



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**PERFIL GENÉTICO FUNCIONAL EN LA ENFERMEDAD DE
CROHN COMPLICADA. INFLUENCIA SOBRE EL DESARROLLO
DE RECURRENCIA POST-QUIRÚRGICA PRECOZ**

Tesis de Grado de Doctora

Yamile Zabana Abdo

Directores de la Tesis:

Dr. Eduard Cabré Gelada

Dr. Eugeni Domènech Morral

Dr. Josep Manyé Almero

Servicio de Aparato Digestivo

Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

2015

A Nabil y Emilia, mis padres
Por haberme permitido llegar hasta aquí, con su amor incondicional,
su apoyo y el impulso y bagaje que me han dado y que hace que sea
quien soy.

A Saed, Farah, Dina y Gaby, mis hermanos
Por todas las horas que les debo... Por hacerme sentir que la distancia
no existe.

WHEN NOTHING IS SURE,
EVERYTHING IS POSSIBLE

MARGARET DRABBLE

EVER TRIED
EVER FAILED
NO MATTER

TRY AGAIN
FAIL AGAIN
FAIL BETTER

SAMUEL BECKETT

THE REAL VOYAGE OF DISCOVERY CONSISTS
NOT IN SEEKING NEW LANDSCAPES
BUT IN HAVING **NEW EYES**

MARCEL PROUST

AGRADECIMIENTOS

Als meus directors: Eduard Cabré, per l'estima de tots aquests anys, per ensenyar-me que un bon científic es sempre una persona instruïda i no només en ciència; Eugeni Domènech, per l'impuls que m'ha donat fent de mi una apassionada de la malaltia inflamatòria intestinal... i de les coses ben fetes en general. Per la exigència que sempre m'ha demanat; Josep Mañé, per ensenyar-me que una visió estereoscòpica és necessària per trobar les respostes en ciència, per la seva paciència, delicadesa i feinada que ha fet en aquesta tesi.

Al tot Servei d'Aparell Digestiu de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (HUGTiP), per fer que aquest projecte sigui factible. En especial als Drs. Miquel Àngel Gassull i Ramon Planas, com caps de servei, pel seu recolzament. Un agradecimiento especial a todos los residentes de mi Servicio, en especial a Eva Erice, mi co-R, porque ha sido mi estimada amiga y compañera en el camino que empezamos aterrizando en Can Ruti, que hemos seguido en nuestros distintos destinos profesionales, con la realización de una tesis incluida, por su cariño y su presencia.

A la Unitat de Malalties Inflamatòries Intestinals del HUGTiP: Míriam Mañosa, pel camí que hem fet plegades i ara més a prop, Juan Naves, que també recorre los caminos de la tesis e intenta sentar raíces por aquí y en especial a Laura Marín, alguien que con el paso del tiempo se ha convertido en una estimada amiga y que me ha permitido conocer la enfermedad desde otra perspectiva.

VIII

A todo el personal de Endoscopias, sobre todo los Drs. Jaume Boix y Vicente Moreno y Cirugía, en especial a la Dra. Piñol y el Dr. Troya, así como personal de enfermería de ambos servicios, por el apoyo recibido en la realización de las fases clínicas de este estudio. Al personal del Servicio de Anatomía patológica, en especial a la Dra. Isabel Ojanguren por el estudio histológico convencional de todas las muestras de este estudio y a Ángela Fernández Vasalo por su ayuda en las técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

Al meus companys de laboratori del Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol: Ramon Bartolí, Gemma Òdena i Isabel Serra, per fer d'aquesta feina una experiència agradable. Una mención especial a Elisabet Pedrosa porque sin su tesón, empeño e ilusión este trabajo habría tardado en iniciar. Gracias por enseñarme que un gran científico empieza con una gran curiosidad y por todo el trabajo realizado en el estudio transcriptómico. A Violeta Lorén, por sus pies en tierra y tener las ideas tan claras, por las largas charlas y por su gran labor en especial en el estudio del TMIGD1. A ambas: gracias por su amistad!

A mis compañeros en otros centros donde he trabajado y que han tenido que adaptarse a mis idas y venidas realizando esta tesis, siendo siempre un enorme soporte e impulso: el Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Municipal de Badalona i a tot el Servei d'Aparell Digestiu de l'Hospital Universitari Mútua de Terrassa, sobre tot durant aquesta recta final.

A los colaboradores de este estudio, cuyo trabajo ha permitido que esta tesis se lleve a cabo: Juanjo Lozano de la Plataforma de Bioinformática de CIBEREhd por su labor en el análisis LIMA-R, Susana Pérez Álvarez de Biokit y del Departamento de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, por su aporte en análisis genómico, Susana Macías por su ayuda en las tinciones histológicas, Sarai Plaza por su trabajo en las técnicas de *western blot* de TMIGD1, Farah Kamberovic por su trabajo con las fotografías de las células de Paneth y a tres biólogos en formación predoctoral que han sido de gran ayuda para la realización de diversas técnicas y unos buenos compañeros de camino: Patricia Romero, Cristina Sánchez y Arce García-Jarraquemada.

A mi gran amigo Pablo Gallegos Riera, por las fotos de la portada y por su cariño que no tiene precio.

A mi gente, por los fines de semana que no pude, por su apoyo en horas bajas y su alegría en cada tramo conseguido de este trabajo, celebrando conmigo.

Y a este proyecto, porque ha hecho que camine el trayecto desde la clínica a la investigación traslacional, porque me ha enseñado a navegar en las aguas de las ciencias básicas, porque me ha dado un puesto de trabajo... Porque estos 7 años a su lado han forjado de mi a una exploradora!

