distintos momentos del tiempo a lo largo de los 24 meses de seguimiento, se ha realizado un análisis de regresión de Cox con covariables tiempo-dependientes. Adicionalmente, se han realizado modelos de regresión lineal mixta con splines para modelizar la evolución de cada una de las variables en el tiempo. Las curvas de incidencia acumulada se calcularon mediante el método de Kaplan Meier y el test del log-rank. Se analizaron los perfiles de expresión de citoquinas mediante fuzzy clustering, así como su asociación con el estado de recurrencia mediante un modelo de regresión beta mixto, y se elaboraron gráficos tipo heat map para representar la evolución de las concentraciones plasmáticas de citoquinas durante el curso postoperatorio en cada grupo. Otros análisis bivariados entre los grupos para datos continuos se realizaron mediante la prueba T de Student (t-test). Los p valores <0.05 se han considerado estadísticamente significativos. Todos los análisis se han realizado mediante el software R (versión 3.3.2), salvo los relativos al estudio de los microRNAs, en los que se ha empleado el software específico detallado en el apartado anterior.

## V. RESULTADOS

---

## **1. Características basales de los pacientes incluidos**

Se incluyeron en el análisis final 61 pacientes con EC sometidos a resección ileocecal o ileocólica por motivo de su enfermedad, incluidos de manera consecutiva desde mayo de 2011 hasta marzo de 2014, y que completaron un seguimiento prospectivo de 2 años desde la cirugía (tiempo fin de seguimiento del último paciente a principios de 2016), así como los procedimientos y determinaciones contempladas en el protocolo del estudio.

La media de edad fue de 40.7 años (rango, 18-74), con predominio de sexo masculino (39 hombres y 22 mujeres), y la mayoría de los pacientes presentaban una localización ileal de la enfermedad (45 pacientes, 73.8%). En 25 pacientes el patrón evolutivo fue estenosante, en 18 penetrante y en 18 inflamatorio. Seis pacientes habían presentado una resección intestinal previa. A todos los pacientes se les realizó una resección del tramo afectado con márgenes macroscópicamente libres de enfermedad, confirmado en el estudio histopatológico de la pieza quirúrgica.

Tras la resección intestinal, 54 pacientes (88.5%) recibieron tratamiento de prevención de la recurrencia post-quirúrgica, instaurado en todos los casos entre la segunda y tercera semanas tras la resección: 6 pacientes recibieron únicamente mesalazina a dosis altas, 33 recibieron tiopurinas, 14 recibieron biológicos (11 adalimumab y 3 infliximab) y 1 paciente recibió tratamiento combinado, azatioprina e infliximab (inició tratamiento de prevención con azatioprina, pero hubo que añadir posteriormente biológico por presencia de enfermedad perianal activa).

Las características basales (demográficas y clínicas) y relativas a la cirugía de los pacientes incluidos se recogen en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Características basales de los pacientes incluidos (datos expresados en media [rango] para variables continuas y frecuencia [%] para variables categóricas).

Características	n = 61
Edad (años) al momento de la cirugía, media (rango)	40.7 (18-74)
Sexo (H/M), n	39/22
Duración de la enfermedad (años) al momento de la cirugía, media (rango)	6.5 (0-37)
Resección intestinal previa, n (%)	6 (9.8%)
Indicación de la cirugía, n (%)	
Fracaso tratamiento médico	18 (29.5%)
Estenosis	25 (41%)
Patrón penetrante	18 (29.5%)
Tabaquismo activo tras la cirugía, n (%)	13 (21.3%)
Localización, n (%)	
L1 Ileal	45 (73.8%)
L3 Ileocólico	12 (19.6%)
L1+ L4 (GI alta)	4 (6.6%)
Patrón de comportamiento, n (%)	
B1 Inflamatorio	18 (29.5%)
B2 Estenosante	25 (41%)
B3 Penetrante	18 (29.5%)
P Perianal	14 (23%)
Tratamiento de prevención de recurrencia, n (%)	
Tiopurinas	33 (54.1%)
Anti-TNF $\alpha$ en monoterapia	14 (22.9%)
Tratamiento combinado	1 (1.7%)
Mesalazina dosis altas	6 (9.8%)
Ninguno	7 (11.5%)
<b>H, Hombre; M, Mujer; GI, gastrointestinal; TNF<math>\alpha</math>, Factor de necrosis tumoral-<math>\alpha</math></b>	

## 2. Pacientes con vs. sin recurrencia post-quirúrgica precoz

La prueba morfológica de control para evaluar la presencia de recurrencia se realizó en todos los pacientes dentro de los 6-12 primeros meses, con un intervalo medio de 10.6 ( $\pm$  0.6) meses tras la cirugía. De los 61 pacientes, 32 (52.5%) fueron evaluados mediante endoscopia, y los 29 restantes (47.5%) mediante entero-RM (Tabla 11).

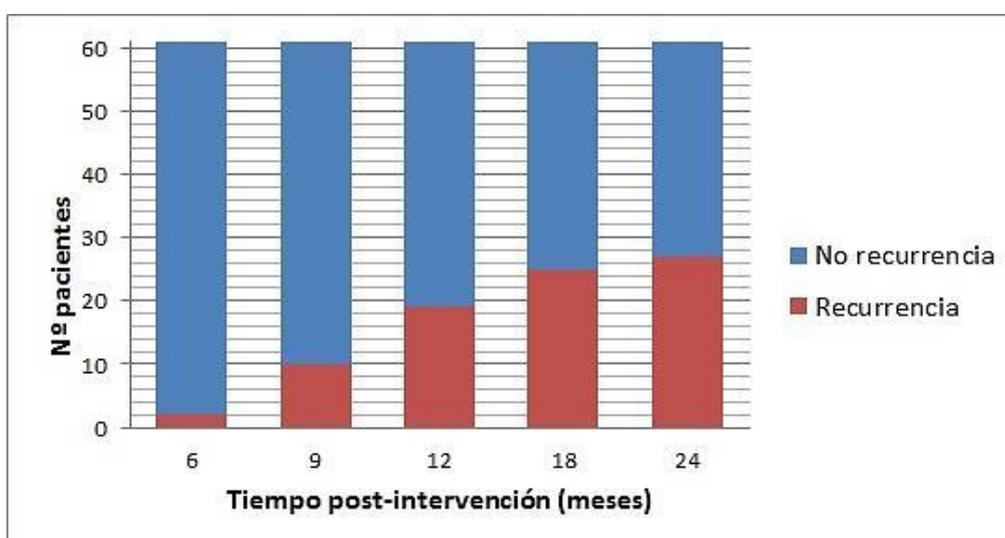
Evolutivamente, un total de 27 pacientes (44.3%) presentaron recurrencia morfológica durante el seguimiento, de los cuales 16 pacientes presentaron recurrencia endoscópica y 11 recurrencia radiológica (Tabla 11). De éstos, un total de 7 pacientes (25.9%) presentaron recurrencia clínica (IHB  $\geq$ 5 en el momento de la prueba morfológica de control).

**Tabla 11.** Tasas de recurrencia endoscópica y radiológica durante el seguimiento.

Pacientes (n=61)	Endoscopia	Entero-RM
<b>Total evaluados</b> (n, %)	32 / 61 (52.5%)	29 / 61 (47.5%)
<b>Remisión</b> (n, %)	16 / 32 (50%)	18 / 29 (62%)
	16 / 32 (50%)	11 / 29 (38%)
	11 / 16 (68.7%)	8 / 11 (72.7%)
	5 / 16 (31.3%)	3 / 11 (27.3%)

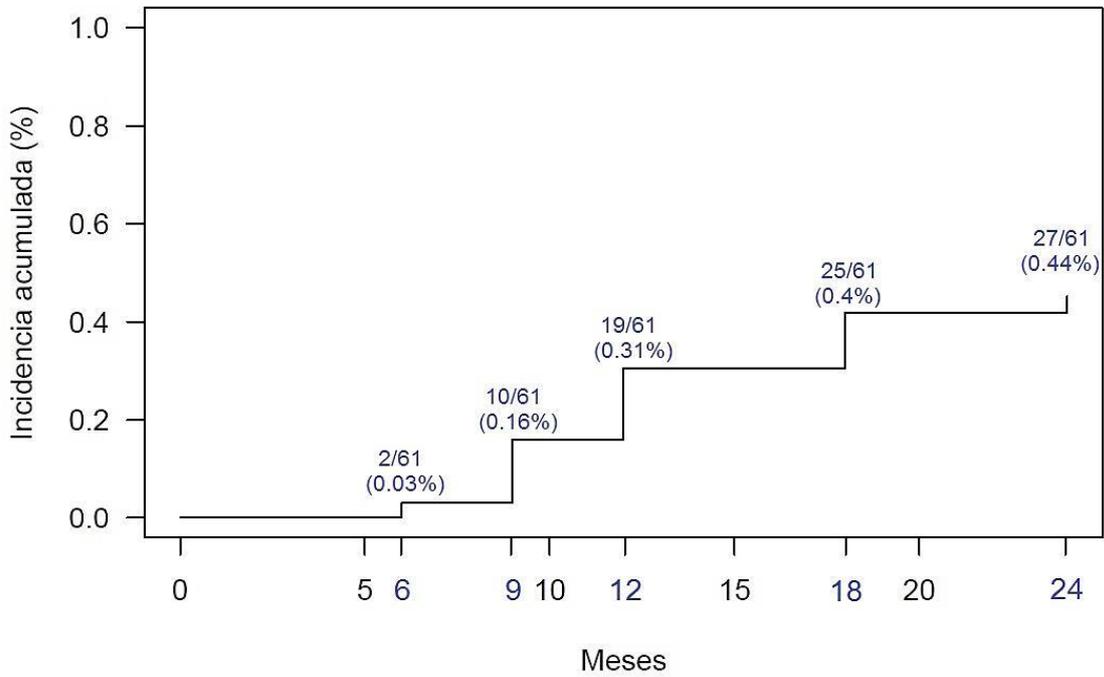
De los 27 pacientes que presentaron recurrencia post-quirúrgica, 19 pacientes la presentaron en los primeros 12 meses (2 pacientes a los 6 meses, 4 a los 7 meses, 4 a los 9 meses y 9 a los 12 meses) y un total de 8 pacientes presentaron la recurrencia durante el segundo año de seguimiento (6 pacientes a los 18 meses y 2 a los 24 meses) (Figura 9).

**Figura 9.** N° de pacientes con desarrollo de recurrencia a lo largo del seguimiento.



La incidencia acumulada de recurrencia en nuestra cohorte de pacientes a lo largo del seguimiento se muestra en la Figura 10.

**Figura 10.** Incidencia acumulada de recurrencia post-quirúrgica durante el seguimiento.



La comparación de las características basales entre los pacientes con recurrencia post-quirúrgica precoz y aquellos sin recurrencia se recoge en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Descriptivo de las características clínicas de los pacientes con vs. sin recurrencia post-quirúrgica durante el seguimiento (datos expresados en media [rango] para variables continuas y frecuencia [%] para variables categóricas).

Características	Recurrencia (n = 27)	No recurrencia (n = 34)	p
Edad (años) al momento de la cirugía	41 (18-72)	40 (22-74)	ns
Sexo (H/M)	16/11	23/11	ns
Duración de la enfermedad (años) al momento de la cirugía	6.7 (0-37)	6.4 (0-26)	ns
Resección intestinal previa	2 (7.4%)	4 (11.7%)	ns
Indicación de la cirugía			ns
Fracaso tratamiento médico	14 (51.9%)	4 (11.8%)	
Estenosis	9 (33.3%)	16 (47.1%)	
Patrón penetrante	4 (14.8%)	14 (41.2%)	
Tabaquismo activo tras la cirugía	6 (22.2%)	7 (20.6%)	ns
IHB en el momento de la prueba morfológica			ns
< 5	20 (74.1%)	34 (100%)	
≥ 5	7 (25.9%)	0	
Localización			ns
L1 Ileal	20 (74.1%)	25 (73.5%)	
L3 Ileocólico	5 (18.5%)	7 (20.6%)	
L1+ L4 (GI alta)	2 (7.4%)	2 (5.9%)	
Patrón de comportamiento			ns
B1 Inflamatorio	14 (51.9%)	4 (11.8%)	
B2 Estenosante	9 (33.3%)	16 (47.1%)	
B3 Penetrante	4 (14.8%)	14 (41.2%)	
P Perianal	8 (29.6%)	6 (17.6%)	
Tratamiento de prevención de recurrencia			ns
Tiopurinas	11 (40.7%)	22 (64.7%)	
Anti-TNF $\alpha$ en monoterapia	7 (25.9%)	7 (20.6%)	
Tratamiento combinado	0	1 (2.9%)	
Mesalazina dosis altas	2 (7.4%)	4 (11.8%)	
Ninguno	7 (25.9%)	0	

**H, Hombre; M, Mujer; IHB, Índice de Harvey-Bradshaw; GI, gastrointestinal; TNF $\alpha$ , Factor de necrosis tumoral- $\alpha$**

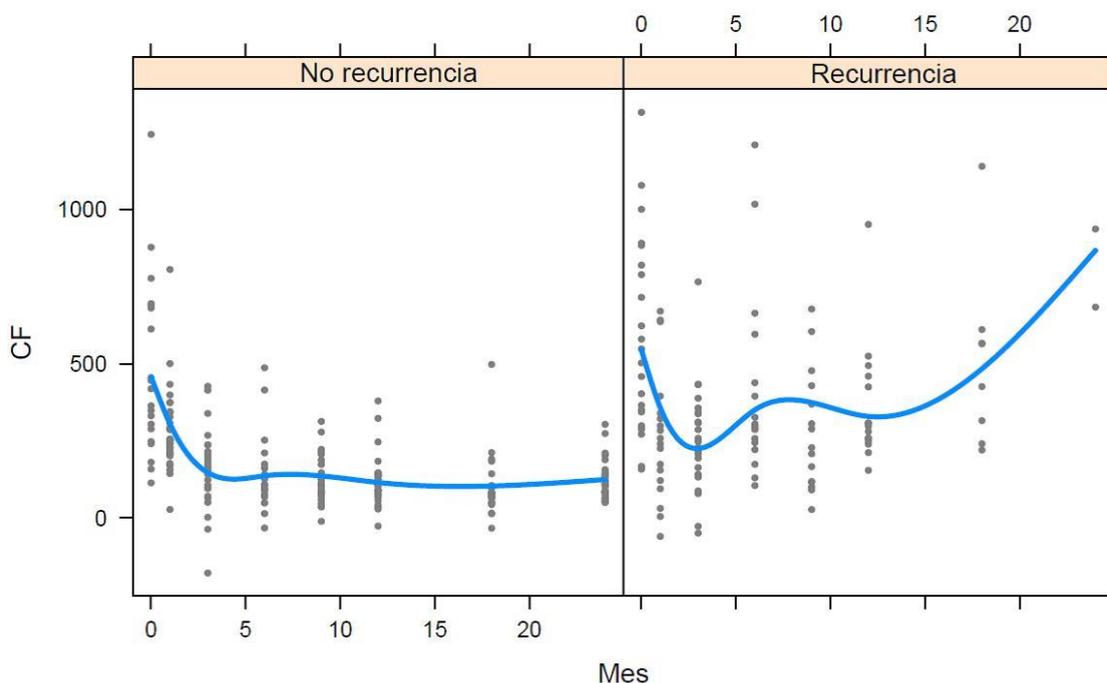
### **3. Marcadores fecales: análisis de la calprotectina fecal en el contexto post-quirúrgico.**

#### **3.1 Comportamiento evolutivo tras la cirugía en pacientes con vs. sin recurrencia post-quirúrgica.**

La monitorización longitudinal de los valores de calprotectina fecal (CF) en nuestra cohorte de pacientes mostró unas concentraciones elevadas del marcador pre-cirugía (mediana: 429.5 µg/g; IQR [164.5 - 802.5]), que posteriormente, en ausencia de complicaciones, disminuyeron progresivamente en los 3 primeros meses tras la cirugía, aunque sin llegar a alcanzar los valores considerados normales por el laboratorio (a los 3 meses: mediana, 134.5 µg/g; IQR [64.25 - 245.53]).

En la figura 11 se representa la evolución global de los valores de CF a lo largo del tiempo (pre- y post-cirugía), diferenciando entre los pacientes que desarrollaron recurrencia y los que se mantuvieron en remisión durante el seguimiento. Se observa cómo los pacientes con recurrencia tenían niveles globalmente más elevados de CF y, además, presentaban un incremento de la misma con el paso del tiempo. En cambio, los pacientes que no desarrollaron recurrencia, tras la disminución y estabilización de los valores en los 3 primeros meses post-cirugía, mantuvieron posteriormente valores bajos durante el seguimiento.

**Figura 11.** Evolución temporal (pre- y post-cirugía) de los valores de CF en los pacientes con y sin recurrencia durante el seguimiento.

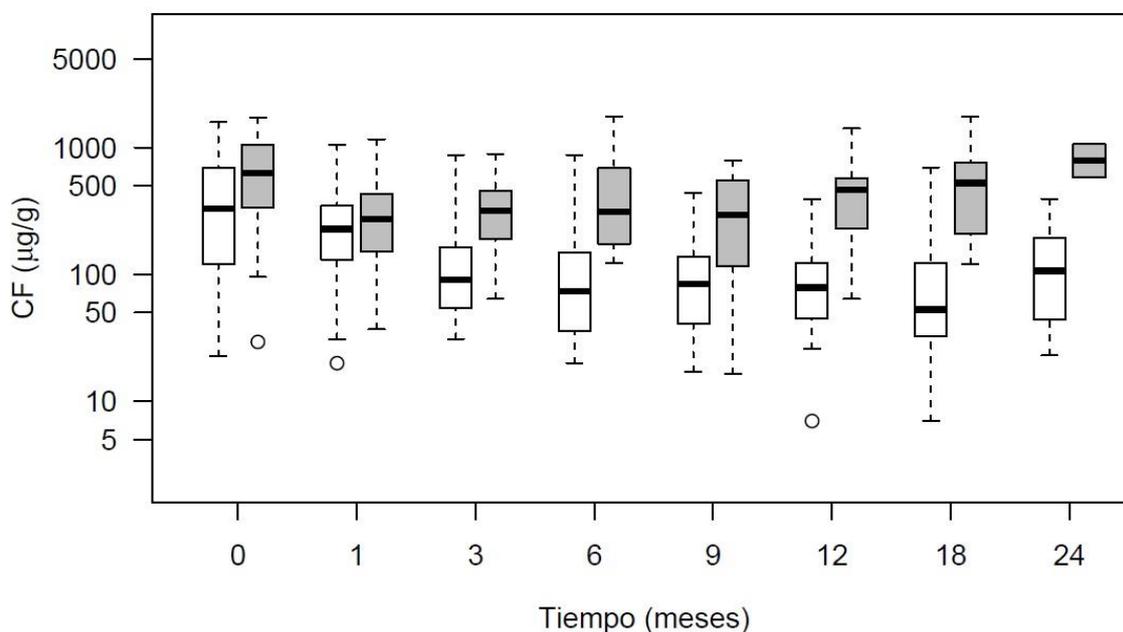


Estas diferencias durante el seguimiento evolutivo fueron estadísticamente significativas, siendo los valores de CF post-cirugía globalmente más elevados en los pacientes que desarrollaron recurrencia post-quirúrgica (mediana: 496  $\mu\text{g/g}$ ; IQR [248,744]), en comparación con los pacientes que se mantuvieron en remisión durante el seguimiento (80  $\mu\text{g/g}$  [39,139];  $p < 0.001$ ).

Al considerar por separado los valores de CF según el tipo de recurrencia morfológica (endoscópica y radiológica) (medianas e IQR: 542  $\mu\text{g/g}$  [318.5,715.5] y 451  $\mu\text{g/g}$  [262.5,735], respectivamente), se mantienen las diferencias observadas en comparación con los pacientes sin recurrencia durante el seguimiento (en ambos casos  $p < 0.001$ ).

En la Figura 12 se muestra la evolución temporal de las medianas de CF en cada grupo (recurrencia vs. no recurrencia), en cada uno de los puntos considerados durante el seguimiento post-quirúrgico.

**Figura 12.** Evolución temporal de los valores de CF (medianas, 1er y 3er cuartil, máximo y mínimo) en los pacientes con y sin recurrencia durante el seguimiento (en color gris y en color blanco, respectivamente).



### 3.2 Capacidad para predecir la recurrencia post-quirúrgica en comparación con los marcadores serológicos.

Con el objetivo de determinar la capacidad de la CF como marcador predictor de recurrencia, se ha ajustado un modelo de regresión de supervivencia siendo la recurrencia el evento a modelizar y teniendo en cuenta que los valores de CF varían con el tiempo, por lo que se ha utilizado un modelo de regresión de Cox para variables tiempo-dependientes. Los resultados del modelo se muestran a continuación:

	<b>Coefficiente</b>	<b>Error est.</b>	<b>HR</b>	<b>Inf. 95%</b>	<b>Sup. 95%</b>	<b>P-value</b>
CF	0.003	0.001	1.003	1.002	1.004	<0.001
AIC	116.613					

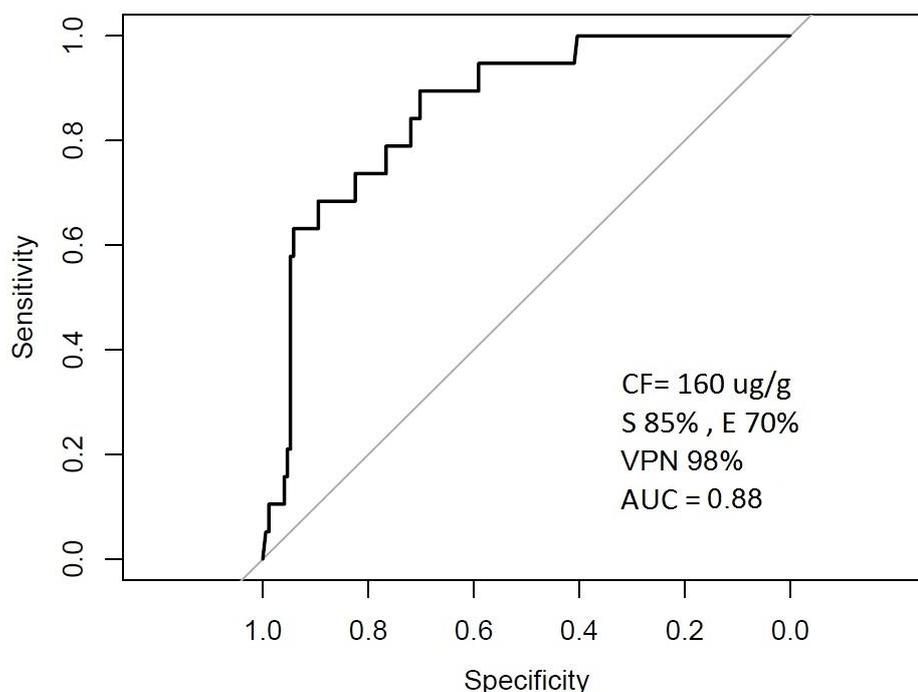
Los resultados del modelo confirman la existencia de una asociación estadísticamente significativa entre la CF y el riesgo de recurrencia ( $p < 0.001$ ). El Hazard Ratio (HR) por incremento en una unidad de los valores de CF es de 1.003 con un intervalo de confianza al 95% [1.002, 1.004].

Al tratarse de una variable tiempo-dependiente, y dada la observación previa de que la CF se mantiene elevada inicialmente tras la intervención (durante el primer trimestre), para analizar su capacidad predictiva de recurrencia posterior se consideraron sus valores a partir de este momento del curso postoperatorio.

Los valores de CF a los 6 meses de la cirugía fueron capaces de diferenciar, de manera estadísticamente significativa, a los pacientes que desarrollan recurrencia de aquellos que se mantienen en remisión (medianas e IQR: 227  $\mu\text{g/g}$  [119.5- 546] y 74  $\mu\text{g/g}$  [36-149], respectivamente;  $p < 0.05$ ).

El área obtenida bajo la curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para la CF fue de 0.88 (IC 95%, 0.75-0.96) (Figura 13). Al calcular el punto de corte con mejor capacidad predictiva del modelo, el resultado fue que un valor de CF  $>160$   $\mu\text{g/g}$  a los 6 meses sería el considerado como mejor predictor de recurrencia morfológica. Este punto de corte aportó una sensibilidad del 85%, una especificidad del 70%, y la ventaja de un valor predictivo negativo muy elevado, del 98%.

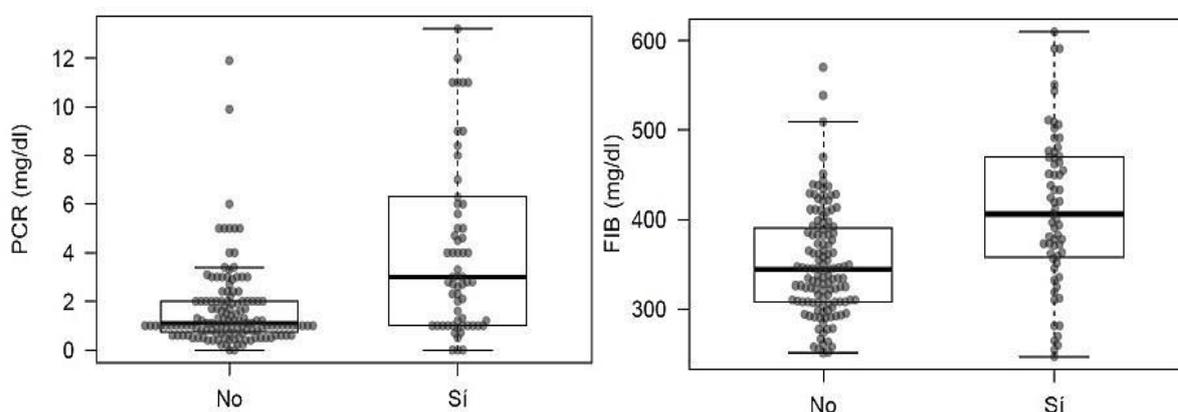
**Figura 13.** Curva ROC de la CF para predecir la presencia de recurrencia morfológica.



CF, calprotectina fecal; S, sensibilidad; E, especificidad; AUC, área bajo la curva ROC.

Los resultados del modelo aplicado a los marcadores serológicos (PCR, fibrinógeno) también confirmó la existencia de una asociación estadísticamente significativa entre estos marcadores y el riesgo de recurrencia ( $p < 0.001$ ), siendo sus valores significativamente diferentes entre los pacientes que desarrollaron recurrencia (medianas e IQR: 3 mg/L [1-6.3] y 406 mg/dL [357.5-470.5], respectivamente), y los pacientes que se mantuvieron en remisión durante el seguimiento (1.1 mg/L [0.78-2] y 344 mg/dL [308-391], respectivamente;  $p < 0.001$ ) (Figura 14).

**Figura 14.** Valores de PCR y fibrinógeno (medianas, 1er y 3er cuartil, máximo y mínimo) en los pacientes con y sin recurrencia durante el seguimiento.



Sin embargo, al analizar las curvas ROC para comparar su capacidad discriminativa de recurrencia, ésta fue menor en comparación con la de la CF, siendo el área bajo la curva ROC de 0.70 para ambos marcadores, con un IC 95% de 0.64-0.76 y 0.64-0.75, respectivamente.

### 3.3 Asociación con el índice endoscópico de Rutgeerts

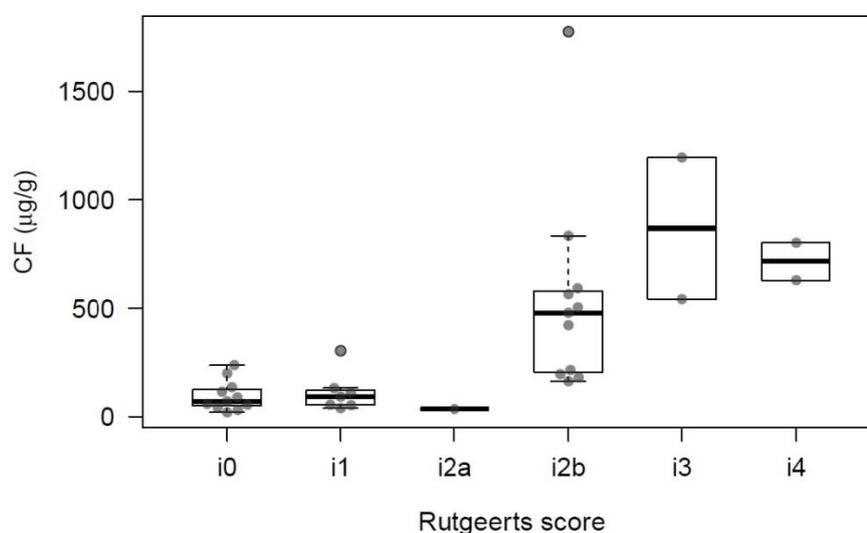
Adicionalmente al análisis principal de la asociación de las distintas variables con el riesgo de recurrencia, se realizaron dos análisis suplementarios para contrastar la asociación entre los valores de CF y los índices empleados para evaluar la recurrencia (índice endoscópico de Rutgeerts e índice radiológico de Sailer). Para la realización de estos análisis se emplearon modelos de regresión ordinal para cada uno de los índices.

Respecto a la relación de la CF con el índice endoscópico, el ajuste del modelo de regresión ordinal mostró la existencia de una asociación estadísticamente significativa entre los valores de CF y el índice de Rutgeerts, de forma que a mayores valores de CF, mayor es la probabilidad de obtener un score de Rutgeerts elevado ( $p < 0.001$ ). En la tabla del modelo se observa que el aumento de una unidad en escala logarítmica de CF lleva asociado un OR de 5.78 (IC 95%, 2.68-14.96).

	Estimate	Std. Error	exp(Estimate)	Lower 95%	Upper 95%	P-value
log(CF)	1.755	0.432	5.782	2.684	14.968	<0.001
AIC	88.65					

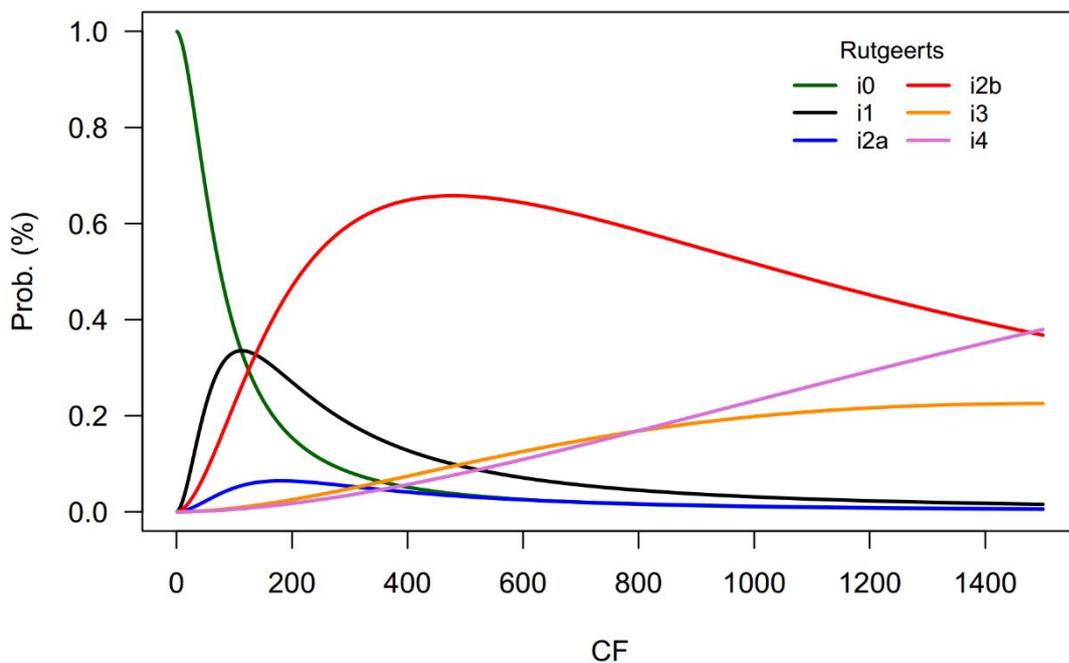
De esta forma, se observa un incremento gradual de los valores de CF en relación a la gravedad de la recurrencia endoscópica evaluada mediante el índice de Rutgeerts. Así, los valores de CF fueron significativamente más bajos en los pacientes con un score de Rutgeerts en la endoscopia i0-i2a (no recurrencia) en comparación con los que se clasificaron entre i2b-i4 (recurrencia) (medianas e IQR: 71  $\mu\text{g/g}$  [48.5-123.5] y 542  $\mu\text{g/g}$  [318.5-715.5], respectivamente;  $p < 0.001$ ; Figura 15).