A todos: MIL GRACIAS

Yamile

ÍNDICE

ENFERMEDAD DE CROHN Y RECURRENCIA POST-QUIRÚRGICA 3

 1.1 Enfermedad de Crohn: *una enfermedad sistémica cada día más prevalente* 4

 1.2 Bases diagnósticas de la EC: *una enfermedad sin características exclusivas* 5

 1.3 Historia natural: *importancia de la clasificación fenotípica y temporal* 8

 1.4 Tratamiento médico: *objetivo fundamental conseguir y mantener la remisión* 14

 1.5 Cirugía en la EC: *remisión completa... pero transitoria* 18

 1.6 Recurrencia post-quirúrgica: *consecuencia inevitable?* 24

 1.7 Factores de riesgo para la recurrencia post-quirúrgica 27

ENFERMEDAD DE CROHN Y RECURRENCIA POST-QUIRÚRGICA: Patogenia 31

 2.1 Sistema inmune intestinal: *protagonista clave en la EC* 33

 2.1.1 El sistema inmune intestinal en la EC 43

 2.1.2 El sistema inmune intestinal en la recurrencia post-quirúrgica de la EC 47

 2.2 Ambiente: *participación fundamental de la microbiota intestinal* 51

 2.2.1 Rol de la flora intestinal en la recurrencia 58

 2.3 Genética 62

 2.3.1 Genes específicos relacionados con la EC: *evolución de los estudios de la influencia de la genética* 64

 2.3.2 El estudio genético más allá de los GWAS: *limitaciones y herencia no conocida* 72

 2.3.3. Biología de sistemas: *enfoques “-ómicos”* 74

 2.3.4 Genética y recurrencia post-quirúrgica 84

ESTUDIO: PERFIL GENÉTICO FUNCIONAL EN LA ENFERMEDAD DE CROHN.

 EFECTO SOBRE EL DESARROLLO DE RECURRENCIA POST-QUIRÚRGICA 87

 1. Antecedentes y Justificación 89

| | |
|---|-----|
| 2. Hipótesis | 91 |
| 3. Objetivos..... | 91 |
| 4. Materiales & Métodos..... | 92 |
| 4.1 Criterios de inclusión de los pacientes. Variables clínicas y endoscópicas recogidas..... | 92 |
| 4.2 Diseño experimental: recogida de muestras y definiciones..... | 93 |
| 4.3 Análisis histopatológico convencional..... | 96 |
| 4.4 Estudio de polimorfismos..... | 96 |
| 4.5 Estudio del transcriptoma..... | 98 |
| 4.6 Bioanálisis..... | 100 |
| 4.7 Corroboración del <i>microarray</i> | 104 |
| 4.8 Caracterización de marcadores (<i>targets</i>)..... | 107 |
| 4.9 Estudio estadístico..... | 110 |
| RESULTADOS..... | 112 |
| 5.1 Criterios de normalización y estandarización (LIMA-R y Qlucore) ... | 112 |
| 5.2 Características basales..... | 117 |
| 5.2.1 Pacientes vs. controles..... | 117 |
| 5.2.2 Pacientes con vs. sin recurrencia post-quirúrgica precoz..... | 119 |
| 5.3 Histología convencional..... | 121 |
| 5.4 Estudio genómico: recurrencia vs. no recurrencia post-quirúrgica precoz..... | 122 |
| 5.5 Análisis del transcriptoma..... | 128 |
| 5.5.1 Pacientes con EC vs. controles: <i>realce de la actividad de la matriz extracelular</i> | 129 |
| 5.5.2 Expresión genética de la recurrencia post-quirúrgica precoz..... | 131 |
| 5.6 Estudio del TMIGD1..... | 137 |
| 5.6.1 Conclusiones del estudio del TMIGD1..... | 150 |
| 5.7 Estudio de las vías del destino celular: vía <i>Notch</i> | 151 |
| 5.7.1 Conclusiones del estudio de la vía <i>Notch</i> | 160 |