**Figura 15.** Valores de CF (medianas) en función del índice endoscópico de Rutgeerts.



Dado que la interpretación de los OR ordinales es bastante compleja, también se ha representado la relación entre la CF y el índice de Rutgeerts mediante un gráfico que se presenta a continuación (Figura 16). Este gráfico se puede obtener al aplicar este tipo de análisis (regresión ordinal), que permite calcular las distintas probabilidades porcentuales de cada score de Rutgeerts según los valores de CF que presenta el paciente. En el gráfico se puede observar cómo, para valores bajos de CF, los índices bajos de Rutgeerts (especialmente i0-i1) son con diferencia los más probables. Sin embargo, conforme aumentan los valores de CF, la probabilidad del índice i0 disminuye de forma abrupta y aumentan las de los índices más elevados (i2b, i3 e i4).

**Figura 16.** Análisis de regresión ordinal que muestra la probabilidad estimada de cada uno de los scores del índice de Rutgeerts según los valores de CF.



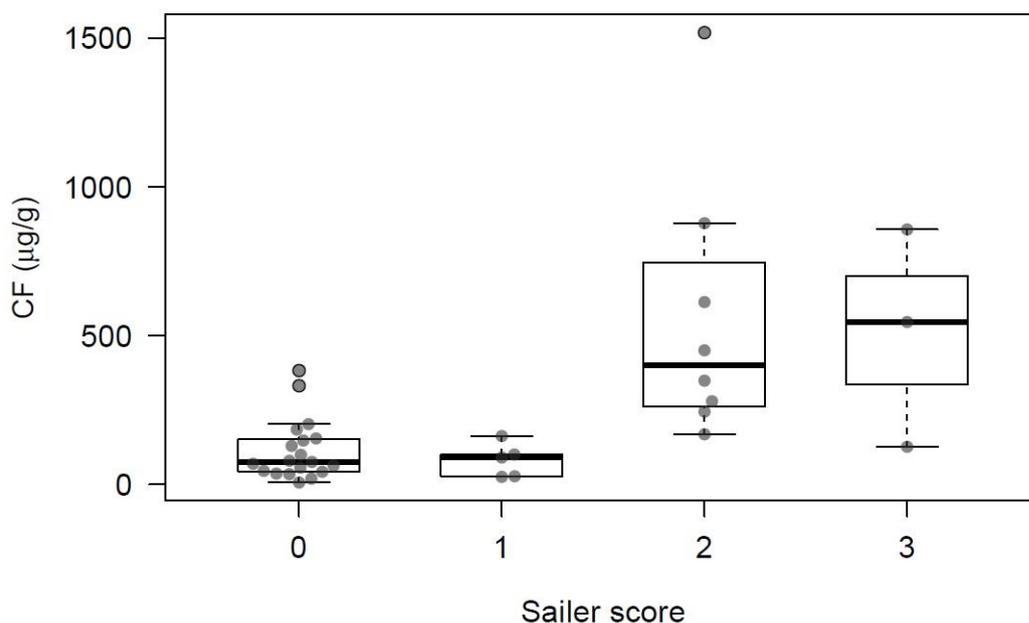
### 3.4 Asociación con el índice radiológico de Sailer

Respecto a los resultados del modelo de regresión ordinal para el índice de Sailer, aquí también se observó una asociación estadísticamente significativa entre los valores de CF y el valor del score radiológico, de forma que a mayores valores de CF, mayor es la probabilidad de obtener un valor del índice de Sailer elevado ( $p=0.001$ ). En este caso, el aumento de una unidad en escala logarítmica de CF lleva asociado un OR de 3.43 (IC 95%, 1.73-7.87) (ver tabla a continuación).

	<b>Estimate</b>	<b>Std. Error</b>	<b>exp(Estimate)</b>	<b>Lower 95%</b>	<b>Upper 95%</b>	<b>P-value</b>
log(CF)	1.233	0.382	3.432	1.73	7.873	0.001
AIC	75.02					

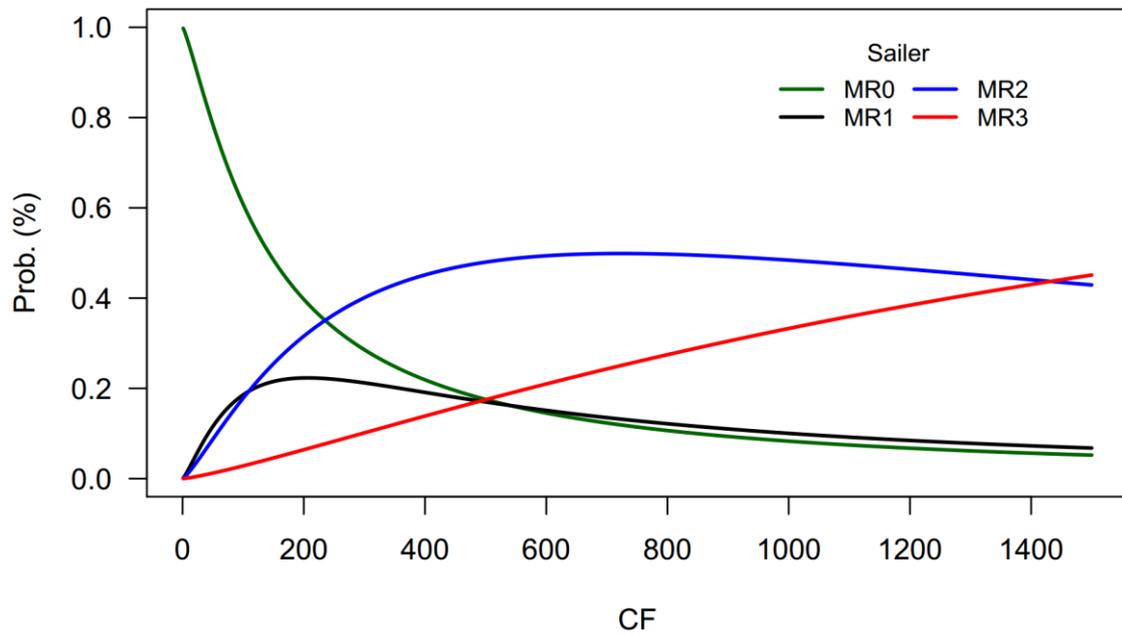
Así, los valores de CF fueron capaces de discriminar la presencia y gravedad de la recurrencia radiológica en la entero-RM, de forma que los valores de CF fueron significativamente más bajos en los pacientes con un score de Sailer MR0 o MR1 (no recurrencia) en comparación con los pacientes que fueron clasificados como MR2 o MR3 (recurrencia) (medianas e IQR: 78  $\mu\text{g/g}$  [41.5-149.75] y 451  $\mu\text{g/g}$  [262.5-735], respectivamente;  $p=0.001$ ; Figura 17).

**Figura 17.** Valores de CF (medianas) en función del índice radiológico de Sailer.



Del mismo modo que en el caso anterior, también se ha representado la relación entre la CF y el índice de Sailer mediante un gráfico que permite calcular las distintas probabilidades porcentuales de cada score de Sailer según los valores de CF que presenta el paciente, y que se muestra a continuación (Figura 18). En el gráfico se puede apreciar cómo, para valores bajos de CF, el índice MR0 es el más probable. Sin embargo, conforme aumentan los valores de CF, la probabilidad del índice MR0 disminuye de forma abrupta y aumentan las de los índices más elevados.

**Figura 18.** Análisis de regresión ordinal que muestra la probabilidad estimada de cada MR score del índice de Sailer según los valores de CF.

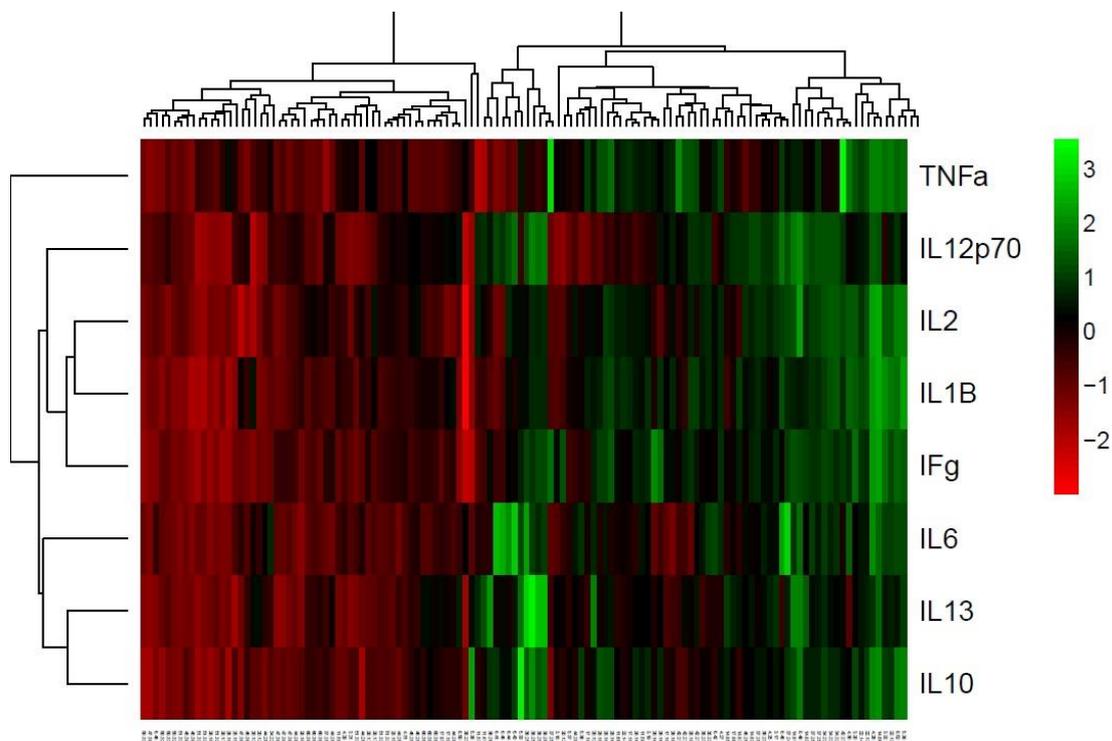


#### 4. Citoquinas plasmáticas: patrón evolutivo tras la cirugía

##### 4.1 Cambios evolutivos en el patrón de expresión de citoquinas tras la cirugía en pacientes con vs. sin recurrencia post-quirúrgica

En el análisis inicial mediante fuzzy clustering, que permite agrupar a los pacientes por similitud respecto al perfil de citoquinas plasmáticas, pudieron apreciarse dos perfiles bien diferenciados de pacientes: un grupo de pacientes con concentraciones más altas de citoquinas y otro grupo en el que predominaban globalmente concentraciones más bajas. Los diferentes perfiles se representan gráficamente mediante heat maps, que permiten apreciar visualmente cómo se agrupan los pacientes en función de la concentración de citoquinas (Figura 19). Cada columna representa un individuo y cada fila representa una citoquina. La escala de color mostrada en el lateral ilustra el nivel de expresión de las citoquinas en plasma: el color rojo representa una menor concentración y el color verde una mayor concentración.

**Figura 19.** Heat map con los resultados del fuzzy clustering, en el que los individuos son ordenados de acuerdo a la similitud en la concentración de citoquinas plasmáticas.

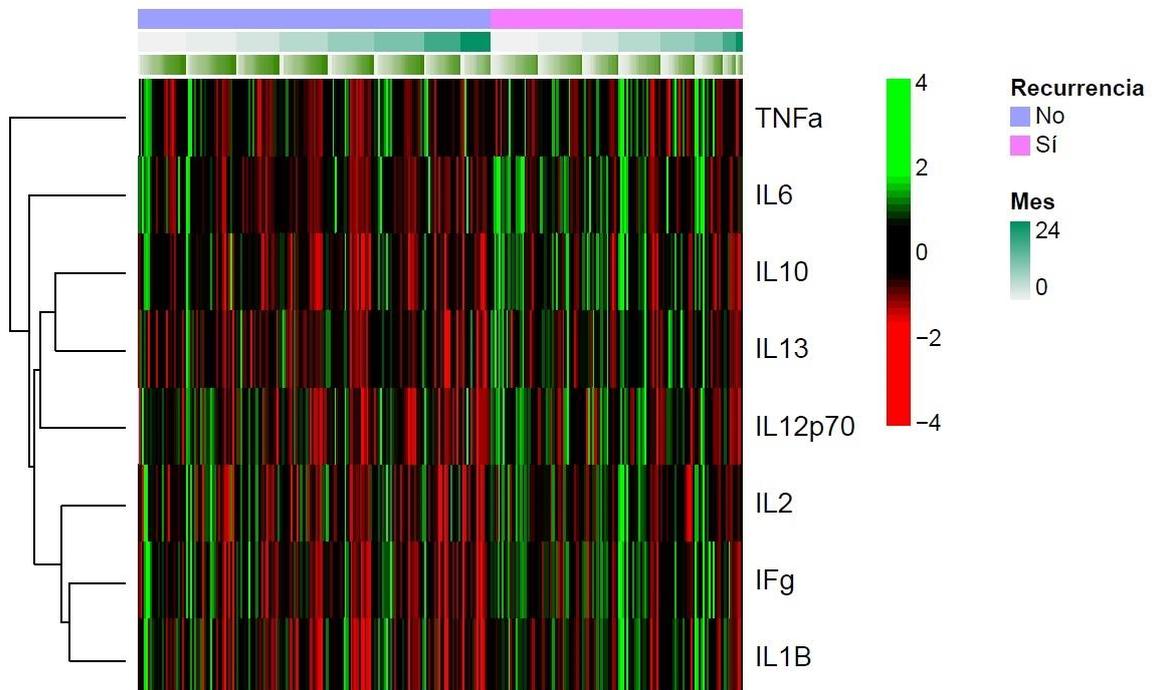


Posteriormente, se realizó un segundo análisis considerando los criterios de tiempo (evolución temporal del perfil de citoquinas) y de desarrollo de recurrencia durante el seguimiento (pacientes separados por grupos: recurrencia vs. no recurrencia).

Al considerar estos criterios, se observó que los cambios más llamativos en el patrón de expresión de citoquinas se producen en los pacientes que desarrollaron recurrencia (en comparación con el grupo sin recurrencia). Estos cambios se evidenciaron al inicio del seguimiento (tras la intervención), apreciándose concentraciones de citoquinas globalmente más elevadas en estos pacientes. Evolutivamente, se observa que este patrón cambia de nuevo con el transcurso del tiempo y vuelve a asemejarse al patrón inicial (pre-cirugía) al final del seguimiento.

En la Figura 20 se ha representado un primer heat map conjunto, que permite comparar visualmente ambos grupos (no recurrencia a la izquierda vs. recurrencia a la derecha) considerando la evolución temporal de las concentraciones de citoquinas en ambos grupos tras la cirugía.

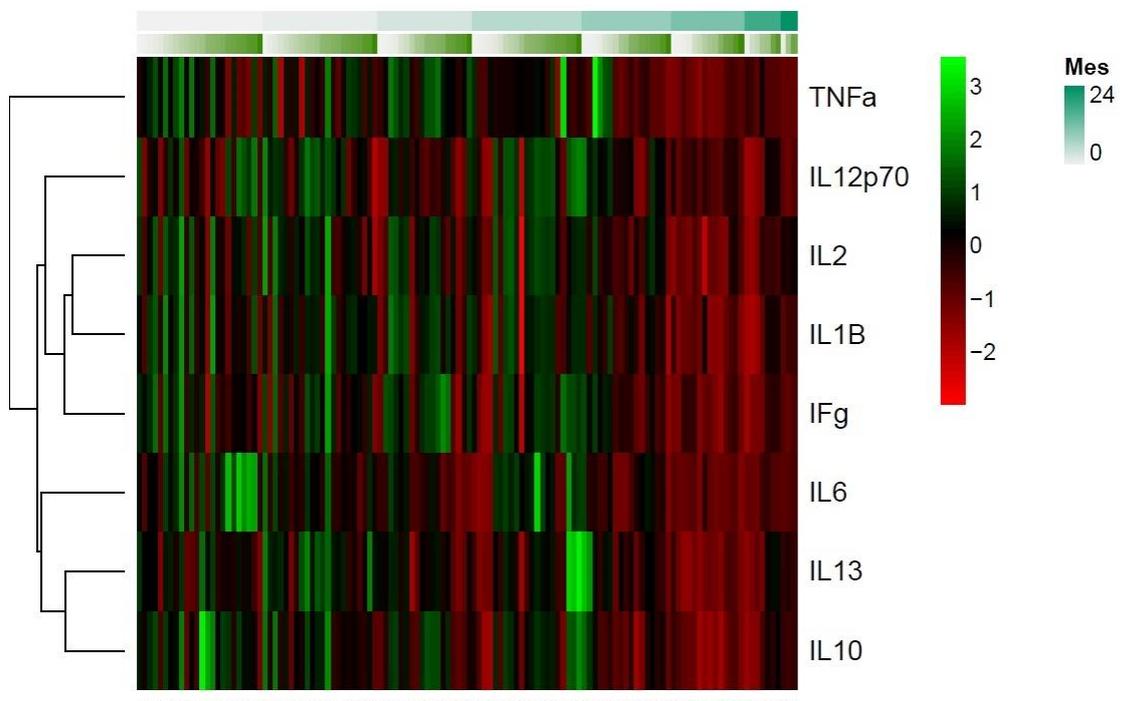
**Figura 20.** Heat map conjunto (grupo no recurrencia a la izquierda vs. grupo recurrencia a la derecha) que permite comparar visualmente la evolución temporal de la concentración de citoquinas post-cirugía en ambos grupos.



Estas diferencias en la concentración de citoquinas plasmáticas se hacen más evidentes visualmente al representar por separado ambos grupos. A continuación, en las Figuras 21 y 22, se muestran los heat maps separados para cada uno de los grupos (pacientes con y sin recurrencia, respectivamente).

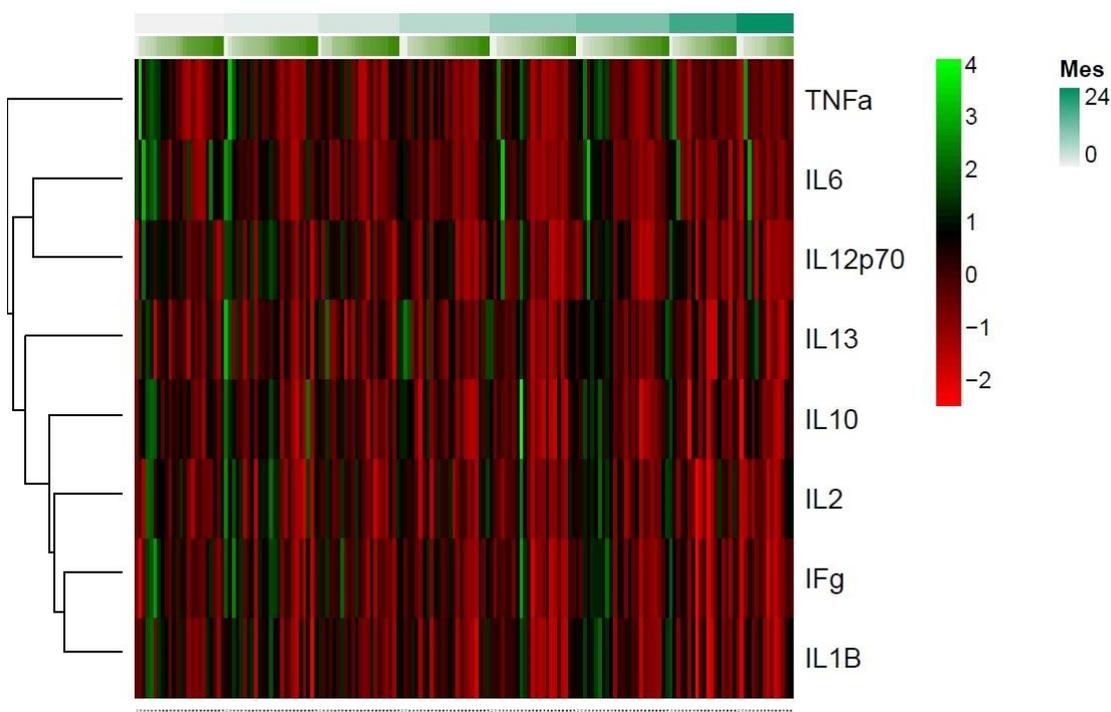
En los pacientes con recurrencia se aprecia un claro predominio de concentraciones elevadas al inicio (tras la intervención y durante el primer año post-cirugía), representado en el gráfico por el predominio de color verde, y se puede observar cómo al final del seguimiento (a partir de los 12-18 meses, según pacientes), se evidencia una disminución global de sus valores, representado en el gráfico por el predominio de color rojo (Figura 21).

**Figura 21.** Heat map representando los valores de concentración de citoquinas para cada paciente (grupo recurrencia) durante el seguimiento post-quirúrgico.



Comparativamente, sin embargo, no se evidenciaron cambios llamativos en los perfiles de expresión de citoquinas durante el curso postoperatorio en el grupo de pacientes que se mantuvieron en remisión (sin recurrencia), que mantuvieron concentraciones plasmáticas más bajas (predominio de color rojo) durante todo el seguimiento (Figura 22).

**Figura 22.** Heat map representando los valores de concentración de citoquinas para cada paciente (grupo no recurrencia) durante el seguimiento post-quirúrgico.

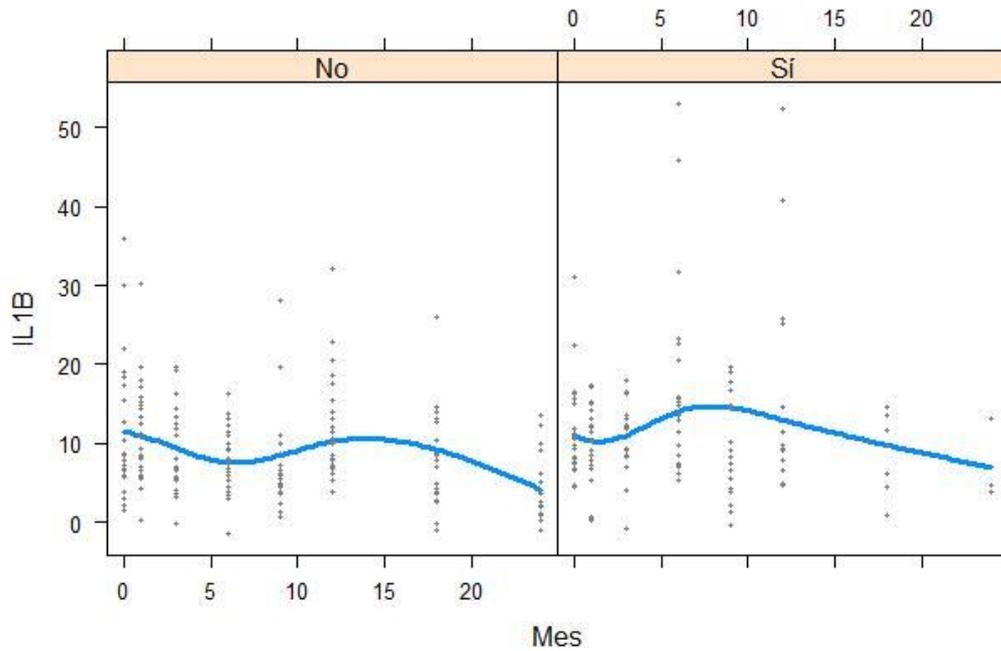


#### 4.2 Análisis individualizado de las citoquinas plasmáticas

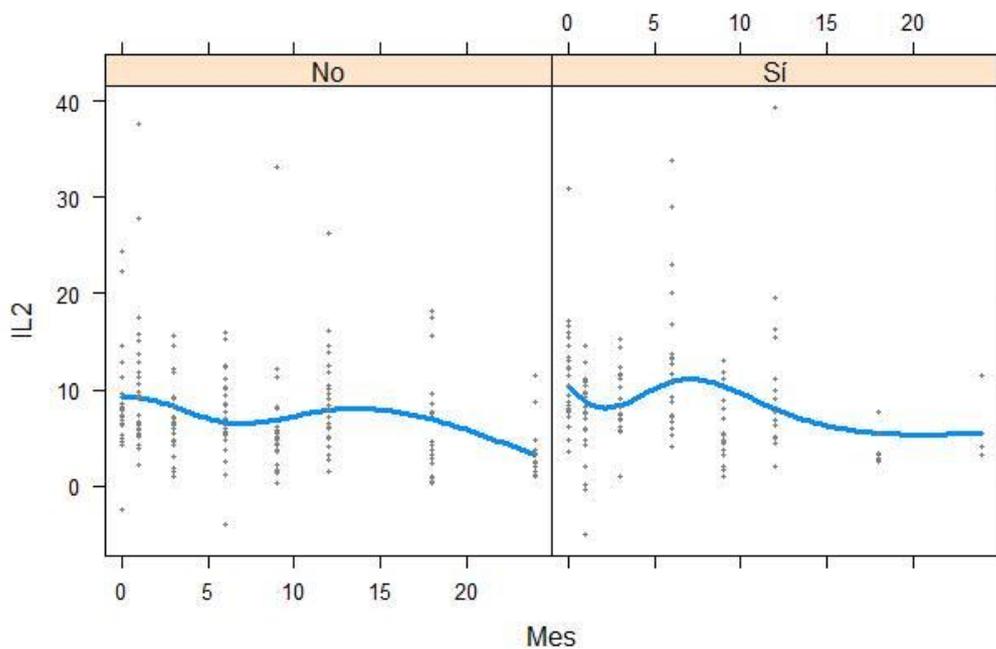
Tras el análisis inicial considerando los perfiles de expresión de las citoquinas plasmáticas, se procedió a analizar de forma individualizada cada una de las citoquinas consideradas (IL1- $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, IL-12p70, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ), con el objeto de caracterizar de forma pormenorizada la evolución de cada una de ellas a lo largo del tiempo en ambos grupos y evaluar la potencial utilidad de una o más de dichas citoquinas para diferenciar a los pacientes que recurren de forma precoz de los que no recurren.

A continuación se representa la evolución individual, a lo largo del tiempo, de las concentraciones de cada una de las citoquinas analizadas (de forma comparativa entre el grupo de pacientes con y sin recurrencia) (Figuras 23-30):

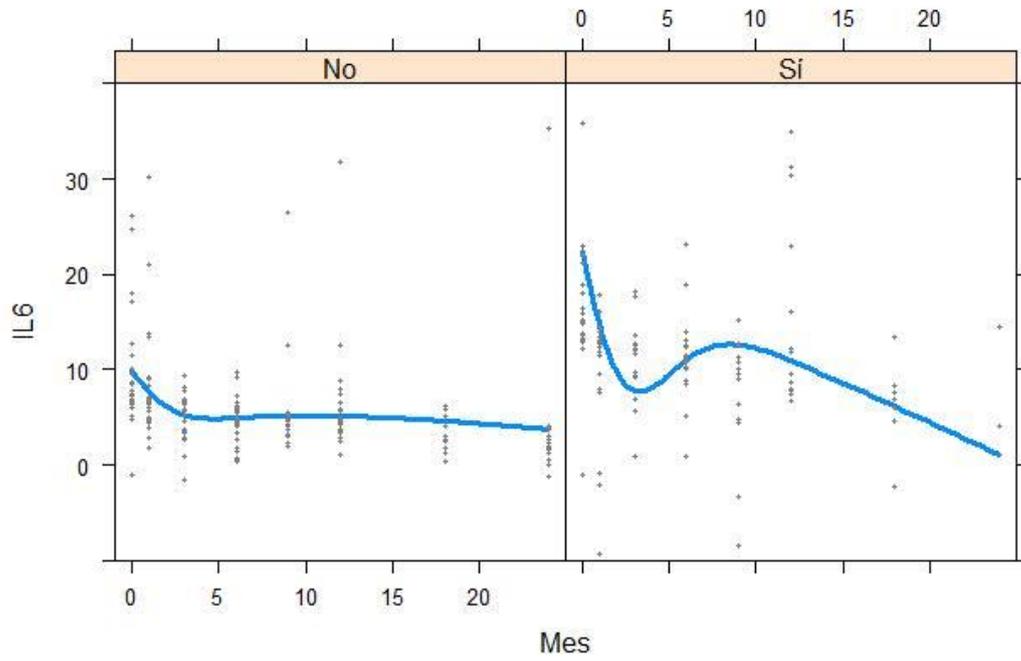
**Figura 23.** Evolución temporal de la IL-1 $\beta$  en pacientes con y sin recurrencia.



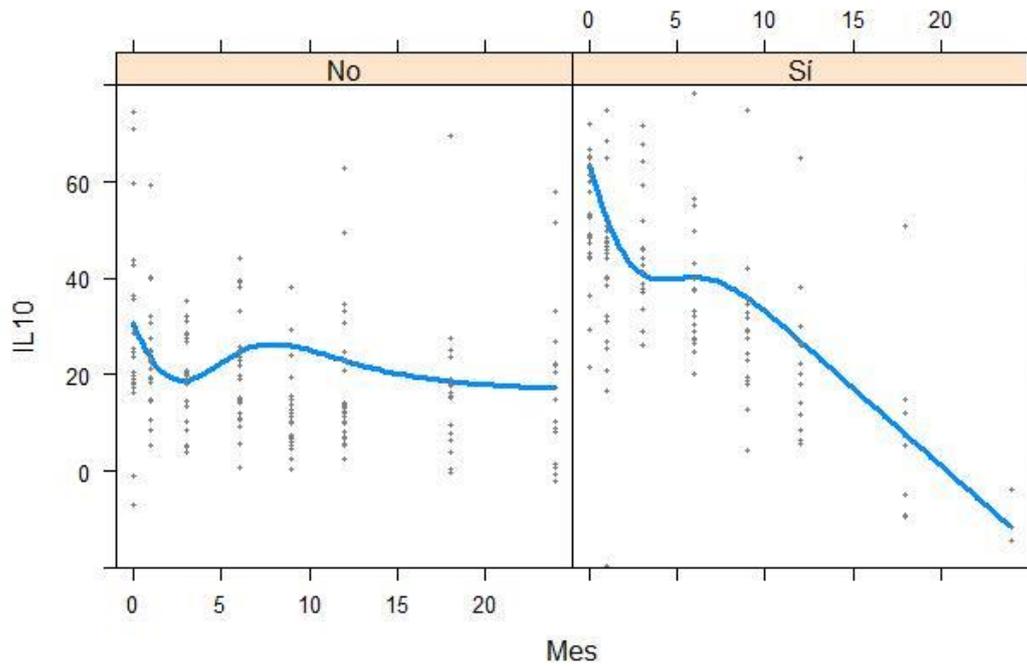
**Figura 24.** Evolución temporal de la IL-2 en pacientes con y sin recurrencia.



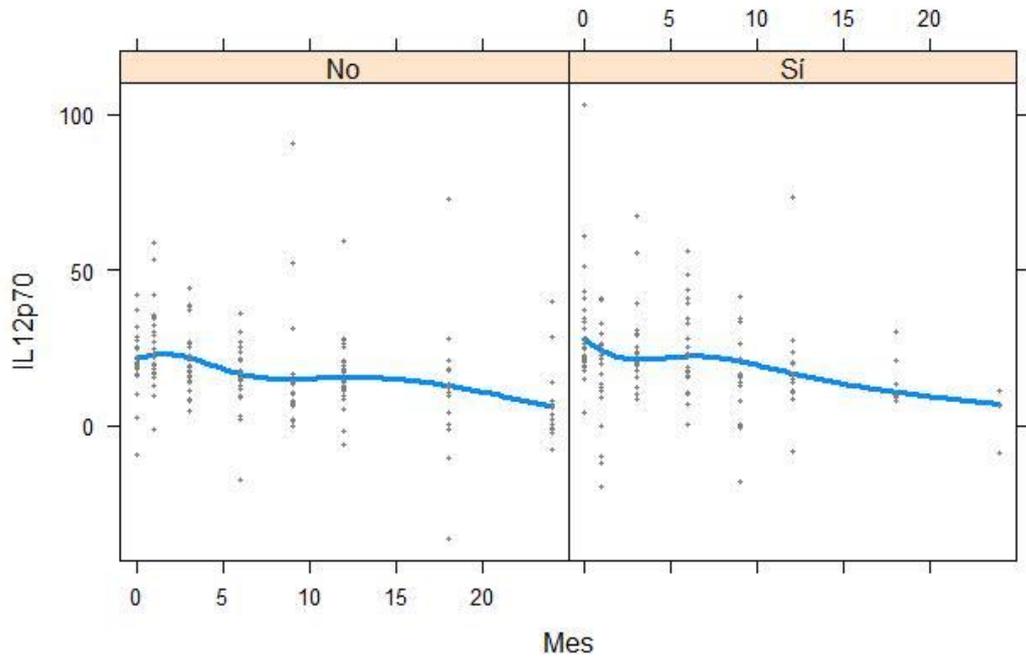
**Figura 25.** Evolución temporal de la IL-6 en pacientes con y sin recurrencia.



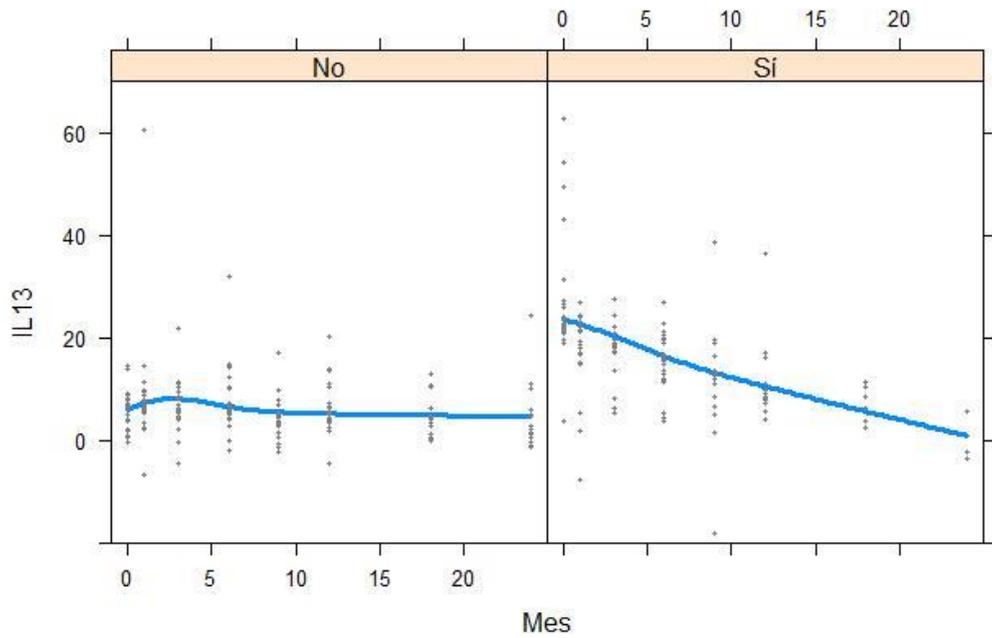
**Figura 26.** Evolución temporal de la IL-10 en pacientes con y sin recurrencia.



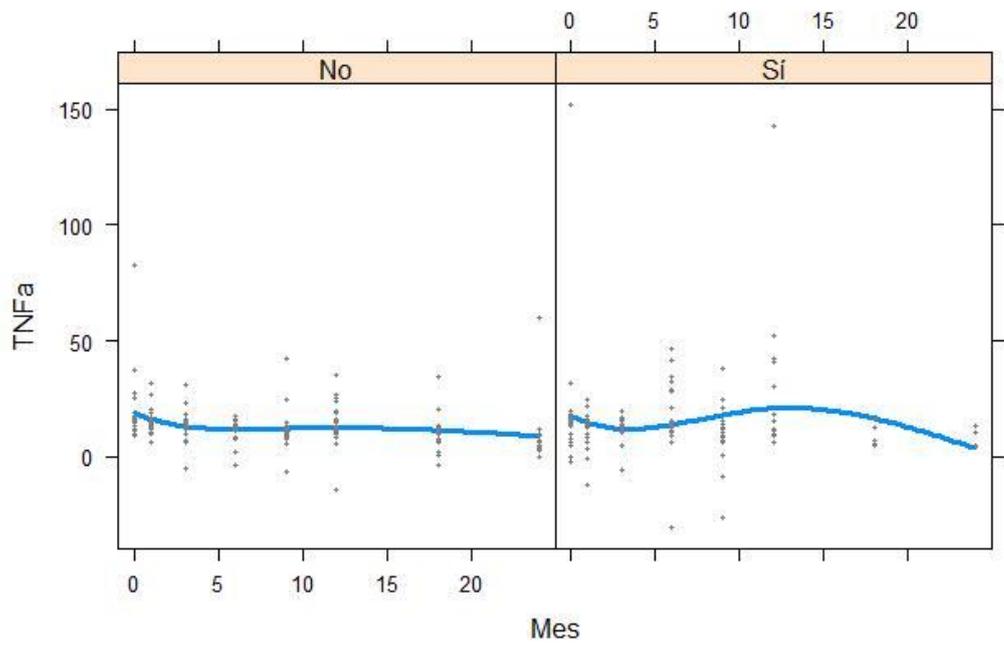
**Figura 27.** Evolución temporal de la IL-12p70 en pacientes con y sin recurrencia.



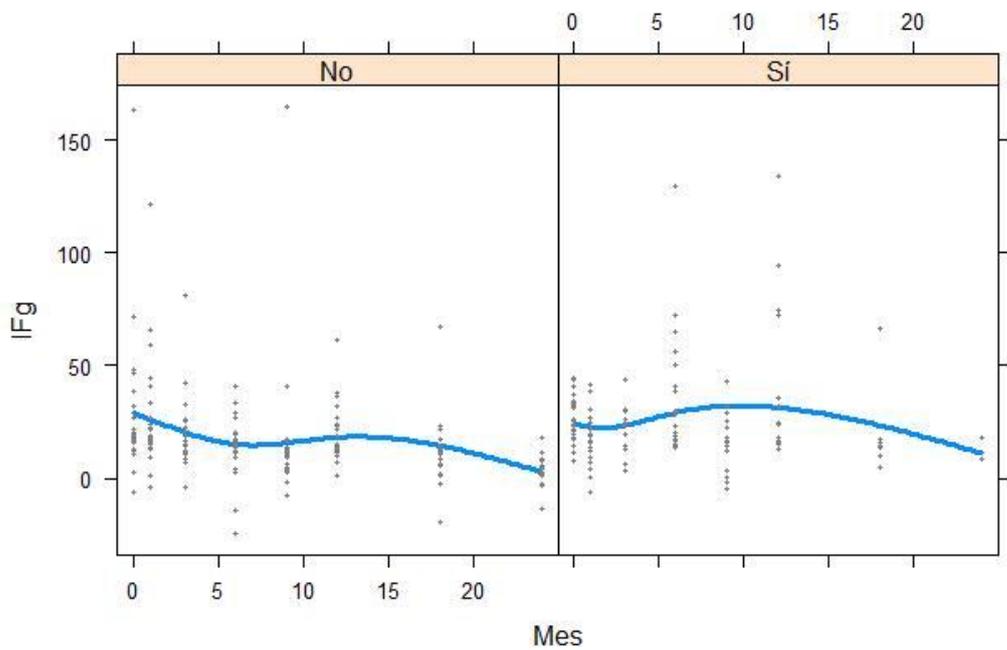
**Figura 28.** Evolución temporal de la IL-13 en pacientes con y sin recurrencia.



**Figura 29.** Evolución temporal del TNF- $\alpha$  en pacientes con y sin recurrencia.



**Figura 30.** Evolución temporal del IFN- $\gamma$  en pacientes con y sin recurrencia.



Como se ha comentado en el apartado anterior, y a diferencia de lo que sucede con la CF, en el caso de las citoquinas plasmáticas los valores que parecen diferenciar más claramente a los pacientes con recurrencia de aquellos que se mantienen en remisión, son los valores al principio del seguimiento, que son más elevados en los pacientes que desarrollan recurrencia de forma precoz.

Posteriormente, con el transcurso de los meses tras la cirugía, los valores se van igualando entre un grupo y el otro. Para analizar en profundidad posibles diferencias entre ambos, se realizaron distintos test de Wilcoxon para cada variable, con el fin de evaluar una posible relación con la recurrencia en los distintos tiempos.

En la mayoría de las citoquinas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en los distintos tiempos, a excepción de tres de ellas: la IL-13 a tiempo cero (pre-cirugía), y la IL-6 e IFN- $\gamma$  a los 6 meses post-cirugía.

En la IL-10 a tiempo cero, aunque se observó una tendencia diferente en su evolución entre ambos grupos, esta diferencia no alcanzó el límite de la significación estadística, a pesar de lo cual hemos creído interesante reseñar esta tendencia en la descripción de los resultados.

En la tabla que se expone a continuación se resumen los resultados mencionados:

Variable	Tiempo (meses)	AUC (IC 95%)	P valor
IL-13	0	0.73 (0.58-0.88)	0.006
IL-10	0	0.64 (0.48-0.80)	0.097
IL-6	6	0.67 (0.50-0.85)	0.044
IFN- $\gamma$	6	0.71 (0.55-0.87)	0.021

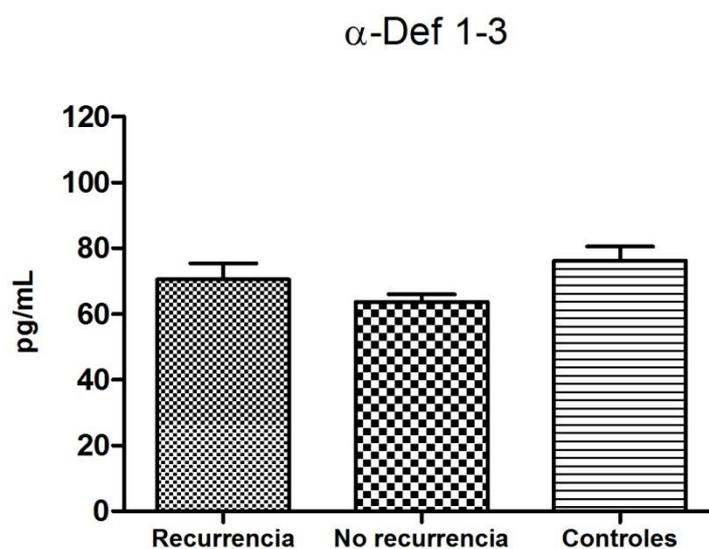
A continuación, se recogen las concentraciones medias (en pg/ml) que se obtuvieron de cada una de estas citoquinas en ambos grupos y en los tiempos mencionados:

Variable	Tiempo (meses)	Recurrencia	No recurrencia
IL-13	0	32.55	7.26
IL-10	0	74.92	26.19
IL-6	6	10.17	3.64
IFN- $\gamma$	6	27.71	15.12

### 5. Análisis de las $\alpha$ -defensinas plasmáticas en el contexto post-quirúrgico

Por otro lado, al analizar y comparar las concentraciones plasmáticas de las  $\alpha$ -Def 1–3, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el subgrupo de pacientes que desarrollaron recurrencia post-quirúrgica y los pacientes que se mantuvieron en remisión durante el seguimiento ( $p=0.16$ ), siendo las concentraciones medias similares entre ambos grupos y en comparación con las de los controles (Figura 31).

**Figura 31.** Concentraciones plasmáticas de  $\alpha$ -Def 1–3 entre los pacientes con vs. sin recurrencia post-quirúrgica y los controles sanos.



## **6. Índice predictivo combinado de recurrencia precoz tras la cirugía**

Con las variables identificadas en los análisis previos con capacidad predictora del riesgo de recurrencia (CF, IL-13 pre-quirúrgica, IL-6 e IFN- $\gamma$  a los 6 meses) se procedió al ajuste de un modelo multivariable.

En este análisis multivariante se incluyeron, además, el resto de variables demográficas, clínicas y analíticas recogidas, con el fin de evaluar su utilidad en la predicción de la recurrencia post-quirúrgica precoz y desarrollar un índice predictivo combinado con las variables resultantes.

A continuación se resumen las variables incluidas en el modelo: sexo, edad en el momento de la intervención, hábito tabáquico tras la cirugía, años de evolución de la enfermedad en el momento de la intervención, localización y patrón de comportamiento según la clasificación de Montreal, presencia de enfermedad perianal, resecciones previas, indicación de la cirugía, tipo de resección, tratamiento de prevención de la recurrencia, marcadores serológicos de actividad (PCR y fibrinógeno), así como las variables identificadas previamente con capacidad predictiva (CF, IL-13 pre-quirúrgica, IL-6 e IFN- $\gamma$  a los 6 meses post-cirugía).

Los resultados finales del análisis multivariante (análisis complejo que considera a cada una de las variables incluidas en el modelo teniendo en cuenta el efecto que ejercen las demás), se presentan a continuación. De todas las variables incluidas en el análisis, y según los datos obtenidos de nuestra cohorte de pacientes, únicamente los valores de CF, IL-6 e IFN- $\gamma$  a los 6 meses post-cirugía se identificaron como factores de riesgo para desarrollar una recurrencia post-quirúrgica precoz, mientras que la asociación de tratamiento profiláctico tras la cirugía se identificó como el único factor protector. En la tabla 13 se muestran los resultados iniciales del algoritmo de selección aplicado por el modelo, con las variables identificadas como significativas, y en la tabla 14 se muestra el modelo multivariable final obtenido, con las respectivas OR de cada variable.

**Tabla 13.** Resultados del algoritmo de selección del análisis multivariante.

	Coefficient	OR
(Intercept)	-0.049	-
Sexo	-	-
Edad	-	-
Años de evolución	-	-
Hábito tabáquico	-	-
Localización	-	-
Patrón comportamiento	-	-
Perianal	-	-
Resecciones previas	-	-
Tipo de resección	-	-
Pfx recurrencia	-1.14	0.32
CF (>160)	0.00026	1.08
PCR	-	-
FIB	-	-
IL-6 (6 m)	0.023	1.47
IL-13 (0 m)	-	-
IFN- $\gamma$ (6 m)	0.013	1.51

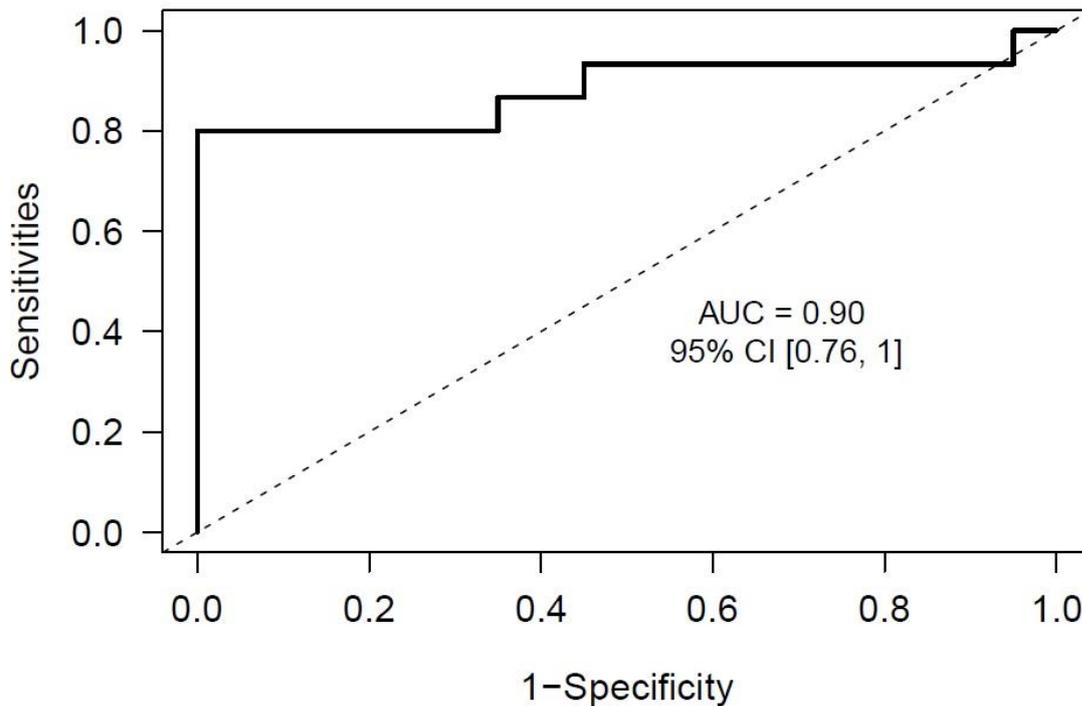
Pfx, Profilaxis o tratamiento de prevención de la recurrencia; CF, calprotectina fecal; IL-6, interleuquina 6; IL-13, interleuquina 13; IFN- $\gamma$ , interferón gamma. (Nota: los valores de CF, IL-6 e IFN- $\gamma$  son los correspondientes a los 6 meses post-cirugía).

**Tabla 14.** Modelo multivariable final a partir de las variables identificadas, con sus respectivas OR.

	Coefficient	OR
(Intercept)	3.15	-
Pfx recurrencia	-7.00	0.001
CF (> 160)	1.11	3.03
IL-6 (6m)	0.34	1.40
IFN- $\gamma$ (6m)	0.03	1.03

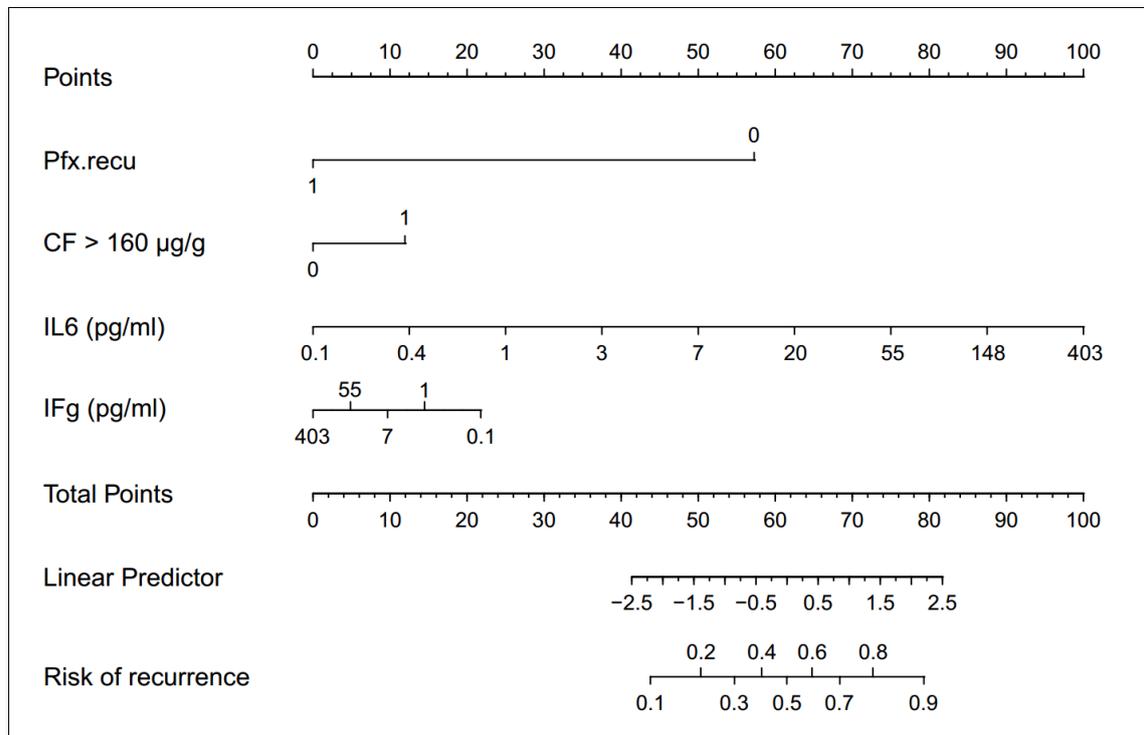
La capacidad predictiva de recurrencia del modelo fue excelente, con un área bajo la curva (AUC) de 0.90 (IC 95% [0.76-1]), por lo que se considera un buen modelo predictivo (Figura 32).

**Figura 32.** Curva ROC del modelo predictivo combinado para la predicción de la recurrencia post-quirúrgica.



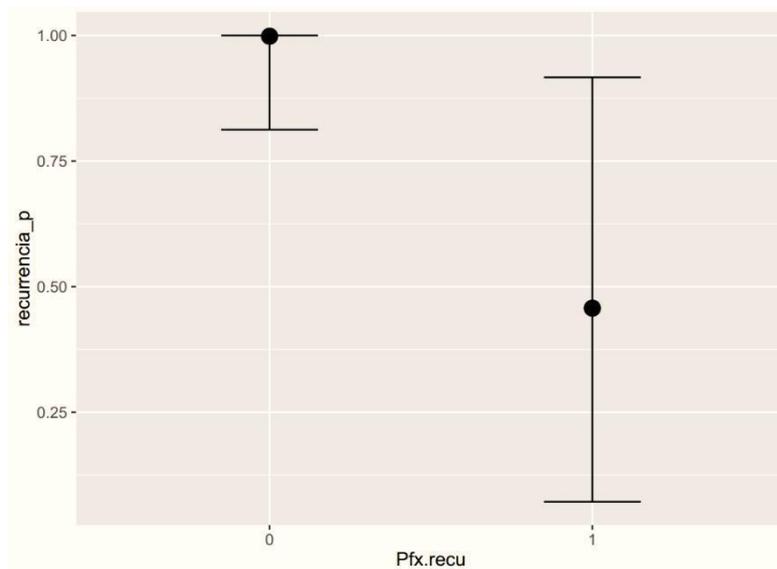
A partir de estos resultados, se elaboró una representación del modelo predictivo mediante un nomograma, que facilita la aplicación práctica del modelo para la realización de predicciones. Para realizar predicciones con el nomograma, se asigna una puntuación a cada variable según la escala superior de puntuación, se suman todos los puntos que presenta el paciente para cada una de las variables y se realiza la predicción final del riesgo de recurrencia mediante las escalas inferiores del nomograma (Figura 33).

**Figura 33.** Nomograma ajustado a partir del modelo de supervivencia multivariable para la predicción de recurrencia.

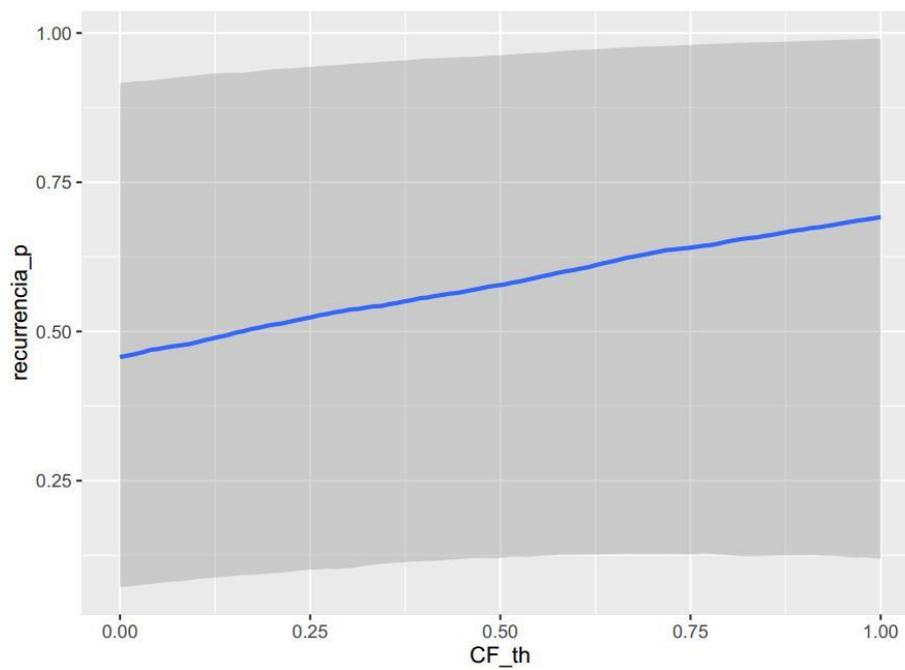


Para poder interpretar mejor los efectos de cada variable en el modelo de supervivencia, se han estimado gráficas de dependencia parcial para cada una de las variables predictoras del modelo. Las gráficas de dependencia parcial se producen al realizar predicciones con el modelo variando los valores de una de las variables predictoras cada vez y manteniendo las demás variables constantes. De esta manera se pueden interpretar los efectos de cada variable de una manera mucho más intuitiva que en la tabla de los coeficientes del modelo. Las gráficas de dependencia parcial del modelo multivariable de supervivencia se presentan a continuación (Figuras 34-37).

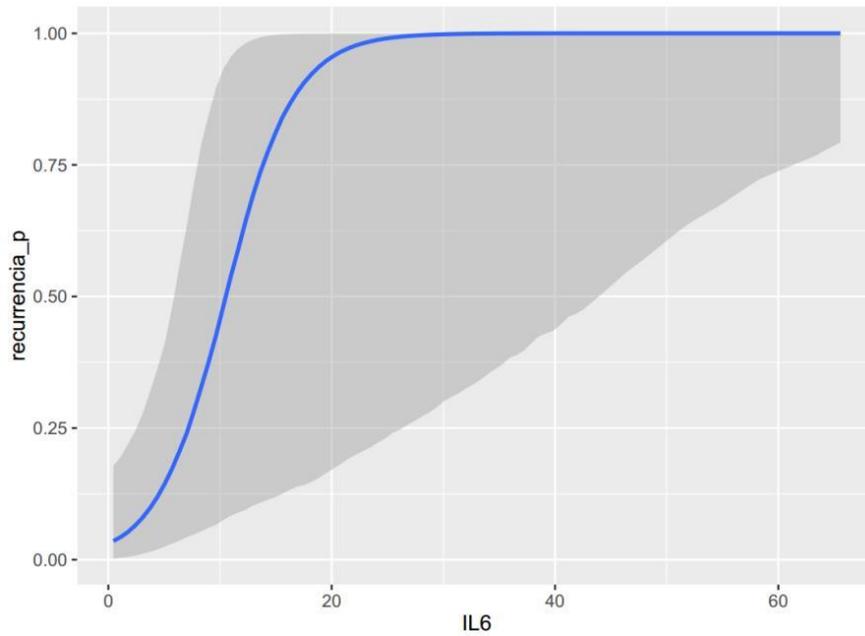
**Figura 34.** Gráfico que muestra el efecto de la variable profilaxis en el riesgo de recurrencia según el modelo multivariable.



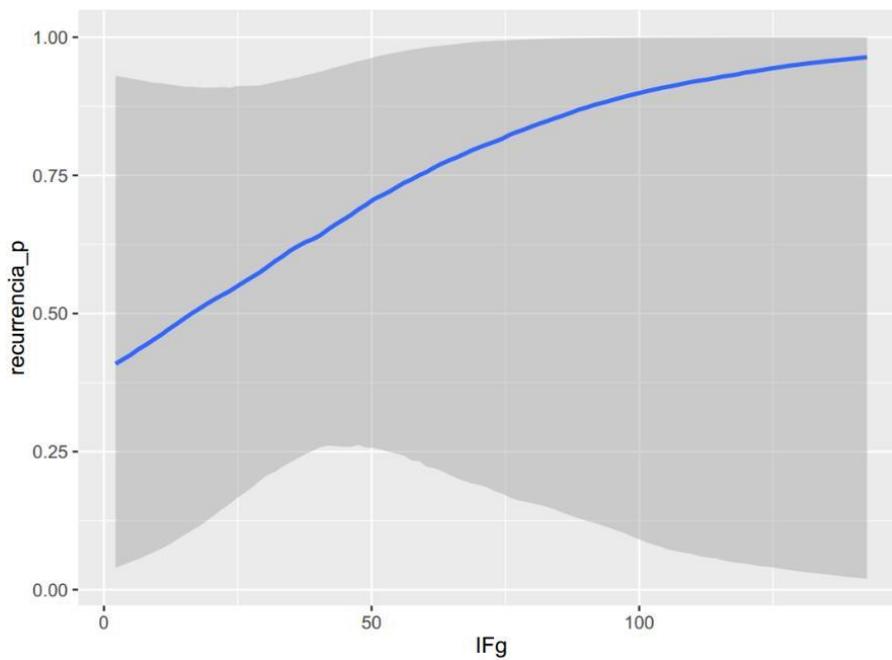
**Figura 35.** Gráfico que muestra el efecto de los valores de CF en el riesgo de recurrencia según el modelo multivariable.



**Figura 36.** Gráfico que muestra el efecto de los valores de IL-6 en el riesgo de recurrencia según el modelo multivariable.



**Figura 37.** Gráfico que muestra el efecto de los valores de IFN- $\gamma$  en el riesgo de recurrencia según el modelo multivariable.



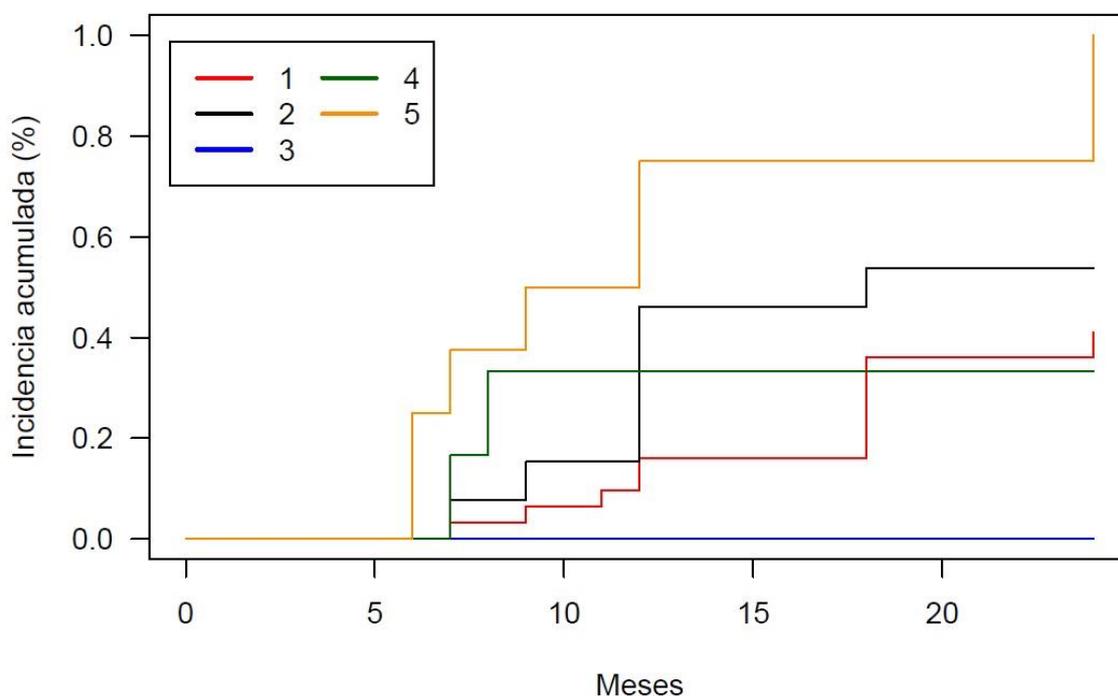
Respecto a la profilaxis, identificada como factor protector en el modelo, el gráfico (Figura 34) muestra cómo la probabilidad de recurrencia disminuye drásticamente en los pacientes que llevan tratamiento de prevención post-cirugía en comparación con los pacientes que no llevan tratamiento, en los que la probabilidad de recurrencia precoz es prácticamente del 100%.