| | |
|--|-----|
| DISCUSIÓN | 163 |
| LIMITACIONES DEL ESTUDIO..... | 184 |
| CONCLUSIONES..... | 186 |
| BIBLIOGRAFÍA | 189 |
| ANEXOS..... | 221 |
| ANEXO 1. Aprobación del Comité Ético de Investigación Científica | 223 |
| ANEXO 2. Lista de polimorfismos y secuencias estudiadas | 224 |
| ANEXO 3. Extracción y análisis de mRNA..... | 226 |
| ANEXO 4. Protocolo de retrotranscripción de mRNA a cDNA | 228 |
| ANEXO 5. Técnica de purificación de proteínas | 229 |
| ANEXO 6. Técnica de extracción de proteínas con el buffer RIPA | 230 |
| ANEXO 7. Técnica de <i>immunoblotting</i> | 230 |
| ANEXO 8. Técnica del estudio de deglicosilación | 232 |
| ANEXO 9. Procedimientos para el estudio de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. | 233 |
| ANEXO 10. Tinción histológica de azul de Alcian..... | 235 |
| ANEXO 11. Lista de genes de expresión diferencial entre pacientes y controles..... | 236 |
| ANEXO 12. Resultados de las tinciones de células madre y células de Paneth | 242 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|-----|
| Tabla 1. Clasificación de Montreal de la EC..... | 9 |
| Tabla 2. Tratamiento médico convencional de la EC..... | 15 |
| Tabla 3. Cirugía: indicaciones | 18 |
| Tabla 4. Estrategias quirúrgicas | 20 |
| Tabla 5. Estricturoplastias: indicaciones y contraindicaciones..... | 22 |
| Tabla 6. Índice endoscópico de Rutgeerts..... | 25 |
| Tabla 7. Argumentos que sugieren que la flora entérica juega un rol en la patogenia de la EC..... | 52 |
| Tabla 8. Cambios en el microbioma asociados a la EII..... | 57 |
| Tabla 9. Evidencia de la susceptibilidad debida a factores genéticos en la EII..... | 62 |
| Tabla 10. Asociaciones genéticas en la EC más conocidas. | 67 |
| Tabla 11 Sondas TaqMan® de los genes a estudio | 105 |
| Tabla 12 Proteínas incluidas en el <i>array</i> de proteínas..... | 110 |
| Tabla 13. Características comparativas entre los pacientes “problema” y el resto de pacientes..... | 113 |
| Tabla 14. Características demográficas de los pacientes con EC..... | 117 |
| Tabla 15 Características demográficas de los controles | 118 |
| Tabla 16. Comparación de pacientes con EC vs. controles, en relación a sus características basales..... | 119 |
| Tabla 17. Comparación de características clínicas entre pacientes con recurrencia post-quirúrgica precoz de aquellos sin recurrencia | 120 |
| Tabla 18. Resultados del análisis histológico entre pacientes con recurrencia post-quirúrgica y pacientes sin esta condición | 121 |
| Tabla 19. Lista de genes excluidos del análisis genómico..... | 123 |
| Tabla 20. Genes que se asocian con la presencia de recurrencia post-quirúrgica precoz..... | 124 |
| Tabla 21. Correlaciones qPCR- <i>array</i> de 10 genes seleccionados..... | 128 |
| Tabla 22. Vías enriquecidas y funciones biológicas más relevantes entre recurrencia y no recurrencia. | 131 |
| Tabla 23 Transcriptoma de la recurrencia post-quirúrgica precoz según LIMA-R.. | 133 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 24. Diferencias de expresión del TMIGD1 en pacientes en comparación con controles. | 138 |
| Tabla 25. Diferencias de expresión del TMIGD1 en pacientes que posteriormente presentaron recurrencia post-quirúrgica precoz de aquellos que no la presentaron. | 139 |
| Tabla 26. Medianas de expresión de proteínas del margen intestinal no inflamado en pacientes por <i>microarrays</i> | 153 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Granulomas maduros | 8 |
| Figura 2. Mapa de la afectación digestiva en la EC..... | 9 |
| Figura 3. Diagrama de una resección ileocecal..... | 22 |
| Figura 4. Probabilidad acumulada de permanecer libre de recurrencia clínica en relación de la gravedad de las lesiones de recurrencia endoscópica evaluadas según el índice de Rutgeerts. | 26 |
| Figura 5. Etiopatogenia de la EC. | 33 |
| Figura 6. Anatomía del epitelio intestinal..... | 36 |
| Figura 7. El sistema intestinal inmune en estado de homeostasia..... | 39 |
| Figura 8. Sistema inmune en la EC..... | 46 |
| Figura 9. Imagen de microscopía electrónica del margen ileal de una resección ileocecal. | 49 |
| Figura 10. Mecanismos potenciales en los que las bacterias entéricas y los hongos pueden inducir daño intestinal crónico mediado por la inmunidad..... | 54 |
| Figura 11. Modelo de la fisiopatología de la EII..... | 75 |
| Figura 12. Rol de la epigenética en la patogénesis de la EC. | 81 |
| Figura 13. Protocolo de preparación <i>in situ</i> tanto de las muestras de resección quirúrgica como de las biopsias endoscópicas | 95 |
| Figura 14. Flujo de trabajo desde la obtención del tejido hasta el análisis bioinformático | 104 |
| Figura 15. Imagen de los ciclos de la qPCR. | 106 |
| Figura 16. Demostración de la paciente considerada como <i>outlier</i> identificada como 1055. | 113 |
| Figura 17. Demostración de los pacientes “problema”. | 115 |
| Figura 18. A. Perfiles de expresión diferente entre los pacientes “problema”, la paciente <i>outlier</i> y el resto de pacientes y controles | 117 |
| Figura 19. Vías enriquecidas en el conjunto de genes infra-expresados en pacientes con EC..... | 130 |
| Figura 20. Vías enriquecidas en el conjunto de genes sobre-expresados en pacientes con EC. | 130 |

| | |
|---|-----|
| Figura 21. <i>Heatmap</i> de los genes con expresión diferencial entre pacientes con y sin recurrencia post-quirúrgica precoz..... | 135 |
| Figura 22. Genes infra-expresados en los pacientes con recurrencia post-quirúrgica, según su agrupación funcional..... | 135 |
| Figura 23. Genes sobre-expresados en los pacientes con recurrencia post-quirúrgica, según su agrupación funcional | 136 |
| Figura 24. Expresión de TMIGD1 entre controles y pacientes, tanto si se compara tejido francamente inflamado como macroscópicamente no inflamado..... | 138 |
| Figura 25. Correlación entre la presencia de TMIGD1 en el <i>microarray</i> de RNA y la RT-qPCR..... | 140 |
| Figura 26. Resultados de la diferencia de expresión de RNAm por técnica de RT-qPCR..... | 140 |
| Figura 27. Diferencias de expresión de TMIGD1 comparando controles con pacientes con recurrencia post-quirúrgica precoz y sin ella | 141 |
| Figura 28. <i>Western blot</i> de TMIGD1. | 142 |
| Figura 29. Experimentos para descartar que el TMIGD1 tenga un peso molecular diferente al esperado debido a la técnica del <i>western blot</i> | 143 |
| Figura 30. Resultados del ensayo de deglicosilación | 144 |
| Figura 31. Comparación del nivel proteínico de TMIGD1 entre pacientes y controles | 145 |
| Figura 32. Comparación del nivel proteínico mediante <i>western blot</i> de TMIGD1 entre pacientes con y sin recurrencia post-quirúrgica precoz | 146 |
| Figura 33. Comparación de los resultados de TMIGD1 a nivel proteínico y de expresión..... | 147 |
| Figura 34. Co-localización mediante inmunofluorescencia de TMIGD1-NOD2. | 149 |
| Figura 35. Co-localización mediante inmunofluorescencia de TMIGD1-Sucrasa-isomaltasa. | 150 |
| Figura 36. Correlación entre la presencia de MAML2 en el <i>microarray</i> de RNA y la RT-qPCR..... | 152 |
| Figura 37. Diferencias en la expresión de proteínas entre los pacientes con EC que experimentan recurrencia post-quirúrgica precoz o no. | 156 |

Figura 38. A. Células caliciformes en las criptas del margen no inflamado entre pacientes con y sin recurrencia post-quirúrgica precoz. B. Distribución de células caliciformes en **criptas** en controles, piezas de resección y en biopsias de seguimiento. C. Distribución de células caliciformes en **columnas** en controles, piezas de resección y en biopsias de seguimiento 160

LISTA DE ABREVIACIONES

| | |
|----------------|---|
| Atoh1 | <i>transcriptional factor atonal homolog 1</i> |
| B1 | patrón inflamatorio de la EC |
| B2 | patrón estenosante de la EC |
| B3 | patrón penetrante de la EC |
| CARD15 | <i>Caspase activation and recruitment domain 15</i> |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> |
| CU | colitis ulcerosa |
| DAMPs | <i>damage-associated molecular patterns</i> |
| DLL | <i>delta-like</i> |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| DOC | dosixicolato de sodio |
| EII | enfermedad inflamatoria intestinal |
| EC | enfermedad de Crohn |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ECCO | <i>European Crohn's and Colitis Organisation</i> |
| FC | <i>fold change</i> |
| FDR | <i>false discovery rate</i> |
| GXG | interacción gen a gene |
| GSEA | <i>gene set enrichment analysis</i> |
| GWAS | <i>Genome-wide association studies</i> |
| H&E | hematoxilina y eosina |
| HES | <i>hairy enhacer of split</i> |
| HKG | <i>housekeeping gen</i> |
| IBD1 | NOD2 |
| Ig | inmunoglobulina |
| IL | interleuquina |
| IFN | interferón |
| IMC | índice de masa corporal |
| L1 | localización ileal de la EC |
| L2 | localización colónica de la EC |
| L3 | localización ileo-cólica de la EC |
| NK | <i>natural killer</i> |

XX

| | |
|--------------|---|
| NOD | <i>nucleotide oligomerization domain</i> |
| NCID | <i>the Notch intracellular domain</i> |
| ns | <i>no significativo</i> |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> |
| miRNA | <i>micro RNA</i> |
| MAML | <i>master-mind-like</i> |
| MM | <i>master mix</i> |
| MMP | <i>metalloproteinases</i> |
| OR | <i>odds ratio</i> |
| PCA | <i>principal component analysis</i> |
| RT-qPCR | <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> |
| RT | <i>room temperature</i> |
| SNP | <i>single nucleotide polymorphism</i> |
| TCA | <i>ácido tricloro-acético</i> |
| TGF- β | <i>transforming growth factor-β</i> |
| Th | <i>T helper</i> |
| TIMP | <i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i> |
| TMIGD1 | <i>transmembrane and immunoglobulin domain containing 1</i> |
| TMIGD2 | <i>transmembrane and immunoglobulin domain containing 2</i> |
| TMIGD3 | <i>transmembrane and immunoglobulin domain containing 3</i> |
| TNF | <i>tumor necrosis factor</i> |
| TLR | <i>toll-like receptors</i> |
| Treg | <i>células T reguladoras</i> |
| vs. | <i>Versus</i> |

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1.

ENFERMEDAD DE CROHN Y RECURRENCIA POST-QUIRÚRGICA

La enfermedad de Crohn es un trastorno inflamatorio intestinal de naturaleza crónica y presentación clínica heterogénea. Su tratamiento constituye un reto cuyo objetivo fundamental es mantener la remisión e intentar cambiar su historia natural, evitando la aparición de complicaciones. A pesar de los avances terapéuticos y de la realización de una cirugía aparentemente curativa, la recurrencia de la enfermedad es un fenómeno frecuente.

1.1 Enfermedad de Crohn: *una enfermedad sistémica cada día más prevalente*

La enfermedad de Crohn (EC), la colitis ulcerosa (CU) y la colitis inclasificable conforman lo que se conoce como enfermedad inflamatoria intestinal (EII). El conjunto de estas enfermedades se caracteriza principalmente por la inflamación crónica del tracto digestivo en diversas localizaciones y se manifiesta clínicamente por períodos de inactividad o remisión, de duración variable, alternados por aquellos de actividad inflamatoria aguda o más acentuada, llamados brotes o recidivas.

La EC se manifiesta por inflamación focal, discontinua y transmural afectando primariamente al tracto digestivo potencialmente en toda su extensión (1). Es esta afectación la que ocasiona la clínica que la caracteriza y que varía según el grado de inflamación, el comportamiento de la EC y su localización anatómica. Puede además presentar un compendio de manifestaciones extraintestinales que incluye la afectación cutánea, articular, ocular, vascular y hepatobiliar, entre otras (2), por lo que ha sido considerada como una auténtica enfermedad multisistémica (3).

Clásicamente se ha considerado la EII como una enfermedad con distribución bimodal ya que su incidencia se concentraba entre la segunda y cuarta década de la vida, existiendo otro pico de incidencia en edades más avanzadas (50-70 años). De todas formas, esta distribución parece ser más acusada en la CU que en la EC. Actualmente, y gracias a estudios epidemiológicos recientes (4,5), se sabe que puede afectar a individuos de cualquier edad, con discreto

predominio en mujeres. En países occidentales su incidencia y prevalencia se encuentran alrededor de 3-8 casos por 100.000 habitantes/año y 25-200 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (5-7), mientras que su incidencia es menor en países en vías de desarrollo por motivos no del todo establecidos. Se han postulado desde una disminución en la sospecha diagnóstica, la confusión con diarrea crónica de causa infecciosa -más frecuente en esas zonas geográficas-, hasta una incidencia verdaderamente menor. Conforme las sociedades se industrializan, con los consecuentes cambios en el estilo de vida (incluyendo dieta, hábitos higiénicos, reducción en la incidencia de infecciones de todo tipo, contaminación ambiental, etc.), se puede apreciar un aumento en la incidencia de la EC (4,8). Esto, sumado al hecho de que algunos pacientes debutan en edades tempranas y que la mortalidad es sólo discretamente mayor que la de la población general (9), hace que la prevalencia de la EC esté también aumentando de forma considerable.