Estos datos reflejan lo que sucede en nuestra cohorte de pacientes analizada, en la cual, de los pacientes que no llevaban tratamiento de prevención de la recurrencia tras la cirugía (n=7), todos presentaron recurrencia durante el seguimiento (7/7, 100%), mientras que de los pacientes que sí llevaban tratamiento profiláctico (n=52), menos de la mitad desarrollaron recurrencia durante el seguimiento (20/32, 38.5%).

Profilaxis	Recurrencia (n)	
	No	Sí
No	0	7
Sí	32	20

Al analizar la incidencia acumulada de recurrencia a los 2 años en nuestra cohorte en función del tipo de tratamiento de prevención tras la cirugía, se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos ( $p < 0.001$ ). En los pacientes que no llevaron tratamiento de prevención tras la cirugía (n=7), la incidencia acumulada de recurrencia a los 2 años fue del 100%, en comparación con los pacientes en los que se instauró tratamiento de prevención, en los que la incidencia acumulada de recurrencia durante el seguimiento fue significativamente menor: 40% en el grupo con tiopurinas (n=33), 52% en el grupo con biológicos (n=14) y 30.5% en el grupo con mesalazina a dosis altas (n=6). El paciente que llevó tratamiento combinado (inmunosupresor y biológico) tras la cirugía no presentó recurrencia durante el seguimiento (Figura 38).

**Figura 38.** Incidencia acumulada de recurrencia post-quirúrgica a los 2 años según tipo de tratamiento preventivo.



1, Tiopurinas; 2, Biológicos; 3, Tratamiento combinado; 4, Mesalazina a dosis altas ; 5, Ningún tratamiento.

En la siguiente tabla se muestra la probabilidad acumulada de recurrencia (%) en el primer y segundo año post-cirugía en cada uno de los grupos:

	<b>1er año</b>	<b>2º año</b>
Grupo 1	9.8%	40%
Grupo 2	47%	52%
Grupo 3	0	0
Grupo 4	30.5%	30.5%
Grupo 5	75.5%	100%

## **7. MicroRNAs: análisis inicial**

Para el análisis inicial de los microRNAs se compararon las muestras de plasma obtenidas en los siguientes tiempos:

1. En el momento previo a la cirugía.
2. A los tres meses de la cirugía.
3. Al año de la cirugía o en el momento de confirmarse la recurrencia (morfológica).

Así, se separaron las muestras en seis grupos diferentes en función de los tiempos mencionados así como de la presencia o no de recurrencia durante el seguimiento. Se han simplificado los diferentes grupos analizados con las siguientes abreviaturas:

- 1R. Recurrencia (muestra pre-cirugía).
- 2R. Recurrencia (muestra a los tres meses de la cirugía).
- 3R. Recurrencia (muestra al año de la cirugía o en el momento de confirmarse la recurrencia morfológica).
  
- 1NR. No recurrencia (muestra pre-cirugía).
- 2NR. No recurrencia (muestra a los tres meses de la cirugía).
- 3NR. No recurrencia (muestra al año de la cirugía).

### **7.1 Número de microRNAs detectados**

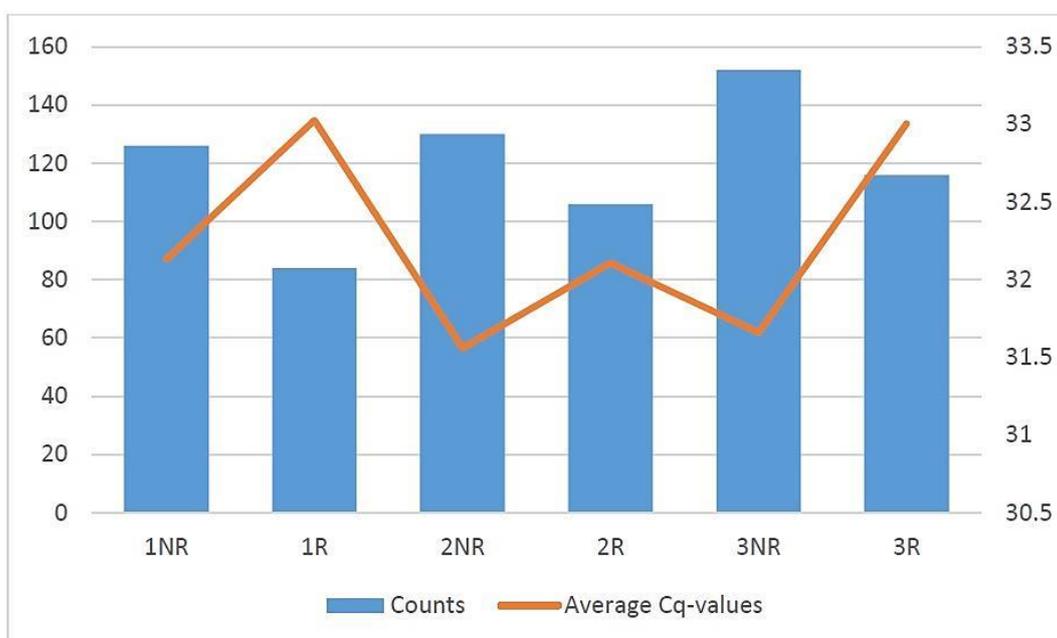
Mediante el análisis de PCR en tiempo real se identificaron 47 microRNAs presentes en todas las muestras, con un promedio de 119 microRNAs detectables por muestra (Tabla 15).

**Tabla 15.** Total de microRNAs presentes en el kit empleado para la reacción de PCR (miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR Human Panel I+II), total de microRNAs que fueron detectables en todas las muestras y promedio de microRNAs detectables por muestra.

	Number of assays
miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR Human Panel I+II	752
Assays with signal in all samples	47
Average number of assays detected per sample	119

En la siguiente figura (Figura 39) se muestra el número de microRNAs detectados en las muestras, así como el valor Cq de la media global para cada una de las muestras. Las barras azules representan el número de microRNAs detectados y la línea naranja muestra el valor medio de Cq para los microRNAs expresados comúnmente.

**Figura 39.** Ilustración gráfica del contenido de microRNAs en las muestras.

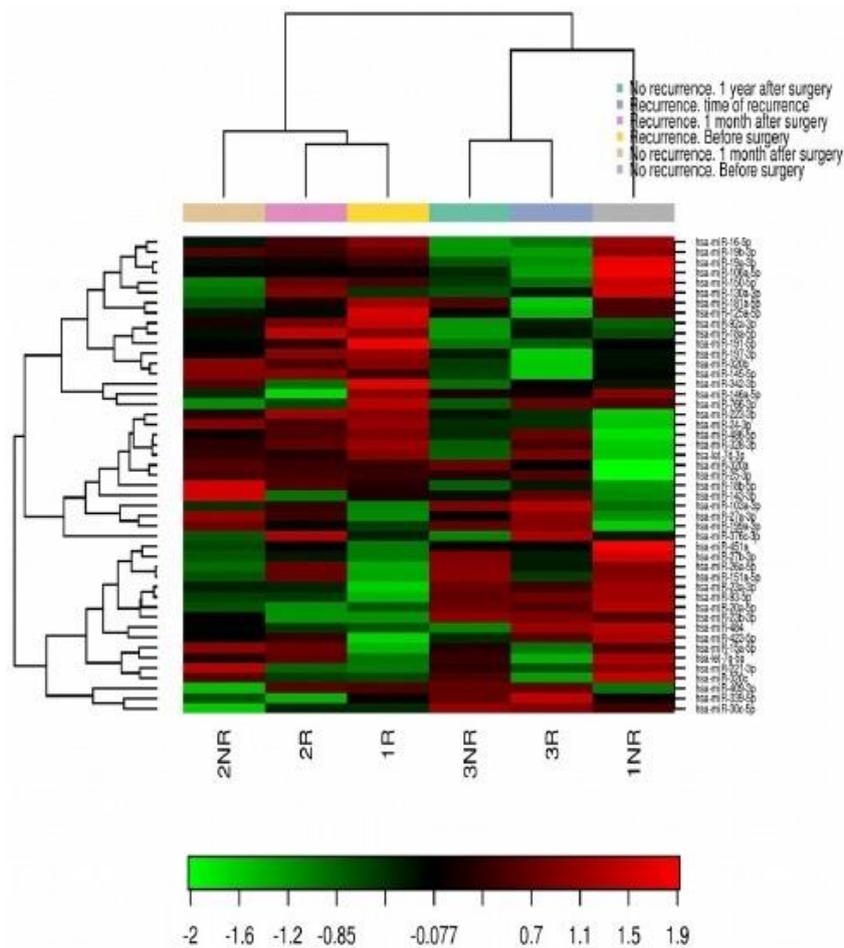


## 7.2 Nivel de expresión de microRNAs en las muestras

Mediante un diagrama tipo Heat map se muestra a continuación el resultado del agrupamiento jerárquico de microRNAs en las muestras de plasma (Figura 40). Cada fila representa un microRNA y cada columna representa una muestra.

El árbol de agrupación de microRNAs se muestra a la izquierda. La escala de color mostrada en la parte inferior ilustra el nivel de expresión relativa de un microRNA en todas las muestras: el color rojo representa un nivel de expresión más elevado y el color verde representa menores niveles de expresión.

**Figura 40.** Heat map y agrupación jerárquica (clustering). La agrupación de microRNAs se realiza en todas las muestras, y en la parte superior se muestran los 47 microRNAs con mayor desviación estándar. Se han utilizado los valores normalizados (dCq) para el análisis.



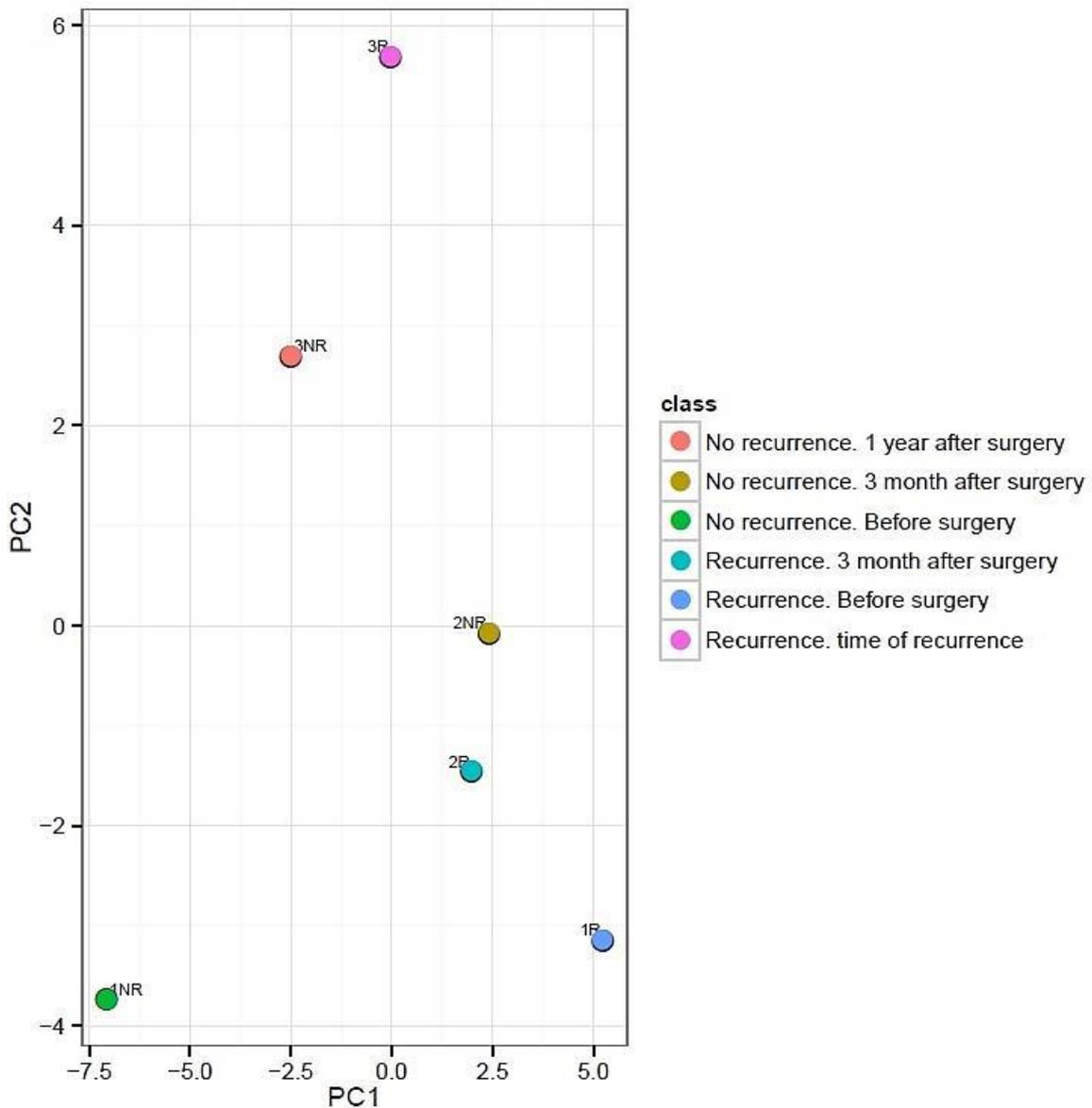
### 7.3 Análisis de Componentes Principales o PCA plot

El Análisis de Componentes Principales (o PCA por sus siglas en inglés: *Principal Component Analysis*) es un método que se emplea para reducir la dimensión de grandes conjuntos de datos y permite explorar de una manera sencilla las clases de muestra surgidas naturalmente según el perfil de expresión.

Al incluir los 47 microRNAs con mayor variación entre todas las muestras, se obtiene una visión general de cómo se divide el conjunto de muestras en base a esta variación. Si las diferencias biológicas entre las muestras son pronunciadas, éste será un componente primario de la variación. Esto conduce a la separación de las muestras en diferentes regiones de una parcela PCA en función de su biología. El componente más grande de la variación se representa en el eje X (PC1) y el segundo mayor se representa en el eje Y (PC2). Se han utilizado los valores normalizados (dCq) para el análisis.

En el PCA Plot las mayores diferencias se apreciaron en las muestras pre-cirugía (1NR vs. 1R), con mayor variación en el eje X (PC1), seguidas de las muestras al año (3NR vs. 3R) con mayor variación en el eje Y (PC2) (Figura 41).

**Figura 41.** MicroRNAs: PCA Plot.



#### 7.4 Expresión diferencial de microRNAs en recurrencia vs. no recurrencia

Cuando se compararon los diferentes grupos considerados entre sí, en todos los casos se identificaron diversos microRNAs expresados diferencialmente (más de dos veces) entre los grupos. En las tablas expuestas a continuación (Tablas 16-18) se muestran los resultados individuales para los 20 microRNAs identificados con mayor expresión diferencial (considerando como puntos de corte un “fold-change” > 3 o < -3) entre cada uno de los grupos comparados en los diferentes tiempos.

**Tabla 16.** MicroRNAs con expresión diferencial pre-cirugía entre los pacientes con y sin recurrencia morfológica posterior durante el seguimiento (1R vs 1NR).

miRname	SD Recurrence. Before surgery	SD No recurrence. Before surgery	Average dCq Recurrence. Before surgery	Average dCq No recurrence. Before surgery	Fold change
<a href="#">hsa-miR-20a-5p</a>	ND	ND	-2.5	3.2	-54
<a href="#">hsa-miR-126-3p</a>	ND	ND	0.51	-5.1	49
<a href="#">hsa-miR-93-5p</a>	ND	ND	-3.8	1.5	-38
<a href="#">hsa-miR-25-3p</a>	ND	ND	0.46	-4.4	29
<a href="#">hsa-miR-199a-5p</a>	ND	ND	-5.4	-0.91	-23
<a href="#">hsa-miR-122-5p</a>	ND	ND	-0.75	-5.0	20
<a href="#">hsa-miR-660-5p</a>	ND	ND	-6.2	-2.1	-17
<a href="#">hsa-miR-148a-3p</a>	ND	ND	-5.8	-2.0	-14
<a href="#">hsa-miR-483-5p</a>	ND	ND	-3.6	-7.3	14
<a href="#">hsa-miR-328-3p</a>	ND	ND	0.087	-3.3	11
<a href="#">hsa-let-7b-5p</a>	ND	ND	-4.2	-0.84	-10
<a href="#">hsa-miR-142-5p</a>	ND	ND	-3.5	-0.22	-9.9
<a href="#">hsa-miR-424-5p</a>	ND	ND	-5.2	-2.1	-9.0
<a href="#">hsa-miR-106b-5p</a>	ND	ND	-4.0	-0.89	-8.6
<a href="#">hsa-miR-22-3p</a>	ND	ND	-4.1	-1.1	-8.5
<a href="#">hsa-miR-29c-3p</a>	ND	ND	-5.5	-2.6	-7.6
<a href="#">hsa-miR-663b</a>	ND	ND	-2.3	-5.2	7.4
<a href="#">hsa-miR-320a</a>	ND	ND	0.38	-2.4	6.8
<a href="#">hsa-miR-361-5p</a>	ND	ND	-3.0	-5.7	6.3
<a href="#">hsa-miR-451a</a>	ND	ND	5.2	7.8	-6.0

**Tabla 17.** MicroRNAs con expresión diferencial a los tres meses de la cirugía entre los pacientes con y sin recurrencia morfológica posterior durante el seguimiento (2R vs 2NR).

miRname	SD Recurrence. 3 month after surgery	SD Norecurrence. 3 month after surgery	Average dCq Recurrence. 3 month after surgery	Average dCq No recurrence. 3 month after surgery	Fold change
<a href="#">hsa-miR-106b-5p</a>	ND	ND	-7.0	-2.2	-28
<a href="#">hsa-let-7b-3p</a>	ND	ND	-7.0	-3.0	-16
<a href="#">hsa-miR-660-5p</a>	ND	ND	-7.4	-3.4	-15
<a href="#">hsa-miR-652-3p</a>	ND	ND	-7.3	-3.4	-15
<a href="#">hsa-miR-22-3p</a>	ND	ND	-6.4	-2.6	-14
<a href="#">hsa-miR-502-3p</a>	ND	ND	-3.8	-6.9	8.7
<a href="#">hsa-miR-143-3p</a>	ND	ND	-4.5	-1.5	-8.2
<a href="#">hsa-miR-431-5p</a>	ND	ND	-7.3	-4.4	-7.7
<a href="#">hsa-miR-1471</a>	ND	ND	-5.1	-8.0	7.4
<a href="#">hsa-miR-22-5p</a>	ND	ND	-5.1	-2.2	-7.2
<a href="#">hsa-miR-604</a>	ND	ND	-4.4	-7.1	6.7
<a href="#">hsa-miR-486-3p</a>	ND	ND	-4.8	-7.5	6.6
<a href="#">hsa-miR-21-5p</a>	ND	ND	-3.7	-1.1	-6.0
<a href="#">hsa-miR-2110</a>	ND	ND	-7.3	-4.7	-5.9
<a href="#">hsa-let-7a-5p</a>	ND	ND	-4.8	-2.2	-5.8
<a href="#">hsa-let-7b-5p</a>	ND	ND	-1.5	-3.6	4.2
<a href="#">hsa-miR-663b</a>	ND	ND	-2.8	-4.9	4.2
<a href="#">hsa-miR-324-5p</a>	ND	ND	-5.2	-7.2	4.0
<a href="#">hsa-miR-885-5p</a>	ND	ND	-4.8	-6.7	3.7
<a href="#">hsa-miR-99b-5p</a>	ND	ND	-4.2	-2.5	-3.2

**Tabla 18.** MicroRNAs con expresión diferencial entre los pacientes con recurrencia (en el momento de la misma) y los pacientes sin recurrencia al año de la cirugía (3R vs 3NR).

miRname	SD Recurrence. time of recurrence	SD No recurrence. 1 year after surgery	Average dCq Recurrence. time of recurrence	Average dCq No recurrence. 1 year after surgery	Fold change
<a href="#">hsa-miR-151a-3p</a>	ND	ND	-6.2	-2.1	-17
<a href="#">hsa-miR-125b-5p</a>	ND	ND	-2.6	-6.4	14
<a href="#">hsa-miR-29a-3p</a>	ND	ND	-6.3	-2.6	-13
<a href="#">hsa-miR-624-5p</a>	ND	ND	-2.2	-5.6	11
<a href="#">hsa-miR-139-3p</a>	ND	ND	-4.7	-7.9	9.6
<a href="#">hsa-miR-660-5p</a>	ND	ND	-5.3	-2.5	-7.0
<a href="#">hsa-miR-15b-5p</a>	ND	ND	-4.7	-2.0	-6.7
<a href="#">hsa-miR-495-3p</a>	ND	ND	-2.6	-5.3	6.6
<a href="#">hsa-miR-940</a>	ND	ND	-3.5	-6.0	5.8
<a href="#">hsa-miR-652-3p</a>	ND	ND	0.12	-2.4	5.6
<a href="#">hsa-miR-22-5p</a>	ND	ND	-5.0	-2.6	-5.2
<a href="#">hsa-miR-374a-5p</a>	ND	ND	-6.3	-4.0	-5.0
<a href="#">hsa-miR-106b-3p</a>	ND	ND	-6.5	-4.2	-5.0
<a href="#">hsa-miR-7-5p</a>	ND	ND	-3.1	-5.3	4.8
<a href="#">hsa-miR-148a-3p</a>	ND	ND	-4.7	-2.6	-4.5
<a href="#">hsa-miR-376b-3p</a>	ND	ND	-3.0	-5.1	4.4
<a href="#">hsa-miR-1207-5p</a>	ND	ND	-4.1	-6.2	4.4
<a href="#">hsa-miR-324-5p</a>	ND	ND	-3.0	-5.1	4.3
<a href="#">hsa-miR-140-3p</a>	ND	ND	-4.1	-2.0	-4.3
<a href="#">hsa-miR-34a-3p</a>	ND	ND	0.90	-1.1	4.0

## **8. Validación de los microRNAs identificados con expresión diferencial**

Basándonos en los resultados obtenidos en el análisis inicial, se emplearon para la validación las muestras correspondientes a los grupos pre-cirugía y al año de la intervención, donde se detectaron las mayores diferencias entre los pacientes con y sin recurrencia. Así, se incluyeron para la validación final un total de 64 muestras (16 por grupo), comparándose los 4 grupos de pacientes en los tiempos mencionados:

- Pre-cirugía:
  - 1R. Recurrencia (muestra pre-cirugía).
  - 1NR. No recurrencia (muestra pre-cirugía).
  
- Al año de la cirugía:
  - 3R. Recurrencia (muestra al año de la cirugía o en el momento de confirmarse la recurrencia morfológica).
  - 3NR. No recurrencia (muestra al año de la cirugía).

Para la validación, se seleccionaron aquellos 15 microRNAs que en la comparación entre los grupos recurrencia vs no-recurrencia (pre-cirugía y al año) presentaron una mayor expresión diferencial, con un "fold change" o veces de cambio superior a 5 en todos los casos (en total, 30 microRNAs + 5 normalizadores).

### **8.1 Número de microRNAs detectados**

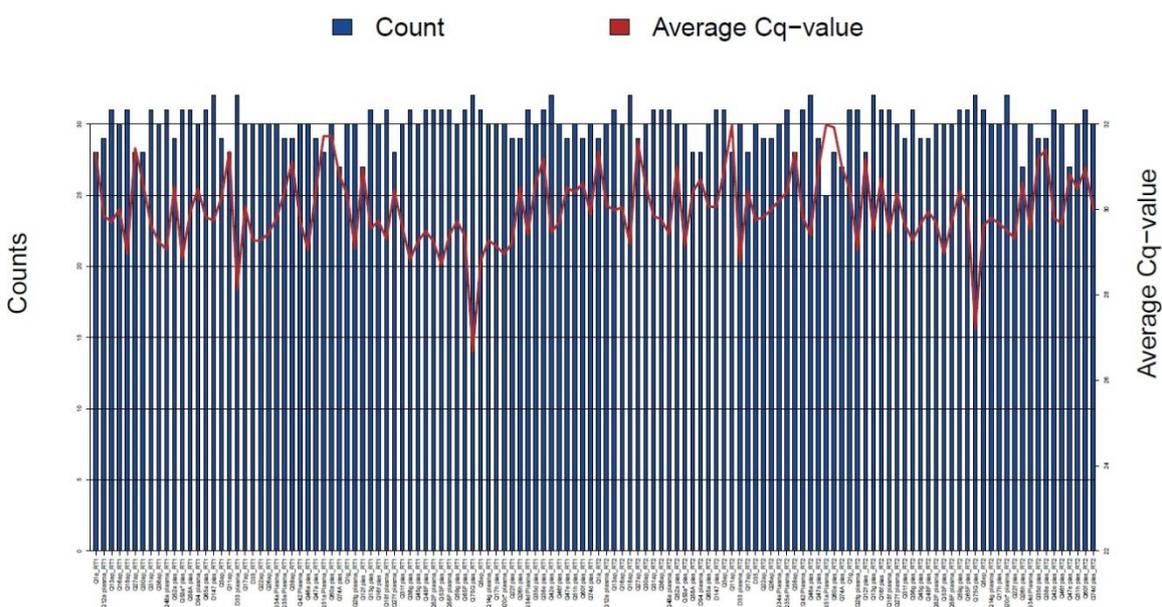
Mediante el análisis de PCR en tiempo real se identificaron 20 microRNAs presentes en todas las muestras, con un promedio de 30 microRNAs detectables por muestra (Tabla 19).

**Tabla 19.** Total de microRNAs presentes en el kit empleado para este análisis (miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR), total de microRNAs que fueron detectables en todas las muestras y promedio de microRNAs detectables por muestra.

	Number of assays
miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR Custom pick and Mix panel	35
Assays with signal in all samples	20
Average number of assays detected per sample	30

En la siguiente figura se muestra el número de microRNAs detectados en las muestras, así como el valor Cq de la media global para cada una de las muestras (Figura 42). Las barras azules representan el número de microRNAs detectados y la línea roja muestra el valor medio de Cq para los microRNAs expresados comúnmente.

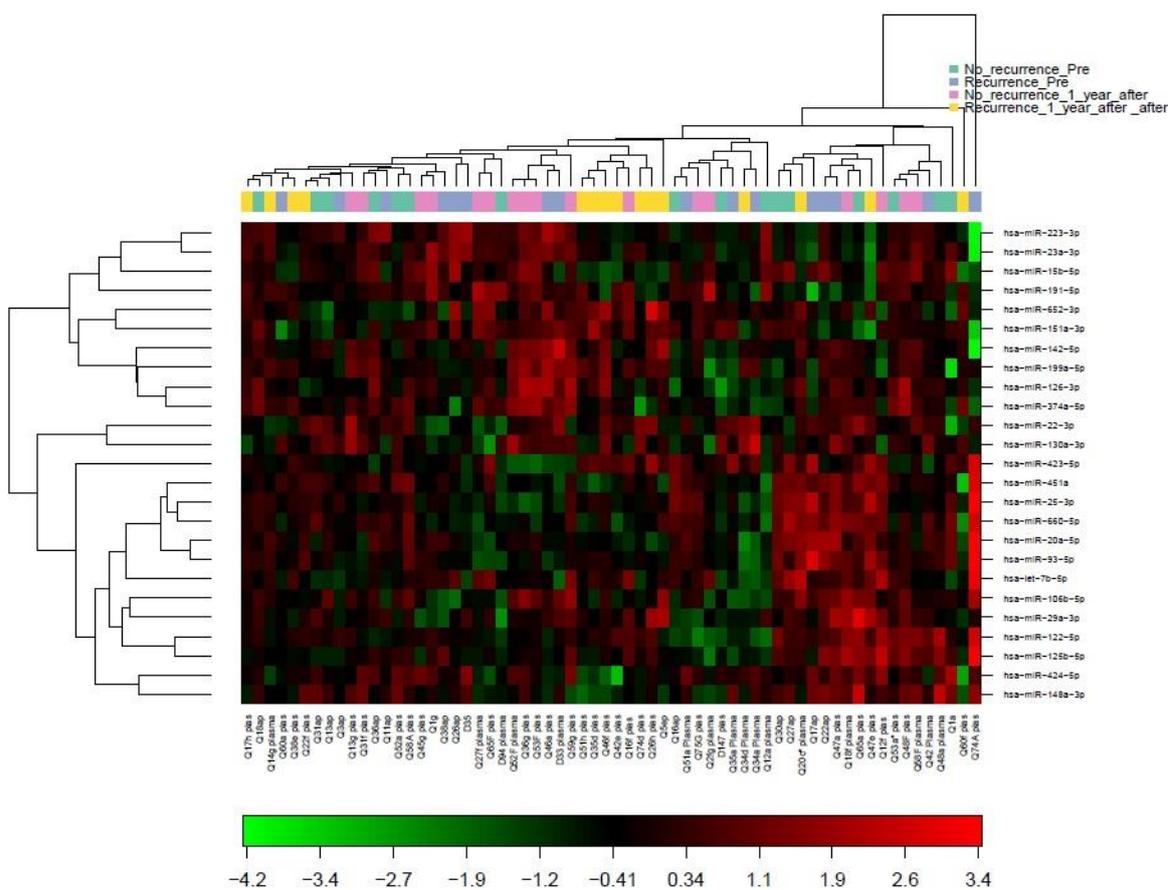
**Figura 42.** Ilustración gráfica del contenido de microRNAs en las muestras empleadas para la validación.



## 8.2 Nivel de expresión de microRNAs en las muestras

Mediante un diagrama tipo Heat map se ha representado el resultado del agrupamiento jerárquico de microRNAs en las muestras de plasma analizadas (Figura 43). Cada fila representa un microRNA y cada columna representa una muestra. La escala de color mostrada en la parte inferior ilustra el nivel de expresión relativa de un microRNA (el color rojo representa un nivel de expresión más elevado y el color verde representa menores niveles de expresión).