1.2 Bases diagnósticas de la EC: *una enfermedad sin características exclusivas*

El diagnóstico de la EC es muchas veces un reto clínico dado que ninguna de las características de la enfermedad es patognomónica. Es por esto que se considera que su diagnóstico tiene que estar respaldado por una clínica sugestiva y la combinación de los hallazgos endoscópicos, radiológicos, histológicos y analíticos (10).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la clínica en la EC es heterogénea. De todas formas existen síntomas que podrían sugerir

su diagnóstico (sobre todo en edades tempranas) como son la diarrea crónica (duración mayor a 6 semanas), el dolor abdominal y/o la pérdida de peso. Otros síntomas frecuentes son la astenia, anorexia y fiebre. En la exploración física los pacientes con EC pueden presentar signos de anemia, desnutrición y retraso del crecimiento y desarrollo, así como la presencia de masa intraabdominales o abscesos perianales. Habitualmente presentan parámetros bioquímicos de inflamación sistémica demostrados por un aumento de la velocidad de sedimentación globular, niveles altos de plaquetas, fibrinógeno o proteína C reactiva. La calprotectina fecal es un parámetro de uso reciente, específico para la inflamación intestinal y que ayuda notablemente a descartar que la clínica de un paciente sea por un cuadro funcional (11).

El primer procedimiento para el diagnóstico de la EC es la ileocolonoscopia. Mediante visión directa se puede acceder hasta el íleon terminal y así valorar la presencia de la afectación discontinua, la presencia de úlceras, las lesiones anales y el patrón en empedrado, frecuente en la EC. Los signos de gravedad a nivel anatómico incluyen la profundidad y la extensión de las úlceras. Dado que la EC puede extenderse a todo el tubo digestivo se sugiere que al diagnóstico se investigue el tracto digestivo superior, incluso en ausencia de síntomas. Los procedimientos recomendados para este cometido en la actualidad incluyen la enterografía mediante resonancia magnética o tomografía computarizada, asegurando así un mapeo de todo el tracto digestivo (extensión de la enfermedad), si bien la gastroscopia, la radiología baritada convencional o la cápsula endoscópica siguen siendo utilizados. Una ventaja de los estudios mediante resonancia

magnética o tomografía computarizada es que mediante estas técnicas se hace posible valorar el grado de afectación transmural, típico de la EC, y la existencia de complicaciones derivadas de la propia enfermedad.

A nivel histológico tampoco existen lesiones exclusivas en el diagnóstico de la EC. Sin embargo, hay hallazgos histológicos que sugieren el diagnóstico. Un rasgo poco frecuente pero específico es la presencia de granulomas no caseificantes (Figura 1) que son el conjunto de células epitelioideas, macrófagos y linfocitos de células T que se pueden encontrar tanto en zonas inflamadas como en no inflamadas y que se localizan habitualmente en la submucosa. Otras características histológicas que se encuentran con frecuencia tanto en las lesiones endoscópicas como en las piezas quirúrgicas de EC son: estenosis por engrosamiento, fístulas, depósitos de fibrina, adhesión a otros órganos, fisuras, úlceras serpiginosas, aftas, apariencia en empedrado, *“fat wrapping”*, metaplasia pseudopilórica, cambios neuromatosos de las submucosa y las fibras de nervios mientéricos, cambios inflamatorios de localización transmural, abscesos de criptas, fibrosis submucosa, infiltrado linfoplasmocitario, necrosis parcheada, irregularidad de vellosidades, y agregados focales de linfocitos (algunos con centros germinales), siendo esta última característica la única que se encuentra en casi la totalidad de pacientes (12).

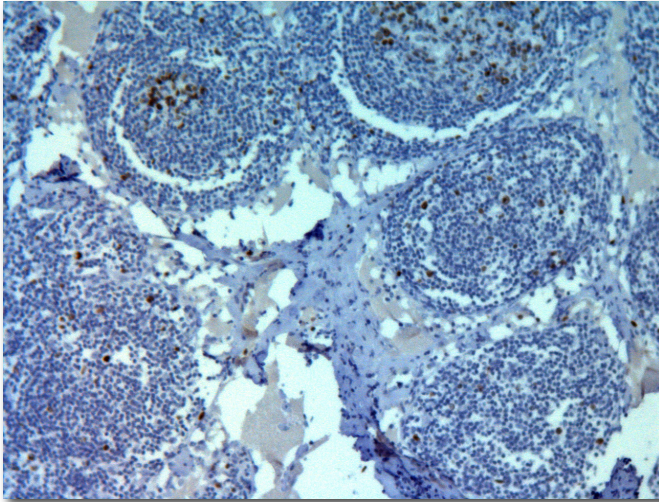


Figura 1. Granulomas maduros con presencia de macrófagos (color marrón) rodeados de linfocitos, principalmente (inmunohistoquímica con anti-lisozima, contrateñida con hematoxilina-eosina, x10). ©Zabana

1.3 Historia natural: *importancia de la clasificación fenotípica y temporal*

La EC es una enfermedad que presenta una amplia variabilidad de manifestaciones clínicas. En un intento de homogenizar los criterios clínicos para su categorización se han propuesto diversas clasificaciones (13–15), siendo la clasificación de Montreal (16) la que se utiliza actualmente, estratificando a los pacientes según edad al diagnóstico, localización anatómica (Figura 2) y comportamiento de la enfermedad (Tabla 1).

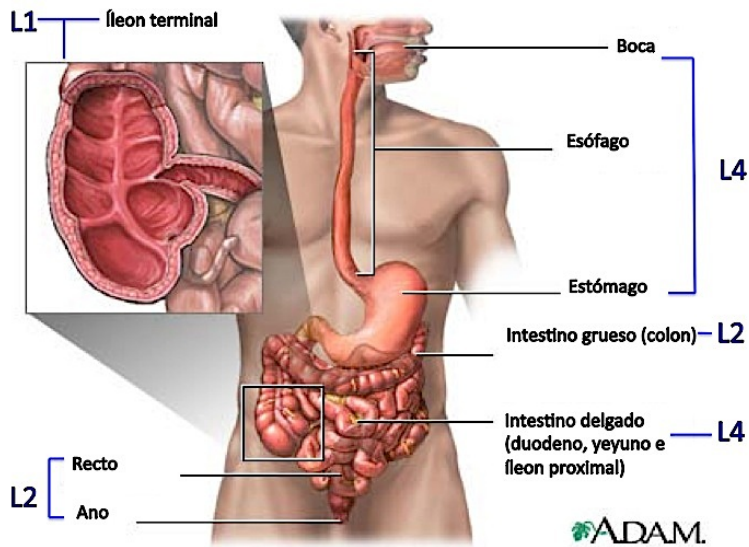


Figura 2. Mapa de la afectación digestiva en la EC (modificado de www.adamimages.com)

Tabla 1. Clasificación de Montreal de la EC (modificada de Silverberg *et al* (16)).

| Edad al diagnóstico (A) | |
|--|--|
| A1 | Diagnóstico antes de los 17 años |
| A2 | Diagnóstico entre los 17 y 40 años |
| A3 | Diagnóstico después de los 40 años |
| Localización de la enfermedad (L) | |
| L1 | Íleon terminal |
| L2 | Colon |
| L3 | Íleon terminal + colon |
| L4 | Tracto digestivo alto (proximal al íleon terminal) |
| <i>* De L1 a L3 se puede agregar el modificador “ + L4” si existe simultáneamente afectación del tracto digestivo alto</i> | |
| Patrón de comportamiento (B) | |
| B1 | Inflamatorio |

| | |
|-----------|--|
| B2 | Estenosante (disminución de la luz intestinal observada por endoscopia, técnicas de imagen o hallazgos quirúrgicos y que presenta dilatación pre-estenótica o síntomas obstructivos) |
| B3 | Penetrante (fístulas o abscesos intraabdominales, masas inflamatorias, perforación intestinal) |

**** A cada una de esta categorías se puede añadir el modificador “p” ante la presencia de enfermedad perianal***

La clasificación fenotípica de la EC juega un papel importante para la decisión del abordaje terapéutico y predecir el curso clínico de la enfermedad (17).

Aproximadamente un 40-50% de pacientes debutan con afectación ileo-cólica, alrededor de un 30% lo hacen exclusivamente a nivel ileal y el 30% restante a nivel cólico (18–21), siendo la afectación mínima para considerar una localización como implicada la presencia de una afta o una úlcera (15). La localización de la EC varía mínimamente en el tiempo y únicamente un 15% presentarán un cambio de localización a los 10 años del diagnóstico, habitualmente de ileal (50%) o cólico (50%) a ileocólico (L3) (22).

Por el contrario, el comportamiento de la enfermedad es más susceptible de presentar cambios a largo plazo. A pesar de que hasta un 90% de pacientes debuta con un comportamiento inflamatorio, el riesgo de desarrollo de estenosis o fístulas aumenta a lo largo del tiempo, siendo lo habitual pasar de un patrón inflamatorio a uno estenosante (29-35%) o penetrante (18-27%) en los 5 primeros años del diagnóstico (16,19,21,23,24). De hecho, más de la mitad de los

pacientes con EC desarrollarán manifestaciones penetrantes o estenosantes durante los primeros 20 años de evolución de la enfermedad (25). Los patrones estenosantes y penetrantes son considerados como complicaciones evolutivas en la EC y, por tanto, como patrones más agresivos dado que requieren tratamiento quirúrgico en mayor proporción que el patrón inflamatorio puro y cuando reaparece la enfermedad después de una intervención quirúrgica suele volver a evolucionar al mismo patrón que ocasionó la necesidad de cirugía previa. La edad de diagnóstico, sobre todo en etapas tempranas (menos de 16 años) es una variable importante que indica una mayor predisposición genética a la EC o de manera alternativa a una exposición precoz y quizá más potente a factores del medio ambiente que ocasionarán la EC.

La edad al diagnóstico también determina el fenotipo de la EC de manera directa. Por ejemplo, la afectación del tracto digestivo alto es más frecuente en pacientes menores a 20 años al debut, siendo la afectación cólica la de mayor incidencia en cohortes que debutan por encima de los 60 años (16). Tomando la edad como diferencia fundamental recientemente se ha propuesto una nueva clasificación fenotípica, la llamada clasificación de París (26) que es una modificación para la población pediátrica de la clasificación de Montreal y que se diferencia de ella en cuatro factores fundamentales que, dejando a un lado a los apartados exclusivos para la edad pediátrica, podría ser interesante para su utilización en adultos dado que define de manera acertada algunos puntos poco precisos en las clasificaciones previas de una manera clara y objetiva:

1. Edad: A1 se divide en A1a (0-<10 años) y A1b (10-<17 años) pudiendo así identificar de manera más adecuada al grupo etario donde mayor inferencia tienen las alteraciones genéticas de la EC;
2. Localización: L1 se considera si un paciente tiene afectación del tercio distal ileal, pero también incluye la afectación limitada al ciego, sin dejar lugar a interpretaciones individuales a la hora de juzgar a un paciente como L1 o L3 al presentar afectación ileocecal exclusiva. Por otra parte L4 se divide en L4a: afectación del tracto digestivo en sentido proximal al ligamento de Treitz y L4b: afectación que va desde el ligamento de Treitz hasta el tercio inferior ileal.
3. Comportamiento: B2B3 para la coexistencia del patrón estenosante y penetrante, importante diferencia con la clasificación de Montreal, donde por defecto un paciente en esta situación sería categorizado como B3.
4. Crecimiento: puntualización fundamental a la hora de tratar a pacientes pediátricos con EC, siendo G1 o G0 según exista o no retraso en el crecimiento, respectivamente.