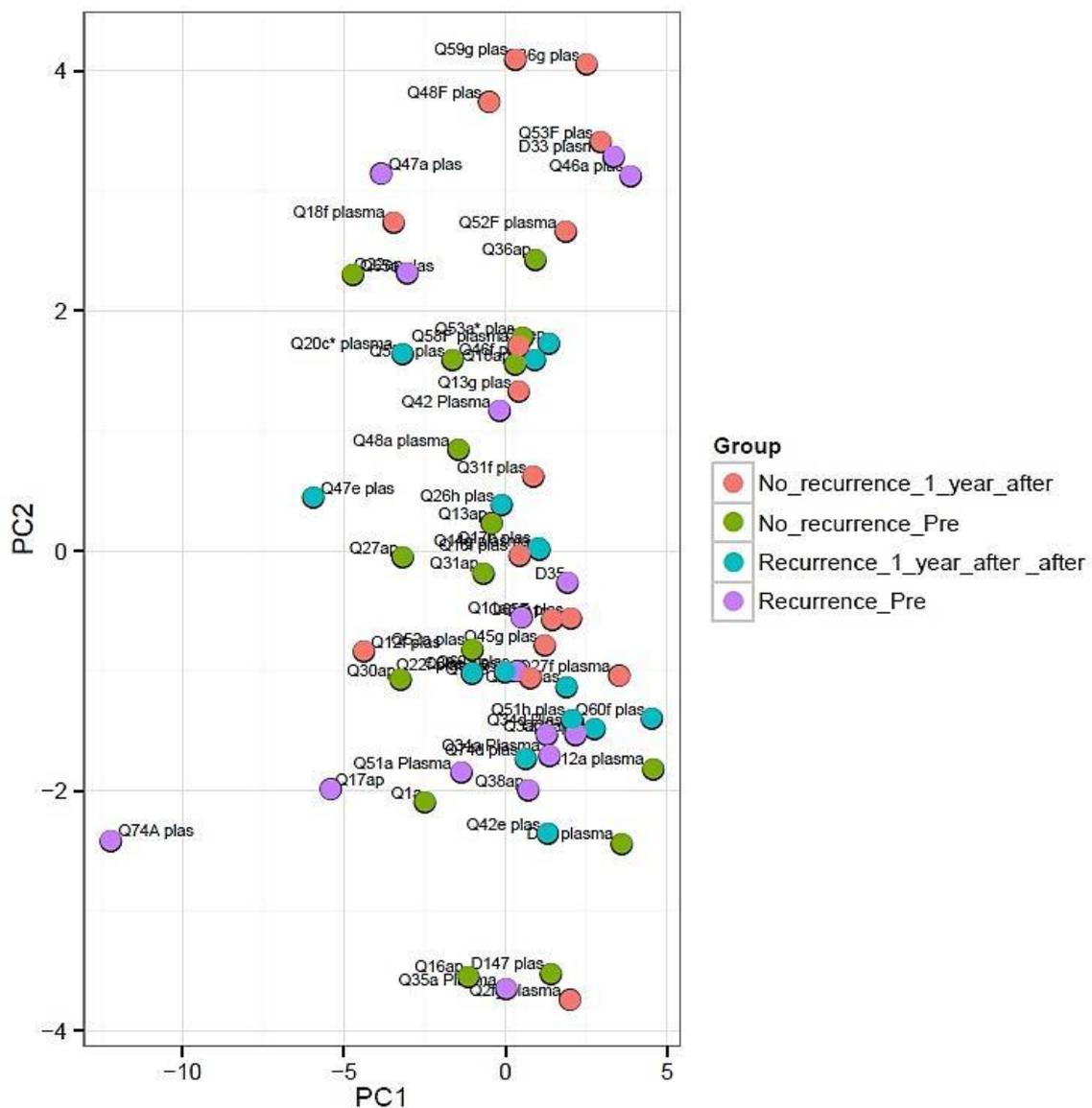
**Figura 43.** Heat map y agrupación jerárquica (clustering). La agrupación de microRNAs se realiza en todas las muestras, y en la parte superior se muestran los 25 microRNAs con mayor desviación estándar. Se han utilizado los valores normalizados (dCq) para el análisis.



### 8.3 Análisis de Componentes Principales o PCA plot

Se realizó el Análisis de Componentes Principales (o PCA) para explorar cómo se agrupan las muestras según las variaciones en el perfil de expresión, incluyéndose los 25 microRNAs principales, con mayor variación entre todas las muestras. En el PCA plot el componente más grande de la variación se representa en el eje X (PC1) y el segundo mayor se representa en el eje Y (PC2). Se han utilizado los valores normalizados (dCq) para el análisis. El gráfico obtenido no mostró agrupaciones claras del conjunto de muestras (Figura 44).

**Figura 44.** PCA Plot de las muestras empleadas en la validación.



## 8.4 Expresión diferencial de microRNAs en recurrencia vs. no recurrencia

### 8.4.1 MicroRNAs con expresión diferencial pre-cirugía entre los pacientes con vs. sin recurrencia

Al comparar las muestras pre-cirugía entre los pacientes con vs. sin recurrencia mediante una prueba T, entre los microRNAs expresados diferencialmente se identificó un microRNA con una expresión diferencial estadísticamente significativa: el hsa-miR-15b-5p ( $p=0.028$ ), aunque la corrección posterior de Benjamini-Hochberg, recomendada cuando se hacen perfiles de paneles o arrays, no alcanzó el nivel de significación de 0.05.

En la Tabla 20 se muestran los resultados individuales obtenidos para el microRNA identificado con mayor expresión diferencial pre-cirugía entre ambos grupos. Se muestra la desviación estándar (SD) entre los grupos, seguida de los valores medios normalizados de Cq, el "fold-change" entre los grupos y los p valores correspondientes a la prueba T y al ajuste de Benjamini-Hochberg (BH adj. p-value).

**Tabla 20.** MicroRNA identificado con expresión diferencial pre-cirugía entre los pacientes con vs. sin recurrencia.

miRname	SD Recurr e_Pre	SD No_recurr ence_Pre	Average dCq Recurr e_Pre	Average dCq No_recurr ence_Pre	Fold change	P-value	BH adj. p- value
<a href="#">hsa-miR-15b-5p</a>	0.46	0.29	-0.041	0.27	-1.2	0.028	0.96

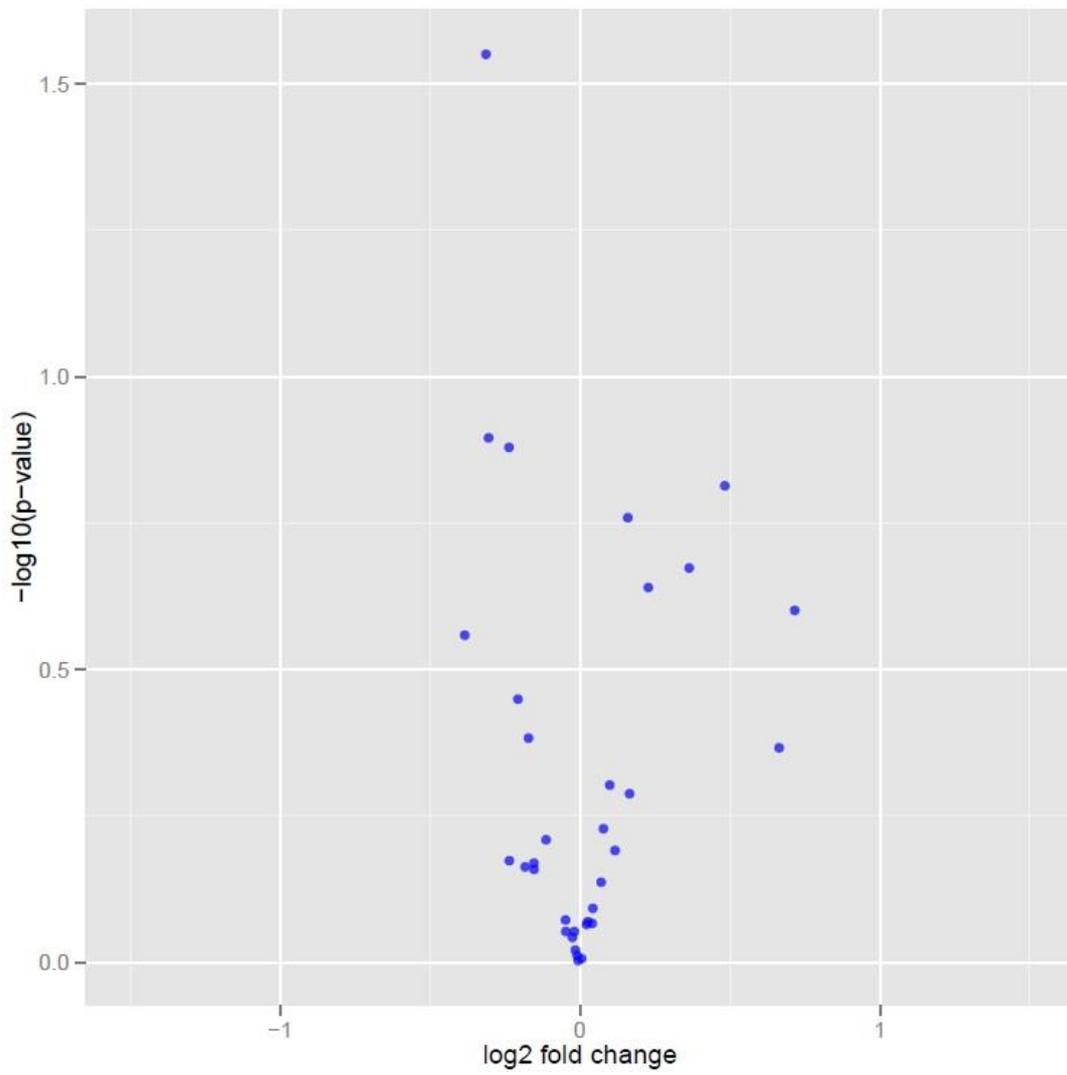
#### 8.4.1.1 Volcano Plot de los microRNAs con expresión diferencial pre-cirugía entre los pacientes con vs. sin recurrencia

Los datos de expresión se han representado en un "volcano plot" (Figura 45), gráfico que permite una rápida identificación visual de los microRNAs que muestran cambios de gran magnitud y que son además estadísticamente significativos. En el eje X se representa el nivel de cambio entre los grupos o "fold-change" (en escala logarítmica, de manera que la regulación positiva o negativa se representa de forma simétrica) y en el eje Y se representa el p

valor (en escala logarítmica negativa, de forma que los p valores más pequeños aparecen mayores). Esta representación da lugar a dos regiones de interés en el gráfico: los puntos que se encuentran en la parte superior (de mayor significación estadística) y los que se encuentran más alejados del centro, hacia la izquierda o hacia la derecha (que presentan un “fold-change” de gran magnitud). De esta forma, el primer eje indica el impacto biológico del cambio (a más efecto biológico mayor “fold-change”) y el segundo muestra la evidencia estadística o fiabilidad del cambio.

En la comparación de las muestras pre-cirugía entre los pacientes con vs. sin recurrencia no se identificaron microRNAs con p-valores < 0.05 tras la corrección de Benjamini-Hochberg para múltiples pruebas, aunque, como se ha comentado previamente, uno de los microRNAs identificados, el hsa-miR-15b-5p (punto representado en la parte superior del gráfico), presentó una mayor tendencia a la significación en comparación con el resto (Figura 45).

**Figura 45.** Volcano plot que muestra la relación entre los valores de p y “fold-change” de los microRNAs pre-cirugía entre los pacientes con vs. sin recurrencia.



#### 8.4.2 MicroRNAs con expresión diferencial al año de la cirugía entre los pacientes con vs. sin recurrencia

Al comparar las muestras al año post-cirugía entre los pacientes con vs. sin recurrencia, se identificaron inicialmente 8 microRNAs con expresión diferencial significativa en la prueba T ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, en la corrección posterior de Benjamini-Hochberg sólo uno de ellos resultó estadísticamente significativo, el hsa-miR-15b-5p, presentando además un nivel de significación muy elevado ( $p < 0.00001$ ). Este miRNA coincide con el mismo identificado en el momento pre-cirugía, aunque en ese punto del tiempo no llegó a alcanzar el nivel de significación de 0.05 (ver apartado 8.4.1).

En la Tabla 21 se muestran los resultados individuales para el miR-15b-5p al año de la cirugía. Se muestra la desviación estándar (SD) entre los grupos, seguida de los valores medios normalizados de Cq, el "fold-change" entre los grupos y los p valores correspondientes a la prueba T y al ajuste de Benjamini-Hochberg.

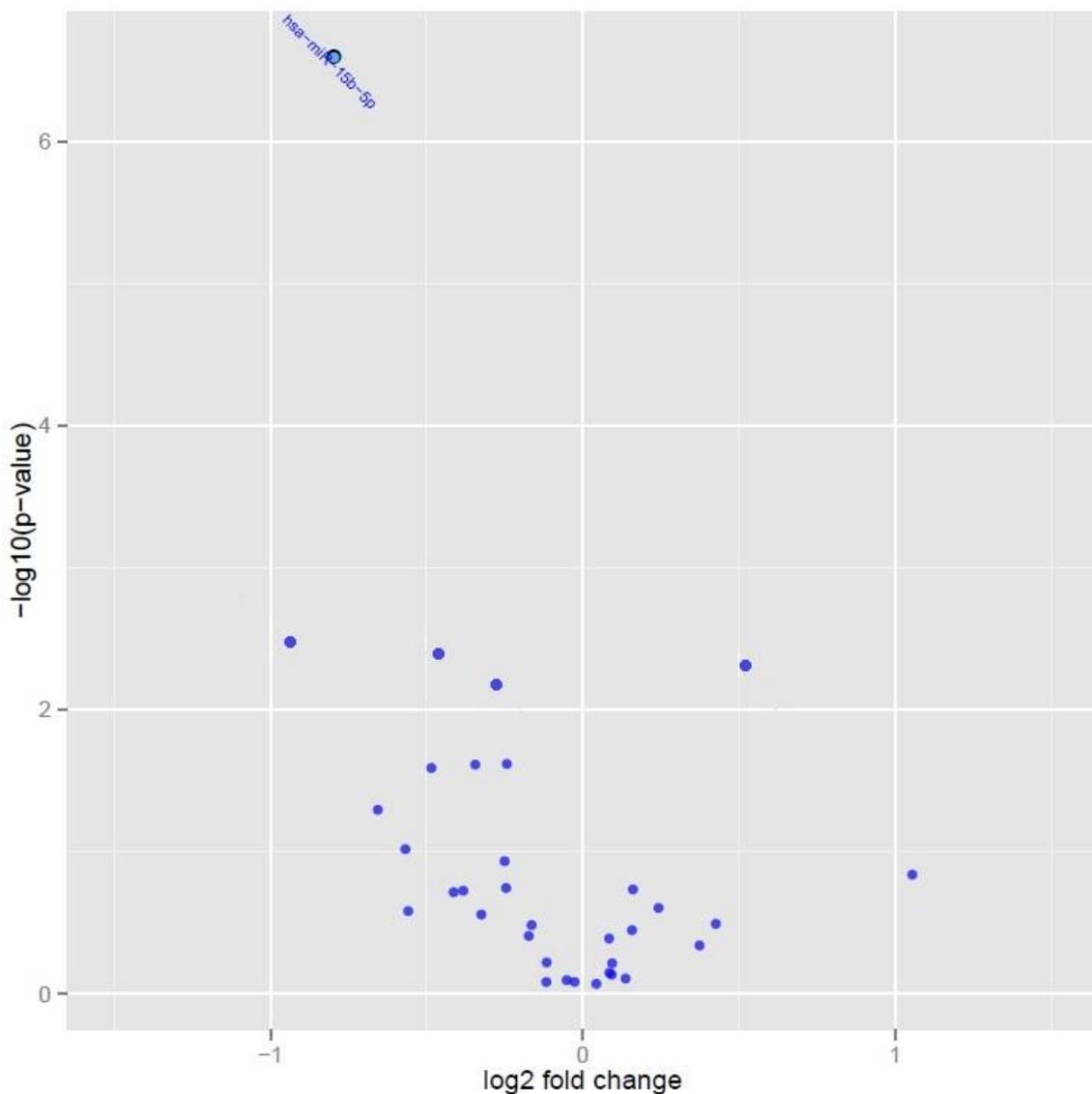
**Tabla 21.** MicroRNA identificado con expresión diferencial al año de la cirugía entre los pacientes con vs. sin recurrencia.

miRname	SD Recurrenc e_1_year_ after	SD No_recurr ence_1_y ear_after	Average dCq Recurrenc e_1_year_ after	Average dCq No_recurr ence_1_y ear_after	Fold change	P-value	BH adj. p- value
<a href="#">hsa-miR-15b-5p</a>	0.36	0.30	-0.43	0.36	-1.7	2.6e-7	0.0000087

#### 8.4.2.1 Volcano Plot de los microRNAs con expresión diferencial al año de la cirugía entre los pacientes con vs. sin recurrencia

En la siguiente figura (Figura 46) se representan los datos de expresión de microRNAs al año de la cirugía mediante un “volcano plot”. Al comparar los pacientes con vs. sin recurrencia al año se identificó el hsa-miR-15b-5p con un elevado nivel de significación tras la corrección de Benjamini-Hochberg para múltiples pruebas (representado en la parte superior del gráfico).

**Figura 46.** Volcano plot que muestra la relación entre los valores de p y “fold-change” de los microRNAs al año de la cirugía entre los pacientes con vs. sin recurrencia.



## VI. DISCUSIÓN

---

## **1. Consideraciones previas respecto al diseño y pertinencia del estudio, así como a la metodología empleada**

A pesar de un conocimiento cada vez mayor sobre la patogenia de la EC y el desarrollo de esquemas de tratamiento más potentes que incluyen los fármacos biológicos, las tasas de cirugía en estos pacientes siguen siendo elevadas ([256](#)). Así, un 50-60% de los pacientes con EC requieren de una resección intestinal en los primeros 10 años tras el diagnóstico, y un 25% de éstos acabarán requiriendo de una segunda cirugía dentro de los 5 años siguientes ([257](#)).

La reaparición de lesiones tras la resección de todo el tramo intestinal afecto (fenómeno conocido como recurrencia post-quirúrgica) es muy frecuente en estos pacientes, a pesar incluso de la intervención terapéutica. Entre los tratamientos empleados para prevenir la recurrencia de la EC se incluyen la mesalazina, los inmunomoduladores tiopurínicos y en la actualidad los fármacos biológicos o anti-TNF ([265](#), [328-330](#)). En los últimos años, diferentes estudios han confirmado la eficacia del tratamiento biológico en la prevención de la recurrencia, especialmente en los pacientes de alto riesgo, con una tendencia actual a su introducción precoz tras la cirugía. Sin embargo, estos tratamientos implican una tasa nada desdeñable de efectos adversos, además de un elevado coste (unos 10.000 euros al año por paciente) ([338](#), [339](#)). Por otro lado, no está claramente establecido qué pacientes se benefician de un tratamiento más intensivo tras la cirugía ni la duración de mantenimiento del mismo ([333](#)).

Por todo ello, surge la necesidad de desarrollar nuevas herramientas y estrategias que permitan identificar el riesgo de una recurrencia precoz tras la cirugía para optimizar el manejo clínico de estos pacientes. En el momento actual, la ileocolonoscopia sigue siendo el patrón oro para el seguimiento y diagnóstico de la recurrencia, aunque supone una técnica invasiva, costosa, no exenta de riesgos y en general mal tolerada por los pacientes. Por este motivo, existe un creciente interés en el empleo de marcadores no invasivos, reproducibles y de fácil obtención, que sirvan para monitorizar a estos

pacientes tras la cirugía y que permitan detectar precozmente el desarrollo de recurrencia.

Por otro lado, el escenario clínico de la recurrencia post-quirúrgica en la EC supone una condición patogénica de *novo*, por lo que los pacientes intervenidos constituyen el mejor modelo natural *in vivo* para poder estudiar e identificar los posibles mecanismos patogénicos implicados en la reaparición de la enfermedad.

Con todo ello, el objetivo de la presente tesis doctoral ha sido la caracterización prospectiva de biomarcadores con capacidad predictiva de recurrencia en el contexto post-quirúrgico de la EC, que permitan identificar y monitorizar los cambios que acontecen en el desarrollo de la inflamación de *novo*. Además, se ha estudiado el perfil de la respuesta inmune que dirige este proceso y los potenciales elementos epigenéticos reguladores, explorando tanto su implicación patogénica en la génesis de la recurrencia como su potencial utilidad como biomarcadores en este escenario.

Este estudio prospectivo se planteó en nuestro centro con las consideraciones referidas a continuación. Se trata de un Hospital terciario, cuya unidad monográfica de Enfermedad Inflamatoria Intestinal es de referencia en la Comunidad Valenciana y atiende unos 1.200 pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa al año. En nuestro centro se intervienen unos 15-20 pacientes al año con EC, cuya indicación y adecuación se somete a discusión previa en nuestro Comité Multidisciplinar (en conjunción con el equipo de Coloproctología, Anatomía Patológica y Radiodiagnóstico). Del mismo modo, el grupo dispone de un protocolo bien establecido para la recogida de muestras de los pacientes y su procesado. Todo ello nos ha permitido la inclusión y seguimiento durante los últimos años de un número suficiente de pacientes para la consecución final del presente proyecto.

En nuestro centro, comenzaron a introducirse en 2010 dos nuevas técnicas en la cartera de servicios. Por un lado, la cuantificación de CF en estos pacientes mediante técnica de ELISA, que ha sido la empleada para su determinación en este estudio. Por otro lado, la sección de abdomen de nuestro Servicio de Radiodiagnóstico incorporó la técnica de la entero-RM, que fue rápidamente incorporándose a nuestra práctica clínica en el manejo de estos pacientes, definiéndose protocolos bien establecidos para su realización e incorporando la cuantificación de índices validados para la valoración de la actividad inflamatoria (como el índice MaRIA).

Respecto a la CF, a pesar de la creciente información sobre su utilidad en la práctica clínica para el manejo de estos pacientes, existía controversia en los estudios iniciales sobre su correlación con la actividad en los pacientes con afectación exclusivamente ileal, en comparación con las formas colónicas e ileocolónicas, en las que la correlación entre la CF y la actividad endoscópica parecía ser mayor. Por otro lado, el índice MaRIA de actividad en la entero-RM había sido previamente validado por el grupo de Rimola *et al.* (340) en correlación con el CDEIS, índice endoscópico en realidad más adecuado para localizaciones cólicas, además de que en la práctica clínica la intubación ileal durante la endoscopia (para valoración del íleon terminal) puede ser difícil en pacientes con afectación estenótica.

Por todo ello, en un estudio previo de nuestro grupo, exploramos la utilidad de estas nuevas herramientas (CF y entero-RM) en la valoración de la EC de localización preferentemente ileal, en comparación con el referente ideal que es el estudio histológico de la pieza quirúrgica (248). En este estudio pudimos caracterizar la adecuada correlación de la CF con el grado de actividad inflamatoria en la entero-RM (evaluada mediante el índice MaRIA), así como con el grado histológico de inflamación en las lesiones de la pieza quirúrgica tras la resección, confirmando la utilidad de ambas técnicas en la valoración de los pacientes con EC ileal.

Con el tiempo, y en el contexto además de nuestra participación en ensayos clínicos en pacientes con EC intervenidos (como el estudio APPRECIA), también se optimizaron los protocolos de adquisición de imágenes y se

implementó la aplicación de otros índices validados para la adecuada valoración morfológica de la recurrencia, como el índice de RM creado por Sailer *et al.* ([270](#), [298](#)), que presenta una adecuada correlación con el índice endoscópico de Rutgeerts. La experiencia de los radiólogos de nuestro centro en su aplicación en la práctica diaria ha permitido la adecuada valoración de aquellos pacientes del presente estudio que fueron evaluados mediante entero-RM.

Por otro lado, disponemos en el Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital de un grupo acreditado de investigación con amplia trayectoria en el manejo de muestras de pacientes con EII, así como en el análisis de datos clínicos y experimentales. La implementación de un laboratorio con capacidad para realizar investigación básica, nos ha permitido a lo largo de los años la puesta a punto y desarrollo de diferentes técnicas para la realización de diversos proyectos, que hemos centrado principalmente en los mecanismos patogénicos implicados en la inmunidad de la EC y en el estudio de biomarcadores. Entre estas técnicas se encuentran la realización de ELISAs (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), el análisis multiplexado de muestras biológicas mediante citometría de flujo modificada (para la determinación de elementos tales como proteínas) o la determinación de elementos de expresión génica mediante técnica de PCR cuantitativa, técnicas que se han empleado en el presente trabajo para la determinación de los parámetros experimentales en las muestras plasmáticas de los pacientes.

Los diferentes protocolos experimentales ya habían sido previamente puestos a punto en nuestro laboratorio para optimizar los experimentos en muestras biológicas complejas como el plasma, tipo de muestra empleada en los análisis del presente trabajo. Con respecto al estudio de microRNAs, nuestro grupo ha trabajado previamente en la caracterización de los perfiles de expresión de estos elementos en pacientes con EC activa e inactiva, como posibles biomarcadores de actividad ([95](#)). En este campo, también hemos desarrollado e implementado un protocolo estandarizado que permite la pre-purificación y extracción del RNA a partir de muestras de plasma de un modo preciso y fiable ([85](#)).

En nuestra búsqueda previa de biomarcadores, también hemos explorado elementos patogénicos implicados en la inmunidad innata en pacientes con EC ileal, como las  $\alpha$ -defensinas, habiendo caracterizado un aumento de sus concentraciones plasmáticas en los pacientes activos (al debut) en comparación con los pacientes inactivos (en remisión), pacientes con otras condiciones inflamatorias ileales no relacionadas con la EC o los controles sanos ([139](#)). Estos resultados preliminares sugieren una implicación de estos elementos en la patogenia, así como su capacidad para diferenciar el grado de actividad y su potencial utilidad como biomarcadores en la EC ileal al diagnóstico.

Por todo ello, en la presente tesis doctoral hemos explorado una laguna de conocimiento actual respecto a la utilidad de todos estos elementos como biomarcadores en los pacientes con EC una vez sometidos a cirugía resectiva, así como la posible implicación patogénica de algunos de ellos en el desarrollo de la recurrencia post-quirúrgica, fenómeno cuya patogenia y diferente evolución temporal entre pacientes seguimos sin poder explicar actualmente.

## 2. Consideraciones relacionadas con los resultados

Los resultados más relevantes obtenidos en el presente estudio se resumen a continuación:

- En este estudio, el patrón de la enfermedad, el hábito tabáquico, el antecedente de resecciones previas o la presencia de enfermedad perianal asociada no resultaron predictivos de mayor recurrencia post-quirúrgica precoz. El tratamiento profiláctico tras la cirugía fue el único factor clínico predictivo, identificado como factor protector frente al desarrollo de recurrencia post-quirúrgica temprana.
- La calprotectina fecal (CF) constituye un marcador muy útil para monitorizar a los pacientes con EC tras la cirugía y dispone de gran capacidad predictiva para detectar precozmente el desarrollo de recurrencia en estos pacientes, considerando la medición de sus valores a partir del tercer mes tras la resección. Sus concentraciones se asocian de forma estrecha con la presencia y gravedad de la recurrencia morfológica (tanto endoscópica como radiológica), habiéndose identificado el punto de corte de 160  $\mu\text{g/g}$  a partir de los 6 meses post-cirugía como el valor de CF con mejor capacidad predictiva de recurrencia, aportando una sensibilidad y un valor predictivo negativo muy elevados para discriminar el desarrollo de lesiones tempranas en estos pacientes.
- El perfil de expresión de citoquinas plasmáticas en la EC cambia tras la cirugía resectiva, identificándose tras la misma un perfil diferente entre los pacientes que desarrollan recurrencia post-quirúrgica precoz y aquellos que se mantienen en remisión. Estos cambios, consistentes en una diferente concentración de citoquinas plasmáticas, son evidenciables inmediatamente tras la cirugía, presentando el grupo de pacientes con recurrencia una respuesta inmune exacerbada desde el inicio, a merced de las mayores concentraciones plasmáticas de citoquinas pro-inflamatorias observadas, en comparación con los pacientes que se mantienen en remisión.

- Los pacientes con EC que recurren precozmente tras la cirugía presentan concentraciones significativamente más elevadas de IL-13 pre-cirugía, así como de IL-6 e IFN- $\gamma$  a los 6 meses tras la intervención, en comparación con los pacientes que se mantienen en remisión. Este hallazgo sugiere un papel patogénico de las citoquinas mencionadas en el desarrollo de la recurrencia precoz, por lo que esto debería ser contrastado en otros estudios con cohortes más amplias para estudiar su relación con otros factores y explorar estas vías en mayor profundidad.
- En este estudio, las  $\alpha$ -defensinas 1-3, implicadas en la respuesta inmune innata y cuyas concentraciones plasmáticas han mostrado previamente potencial utilidad como biomarcadores en la EC ileal al debut, no muestran capacidad en el contexto post-quirúrgico para discernir a los pacientes que desarrollan recurrencia.
- La identificación de otros marcadores en el presente estudio, además de la CF, con capacidad predictiva de recurrencia ha permitido ajustar un modelo predictivo multivariable y desarrollar un índice pronóstico con elevada capacidad predictiva del riesgo. Este índice predictivo combinado, a falta de ser validado en otra cohorte independiente, constituye una nueva herramienta de gran utilidad para identificar con precisión a los pacientes que van a desarrollar una recurrencia precoz tras la cirugía.
- Entre los microRNAs (miRNAs) identificados en este estudio con expresión diferencial entre los pacientes que desarrollan recurrencia y los que se mantienen en remisión, el miR 15b-5p ha sido el único que se asocia de forma significativa con el desarrollo de recurrencia post-quirúrgica al año.

Tras la descripción general de los principales hallazgos del presente trabajo, se desarrollan a continuación, de manera argumentada, los hallazgos más relevantes y otras observaciones derivadas del estudio que resultan de interés en el escenario post-quirúrgico de la EC.

- **Recurrencia post-quirúrgica en nuestra cohorte y factores relacionados**

En nuestra cohorte, pese a la intervención terapéutica preventiva en casi el 90%, la recurrencia morfológica se observa en más del 40% de los pacientes a los 2 años de la intervención (44.3%), cifras que son similares y, en algunos casos, inferiores a las referidas en otros estudios ([274](#), [304](#), [305](#)). En nuestra serie, la gran mayoría de los pacientes estaban asintomáticos, puesto que de los 27 pacientes que presentaron recurrencia morfológica, solo 7 presentaban síntomas (26%), frecuencia de recurrencia clínica también similar a la descrita previamente. Todos los pacientes presentaban EC con afectación ileal, más del 70% con localización ileal exclusiva y casi un 20% con afectación ileocólica.

Entre los factores clínicos que se han considerado predictivos de un mayor riesgo de recurrencia precoz se encuentran el tabaquismo activo, el antecedente de resecciones previas (o de una resección previa extensa), la ausencia de tratamiento profiláctico, el patrón penetrante y la presencia de enfermedad perianal. En nuestro estudio, ni el patrón de comportamiento ni la enfermedad perianal fueron predictivos de recurrencia. Tampoco el antecedente de resecciones previas se asoció de forma significativa con un mayor riesgo de recurrencia, aunque solo 6 pacientes en nuestra cohorte presentaban este antecedente, lo que pudo limitar la detección de diferencias significativas en términos de recurrencia. Respecto al tabaco, un 21% de nuestros pacientes eran fumadores activos tras la cirugía, sin que se evidenciara una asociación entre el riesgo de recurrencia temprana y el tabaquismo activo. Este hecho también podría estar en relación con el tamaño muestral, dado que la relación entre hábito tabáquico y recurrencia ha sido bien establecida en los ensayos clínicos y en estudios realizados en centros de referencia ([274](#)), si bien el único estudio publicado de base poblacional que evaluó el impacto del tabaco en la tasa de recurrencia post-quirúrgica fue también negativo a este respecto ([260](#)). Coincidente con nuestros datos, un estudio multicéntrico publicado este mismo año por el grupo de Yamamoto *et al.* ([341](#)), que incluía 127 pacientes, tampoco identificó asociación entre ninguno de los factores clínicos mencionados y las tasas de recurrencia

endoscópica precoz (al año) tras la cirugía, aunque el tamaño muestral y el diseño del estudio (retrospectivo) limitan el poder extraer conclusiones definitivas.