En conjunto, todas estas consideraciones fenotípicas son relevantes dado que definirán el pronóstico y por tanto el manejo más adecuado del paciente.

Durante el primer año del diagnóstico de la EC, un tercio de pacientes presenta enfermedad activa a pesar de recibir terapia médica o quirúrgica (27). La actividad de la enfermedad en el año previo logra predecir el curso en años posteriores (28,29). Así, un paciente que alcance la remisión clínica durante el primer año, tiene un 80% de

posibilidades de mantener la remisión mientras que en aquellos con control clínico parcial ésta se reduce esta proporción a un 30% en los años posteriores (30).

A pesar de que el curso de la enfermedad difiere de manera importante entre pacientes, se han descrito algunos factores predictivos de riesgo de enfermedad más agresiva definida, según la mayoría de estudios, como aquella que requiere resección quirúrgica (5,19,31–33), que presenta progresión de un patrón inflamatorio a uno estenosante o penetrante (14,34–37), que presenta criterios de corticodependencia (concepto definido por la incapacidad de reducir a una dosis equivalente a 10mg de prednisolona/día a los tres meses de iniciados los esteroides o que antes de cumplir tres meses de la discontinuación de esteroides vuelve a tener clínica de actividad inflamatoria)(31,34), o que requiere uso de inmunomoduladores (31,37), agentes biológicos (31,37) u hospitalizaciones (31). Entre los factores de riesgo identificados, se incluyen tabaquismo activo (5,38,39), edad precoz de debut de la enfermedad (5,31), afectación de intestino delgado (33,34,37,40), requerimiento de corticoides al diagnóstico (31,33,34) y presencia de enfermedad perianal al diagnóstico (31,33,37). Por contraparte, la evidencia de los factores de curso favorable es escasa. En uno de los pocos estudios diseñados con el objetivo de explorar los factores basales de curso indolente en la EC se observó que la afectación cólica exclusiva, en la era del tratamiento inmunosupresor precoz, es la única característica basal de mejor pronóstico (41).

Con el fin de conseguir un auténtico cambio en la historia natural de la EC, se ha propuesto que las intervenciones terapéuticas deberían iniciarse de forma precoz, antes del desarrollo de complicaciones penetrantes o estenosantes y previamente a la pérdida de función intestinal. Sin embargo, no existe una definición aceptada de EC “precoz” (42). En la práctica clínica se considera un paciente con EC precoz a aquél con diagnóstico reciente de la enfermedad. De todas formas, esta definición es arbitraria y puede ser inadecuada ya que, como se ha comentado previamente, entre un 10 y un 40% de pacientes adultos presentan una complicación penetrante o estenosante durante el proceso diagnóstico o en los primeros 3 meses después de él (25). Una propuesta reciente incluye en el concepto de EC precoz aquellos pacientes, adultos y niños, con EC de menos de 2 años de diagnóstico, con parámetros clínicos, biológicos y endoscópicos de actividad pero sin haber presentado complicaciones penetrantes o estenosantes y sin requerimientos previos de cualquier intervención quirúrgica o endoscópica de estas complicaciones ni haber requerido tratamiento con inmunomoduladores (azatioprina, mercaptopurina, metotrexate), agentes biológicos (infliximab, adalimumab), o presentado criterios de corticodependencia (43).

1.4 Tratamiento médico: *objetivo fundamental conseguir y mantener la remisión*

Como ya se ha comentado, el curso natural de la EC se caracteriza por brotes recurrentes con períodos variables de enfermedad inactiva (remisión) (44). Esto implica que la mayoría de pacientes tienen que

seguir tratamiento, habitualmente durante toda su vida, fundamentalmente para mantener el estado de remisión y de forma adicional (e intermitente) inducir la remisión en momentos de brote de actividad (45).

El tratamiento de la EC depende de varios factores, entre ellos la localización de la enfermedad, grado de actividad inflamatoria (leve, moderado, grave), presencia de complicaciones o manifestaciones extraintestinales, edad, respuesta y tolerancia previas a los fármacos, así como del balance entre su potencia terapéutica y posibles efectos secundarios (Tabla 2) (46–48)

Tabla 2. Tratamiento médico convencional de la EC

| Compuesto | Medicación | Indicación |
|-------------------------|-------------------|--|
| Aminosalicilatos | Mesalazina | Inducción en EC leve, de |
| | Sulfasalazina | afectación cólica Prevenición de recurrencia post- quirúrgica en pacientes de bajo riesgo |
| Antibióticos | Ciprofloxacino | Inducción de EC leve- |
| | Metronidazol | moderada. Tratamiento de complicaciones penetrantes o enfermedad perianal. <i>Metronidazol:</i> prevención de |

| | | |
|--------------------------|---|--|
| | | recurrencia post-quirúrgica |
| Corticoides | Clásicos: prednisona y | <u>Clásicos</u> : inducción en EC moderada-grave |
| | prednisolona. Budesonida | <u>Budesonida</u> : inducción en EC leve-moderada de íleon terminal y colon derecho |
| Inmunomoduladores | Tiopurinas (azatioprina, mercaptopurina) Metotrexato | Mantenimiento de EC crónicamente activa, corticodependiente o refractaria Co-tratamiento asociado a infliximab EC con factores de riesgo de enfermedad agresiva. Prevención de la recurrencia post-quirúrgica |

| | | |
|---------------------------|---|--|
| Agentes biológicos | Infliximab Adalimumab Certolizumab Vedolizumab | Inducción y mantenimiento de EC crónicamente activa, corticodependencia o refratariedad. Complicaciones penetrantes o enfermedad perianal moderada-grave. Prevención de recurrencia post- quirúrgica en pacientes de alto riesgo o intolerantes a tiopurinas |
| Dieta enteral | Dietas enterales poliméricas o elementales | Inducción y mantenimiento de EC en edades pediátricas Tratamiento co- adyuvante con otros tratamientos |

A pesar de que no existe un tratamiento curativo para la EC, el objetivo primordial de la terapia farmacológica es conseguir la desaparición de los síntomas y el mantenimiento de la remisión clínica. A pesar de que en la actualidad se pretende cambiar el curso de la enfermedad y con ello prevenir la aparición de complicaciones

penetrantes y estenosantes a largo plazo y, por tanto, evitar la resección quirúrgica (49), por el momento ningún estudio que haya comparado estrategias de tratamiento ha logrado demostrar tal impacto en la historia natural de la EC.