En cambio, un hallazgo importante de nuestro estudio, por sus implicaciones en la práctica clínica, ha sido que el tratamiento profiláctico tras la cirugía se ha identificado como el único factor predictivo de menor recurrencia postquirúrgica precoz. La asociación de tratamiento preventivo demuestra un importante efecto protector en nuestra cohorte, de forma que el total de los pacientes que no llevaban tratamiento tras la resección (n=7, en base a sus características, inicialmente de menor riesgo) presentan invariablemente recurrencia durante el seguimiento, siendo las tasas de recurrencia del 75% en el primer año y del 100% a los dos años.

En los pacientes tratados con 5-ASA (n=6) este porcentaje fue significativamente menor (30.5%), aunque estos pacientes presentan la recurrencia ya en el primer año. En nuestra serie, los pacientes tratados con azatioprina (n=33) y con biológicos (n=14) presentan tasas de recurrencia a los 2 años del 40% y 52%, respectivamente. Este resultado contrasta con la mayoría de estudios que han comparado la eficacia de ambos grupos de fármacos en la prevención de la recurrencia y en los que los biológicos han mostrado tasas menores de recurrencia endoscópica al año y a los 2 años en comparación con azatioprina ([329](#), [330](#)). No obstante, existen resultados dispares en este sentido, ya que en el ensayo clínico APPRECIA el tratamiento con adalimumab no mostró ser superior a azatioprina en prevenir la recurrencia endoscópica al año de la cirugía ([331](#)). En nuestra serie, ciertamente, los pacientes tratados con azatioprina presentan menores tasas de recurrencia y se mantienen más tiempo sin lesiones, aunque cabe destacar que el subgrupo de pacientes tratado con biológicos, aparte de ser mucho menor en tamaño para establecer comparaciones, eran pacientes que ya llevaban en su mayoría este tipo de tratamiento antes de la cirugía y en los que se mantuvo tras la resección por tratarse de pacientes considerados de alto riesgo, en los que se presupone de entrada un mayor riesgo de recurrencia.

Respecto a la recurrencia endoscópica en nuestra serie, de los 32 pacientes en los que se realizó la endoscopia en el primer año, 16 presentaron hallazgos endoscópicos de recurrencia (Rutgeerts >i2a), lo que representa un porcentaje de recurrencia endoscópica en el primer año del 50%, dentro del rango publicado en estudios previos. En la revisión sobre la historia natural de la recurrencia postoperatoria publicada por Buisson *et al.* ([274](#)), se evidenció que entre el 48-93% de los pacientes presentaban recurrencia endoscópica al año de la cirugía. Del total de pacientes con recurrencia endoscópica en nuestra serie, 5 pacientes presentaron recurrencia grave (31% de los mismos). Este porcentaje es inferior a la serie descrita por Rutgeerts *et al.* ([230](#)), en la que se describió que hasta un 44% de las recurrencias tempranas (en el primer año) fueron graves (i3 o i4), aunque este estudio fue descrito en pacientes que no recibían tratamiento para la prevención de la recurrencia.

Por otro lado, el punto de corte habitualmente empleado en los estudios para definir la recurrencia endoscópica es i2, aunque una lectura detallada del estudio de Rutgeerts muestra que, aunque la evolución clínica de los pacientes con scores i3 o i4 fue marcadamente peor, la de los pacientes con un score i2 fue menos predecible. La definición de las lesiones que abarca el score i2 de Rutgeerts es muy amplia y, en realidad, la relevancia de las lesiones mucosas confinadas a la anastomosis (consideradas también como i2) está en discusión, y algunos autores sostienen que probablemente estén relacionadas con fenómenos locales de isquemia ([220](#)). En este sentido, un estudio prospectivo reciente con seguimiento a 5 años desde la cirugía, mostró que estas lesiones localizadas tienen muy baja probabilidad de progresar a lesiones endoscópicas más severas o a recurrencia clínica en el medio plazo, razón por la que se propuso diferenciarlas como i2a ([342](#)). En nuestro estudio, casualmente, solo hubo un paciente con lesión confinada a la anastomosis (úlceras lineales) en la evaluación endoscópica, con resto de mucosa preservada y sin otras lesiones en el neo-íleon, que fue clasificado como i2a. Aunque la presencia de una única observación en este grupo (i2a) no permite hacer comparaciones con los pacientes del grupo i2b o sacar conclusiones sobre este aspecto, sí podemos reportar que este paciente permaneció libre de recurrencia clínica y endoscópica (sin progresión de las lesiones) a los 2 años de seguimiento. Es

probable que las observaciones del estudio prospectivo mencionado, respecto a clasificar a estos pacientes como un subgrupo aparte (sin considerar estas lesiones localizadas como verdadera recurrencia), sean acertadas y deba considerarse evaluar este aspecto en futuros estudios para para confirmar la mejor evolución clínica de estos pacientes y aplicar esta diferenciación del grado i2 de Rutgeerts a la hora de evaluar la recurrencia endoscópica.

- **Análisis de la calprotectina fecal como biomarcador**

En el presente trabajo hemos caracterizado con detalle el comportamiento evolutivo de la CF tras la cirugía en estos pacientes y su capacidad predictiva de recurrencia, tanto de forma aislada como en combinación con otros marcadores, así como el momento más apropiado para iniciar su determinación en la EC post-quirúrgica.

Los estudios iniciales que evaluaban el papel de la CF en el contexto de la recurrencia incluían un número limitado de pacientes, muy pocos aportaban medidas correlacionadas con los hallazgos endoscópicos, y presentaban importantes diferencias metodológicas que podrían explicar los resultados inconsistentes entre estudios ([299-303](#)). Sin embargo, más recientemente, los datos procedentes de los dos estudios prospectivos más amplios y mejor diseñados hasta la fecha, apoyan la utilidad de la CF en este escenario ([304](#), [305](#)).

Estos estudios, en línea con nuestros resultados, confirman la correlación de la CF con los hallazgos endoscópicos y la presencia de recurrencia, proponiéndose además un punto de corte más ajustado respecto a los estudios iniciales, donde se aportaban puntos de corte muy variables y en un rango muy amplio. No obstante, cabe destacar algunos aspectos importantes respecto al uso de la CF en este escenario, no definidos con claridad, y cuya concreción resulta necesaria de cara a su aplicación en la práctica clínica o a su integración en los algoritmos de manejo de la recurrencia, como: el momento más adecuado tras la cirugía para iniciar la monitorización de sus valores, si aporta suficiente sensibilidad en la detección de lesiones tempranas para poder

cribar la realización de otros procedimientos, o los puntos de corte óptimos en estos pacientes para identificar con fiabilidad la actividad inflamatoria *de novo*.

En nuestro estudio, en línea con lo descrito por otros autores ([300](#), [304](#)), se observan concentraciones marcadamente elevadas de CF antes de la cirugía. Tras la resección, estos valores se mantienen inicialmente elevados, en parte, probablemente, por la inflamación inherente a la cicatrización de la anastomosis quirúrgica, que puede mantener elevada inicialmente la CF en estos pacientes a pesar de haberse resecado toda la enfermedad macroscópica. Mediante la monitorización longitudinal de sus valores durante el curso postoperatorio, se observó un descenso rápido y progresivo de los mismos a lo largo de los 3 primeros meses, estabilizándose a partir de este momento y elevándose posteriormente solo en aquellos pacientes que desarrollaron recurrencia durante el seguimiento. Estos datos, consistentes con los hallazgos de Lamb *et al.* ([300](#)), apoyan que se deba iniciar la medición de los valores de CF en estos pacientes a partir del primer trimestre post-cirugía y, por otro lado, que la CF resulta de nuevo útil a partir de este momento para identificar con fiabilidad la aparición de actividad inflamatoria *de novo* relacionada con el desarrollo de recurrencia.

Por otro lado, respecto a la sensibilidad que aporta este marcador en la detección de lesiones tempranas, nuestros resultados demuestran, en línea con los dos estudios principales disponibles hasta la fecha ([304](#), [305](#)), que la CF es un potente marcador temprano de inflamación y es capaz de identificar fielmente el inicio de la recurrencia. Al analizar las curvas ROC de este marcador fecal en comparación con los marcadores serológicos, la CF mostró una capacidad predictiva de recurrencia excelente, con un AUC de 0.88, muy superior a la de la PCR y el fibrinógeno en este contexto. Además, acorde con nuestros resultados, su estrecha asociación con la presencia y la gravedad de la recurrencia morfológica (tanto endoscópica como radiológica) en pacientes todavía asintomáticos, convierte a este marcador en el principal candidato para cribar la realización de exploraciones endoscópicas (actual patrón oro para el diagnóstico). Hemos caracterizado en el presente trabajo su excelente capacidad predictiva de recurrencia, obteniendo como mejor punto de corte un

valor de CF > 160 µg/g a partir del sexto mes, discretamente superior al propuesto en los estudios previos mencionados. Este punto de corte aportó suficiente sensibilidad y, sobre todo, un valor predictivo negativo muy elevado, que permitiría con elevada precisión excluir la posibilidad de una recurrencia temprana y la realización de exploraciones invasivas, de forma sistemática, en todos los pacientes tras la cirugía.

Respecto a la evaluación morfológica de la recurrencia, al tratarse de un estudio realizado en práctica clínica, un subgrupo de pacientes fue evaluado mediante entero-RM en lugar de endoscopia. En la mayoría de casos, los gastroenterólogos del grupo que solicitaron la evaluación morfológica mediante prueba de imagen, fue por negativa del paciente a someterse a una ileocolonoscopia encontrándose asintomático. En una minoría de casos fue, sin embargo, porque la endoscopia no permitió una adecuada valoración del neoíleon, bien por dificultades técnicas, bien por estenosis de la anastomosis. La entero-RM, comparada con la ileoscopia, ha demostrado presentar una buena correlación con el índice de Rutgeerts, especialmente en estadios avanzados (i3-i4) ([298](#)). En nuestro estudio, la CF, además de mostrar buena correlación con los hallazgos endoscópicos, presentó también buena correlación con el índice de Sailer, score radiológico que ha sido previamente validado en pacientes intervenidos para la valoración de la recurrencia ([270](#), [298](#)). Esta asociación fue mayor para los scores MR2 y MR3 de Sailer, considerados como definitorios de recurrencia. En un estudio previo de nuestro grupo, pudimos caracterizar la asociación de la CF con el grado de actividad inflamatoria a nivel ileal evaluada también mediante RM (índice MaRIA), demostrando su utilidad para evaluar la presencia de actividad en los pacientes con afectación de intestino delgado ([248](#)). En la cohorte actual analizada, se confirma también por primera vez esta correlación en los pacientes con EC ileal intervenidos, mostrando que los valores de CF pueden ser útiles para predecir la presencia y gravedad de las lesiones en la entero-RM tras la cirugía.

Del mismo modo, nuestros resultados muestran que los valores de CF se asocian de forma estrecha, no solo con la presencia (>i2a en este estudio), sino también con la gravedad de la recurrencia endoscópica evaluada mediante

el índice de Rutgeerts. En estudios iniciales, los resultados a este respecto eran controvertidos, puesto que algunos autores no encontraban diferencias significativas en las concentraciones de CF entre los pacientes con y sin recurrencia endoscópica ([299](#), [300](#), [303](#)), mientras que otros autores sí que reportaban una elevada correlación entre la CF y el índice de Rutgeerts ([302](#), [343](#)). Como se ha comentado previamente, estos estudios iniciales incluían un número pequeño de pacientes, no todos eran evaluados endoscópicamente, y a veces con una definición poco clara de lo que se consideraba recurrencia, lo que puede explicar las discrepancias entre estudios. Sin embargo, los resultados de un meta-análisis publicado en 2015 ([344](#)), incluyendo los 10 estudios que cumplían los criterios de inclusión por su diseño y metodología (entre los que se encuentra un análisis inicial del presente estudio, con n=26, publicado en forma de abstract ([301](#))), concluyen que la CF es útil para identificar la recurrencia endoscópica. Igualmente, los dos estudios prospectivos más amplios y recientes publicados, confirman esta asociación ([304](#), [305](#)), en línea con lo observado en nuestra cohorte.

- **Análisis de las citoquinas plasmáticas tras la cirugía**

En este estudio hemos analizado el patrón de expresión de citoquinas en plasma para caracterizar los cambios que acontecen en el perfil de la respuesta inmune de estos pacientes tras la cirugía e identificar posibles citoquinas o patrones que diferencien a los pacientes que desarrollan la recurrencia de forma precoz.

La evidencia disponible demuestra que la inflamación crónica en la EI presenta cambios temporales en los perfiles de expresión de citoquinas con el curso evolutivo ([160-164](#)). Diversos estudios muestran que la inflamación en etapas tempranas está dirigida principalmente por citoquinas de la vía Th1, mientras que en la EC de larga evolución la respuesta inmune suele comprender una combinación de componentes de las vías Th1/Th17. Estos datos indican que los mecanismos inmunes responsables de perpetuar la inflamación crónica en fases avanzadas son distintos a los que rigen el inicio de la enfermedad.

En el contexto de la EC post-quirúrgica, aunque hay poco estudios, también se ha descrito un patrón de citoquinas distinto en el neo-íleon macroscópicamente sano, con elevadas concentraciones de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12 (componentes principales de la vía Th1), y en el neo-íleon tras la aparición de recurrencia endoscópica, con un marcado incremento en IL-17A, así como la inducción de citoquinas implicadas en el control de las respuestas celulares Th17, como la IL-6 e IL-23 ([278](#)).

En el presente trabajo hemos comprobado que existe un cambio en el patrón de expresión de citoquinas tras la cirugía, diferenciándose a partir de la resección dos perfiles bien diferenciados de pacientes: un subgrupo que mantiene unas concentraciones plasmáticas bajas durante el seguimiento postoperatorio (y que se corresponde con los pacientes que se mantienen en remisión tras la cirugía) y otro subgrupo que presenta concentraciones plasmáticas más elevadas (y que se corresponde con los pacientes que desarrollan recurrencia durante el seguimiento). Estas observaciones demuestran, por un lado, que la cirugía resectiva en estos pacientes se acompaña de un cambio en el perfil de la respuesta inmunológica, que difiere entre los pacientes que van a desarrollar recurrencia temprana y los que se mantienen en remisión, y por otro, que los niveles de expresión de citoquinas plasmáticas tras la cirugía están en íntima relación con el desarrollo de recurrencia a corto plazo.

Según nuestros resultados, los pacientes que desarrollan recurrencia temprana, presentan concentraciones plasmáticas más elevadas tras la cirugía, apreciándose este incremento inmediatamente tras la intervención (y durante el primer año tras la cirugía), y disminuyendo progresivamente sus valores a partir del segundo año de seguimiento. Esta disminución evidenciada a partir del segundo año concuerda con el desarrollo de la recurrencia en este subgrupo de pacientes y la consecuente instauración de tratamiento para la misma, lo que sugiere el efecto del tratamiento sobre la concentración de las citoquinas plasmáticas. Por el contrario, los pacientes que se mantienen libres de recurrencia mantienen concentraciones globalmente más bajas tras la cirugía y durante todo el curso postoperatorio.

Dentro del perfil de citoquinas analizado (IL1- $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, IL-12p70, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ), en los pacientes que desarrollan recurrencia temprana se apreciaron unas concentraciones elevadas de forma global, aunque con cierto predominio en los primeros meses tras la cirugía de TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-1 e IL-6. Este perfil incluye citoquinas implicadas en la respuesta de tipo Th1 (TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$ ), concordante con el perfil de respuesta inmunológica descrito en las etapas tempranas de la inflamación y con el patrón reportado en el neo-íleon macroscópicamente sano, antes de la aparición de recurrencia endoscópica.

Por otro lado, la IL-1 y la IL-6 son citoquinas implicadas en el control de las respuestas celulares Th17. El incremento de estas citoquinas, implicadas en la inducción de la IL-17A, se ha descrito en el neo-íleon tras la aparición de la recurrencia endoscópica ([278](#)). El perfil de respuesta inmune detectado en este estudio combina por tanto componentes relativos a ambas vías, Th1/Th17, lo que sugiere que la respuesta inmune en la EC post-quirúrgica, a pesar del teórico “reset” establecido tras la resección, no se asemeja tanto a la situación de debut de la enfermedad sino que los mecanismos patogénicos parten del estado evolutivo previo de la misma.

En el presente estudio, el análisis posterior de las citoquinas de manera individualizada, para comparar su evolución temporal y concentraciones en ambos grupos, tan sólo mostró diferencias significativas en las concentraciones de IL-6 e IFN- $\gamma$  a los 6 meses post-cirugía, así como llamativamente, de la IL-13 pre-quirúrgica. La elevada producción de IFN- $\gamma$  por las células de tipo Th1 se ha descrito como parte de la respuesta inmune característica que predomina en las fases iniciales de la EC, concordante con lo observado en el presente estudio, como parte de la respuesta inmune que está dirigiendo la inflamación temprana de aquellos pacientes que posteriormente desarrollarán la recurrencia. Por otro lado, la IL-6 es otra citoquina pro-inflamatoria conocida en la cascada inflamatoria de la EII, y aunque forma parte de la respuesta de tipo Th17 (predominante en fases más avanzadas de la EC), también ha sido descrita previamente en la literatura como una citoquina que podría ser relevante en el desarrollo de la recurrencia precoz ([279](#)), por lo que a la luz de

nuestros resultados, en la misma línea que lo descrito en estudios previos, la IL-6 podría estar ejerciendo un papel patogénico en la génesis de la recurrencia post-quirúrgica temprana.

La IL-13, en cambio, es una citoquina implicada en la respuesta de tipo Th2, más relevante clásicamente en la CU, aunque también observada (en menor medida que la respuesta Th17) en la EC tardía. El aumento observado de sus concentraciones pre-cirugía en nuestros pacientes podría ser concordante, por tanto, con la presencia de lesiones ya establecidas en estos pacientes por el tiempo de evolución de la enfermedad, que conduce a la necesidad de cirugía. El hecho de que este incremento de la IL-13 pre-cirugía sea mayor en los pacientes que posteriormente desarrollarán una recurrencia post-quirúrgica más temprana es un dato llamativo, de difícil interpretación. Es posible que los pacientes que llegan a la cirugía con una EC más evolucionada, y por tanto con mayores niveles de IL-13, presenten un patrón de enfermedad más agresivo o más tendente a las complicaciones evolutivas fibroestenósantes o fistulizantes, dado que la IL-13 se ha relacionado con el fenómeno de la fibrosis intestinal y el desarrollo de fístulas en la EC ([345](#), [346](#)). De hecho, al tratarse de un estudio realizado en pacientes con EC que requieren de cirugía resectiva por motivo de su enfermedad, existe un elevado porcentaje de pacientes en nuestra cohorte con patrones estenosantes y penetrantes, que suelen requerir con elevada frecuencia de tratamiento quirúrgico. Estos patrones constituyeron en nuestra cohorte un porcentaje cercano al 50% del total de los pacientes que desarrollaron recurrencia morfológica durante el seguimiento.

- **Análisis de las  $\alpha$ -defensinas plasmáticas 1-3 en el contexto post-quirúrgico**

En un trabajo previo, nuestro grupo ha caracterizado que existe un aumento de las concentraciones plasmáticas de  $\alpha$ -defensinas 1-3 ( $\alpha$ -Def 1-3) en los pacientes con EC ileal activa (al debut de la enfermedad), en comparación con los pacientes EC inactivos, pacientes con ileítis terminal de etiología distinta a la EC o los controles sanos ([139](#)). Estos resultados preliminares sugieren a priori una implicación de las  $\alpha$ -Def en la patogenia, así como su capacidad para

diferenciar el grado de actividad y su potencial utilidad como biomarcadores en la EC ileal al diagnóstico. En base a estos hallazgos previos, se decidió también explorar su posible utilidad como biomarcadores en el contexto post-quirúrgico de la EC y evaluar su capacidad para diferenciar a los pacientes que desarrollan actividad inflamatoria de *novo* en el seno de la recurrencia post-quirúrgica, aspecto que no había sido caracterizado hasta el momento.

Sin embargo, según los resultados obtenidos en el presente estudio, las  $\alpha$ -Def 1-3 no parecen mostrar capacidad en este contexto para diferenciar a los pacientes que desarrollan recurrencia, dado que no se observaron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de los pacientes con vs. sin recurrencia post-quirúrgica en nuestra cohorte. Es posible que los mecanismos patogénicos implicados en el desarrollo de la recurrencia sean diferentes a los que rigen el inicio de la enfermedad al debut, tal como se aprecia en el perfil de respuesta inmune observado con el análisis de las citoquinas, y que la respuesta inmune innata tenga un papel menos importante en este contexto.

- **Índice predictivo combinado de recurrencia post-quirúrgica**

Acorde con los resultados expuestos previamente, la CF muestra ser un marcador con excelente capacidad predictiva de recurrencia en estos pacientes tras la cirugía. Aunque hay que tener presente que, a pesar de haber demostrado una mayor especificidad como marcador de inflamación que los marcadores serológicos, la CF no es específica de la EII, pudiendo elevarse en otras circunstancias o a merced de otros factores, independientemente de la actividad de la enfermedad. Esto nos indica la importancia de contextualizar el valor de una determinación elevada de manera puntual, y a monitorizar su tendencia evolutiva en el tiempo mediante determinaciones seriadas, para otorgarle el valor adecuado en la práctica clínica diaria y que sea de utilidad en la toma de decisiones.

En nuestro estudio, la caracterización de otros biomarcadores como las citoquinas plasmáticas, ha permitido también identificar a la IL-6 e IFN- $\gamma$  como marcadores predictivos de recurrencia en el mismo momento del curso

postoperatorio que la CF (a los 6 meses). Estos hallazgos han permitido desarrollar, por primera vez, un índice predictivo combinado que ofrece aún mayor precisión en la identificación de los pacientes que van a desarrollar una recurrencia precoz tras la cirugía. La combinación de estos marcadores con la CF aumenta el valor predictivo de la misma, y ratifica además el significado de recurrencia que puede tener la CF en este escenario (evitando la necesidad de contextualizar elevaciones puntuales por otros motivos en estos pacientes). Además, este índice combinado aporta una nueva herramienta predictiva que, tras su validación en otra cohorte independiente, puede ser de gran utilidad clínica para el manejo de la EC post-quirúrgica.

- **Análisis de la expresión de miRNAs en el contexto de la recurrencia**

El análisis preliminar de pools de miRNAs en las muestras de plasma de nuestros pacientes pareció identificar un conjunto de miRNAs con potencial capacidad biomarcadora para identificar el paciente con EC que va a presentar recurrencia precoz, sin embargo el proceso de validación otorga dicha capacidad sólo al miR 15b-5p, cuya disminución significativa identifica a los pacientes con recurrencia al año de la cirugía. La principal limitación de este estudio exploratorio inicial es que la validación ha sido interna. Estudios posteriores nos permitirán validar este hallazgo en otra cohorte independiente y caracterizar además si dicho miRNA se infra-expresa en momentos previos al año, de modo que pueda ser considerado un biomarcador predictor de recurrencia y pudiera incluso ser incluido en el índice pronóstico elaborado en este trabajo de tesis.

Algunos estudios realizados en humanos han identificado patologías en las que el miR 15b-5p forma parte de una “huella” de miRNAs que identifica una patología concreta. En algunos casos el miRNA está sobreexpresado y en otros infraexpresado, y parece implicarse tanto en patologías oncológicas como en las degenerativas inflamatorias. Así, se ha visto que el miR 15b-5p se sobreexpresa en plasma asociado a la presencia de melanoma (347) al igual que hay cambios en dicho miRNA en situaciones post-cirugía del melanoma (348). Se sobreexpresa también en el hepatocarcinoma (349), el

adenocarcinoma esofágico (350), el cáncer ovárico epitelial (351) y el cáncer de pulmón (352). Infraexpresado, el miR 15b-5p se detecta en la “huella” de miRNAs que se asocian a la enfermedad de Alzheimer (353, 354), en el linfoma Hodking (355) y en la ruptura de la chordae tendinae mitral (356). Su expresión disminuida se asocia también a la mayor longevidad en humanos (357) y se ha visto que las lipoproteínas aterogénicas disminuyen la expresión del miR 15b-5p para desencadenar su efecto (358).

Diferentes estudios en distintas patologías o procesos biológicos van caracterizando las dianas biológicas sobre las que actúa este miRNA. La infraexpresión del miR 15b-5p induce la formación de TRIM29, el cual a su vez induce la proliferación y expansión de algunos tumores, a través de la vía AKT/mTOR (359). Recientemente se ha descrito que la sobreexpresión del miR 15b-5p condiciona la inhibición de la angiogénesis en ratones, identificándose la protein-kinasa B-3 (AKT-3) como el target directo del miR 15b-5p (360). Del mismo modo, se ha descrito que el miR 15b-5p tiene capacidad reguladora del proceso apoptótico via down-regulación de la proteína pro-apoptótica XIAP de reciente descubrimiento (361).

Otros mecanismos que podrían estar implicados se han descrito para el miR 15b general (incluyendo todas las formas, tanto 3p como 5p) y se trata de la capacidad de este micro de estimular la producción de ROS en la mitocondria a través de la regulación de la proteína mitocondrial sirtuin SIRT4 (362). Además tiene la capacidad de suprimir la diferenciación Th17 (o, por el contrario, facilitarla cuando está infra-expresado) lo cual se ha caracterizado en pacientes afectados de esclerosis múltiple (363), y finalmente parece regular también la expresión de HIF 2a (factor inducido por hipoxia) lo que a su vez tendrá un efecto participante en la regulación de la diferenciación de los linfocitos T helper (364).

De este estudio, además de identificar al miR 15b-5p como el miR relacionado con la recurrencia de la EC en los pacientes intervenidos, se derivan sugerencias o hipótesis patogénicas que deberían explorarse en la EC. Entre los hallazgos que se han descrito en esta enfermedad, se han objetivado

alteraciones mitocondriales ([365](#)), se ha cuestionado la capacidad apoptótica de las células de la inmunidad ([148](#)), se conoce el importante impacto que tienen las células Th17 ([154](#)) y se ha relacionado la vía de PI3K/AKT/PTEN como target terapéutico fundamental en la EC ([366](#)). En todos estos aspectos podría estar implicado el miR 15b-5p, como se ha demostrado, por el momento, en otras patologías; y quizás su modulación debería considerarse para explorar una potencial nueva diana terapéutica.

## VII. CONCLUSIONES

---

1. En este estudio, el tratamiento profiláctico tras la cirugía es el único factor clínico identificado como predictivo, asociado con un menor riesgo de desarrollar una recurrencia post-quirúrgica temprana.
2. La calprotectina fecal es un marcador útil para monitorizar a los pacientes con EC a partir del tercer mes tras la cirugía y dispone de mayor capacidad predictiva que la PCR o el fibrinógeno para detectar precozmente el desarrollo de recurrencia morfológica. Valores inferiores a 160 µg/g a partir de los 6 meses presentan un elevado valor predictivo negativo para descartar el desarrollo de lesiones tempranas en estos pacientes.
3. La concentración de citoquinas plasmáticas tras la cirugía es significativamente mayor en los pacientes que desarrollarán recurrencia precoz respecto a los que se mantienen en remisión, lo cual se observa desde el momento post-quirúrgico inmediato. Los pacientes que desarrollan recurrencia precoz presentan concentraciones significativamente más elevadas de IL-13 pre-cirugía, así como de IL-6 e IFN-γ a los 6 meses tras la intervención.
4. En este estudio, las α-defensinas 1-3, implicadas en la respuesta inmune innata, no muestran capacidad en el contexto post-quirúrgico para discernir a los pacientes que van a desarrollar recurrencia precoz.
5. La combinación de los valores de calprotectina fecal, IL-6 e IFN-γ a los 6 meses post-cirugía constituye un índice pronóstico con elevada capacidad predictiva del riesgo de recurrencia. Este índice predictivo, una vez validado en otra cohorte independiente, puede constituir una herramienta de gran utilidad para identificar con precisión a los pacientes que van a desarrollar una recurrencia precoz tras la cirugía.
6. El miRNA 15b-5p presenta una expresión diferencial entre los pacientes con EC que desarrollan recurrencia temprana tras la cirugía y los que se mantienen en remisión, y su menor expresión se asocia de forma significativa con el desarrollo de recurrencia post-quirúrgica al año.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*. 2007;369(9573):1641-57.
2. Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474(7351):298-306.
3. Moum B, Ekbom A. Epidemiology of inflammatory bowel disease--methodological considerations. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2002;34(5):364-9.
4. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012;142(1):46-54 e42; quiz e30.
5. Pajares JM, Gisbert JP. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Spain. A systematic review. *Rev Esp Enferm Dig*. 2001;93(1):9-20.
6. Saro Gismera C, Riestra Menendez S, Milla Crespo A, Sanchez Fernandez R, Lacort Fernandez M, Arguelles Fernandez G, et al. [Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease. Asturian study in 5 areas (EIICEA). Spain]. *An Med Interna*. 2003;20(1):3-9.
7. Mayberry JF, Rhodes J. Epidemiological aspects of Crohn's disease: a review of the literature. *Gut*. 1984;25(8):886-99.
8. Brullet E, Bonfill X, Urrutia G, Ruiz Ochoa V, Cueto M, Clofent J, et al. [Epidemiological study on the incidence of inflammatory bowel disease in 4 Spanish areas. Spanish Group on the Epidemiological Study of Inflammatory Bowel Disease]. *Medicina clinica*. 1998;110(17):651-6.
9. Van Assche G, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's & colitis*. 2010;4(1):7-27.
10. AbouZahr C, Cleland J, Coullare F, Macfarlane SB, Notzon FC, Setel P, et al. The way forward. *Lancet*. 2007;370(9601):1791-9.
11. D'Inca R, Dal Pont E, Di Leo V, Ferronato A, Fries W, Vettorato MG, et al. Calprotectin and lactoferrin in the assessment of intestinal inflammation and organic disease. *International journal of colorectal disease*. 2007;22(4):429-37.
12. Magro F, Langner C, Driessen A, Ensari A, Geboes K, Mantzaris GJ, et al. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's & colitis*. 2013;7(10):827-51.
13. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine*. 2002;347(6):417-29.
14. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448(7152):427-34.
15. Packey CD, Sartor RB. Interplay of commensal and pathogenic bacteria, genetic mutations, and immunoregulatory defects in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Journal of internal medicine*. 2008;263(6):597-606.
16. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen TI, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine*. 1991;324(2):84-8.
17. Lowe AM, Roy PO, M BP, Michel P, Bitton A, St-Onge L, et al. Epidemiology of Crohn's disease in Quebec, Canada. *Inflammatory bowel diseases*. 2009;15(3):429-35.
18. Brant SR. Update on the heritability of inflammatory bowel disease: the importance of twin studies. *Inflammatory bowel diseases*. 2011;17(1):1-5.

19. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ (Clinical research ed)*. 1996;312(7023):95-6.
20. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 2007;369(9573):1627-40.
21. Colombel JF, Grandbastien B, Gower-Rousseau C, Plegat S, Evrard JP, Dupas JL, et al. Clinical characteristics of Crohn's disease in 72 families. *Gastroenterology*. 1996;111(3):604-7.
22. Heyman MB, Kirschner BS, Gold BD, Ferry G, Baldassano R, Cohen SA, et al. Children with early-onset inflammatory bowel disease (IBD): analysis of a pediatric IBD consortium registry. *J Pediatr*. 2005;146(1):35-40.
23. Peeters M, Nevens H, Baert F, Hiele M, de Meyer AM, Vlietinck R, et al. Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology*. 1996;111(3):597-603.
24. Dorn SD, Abad JF, Panagopoulos G, Korelitz BI. Clinical characteristics of familial versus sporadic Crohn's disease using the Vienna Classification. *Inflammatory bowel diseases*. 2004;10(3):201-6.
25. Annese V, Andreoli A, Astegiano M, Campieri M, Caprilli R, Cucchiara S, et al. Clinical features in familial cases of Crohn's disease and ulcerative colitis in Italy: a GISC study. Italian Study Group for the Disease of Colon and Rectum. *The American journal of gastroenterology*. 2001;96(10):2939-45.
26. Picco MF, Goodman S, Reed J, Bayless TM. Methodologic pitfalls in the determination of genetic anticipation: the case of Crohn disease. *Annals of internal medicine*. 2001;134(12):1124-9.
27. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):599-603.
28. Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, et al. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nature genetics*. 1996;14(2):199-202.
29. Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, Fields CT, LaBuda MC, Rohal PM, et al. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(13):7502-7.
30. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet*. 2001;357(9272):1925-8.
31. Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Pfutzer R, Weeks DE. High-density genome scan in Crohn disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12. *American journal of human genetics*. 2000;66(6):1857-62.
32. Vermeire S, Rutgeerts P, Van Steen K, Joossens S, Claessens G, Pierik M, et al. Genome wide scan in a Flemish inflammatory bowel disease population: support for the IBD4 locus, population heterogeneity, and epistasis. *Gut*. 2004;53(7):980-6.
33. Barmada MM, Brant SR, Nicolae DL, Achkar JP, Panhuysen CI, Bayless TM, et al. A genome scan in 260 inflammatory bowel disease-affected relative pairs. *Inflammatory bowel diseases*. 2004;10(1):15-22.
34. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):603-6.

35. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(7):4812-8.
36. Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2003;124(4):993-1000.
37. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, et al. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;122(4):854-66.
38. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002;122(4):867-74.
39. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *American journal of human genetics*. 2002;70(4):845-57.
40. Barreau F, Meinzer U, Chareyre F, Berrebi D, Niwa-Kawakita M, Dussaillant M, et al. CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice. *PloS one*. 2007;2(6):e523.
41. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *The American journal of gastroenterology*. 2004;99(12):2393-404.
42. Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, Fukuda Y, Takahashi S, Ogura Y, et al. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;123(1):86-91.
43. Dassopoulos T, Nguyen GC, Talor MV, Datta LW, Isaacs KL, Lewis JD, et al. NOD2 mutations and anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies are risk factors for Crohn's disease in African Americans. *Am J Gastroenterol*. 105(2):378-86.
44. Gutierrez A, Scharl M, Sempere L, Holler E, Zapater P, Almenta I, et al. Genetic susceptibility to increased bacterial translocation influences the response to biological therapy in patients with Crohn's disease. *Gut*. 2014;63(2):272-80.
45. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2012;491(7422):119-24.
46. Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut*. 2011;60(12):1739-53.
47. Cho JH, Brant SR. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1704-12.
48. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008;451(7182):1069-75.
49. Naser SA, Arce M, Khaja A, Fernandez M, Naser N, Elwasila S, et al. Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. *World journal of gastroenterology*. 2012;18(5):412-24.
50. Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(10):767-77.
51. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*. 2008;456(7219):259-63.

52. Cadwell K, Patel KK, Maloney NS, Liu TC, Ng AC, Storer CE, et al. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell*. 2010;141(7):1135-45.
53. Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nature medicine*. 2010;16(1):90-7.
54. Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim YG, Magalhaes JG, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nature immunology*. 2010;11(1):55-62.
55. Fritz T, Niederreiter L, Adolph T, Blumberg RS, Kaser A. Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. *Gut*. 2011;60(11):1580-8.
56. Kaser A, Blumberg RS. Autophagy, microbial sensing, endoplasmic reticulum stress, and epithelial function in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1738-47.
57. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature genetics*. 2008;40(8):955-62.
58. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nature genetics*. 2007;39(7):830-2.
59. Leshed A, Somasundaram R, de Haar C, van der Woude CJ, Braat H, Peppelenbosch MP. Role of defective autophagia and the intestinal flora in Crohn disease. *Self/nonself*. 2010;1(4):323-7.
60. McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, Chilewski SD, Landry A, Goyette P, et al. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat Genet*. 2008;40(9):1107-12.
61. Tong Y, Yamaguchi H, Giaime E, Boyle S, Kopan R, Kelleher RJ, 3rd, et al. Loss of leucine-rich repeat kinase 2 causes impairment of protein degradation pathways, accumulation of alpha-synuclein, and apoptotic cell death in aged mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(21):9879-84.
62. Skipper L, Li Y, Bonnard C, Pavanni R, Yih Y, Chua E, et al. Comprehensive evaluation of common genetic variation within LRRK2 reveals evidence for association with sporadic Parkinson's disease. *Human molecular genetics*. 2005;14(23):3549-56.
63. Wang S, Wang F, Shi X, Dai J, Peng Y, Guo X, et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) Val-9Ala polymorphism and cancer risk - A meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2009;45(16):2874-81.
64. Nair RP, Duffin KC, Helms C, Ding J, Stuart PE, Goldgar D, et al. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nat Genet*. 2009;41(2):199-204.
65. Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A, et al. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet*. 2007;39(11):1329-37.
66. Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, et al. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2004;351(20):2069-79.
67. Niessner M, Volk BA. Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clinical and experimental immunology*. 1995;101(3):428-35.

68. Gerhartz C, Heesel B, Sasse J, Hemmann U, Landgraf C, Schneider-Mergener J, et al. Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(22):12991-8.
69. Vignais ML, Sadowski HB, Watling D, Rogers NC, Gilman M. Platelet-derived growth factor induces phosphorylation of multiple JAK family kinases and STAT proteins. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(4):1759-69.
70. Sampath D, Castro M, Look DC, Holtzman MJ. Constitutive activation of an epithelial signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway in asthma. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(9):1353-61.
71. Yokota A, Narazaki M, Shima Y, Murata N, Tanaka T, Suemura M, et al. Preferential and persistent activation of the STAT1 pathway in rheumatoid synovial fluid cells. *The Journal of rheumatology*. 2001;28(9):1952-9.
72. Wu F, Dassopoulos T, Cope L, Maitra A, Brant SR, Harris ML, et al. Genome-wide gene expression differences in Crohn's disease and ulcerative colitis from endoscopic pinch biopsies: insights into distinctive pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(7):807-21.
73. Schreiber S, Rosenstiel P, Hampe J, Nikolaus S, Groessner B, Schottelius A, et al. Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 in human chronic inflammatory bowel disease. *Gut*. 2002;51(3):379-85.
74. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine*. 2009;361(21):2066-78.
75. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature*. 2007;447(7143):396-8.
76. Yung RL, Julius A. Epigenetics, aging, and autoimmunity. *Autoimmunity*. 2008;41(4):329-35.
77. Holliday R. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics*. 2006;1(2):76-80.
78. Keller TE, Yi SV. DNA methylation and evolution of duplicate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(16):5932-7.
79. Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nature reviews Genetics*. 2012;13(2):97-109.
80. Martin TD, Chan SS, Hart AR. Environmental factors in the relapse and recurrence of inflammatory bowel disease: a review of the literature. *Digestive diseases and sciences*. 2015;60(5):1396-405.
81. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 2008;9(2):102-14.
82. Iborra M, Beltran B, Nos P. [New knowledge in genetics and inflammatory bowel disease. Are there any practical applications?]. *Gastroenterologia y hepatologia*. 2011;34(9):591-8.
83. Kalla R, Ventham NT, Kennedy NA, Quintana JF, Nimmo ER, Buck AH, et al. MicroRNAs: new players in IBD. *Gut*. 2014.
84. Iborra M, Bernuzzi F, Invernizzi P, Danese S. MicroRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: crucial regulators in immune response. *Autoimmun Rev*. 2012;11(5):305-14.
85. Moret I, Sanchez-Izquierdo D, Iborra M, Tortosa L, Navarro-Puche A, Nos P, et al. Assessing an improved protocol for plasma microRNA extraction. *PLoS one*. 2013;8(12):e82753.

86. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell research*. 2008;18(10):997-1006.
87. Wu F, Zikusoka M, Trindade A, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, et al. MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2 alpha. *Gastroenterology*. 2008;135(5):1624-35 e24.
88. Wu F, Guo NJ, Tian H, Marohn M, Gearhart S, Bayless TM, et al. Peripheral blood microRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(1):241-50.
89. Jensen MD, Andersen RF, Christensen H, Nathan T, Kjeldsen J, Madsen JS. Circulating microRNAs as biomarkers of adult Crohn's disease. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2015;27(9):1038-44.
90. Peck BC, Weiser M, Lee SE, Gipson GR, Iyer VB, Sartor RB, et al. MicroRNAs Classify Different Disease Behavior Phenotypes of Crohn's Disease and May Have Prognostic Utility. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(9):2178-87.
91. Fujioka S, Nakamichi I, Esaki M, Asano K, Matsumoto T, Kitazono T. Serum microRNA levels in patients with Crohn's disease during induction therapy by infliximab. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2014;29(6):1207-14.
92. Zahm AM, Thayu M, Hand NJ, Horner A, Leonard MB, Friedman JR. Circulating microRNA is a biomarker of pediatric Crohn disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2011;53(1):26-33.
93. Wu F, Zhang S, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, Meltzer SJ, et al. Identification of microRNAs associated with ileal and colonic Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(10):1729-38.
94. Fasseu M, Treton X, Guichard C, Pedruzzi E, Cazals-Hatem D, Richard C, et al. Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *PLoS One*. 2010;5(10).
95. Iborra M, Bernuzzi F, Correale C, Vetrano S, Fiorino G, Beltran B, et al. Identification of serum and tissue micro-RNA expression profiles in different stages of inflammatory bowel disease. *Clinical and experimental immunology*. 2013;173(2):250-8.
96. Paraskevi A, Theodoropoulos G, Papaconstantinou I, Mantzaris G, Nikiteas N, Gazouli M. Circulating MicroRNA in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's & colitis*. 2012;6(9):900-4.
97. Chen WX, Ren LH, Shi RH. Implication of miRNAs for inflammatory bowel disease treatment: Systematic review. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*. 2014;5(2):63-70.
98. Glinisky GV. Disease phenocode analysis identifies SNP-guided microRNA maps (MirMaps) associated with human "master" disease genes. *Cell Cycle*. 2008;7(23):3680-94.
99. Kim DH, Cheon JH. Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Recent Advances in Biologic Therapies. *Immune network*. 2017;17(1):25-40.
100. Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell*. 2010;140(6):859-70.
101. Cheroutre H, Madakamutil L. Acquired and natural memory T cells join forces at the mucosal front line. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(4):290-300.
102. Blander JM, Sander LE. Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(3):215-25.

103. Rhee SH, Im E, Riegler M, Kokkotou E, O'Brien M, Pothoulakis C. Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(38):13610-5.
104. Lee J, Mo JH, Katakura K, Alkalay I, Rucker AN, Liu YT, et al. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nature cell biology*. 2006;8(12):1327-36.
105. Yan F, Polk DB. Disruption of NF-kappaB signalling by ancient microbial molecules: novel therapies of the future? *Gut*. 2010;59(4):421-6.
106. Sansonetti PJ. War and peace at mucosal surfaces. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(12):953-64.
107. Bernardo D. Human intestinal dendritic cells as controllers of mucosal immunity. *Revista espanola de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva*. 2013;105(5):279-90.
108. Maynard CL, Weaver CT. Intestinal effector T cells in health and disease. *Immunity*. 2009;31(3):389-400.
109. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474(7351):307-17.
110. Tappenden KA, Deutsch AS. The physiological relevance of the intestinal microbiota--contributions to human health. *Journal of the American College of Nutrition*. 2007;26(6):679S-83S.
111. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005;307(5717):1915-20.
112. Mayer L. Evolving paradigms in the pathogenesis of IBD. *J Gastroenterol*. 2010;45(1):9-16.
113. Barrett JC, Lee JC, Lees CW, Prescott NJ, Anderson CA, Phillips A, et al. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nature genetics*. 2009;41(12):1330-4.
114. Thachil E, Hugot JP, Arbeille B, Paris R, Grodet A, Peuchmaur M, et al. Abnormal activation of autophagy-induced crinophagy in Paneth cells from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2012;142(5):1097-9 e4.
115. Plantinga TS, Crisan TO, Oosting M, van de Veerdonk FL, de Jong DJ, Philpott DJ, et al. Crohn's disease-associated ATG16L1 polymorphism modulates pro-inflammatory cytokine responses selectively upon activation of NOD2. *Gut*. 2011;60(9):1229-35.
116. Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*. 2007;56(1):61-72.
117. Soderholm JD, Olaison G, Peterson KH, Franzen LE, Lindmark T, Wiren M, et al. Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut*. 2002;50(3):307-13.
118. Schoultz I, Soderholm JD, McKay DM. Is metabolic stress a common denominator in inflammatory bowel disease? *Inflammatory bowel diseases*. 2011;17(9):2008-18.
119. Arnott ID, Kingstone K, Ghosh S. Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2000;35(11):1163-9.
120. Oshitani N, Watanabe K, Nakamura S, Fujiwara Y, Higuchi K, Arakawa T. Dislocation of tight junction proteins without F-actin disruption in inactive Crohn's disease. *Int J Mol Med*. 2005;15(3):407-10.

121. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, et al. Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1998;115(6):1405-13.
122. Soderholm JD, Peterson KH, Olaison G, Franzen LE, Westrom B, Magnusson KE, et al. Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology*. 1999;117(1):65-72.
123. Wang F, Graham WV, Wang Y, Witkowski ED, Schwarz BT, Turner JR. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *The American journal of pathology*. 2005;166(2):409-19.
124. Ye D, Ma I, Ma TY. Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(3):G496-504.
125. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, et al. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(50):18129-34.
126. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(7):521-33.
127. Zhao L, Lu W. Defensins in innate immunity. *Current opinion in hematology*. 2014;21(1):37-42.
128. Wehkamp J, Koslowski M, Wang G, Stange EF. Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease. *Mucosal immunology*. 2008;1 Suppl 1:S67-74.
129. Keshav S. Paneth cells: leukocyte-like mediators of innate immunity in the intestine. *Journal of leukocyte biology*. 2006;80(3):500-8.
130. Bevins CL. Innate immune functions of alpha-defensins in the small intestine. *Digestive diseases*. 2013;31(3-4):299-304.
131. Sandborn WJ, Schreiber S, Hanauer SB, Colombel JF, Bloomfield R, Lichtenstein GR, et al. Reinduction with certolizumab pegol in patients with relapsed Crohn's disease: results from the PRECiSE 4 Study. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2010;8(8):696-702 e1.
132. Peyrin-Biroulet L, Chamailard M. NOD2 and defensins: translating innate to adaptive immunity in Crohn's disease. *Journal of endotoxin research*. 2007;13(3):135-9.
133. Jager S, Stange EF, Wehkamp J. Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease. *Langenbeck's archives of surgery*. 2013;398(1):1-12.
134. Lakatos PL, Altorjay I, Mandi Y, Lakatos L, Tumpek J, Kovacs A, et al. Interaction between seroreactivity to microbial antigens and genetics in Crohn's disease: is there a role for defensins? *Tissue antigens*. 2008;71(6):552-9.
135. Wehkamp J, Stange EF. Paneth's disease. *Journal of Crohn's & colitis*. 2010;4(5):523-31.
136. Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, Huang N, Fowler EV, Radford-Smith GL. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut*. 2008;57(7):903-10.
137. Yamaguchi N, Isomoto H, Mukae H, Ishimoto H, Ohnita K, Shikuwa S, et al. Concentrations of alpha- and beta-defensins in plasma of patients with inflammatory bowel disease. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2009;58(4):192-7.

138. Gutierrez A, Holler E, Zapater P, Sempere L, Jover R, Perez-Mateo M, et al. Antimicrobial peptide response to blood translocation of bacterial DNA in Crohn's disease is affected by NOD2/CARD15 genotype. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(8):1641-50.
139. Cerrillo E, Moret I, Iborra M, Saez-Gonzalez E, Buso E, Ramos D, et al. alpha-Defensins(alpha Def) 1-3 Are Specific Plasmatic Markers for Crohn's Disease (CD) at Diagnosis and Tissue alpha-Def 5 Methylation Is a Pathogenic Mechanism for alpha Def-5 Down Regulation in CD. *Gastroenterology.* 2016;150(4):S987-S.
140. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology.* 1998;115(1):182-205.
141. Hlavaty T, Ferrante M, Henckaerts L, Pierik M, Rutgeerts P, Vermeire S. Predictive model for the outcome of infliximab therapy in Crohn's disease based on apoptotic pharmacogenetic index and clinical predictors. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13(4):372-9.
142. Van den Brande JM, Koehler TC, Zelinkova Z, Bennink RJ, te Velde AA, ten Cate FJ, et al. Prediction of antitumour necrosis factor clinical efficacy by real-time visualisation of apoptosis in patients with Crohn's disease. *Gut.* 2007;56(4):509-17.
143. Cossu A, Biancone L, Ascolani M, Pallone F, Boirivant M. "In vitro" azathioprine-induced changes in peripheral T cell apoptosis and IFN-gamma production associate with drug response in patients with Crohn's Disease. *Journal of Crohn's & colitis.* 2013;7(6):441-50.
144. Boirivant M, Pica R, DeMaria R, Testi R, Pallone F, Strober W. Stimulated human lamina propria T cells manifest enhanced Fas-mediated apoptosis. *The Journal of clinical investigation.* 1996;98(11):2616-22.
145. Ina K, Itoh J, Fukushima K, Kusugami K, Yamaguchi T, Kyokane K, et al. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *Journal of immunology.* 1999;163(2):1081-90.
146. Itoh J, de La Motte C, Strong SA, Levine AD, Fiocchi C. Decreased Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease. *Gut.* 2001;49(1):35-41.
147. de Souza HS, West GA, Rebert N, de la Motte C, Drazba J, Fiocchi C. Increased levels of survivin, via association with heat shock protein 90, in mucosal T cells from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2012;143(4):1017-26 e9.
148. Moret I, Rausell F, Iborra M, Bastida G, Aguas M, Tortosa L, et al. Apoptosis Resistance of Crohn's Disease Blood T-Cells Depends on Catalase Activity Inhibition. *Gastroenterology.* 2012;142(5):S885-S.
149. Bu P, Keshavarzian A, Stone DD, Liu J, Le PT, Fisher S, et al. Apoptosis: one of the mechanisms that maintains unresponsiveness of the intestinal mucosal immune system. *Journal of immunology.* 2001;166(10):6399-403.
150. Boirivant M, Marini M, Di Felice G, Pronio AM, Montesani C, Tersigni R, et al. Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology.* 1999;116(3):557-65.
151. Doering J, Begue B, Lentze MJ, Rieux-Laucat F, Goulet O, Schmitz J, et al. Induction of T lymphocyte apoptosis by sulphasalazine in patients with Crohn's disease. *Gut.* 2004;53(11):1632-8.
152. Santaolalla R, Mane J, Pedrosa E, Loren V, Fernandez-Banares F, Mallolas J, et al. Apoptosis resistance of mucosal lymphocytes and IL-10 deficiency in patients with steroid-refractory Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(7):1490-500.
153. de Souza HS, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology.* 2016;13(1):13-27.

154. Rennert H, Bercovich D, Hubert A, Abeliovich D, Rozovsky U, Bar-Shira A, et al. A novel founder mutation in the RNASEL gene, 471delAAAG, is associated with prostate cancer in Ashkenazi Jews. *American journal of human genetics*. 2002;71(4):981-4.
155. Pariente B, Cosnes J, Danese S, Sandborn WJ, Lewin M, Fletcher JG, et al. Development of the Crohn's disease digestive damage score, the Lemann score. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(6):1415-22.
156. Raza K, Falciani F, Curnow SJ, Ross EJ, Lee CY, Akbar AN, et al. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis research & therapy*. 2005;7(4):R784-95.
157. Thia KT, Sandborn WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Loftus EV, Jr. Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. *Gastroenterology*. 2010;139(4):1147-55.
158. Peyrin-Biroulet L, Loftus EV, Jr., Colombel JF, Sandborn WJ. Early Crohn disease: a proposed definition for use in disease-modification trials. *Gut*. 2010;59(2):141-7.
159. Peyrin-Biroulet L, Billioud V, D'Haens G, Panaccione R, Feagan B, Panes J, et al. Development of the Paris definition of early Crohn's disease for disease-modification trials: results of an international expert opinion process. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(12):1770-6.
160. Cominelli F. Early and late gut immune responses in IBD. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2008;46 Suppl 1:E20.
161. Desreumaux P, Brandt E, Gambiez L, Emilie D, Geboes K, Klein O, et al. Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1997;113(1):118-26.
162. Kugathasan S, Saubermann LJ, Smith L, Kou D, Itoh J, Binion DG, et al. Mucosal T-cell immunoregulation varies in early and late inflammatory bowel disease. *Gut*. 2007;56(12):1696-705.
163. Rivera-Nieves J, Ho J, Bamias G, Ivashkina N, Ley K, Oppermann M, et al. Antibody blockade of CCL25/CCR9 ameliorates early but not late chronic murine ileitis. *Gastroenterology*. 2006;131(5):1518-29.
164. Spencer DM, Veldman GM, Banerjee S, Willis J, Levine AD. Distinct inflammatory mechanisms mediate early versus late colitis in mice. *Gastroenterology*. 2002;122(1):94-105.
165. Bamias G, Martin C, Mishina M, Ross WG, Rivera-Nieves J, Marini M, et al. Proinflammatory effects of TH2 cytokines in a murine model of chronic small intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2005;128(3):654-66.
166. Brandt E, Colombel JF, Ectors N, Gambiez L, Emilie D, Geboes K, et al. Enhanced production of IL-8 in chronic but not in early ileal lesions of Crohn's disease (CD). *Clinical and experimental immunology*. 2000;122(2):180-5.
167. Veny M, Esteller M, Ricart E, Pique JM, Panes J, Salas A. Late Crohn's disease patients present an increase in peripheral Th17 cells and cytokine production compared with early patients. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2010;31(5):561-72.
168. Gionchetti P, Amadini C, Rizzello F, Venturi A, Poggioli G, Campieri M. Probiotics for the treatment of postoperative complications following intestinal surgery. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2003;17(5):821-31.
169. Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Venturi A, Lammers KM, Brigidi P, et al. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1202-9.

170. D'Haens GR, Vermeire S, Van Assche G, Noman M, Aerden I, Van Olmen G, et al. Therapy of metronidazole with azathioprine to prevent postoperative recurrence of Crohn's disease: a controlled randomized trial. *Gastroenterology*. 2008;135(4):1123-9.
171. McGuckin MA, Eri R, Simms LA, Florin TH, Radford-Smith G. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*. 2009;15(1):100-13.
172. Chu H, Khosravi A, Kusumawardhani IP, Kwon AH, Vasconcelos AC, Cunha LD, et al. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Science*. 2016;352(6289):1116-20.
173. Almenier HA, Al Menshawy HH, Maher MM, Al Gamal S. Oxidative stress and inflammatory bowel disease. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012;4:1335-44.
174. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(34):13780-5.
175. Dey N, Soergel DA, Repo S, Brenner SE. Association of gut microbiota with post-operative clinical course in Crohn's disease. *BMC gastroenterology*. 2013;13:131.
176. Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*. 2011;60(5):631-7.
177. Andersen V, Olsen A, Carbonnel F, Tjonneland A, Vogel U. Diet and risk of inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis*. 2012;44(3):185-94.
178. Hansen TS, Jess T, Vind I, Elkjaer M, Nielsen MF, Gamborg M, et al. Environmental factors in inflammatory bowel disease: a case-control study based on a Danish inception cohort. *J Crohns Colitis*. 2011;5(6):577-84.
179. Pearson M, Teahon K, Levi AJ, Bjarnason I. Food intolerance and Crohn's disease. *Gut*. 1993;34(6):783-7.
180. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1489-99.
181. D'Argenio V, Precone V, Casaburi G, Miele E, Martinelli M, Staiano A, et al. An altered gut microbiome profile in a child affected by Crohn's disease normalized after nutritional therapy. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(5):851-2.
182. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clinic proceedings*. 2006;81(11):1462-71.
183. Ryan WR, Allan RN, Yamamoto T, Keighley MR. Crohn's disease patients who quit smoking have a reduced risk of reoperation for recurrence. *American journal of surgery*. 2004;187(2):219-25.
184. Rubin DT, Hanauer SB. Smoking and inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2000;12(8):855-62.
185. Biedermann L, Brulisauer K, Zeitz J, Frei P, Scharl M, Vavricka SR, et al. Smoking cessation alters intestinal microbiota: insights from quantitative investigations on human fecal samples using FISH. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(9):1496-501.
186. Lakatos PL, Szamosi T, Lakatos L. Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? *World J Gastroenterol*. 2007;13(46):6134-9.
187. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbom A. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2003;124(1):40-6.
188. Kefalakes H, Stylianides TJ, Amanakis G, Kolios G. Exacerbation of inflammatory bowel diseases associated with the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: myth or reality? *European journal of clinical pharmacology*. 2009;65(10):963-70.

189. Forrest K, Symmons D, Foster P. Systematic review: is ingestion of paracetamol or non-steroidal anti-inflammatory drugs associated with exacerbations of inflammatory bowel disease? *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2004;20(10):1035-43.
190. Reinisch W, Miehsler W, Dejaco C, Harrer M, Waldhoer T, Lichtenberger C, et al. An open-label trial of the selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, rofecoxib, in inflammatory bowel disease-associated peripheral arthritis and arthralgia. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2003;17(11):1371-80.
191. Maunder RG, Levenstein S. The role of stress in the development and clinical course of inflammatory bowel disease: epidemiological evidence. *Curr Mol Med*. 2008;8(4):247-52.
192. Maunder RG. Evidence that stress contributes to inflammatory bowel disease: evaluation, synthesis, and future directions. *Inflammatory bowel diseases*. 2005;11(6):600-8.
193. Mawdsley JE, Rampton DS. The role of psychological stress in inflammatory bowel disease. *Neuroimmunomodulation*. 2006;13(5-6):327-36.
194. Ellingson JL, Anderson JL, Koziczowski JJ, Radcliff RP, Sloan SJ, Allen SE, et al. Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J Food Prot*. 2005;68(5):966-72.
195. Pierce ES. Where are all the *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in patients with Crohn's disease? *PLoS pathogens*. 2009;5(3):e1000234.
196. Olsen I, Tollefsen S, Aagaard C, Reitan LJ, Bannantine JP, Andersen P, et al. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* reactive CD4 T cells from intestinal biopsies of Crohn's disease patients. *PloS one*. 2009;4(5):e5641.
197. Farmer RG, Hawk WA, Turnbull RB, Jr. Clinical patterns in Crohn's disease: a statistical study of 615 cases. *Gastroenterology*. 1975;68(4 Pt 1):627-35.
198. Greenstein AJ, Lachman P, Sachar DB, Springhorn J, Heimann T, Janowitz HD, et al. Perforating and non-perforating indications for repeated operations in Crohn's disease: evidence for two clinical forms. *Gut*. 1988;29(5):588-92.
199. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie*. 2005;19 Suppl A:5A-36A.
200. Tarrant KM, Barclay ML, Frampton CM, Geary RB. Perianal disease predicts changes in Crohn's disease phenotype-results of a population-based study of inflammatory bowel disease phenotype. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(12):3082-93.
201. Jess T, Riis L, Vind I, Winther KV, Borg S, Binder V, et al. Changes in clinical characteristics, course, and prognosis of inflammatory bowel disease during the last 5 decades: a population-based study from Copenhagen, Denmark. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(4):481-9.
202. Ramadas AV, Gunesh S, Thomas GA, Williams GT, Hawthorne AB. Natural history of Crohn's disease in a population-based cohort from Cardiff (1986-2003): a study of changes in medical treatment and surgical resection rates. *Gut*. 2010;59(9):1200-6.
203. Lakatos PL, Golovics PA, David G, Pandur T, Erdelyi Z, Horvath A, et al. Has there been a change in the natural history of Crohn's disease? Surgical rates and medical management in a population-based inception cohort from Western Hungary between 1977-2009. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(4):579-88.

204. Nuij VJ, Zelinkova Z, Rijk MC, Beukers R, Ouwendijk RJ, Quispel R, et al. Phenotype of inflammatory bowel disease at diagnosis in the Netherlands: a population-based inception cohort study (the Delta Cohort). *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(10):2215-22.
205. Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, Aadland E, Schulz T, Vatn MH, et al. Clinical course in Crohn's disease: results of a five-year population-based follow-up study (the IBSEN study). *Scandinavian journal of gastroenterology.* 2007;42(5):602-10.
206. Solberg IC, Vatn MH, Hoie O, Stray N, Sauar J, Jahnsen J, et al. Clinical course in Crohn's disease: results of a Norwegian population-based ten-year follow-up study. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association.* 2007;5(12):1430-8.
207. Levine A, Griffiths A, Markowitz J, Wilson DC, Turner D, Russell RK, et al. Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(6):1314-21.
208. Lapidus A, Bernell O, Hellers G, Lofberg R. Clinical course of colorectal Crohn's disease: a 35-year follow-up study of 507 patients. *Gastroenterology.* 1998;114(6):1151-60.
209. Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, Binder V. Disease activity courses in a regional cohort of Crohn's disease patients. *Scandinavian journal of gastroenterology.* 1995;30(7):699-706.
210. Veloso FT, Ferreira JT, Barros L, Almeida S. Clinical outcome of Crohn's disease: analysis according to the vienna classification and clinical activity. *Inflamm Bowel Dis.* 2001;7(4):306-13.
211. Romberg-Camps MJ, Dagnelie PC, Kester AD, Hesselink-van de Kruijs MA, Cilissen M, Engels LG, et al. Influence of phenotype at diagnosis and of other potential prognostic factors on the course of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2009;104(2):371-83.
212. Beaugerie L, Seksik P, Nion-Larmurier I, Gendre JP, Cosnes J. Predictors of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2006;130(3):650-6.
213. Loly C, Belaiche J, Louis E. Predictors of severe Crohn's disease. *Scandinavian journal of gastroenterology.* 2008;43(8):948-54.
214. Lichtenstein GR, Olson A, Travers S, Diamond RH, Chen DM, Pritchard ML, et al. Factors associated with the development of intestinal strictures or obstructions in patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(5):1030-8.
215. Lakatos PL, Czegledi Z, Szamosi T, Banai J, David G, Zsigmond F, et al. Perianal disease, small bowel disease, smoking, prior steroid or early azathioprine/biological therapy are predictors of disease behavior change in patients with Crohn's disease. *World journal of gastroenterology.* 2009;15(28):3504-10.
216. Cosnes J, Carbonnel F, Carrat F, Beaugerie L, Cattan S, Gendre J. Effects of current and former cigarette smoking on the clinical course of Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics.* 1999;13(11):1403-11.
217. Mazor Y, Maza I, Kaufman E, Ben-Horin S, Karban A, Chowers Y, et al. Prediction of disease complication occurrence in Crohn's disease using phenotype and genotype parameters at diagnosis. *Journal of Crohn's & colitis.* 2011;5(6):592-7.
218. Cosnes J, Cattan S, Blain A, Beaugerie L, Carbonnel F, Parc R, et al. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2002;8(4):244-50.
219. Zabana Y, Garcia-Planella E, van Domselaar M, Manosa M, Gordillo J, Lopez-Sanroman A, et al. Predictors of favourable outcome in inflammatory Crohn's disease.

- A retrospective observational study. *Gastroenterologia y hepatologia*. 2013;36(10):616-23.
220. Sandborn WJ, Feagan BG, Hanauer SB, Lochs H, Lofberg R, Modigliani R, et al. A review of activity indices and efficacy endpoints for clinical trials of medical therapy in adults with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;122(2):512-30.
221. Ha C, Kornbluth A. Mucosal healing in inflammatory bowel disease: where do we stand? *Current gastroenterology reports*. 2010;12(6):471-8.
222. Best WR, Bechtel JM, Singleton JW, Kern F, Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*. 1976;70(3):439-44.
223. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet*. 1980;1(8167):514.
224. Vermeire S, Schreiber S, Sandborn WJ, Dubois C, Rutgeerts P. Correlation between the Crohn's disease activity and Harvey-Bradshaw indices in assessing Crohn's disease severity. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2010;8(4):357-63.
225. van Hees PA, van Elteren PH, van Lier HJ, van Tongeren JH. An index of inflammatory activity in patients with Crohn's disease. *Gut*. 1980;21(4):279-86.
226. Irvine EJ. Usual therapy improves perianal Crohn's disease as measured by a new disease activity index. McMaster IBD Study Group. *Journal of clinical gastroenterology*. 1995;20(1):27-32.
227. Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezaand RA, et al. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *The New England journal of medicine*. 1999;340(18):1398-405.
228. Mary JY, Modigliani R. Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study. Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID). *Gut*. 1989;30(7):983-9.
229. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, Baert F, Bulois P, Maunoury V, et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointestinal endoscopy*. 2004;60(4):505-12.
230. Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Beyls J, Kerremans R, Hiele M. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1990;99(4):956-63.
231. Chiorean MV, Sandrasegaran K, Saxena R, Maglinte DD, Nakeeb A, Johnson CS. Correlation of CT enteroclysis with surgical pathology in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(11):2541-50.
232. Rimola J, Rodriguez S, Garcia-Bosch O, Ordas I, Ayala E, Aceituno M, et al. Magnetic resonance for assessment of disease activity and severity in ileocolonic Crohn's disease. *Gut*. 2009;58(8):1113-20.
233. Ordas I, Rimola J, Rodriguez S, Paredes JM, Martinez-Perez MJ, Blanc E, et al. Accuracy of magnetic resonance enterography in assessing response to therapy and mucosal healing in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2014;146(2):374-82 e1.
234. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2004;10(5):661-5.
235. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut*. 2006;55(3):426-31.

236. Consigny Y, Modigliani R, Colombel JF, Dupas JL, Lemann M, Mary JY, et al. A simple biological score for predicting low risk of short-term relapse in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12(7):551-7.
237. Gisbert JP, Gonzalez-Lama Y, Mate J. [Role of biological markers in inflammatory bowel disease]. *Gastroenterologia y hepatologia.* 2007;30(3):117-29.
238. Andre C, Descos L, Andre F, Vignal J, Landais P, Fermanian J. Biological measurements of Crohn's disease activity--a reassessment. *Hepato-gastroenterology.* 1985;32(3):135-7.
239. Foell D, Wittkowski H, Roth J. Monitoring disease activity by stool analyses: from occult blood to molecular markers of intestinal inflammation and damage. *Gut.* 2009;58(6):859-68.
240. D'Haens G, Ferrante M, Vermeire S, Baert F, Noman M, Moortgat L, et al. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18(12):2218-24.
241. Sipponen T, Karkkainen P, Savilahti E, Kolho KL, Nuutinen H, Turunen U, et al. Correlation of faecal calprotectin and lactoferrin with an endoscopic score for Crohn's disease and histological findings. *Alimentary pharmacology & therapeutics.* 2008;28(10):1221-9.
242. Burri E, Beglinger C. The use of fecal calprotectin as a biomarker in gastrointestinal disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;8(2):197-210.
243. Sipponen T, Savilahti E, Kolho KL, Nuutinen H, Turunen U, Farkkila M. Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14(1):40-6.
244. Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A, Trummler M, Vavricka SR, Bruegger LE, et al. Fecal calprotectin correlates more closely with the Simple Endoscopic Score for Crohn's disease (SES-CD) than CRP, blood leukocytes, and the CDAI. *Am J Gastroenterol.* 2010;105(1):162-9.
245. Lin JF, Chen JM, Zuo JH, Yu A, Xiao ZJ, Deng FH, et al. Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity. *Inflamm Bowel Dis.* 2014;20(8):1407-15.
246. Stawczyk-Eder K, Eder P, Lykowska-Szuber L, Krela-Kazmierczak I, Klimczak K, Szymczak A, et al. Is faecal calprotectin equally useful in all Crohn's disease locations? A prospective, comparative study. *Archives of medical science : AMS.* 2015;11(2):353-61.
247. Jensen MD, Kjeldsen J, Nathan T. Fecal calprotectin is equally sensitive in Crohn's disease affecting the small bowel and colon. *Scandinavian journal of gastroenterology.* 2011;46(6):694-700.
248. Cerrillo E, Beltran B, Pous S, Echarri A, Gallego JC, Iborra M, et al. Fecal Calprotectin in Ileal Crohn's Disease: Relationship with Magnetic Resonance Enterography and a Pathology Score. *Inflamm Bowel Dis.* 2015;21(7):1572-9.
249. Molander P, af Bjorkestén CG, Mustonen H, Haapamaki J, Vauhkonen M, Kolho KL, et al. Fecal calprotectin concentration predicts outcome in inflammatory bowel disease after induction therapy with TNFalpha blocking agents. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18(11):2011-7.
250. Guidi L, Marzo M, Andrisani G, Felice C, Pugliese D, Mocci G, et al. Faecal calprotectin assay after induction with anti-Tumour Necrosis Factor alpha agents in inflammatory bowel disease: Prediction of clinical response and mucosal healing at one year. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of*

- Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver. 2014;46(11):974-9.
251. Roseth AG, Aadland E, Grzyb K. Normalization of faecal calprotectin: a predictor of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2004;39(10):1017-20.
252. Sipponen T, Bjorkesten CG, Farkkila M, Nuutinen H, Savilahti E, Kolho KL. Faecal calprotectin and lactoferrin are reliable surrogate markers of endoscopic response during Crohn's disease treatment. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2010;45(3):325-31.
253. Mao R, Xiao YL, Gao X, Chen BL, He Y, Yang L, et al. Fecal calprotectin in predicting relapse of inflammatory bowel diseases: a meta-analysis of prospective studies. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18(10):1894-9.
254. de Suray N, Salleron J, Vernier-Massouille G, Grimaud J-C, Bouhnik Y, Laharie D, et al. Close Monitoring of CRP and Fecal Calprotectin is Able to Predict Clinical Relapse in Patients With Crohn's Disease in Remission After Infliximab Withdrawal. a Sub-Analysis of the Stori Study. *Gastroenterology*. 2012;142(5):S149-S.
255. Gomollon F, Dignass A, Annesse 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. *Journal of Crohn's & colitis*. 2017;11(1):3-25.
256. Sokol H, Seksik P, Cosnes J. Complications and surgery in the inflammatory bowel diseases biological era. *Current opinion in gastroenterology*. 2014;30(4):378-84.
257. Frolkis AD, Lipton DS, Fiest KM, Negron ME, Dykeman J, deBruyn J, et al. Cumulative incidence of second intestinal resection in Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis of population-based studies. *Am J Gastroenterol*. 2014;109(11):1739-48.
258. Cullen G, O'Toole A, Keegan D, Sheahan K, Hyland JM, O'Donoghue D P. Long-term clinical results of ileocecal resection for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(11):1369-73.
259. Farmer RG, Whelan G, Fazio VW. Long-term follow-up of patients with Crohn's disease. Relationship between the clinical pattern and prognosis. *Gastroenterology*. 1985;88(6):1818-25.
260. Bernell O, Lapidus A, Hellers G. Risk factors for surgery and postoperative recurrence in Crohn's disease. *Annals of surgery*. 2000;231(1):38-45.
261. Bernell O, Lapidus A, Hellers G. Risk factors for surgery and recurrence in 907 patients with primary ileocaecal Crohn's disease. *The British journal of surgery*. 2000;87(12):1697-701.
262. Lazarev M, Huang C, Bitton A, Cho JH, Duerr RH, McGovern DP, et al. Relationship between proximal Crohn's disease location and disease behavior and surgery: a cross-sectional study of the IBD Genetics Consortium. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(1):106-12.
263. Alos R, Hinojosa J. Timing of surgery in Crohn's disease: a key issue in the management. *World journal of gastroenterology*. 2008;14(36):5532-9.
264. Aratari A, Papi C, Leandro G, Viscido A, Capurso L, Caprilli R. Early versus late surgery for ileo-caecal Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2007;26(10):1303-12.
265. Gionchetti P, Dignass A, Danese S, Magro Dias FJ, Rogler G, Lakatos PL, et al. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 2: Surgical Management and Special Situations. *Journal of Crohn's & colitis*. 2017;11(2):135-49.

266. Nordgren SR, Fasth SB, Oresland TO, Hulten LA. Long-term follow-up in Crohn's disease. Mortality, morbidity, and functional status. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 1994;29(12):1122-8.
267. Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Kerremans R, Coenegrachts JL, Coremans G. Natural history of recurrent Crohn's disease at the ileocolonic anastomosis after curative surgery. *Gut*. 1984;25(6):665-72.
268. D'Haens GR, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeerts P. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology*. 1998;114(2):262-7.
269. Pallotta N, Giovannone M, Pezzotti P, Gigliozzi A, Barberani F, Piacentino D, et al. Ultrasonographic detection and assessment of the severity of Crohn's disease recurrence after ileal resection. *BMC gastroenterology*. 2010;10:69.
270. Koilakou S, Sailer J, Peloschek P, Ferlitsch A, Vogelsang H, Miehsler W, et al. Endoscopy and MR enteroclysis: equivalent tools in predicting clinical recurrence in patients with Crohn's disease after ileocolic resection. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(2):198-203.
271. Low RN, Francis IR, Politoske D, Bennett M. Crohn's disease evaluation: comparison of contrast-enhanced MR imaging and single-phase helical CT scanning. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*. 2000;11(2):127-35.
272. Sands BE. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1518-32.
273. Chardavoyne R, Flint GW, Pollack S, Wise L. Factors affecting recurrence following resection for Crohn's disease. *Diseases of the colon and rectum*. 1986;29(8):495-502.
274. Buisson A, Chevaux JB, Allen PB, Bommelaer G, Peyrin-Biroulet L. Review article: the natural history of postoperative Crohn's disease recurrence. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2012;35(6):625-33.
275. Nos P, Domenech E. Postoperative Crohn's disease recurrence: a practical approach. *World journal of gastroenterology*. 2008;14(36):5540-8.
276. Ahmed T, Rieder F, Fiocchi C, Achkar JP. Pathogenesis of postoperative recurrence in Crohn's disease. *Gut*. 2011;60(4):553-62.
277. D'Haens G, Rutgeerts P. Postoperative recurrence of Crohn's disease: pathophysiology and prevention. *Inflamm Bowel Dis*. 1999;5(4):295-303.
278. Zorzi F, Monteleone I, Sarra M, Calabrese E, Marafini I, Cretella M, et al. Distinct profiles of effector cytokines mark the different phases of Crohn's disease. *PLoS one*. 2013;8(1):e54562.
279. Yamamoto T, Umegae S, Kitagawa T, Matsumoto K. Mucosal cytokine production during remission after resection for Crohn's disease and its relationship to future relapse. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2004;19(6):671-8.
280. Meresse B, Rutgeerts P, Malchow H, Dubucquoi S, Dessaint JP, Cohard M, et al. Low ileal interleukin 10 concentrations are predictive of endoscopic recurrence in patients with Crohn's disease. *Gut*. 2002;50(1):25-8.
281. Ng SC, Lied GA, Kamm MA, Sandhu F, Guenther T, Arebi N. Predictive value and clinical significance of myenteric plexitis in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(10):1499-507.
282. Ferrante M, de Hertogh G, Hlavaty T, D'Haens G, Penninckx F, D'Hoore A, et al. The value of myenteric plexitis to predict early postoperative Crohn's disease recurrence. *Gastroenterology*. 2006;130(6):1595-606.

283. Rahier JF, Dubuquoy L, Colombel JF, Jouret-Mourin A, Delos M, Ferrante M, et al. Decreased lymphatic vessel density is associated with postoperative endoscopic recurrence in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(10):2084-90.
284. Guo R, Zhou Q, Proulx ST, Wood R, Ji RC, Ritchlin CT, et al. Inhibition of lymphangiogenesis and lymphatic drainage via vascular endothelial growth factor receptor 3 blockade increases the severity of inflammation in a mouse model of chronic inflammatory arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(9):2666-76.
285. Lindberg E, Jarnerot G, Huitfeldt B. Smoking in Crohn's disease: effect on localisation and clinical course. *Gut*. 1992;33(6):779-82.
286. Rutgeerts P, Goobes K, Peeters M, Hiele M, Penninckx F, Aerts R, et al. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet*. 1991;338(8770):771-4.
287. Harper PH, Lee EC, Kettlewell MG, Bennett MK, Jewell DP. Role of the faecal stream in the maintenance of Crohn's colitis. *Gut*. 1985;26(3):279-84.
288. Cameron JL, Hamilton SR, Coleman J, Sitzmann JV, Bayless TM. Patterns of ileal recurrence in Crohn's disease. A prospective randomized study. *Annals of surgery*. 1992;215(5):546-51; discussion 51-2.
289. Rutgeerts P, Hiele M, Geboes K, Peeters M, Penninckx F, Aerts R, et al. Controlled trial of metronidazole treatment for prevention of Crohn's recurrence after ileal resection. *Gastroenterology*. 1995;108(6):1617-21.
290. De Cruz P, Kang S, Wagner J, Buckley M, Sim WH, Prideaux L, et al. Association between specific mucosa-associated microbiota in Crohn's disease at the time of resection and subsequent disease recurrence: a pilot study. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2015;30(2):268-78.
291. Cummings JH, Macfarlane GT. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *The Journal of applied bacteriology*. 1991;70(6):443-59.
292. Nguyen KA, Cao Y, Chen JR, Townsend CM, Jr., Ko TC. Dietary fiber enhances a tumor suppressor signaling pathway in the gut. *Annals of surgery*. 2006;243(5):619-25; discussion 25-7.
293. Vanhoutvin SA, Troost FJ, Hamer HM, Lindsey PJ, Koek GH, Jonkers DM, et al. Butyrate-induced transcriptional changes in human colonic mucosa. *PloS one*. 2009;4(8):e6759.
294. Benjamin JL, Hedin CR, Koutsoumpas A, Ng SC, McCarthy NE, Prescott NJ, et al. Smokers with active Crohn's disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18(6):1092-100.
295. Murugananthan AU, Bernardo DO, Tozer P, Hart AL, Knight SC, Whelan K, et al. CLINICAL RISK FACTORS FOR CROHN'S DISEASE POSTOPERATIVE RECURRENCE ARE REFLECTED IN ALTERATIONS IN MUCOSALLY ADHERENT MICROBIOTA AT SURGICAL RESECTION. *Gut*. 2012;61:A168-A.
296. Chari ST, Keate RF. Ileocolonic anastomotic ulcers: a case series and review of the literature. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(5):1239-43.
297. Domènech E, Mañosa M, Bernal I, Garcia-Planella E, Cabré E, Piñol M, et al. Impact of azathioprine on the prevention of postoperative Crohn's disease recurrence: Results of a prospective, observational, long-term follow-up study. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2008;14(4):508-13.
298. Sailer J, Peloschek P, Reinisch W, Vogelsang H, Turetschek K, Schima W. Anastomotic recurrence of Crohn's disease after ileocolic resection: comparison of MR enteroclysis with endoscopy. *European Radiology*. 2008;18(11):2512-21.

299. Scarpa M, D'Inca R, Basso D, Ruffolo C, Polese L, Bertin E, et al. Fecal lactoferrin and calprotectin after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Diseases of the colon and rectum*. 2007;50(6):861-9.
300. Lamb CA, Mohiuddin MK, Gicquel J, Neely D, Bergin FG, Hanson JM, et al. Faecal calprotectin or lactoferrin can identify postoperative recurrence in Crohn's disease. *The British journal of surgery*. 2009;96(6):663-74.
301. Beltran B, Cerrillo E, Iborra M, Moret I, Rausell F, Tortosa L, et al. Fecal Calprotectin (FC) is a Useful Early Predictive Marker for Postoperative Recurrence in Crohn's Disease (CD). *Gastroenterology*. 2012;142(5):S659-S.
302. Yamamoto T, Shiraki M, Bamba T, Umegae S, Matsumoto K. Faecal calprotectin and lactoferrin as markers for monitoring disease activity and predicting clinical recurrence in patients with Crohn's disease after ileocolonic resection: A prospective pilot study. *United European Gastroenterology Journal*. 2013;1(5):368-74.
303. Lasson A, Strid H, Öhman L, Isaksson S, Olsson M, Rydström B, et al. Fecal calprotectin one year after ileocaecal resection for Crohn's disease — A comparison with findings at ileocolonoscopy. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2014;8(8):789-95.
304. Wright EK, Kamm MA, De Cruz P, Hamilton AL, Ritchie KJ, Krejany EO, et al. Measurement of Fecal Calprotectin Improves Monitoring and Detection of Recurrence of Crohn's Disease After Surgery. *Gastroenterology*. 2015;148(5):938-47.e1.
305. Boschetti G, Laidet Mh, Moussata D, Stefanescu C, Roblin X, Phelip G, et al. Levels of Fecal Calprotectin Are Associated With the Severity of Postoperative Endoscopic Recurrence in Asymptomatic Patients With Crohn's Disease. *The American Journal of Gastroenterology*. 2015;110(6):865-72.
306. Lobatón T, López-García A, Rodríguez-Moranta F, Ruiz A, Rodríguez L, Guardiola J. A new rapid test for fecal calprotectin predicts endoscopic remission and postoperative recurrence in Crohn's disease. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2013;7(12):e641-e51.
307. De Cruz P, Kamm MA, Prideaux L, Allen PB, Desmond PV. Postoperative recurrent luminal Crohn's disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18(4):758-77.
308. McLeod RS, Wolff BG, Ross S, Parkes R, McKenzie M, Investigators of the CT. Recurrence of Crohn's disease after ileocolic resection is not affected by anastomotic type: results of a multicenter, randomized, controlled trial. *Diseases of the colon and rectum*. 2009;52(5):919-27.
309. Ng SC, Lied GA, Arebi N, Phillips RK, Kamm MA. Clinical and surgical recurrence of Crohn's disease after ileocolonic resection in a specialist unit. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2009;21(5):551-7.
310. Simillis C, Yamamoto T, Reese GE, Umegae S, Matsumoto K, Darzi AW, et al. A meta-analysis comparing incidence of recurrence and indication for reoperation after surgery for perforating versus nonperforating Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(1):196-205.
311. Hofer B, Bottger T, Hernandez-Richter T, Seifert JK, Junginger T. The impact of clinical types of disease manifestation on the risk of early postoperative recurrence in Crohn's disease. *Hepato-gastroenterology*. 2001;48(37):152-5.
312. Parente F, Sampietro GM, Molteni M, Greco S, Anderloni A, Sposito C, et al. Behaviour of the bowel wall during the first year after surgery is a strong predictor of symptomatic recurrence of Crohn's disease: a prospective study. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2004;20(9):959-68.

313. Simillis C, Jacovides M, Reese GE, Yamamoto T, Tekkis PP. Meta-analysis of the role of granulomas in the recurrence of Crohn disease. *Diseases of the colon and rectum*. 2010;53(2):177-85.
314. Sokol H, Polin V, Lavergne-Slove A, Panis Y, Treton X, Dray X, et al. Plexitis as a predictive factor of early postoperative clinical recurrence in Crohn's disease. *Gut*. 2009;58(9):1218-25.
315. De Dombal FT, Burton I, Goligher JC. Recurrence of Crohn's disease after primary excisional surgery. *Gut*. 1971;12(7):519-27.
316. Wettergren A, Christiansen J. Risk of recurrence and reoperation after resection for ileocolic Crohn's disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 1991;26(12):1319-22.
317. Scarpa M, Angriman I, Barollo M, Polese L, Ruffolo C, Bertin M, et al. Risk factors for recurrence of stenosis in Crohn's disease. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*. 2003;74 Suppl 2:80-3.
318. Poggioli G, Laureti S, Selleri S, Brignola C, Grazi GL, Stocchi L, et al. Factors affecting recurrence in Crohn's disease. Results of a prospective audit. *International journal of colorectal disease*. 1996;11(6):294-8.
319. Botti F, Carrara A, Antonelli B, Quadri F, Maino M, Cesana B, et al. [The minimal bowel resection in Crohn's disease: analysis of prognostic factors on the surgical recurrence]. *Annali italiani di chirurgia*. 2003;74(6):627-33.
320. Fazio VW, Marchetti F, Church M, Goldblum JR, Lavery C, Hull TL, et al. Effect of resection margins on the recurrence of Crohn's disease in the small bowel. A randomized controlled trial. *Annals of surgery*. 1996;224(4):563-71; discussion 71-3.
321. Fazio VW, Marchetti F. Recurrent Crohn's disease and resection margins: bigger is not better. *Advances in surgery*. 1999;32:135-68.
322. Hildebrandt U, Kessler K, Plusczyk T, Pistorius G, Vollmar B, Menger MD. Comparison of surgical stress between laparoscopic and open colonic resections. *Surgical endoscopy*. 2003;17(2):242-6.
323. Dasari BV, McKay D, Gardiner K. Laparoscopic versus Open surgery for small bowel Crohn's disease. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2011(1):CD006956.
324. De Cruz P, Kamm MA, Hamilton AL, Ritchie KJ, Krejany EO, Gorelik A, et al. Crohn's disease management after intestinal resection: a randomised trial. *Lancet*. 2015;385(9976):1406-17.
325. Reese GE, Nanidis T, Borysiewicz C, Yamamoto T, Orchard T, Tekkis PP. The effect of smoking after surgery for Crohn's disease: a meta-analysis of observational studies. *International journal of colorectal disease*. 2008;23(12):1213-21.
326. Doherty G, Bennett G, Patil S, Cheifetz A, Moss AC. Interventions for prevention of post-operative recurrence of Crohn's disease. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2009(4):CD006873.
327. van Loo ES, Dijkstra G, Ploeg RJ, Nieuwenhuijs VB. Prevention of postoperative recurrence of Crohn's disease. *Journal of Crohn's & colitis*. 2012;6(6):637-46.
328. Peyrin-Biroulet L, Deltenre P, Ardizzone S, D'Haens G, Hanauer SB, Herfarth H, et al. Azathioprine and 6-mercaptopurine for the prevention of postoperative recurrence in Crohn's disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2009;104(8):2089-96.
329. Savarino E, Bordini G, Dulbecco P, Assandri L, Bruzzone L, Mazza F, et al. Adalimumab is more effective than azathioprine and mesalamine at preventing

postoperative recurrence of Crohn's disease: a randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol.* 2013;108(11):1731-42.

330. De Cruz P, Kamm MA, Hamilton AL, Ritchie KJ, Krejany EO, Gorelik A, et al. Efficacy of thiopurines and adalimumab in preventing Crohn's disease recurrence in high-risk patients - a POCER study analysis. *Alimentary pharmacology & therapeutics.* 2015;42(7):867-79.

331. Lopez-Sanroman A, Vera-Mendoza I, Domenech E, Taxonera C, Vega Ruiz V, Marin-Jimenez I, et al. Adalimumab Vs Azathioprine in the Prevention of Postoperative Crohn's Disease Recurrence. A Geteccu Randomized Trial. *Journal of Crohn's & colitis.* 2017.

332. Schwartz M, Regueiro M. Prevention and treatment of postoperative Crohn's disease recurrence: an update for a new decade. *Current gastroenterology reports.* 2011;13(1):95-100.

333. Sorrentino D. State-of-the-art medical prevention of postoperative recurrence of Crohn's disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology.* 2013;10(7):413-22.

334. Sandborn WJ, Hanauer S, Van Assche G, Panes J, Wilson S, Petersson J, et al. Treating beyond symptoms with a view to improving patient outcomes in inflammatory bowel diseases. *Journal of Crohn's & colitis.* 2014;8(9):927-35.

335. Ferrante M, Papamichael K, Duricova D, D'Haens G, Vermeire S, Archavlis E, et al. Systematic versus Endoscopy-driven Treatment with Azathioprine to Prevent Postoperative Ileal Crohn's Disease Recurrence. *Journal of Crohn's & colitis.* 2015;9(8):617-24.

336. Baudry C, Pariente B, Lourenco N, Simon M, Chirica M, Cattan P, et al. Tailored treatment according to early post-surgery colonoscopy reduces clinical recurrence in Crohn's disease: a retrospective study. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver.* 2014;46(10):887-92.

337. Gonzalez-Lama Y, Blazquez I, Suarez CJ, Oliva B, Matallana V, Calvo M, et al. Impact of endoscopic monitoring in postoperative Crohn's disease patients already receiving pharmacological prevention of recurrence. *Revista espanola de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva.* 2015;107(10):586-90.

338. D'Haens G, Baert F, van Assche G, Caenepeel P, Vergauwe P, Tuynman H, et al. Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. *Lancet.* 2008;371(9613):660-7.

339. Ricart E, Garcia-Bosch O, Ordas I, Panes J. Are we giving biologics too late? The case for early versus late use. *World journal of gastroenterology.* 2008;14(36):5523-7.

340. Rimola J, Ordas I, Rodriguez S, Garcia-Bosch O, Aceituno M, Llach J, et al. Magnetic resonance imaging for evaluation of Crohn's disease: validation of parameters of severity and quantitative index of activity. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(8):1759-68.

341. de Barcelos IF, Kotze PG, Spinelli A, Suzuki Y, Teixeira FV, de Albuquerque IC, et al. Factors affecting the incidence of early endoscopic recurrence after ileocolonic resection for Crohn's disease: a multicentre observational study. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland.* 2017;19(1):O39-O45.

342. Domenech E, Manosa M, Bernal I, Garcia-Planella E, Cabre E, Pinol M, et al. Impact of azathioprine on the prevention of postoperative Crohn's disease recurrence:

- results of a prospective, observational, long-term follow-up study. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14(4):508-13.
343. Sorrentino D, Paviotti A, Terrosu G, Avellini C, Geraci M, Zarifi D. Low-dose maintenance therapy with infliximab prevents postsurgical recurrence of Crohn's disease. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association.* 2010;8(7):591-9 e1; quiz e78-9.
344. Qiu Y, Mao R, Chen B-l, He Y, Zeng Z-r, Xue L, et al. Fecal Calprotectin for Evaluating Postoperative Recurrence of Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases.* 2015;21(2):315-22.
345. Mannon P, Reinisch W. Interleukin 13 and its role in gut defence and inflammation. *Gut.* 2012;61(12):1765-73.
346. Bailey JR, Bland PW, Tarlton JF, Peters I, Moorghen M, Sylvester PA, et al. IL-13 promotes collagen accumulation in Crohn's disease fibrosis by down-regulation of fibroblast MMP synthesis: a role for innate lymphoid cells? *PloS one.* 2012;7(12):e52332.
347. Fogli S, Polini B, Carpi S, Pardini B, Naccarati A, Dubbini N, et al. Identification of plasma microRNAs as new potential biomarkers with high diagnostic power in human cutaneous melanoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.* 2017;39(5):1010428317701646.
348. Latchana N, Abrams ZB, Howard JH, Regan K, Jacob N, Fadda P, et al. Plasma MicroRNA Levels Following Resection of Metastatic Melanoma. *Bioinformatics and biology insights.* 2017;11:1177932217694837.
349. Chen Y, Chen J, Liu Y, Li S, Huang P. Plasma miR-15b-5p, miR-338-5p, and miR-764 as Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research.* 2015;21:1864-71.
350. Chiam K, Wang T, Watson DI, Mayne GC, Irvine TS, Bright T, et al. Circulating Serum Exosomal miRNAs As Potential Biomarkers for Esophageal Adenocarcinoma. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract.* 2015;19(7):1208-15.
351. Wang L, Zhu MJ, Ren AM, Wu HF, Han WM, Tan RY, et al. A ten-microRNA signature identified from a genome-wide microRNA expression profiling in human epithelial ovarian cancer. *PloS one.* 2014;9(5):e96472.
352. Chen QY, Jiao DM, Zhu Y, Hu H, Wang J, Tang X, et al. Identification of carcinogenic potential-associated molecular mechanisms in CD133(+) A549 cells based on microRNA profiles. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.* 2016;37(1):521-30.
353. Kumar P, Dezso Z, MacKenzie C, Oestreicher J, Agoulnik S, Byrne M, et al. Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease. *PloS one.* 2013;8(7):e69807.
354. Cosin-Tomas M, Antonell A, Llado A, Alcolea D, Fortea J, Ezquerra M, et al. Plasma miR-34a-5p and miR-545-3p as Early Biomarkers of Alzheimer's Disease: Potential and Limitations. *Molecular neurobiology.* 2016.
355. Paydas S, Acikalin A, Ergin M, Celik H, Yavuz B, Tanriverdi K. Micro-RNA (miRNA) profile in Hodgkin lymphoma: association between clinical and pathological variables. *Medical oncology.* 2016;33(4):34.
356. Bulent Vatan M, Kalayci Yigin A, Akdemir R, Tarik Agac M, Akif Cakar M, Aksoy M, et al. Altered Plasma MicroRNA Expression in Patients with Mitral Chordae Tendineae Rupture. *The Journal of heart valve disease.* 2016;25(5):580-8.
357. Smith-Vikos T, Liu Z, Parsons C, Gorospe M, Ferrucci L, Gill TM, et al. A serum miRNA profile of human longevity: findings from the Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA). *Aging.* 2016;8(11):2971-87.

358. de Gonzalo-Calvo D, Cenarro A, Garlaschelli K, Pellegatta F, Vilades D, Nasarre L, et al. Translating the microRNA signature of microvesicles derived from human coronary artery smooth muscle cells in patients with familial hypercholesterolemia and coronary artery disease. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2017;106:55-67.
359. Zhu LP, Zhou JP, Zhang JX, Wang JY, Wang ZY, Pan M, et al. MiR-15b-5p Regulates Collateral Artery Formation by Targeting AKT3 (Protein Kinase B-3). *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2017;37(5):957-68.
360. Zhou XM, Sun R, Luo DH, Sun J, Zhang MY, Wang MH, et al. Upregulated TRIM29 promotes proliferation and metastasis of nasopharyngeal carcinoma via PTEN/AKT/mTOR signal pathway. *Oncotarget*. 2016;7(12):13634-50.
361. Ding WB, Wang YX, Dong CW. microRNA15b induced SMCC7721 apoptosis via down-regulation of XIAP. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2017;21(3):542-8.
362. Lang A, Grether-Beck S, Singh M, Kuck F, Jakob S, Kefalas A, et al. MicroRNA-15b regulates mitochondrial ROS production and the senescence-associated secretory phenotype through sirtuin 4/SIRT4. *Aging*. 2016;8(3):484-505.
363. Liu R, Ma X, Chen L, Yang Y, Zeng Y, Gao J, et al. MicroRNA-15b Suppresses Th17 Differentiation and Is Associated with Pathogenesis of Multiple Sclerosis by Targeting O-GlcNAc Transferase. *Journal of immunology*. 2017;198(7):2626-39.
364. Singh Y, Garden OA, Lang F, Cobb BS. MicroRNAs regulate T-cell production of interleukin-9 and identify hypoxia-inducible factor-2alpha as an important regulator of T helper 9 and regulatory T-cell differentiation. *Immunology*. 2016;149(1):74-86.
365. Beltran B, Nos P, Dasi F, Iborra M, Bastida G, Martinez M, et al. Mitochondrial dysfunction, persistent oxidative damage, and catalase inhibition in immune cells of naive and treated Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(1):76-86.
366. Tokuhira N, Kitagishi Y, Suzuki M, Minami A, Nakanishi A, Ono Y, et al. PI3K/AKT/PTEN pathway as a target for Crohn's disease therapy (Review). *International journal of molecular medicine*. 2015;35(1):10-6.