1.5 Cirugía en la EC: *remisión completa... pero transitoria*

A pesar de los avances en el tratamiento médico de la EC, entre un 30-60% de pacientes requerirá algún tipo de tratamiento quirúrgico durante su vida (5,19). Existen tres preceptos a tener en cuenta en relación a la cirugía en la EC: establecer el momento idóneo para la intervención quirúrgica, lograr las mejores condiciones pre-operatorias y optimizar los resultados post-operatorios (50). A pesar de que el tiempo idóneo para el abordaje quirúrgico es aún tema de debate (51), según el último consenso de la *European Crohn's and Colitis Organisation* (ECCO), se recomienda el tratamiento precoz cuando se trata de las complicaciones de la EC (46). En estudios que han investigado el impacto del momento de cirugía se ha demostrado que cuanto más precoz la cirugía, menor morbi-mortalidad y mayor tiempo en remisión (51,52).

La cirugía está indicada fundamentalmente para el fracaso de tratamiento médico y el manejo de complicaciones derivadas de la EC (50) (Tabla 3).

Tabla 3. Cirugía: indicaciones

| Indicaciones | |
|---------------------------------------|--|
| Fracaso del tratamiento médico | Intolerancia o complicaciones del tratamiento médico |

| | |
|--|---|
| | <p>Corticodependencia/Corticorrefractariedad</p> <p>Compromiso de la calidad de vida del paciente</p> <p>Incapacidad de cumplimiento de tratamiento médico</p> <p>Retraso de crecimiento en niños</p> |
| Complicaciones de la EC | <p>Obstrucción</p> <p>Abscesos intraabdominales</p> <p>Fístulas (entero-entéricas o entero-orgánicas)</p> <p>Hemorragia masiva</p> <p>Perforación intestinal</p> <p>Uropatía obstructiva</p> <p>Megacolon tóxico</p> <p>Enfermedad perianal</p> |
| Displasia o cáncer | Fundamentalmente en enfermedad cólica de años de evolución |
| Manifestaciones extraintestinales | Únicamente en aquella dependientes del curso de la EC |

Una vez se haya sopesado la necesidad de un tratamiento quirúrgico, la estrategia adecuada dependerá de la localización de la EC, la edad del paciente, el grado de actividad inflamatoria, el tipo de indicación de la cirugía y la longitud y número de segmentos intestinales afectados (53–55) (Tabla 4).

Tabla 4. Estrategias quirúrgicas

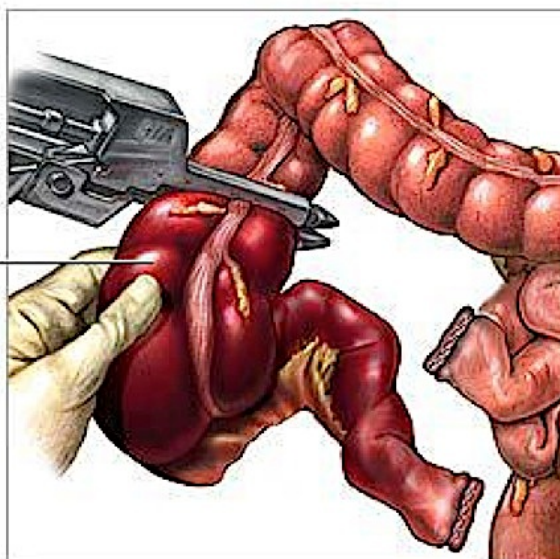
| Tipo de técnica quirúrgica | |
|--|---|
| Técnicas de desvío (<i>by-pass</i>) | Gastroyeyunostomía Gastroduodenostomía Duodenoyeyunostomía |
| Técnicas de resección | Resección ileal o yeyunal con anastomosis termino-terminal, latero-lateral, termino-lateral Colectomía subtotal o segmentaria (sigma, colon derecho, transverso, ascendente). Anastomosis ileo-rectal Proctectomía con amputación abdominoperineal (recto o ano) |
| Técnicas derivativas | Ileostomía (temporal o definitiva), colostomía |
| Técnicas de estricturoplastia | Ver tabla 5 |
| Técnicas en enfermedad perianal | Tratamiento de fístulas: colocación de drenajes, fistulotomía, puesta a plano |

La técnica más frecuente en el tratamiento quirúrgico de la EC de intestino delgado es la resección intestinal (Figura 3) (46,54,55). Este es un procedimiento seguro, disponible en todos los centros de referencia para EII y que presenta buenos resultados funcionales (52). Sus indicaciones principales son el tratamiento de las complicaciones penetrantes (fístulas entéricas, plastrones inflamatorios o abscesos intraabdominales), las estenosis no tratables por dilatación

endoscópica, las complicaciones hemorrágicas y la sospecha de neoplasia (56). En las resecciones intestinales por EC se intenta retirar todo el tejido inflamado y dejar los márgenes de resección libres de enfermedad.

Otra técnica quirúrgica ampliamente utilizada en la EC es la estricturoplastia. Esta técnica fue introducida en el tratamiento quirúrgico de la EC al inicio de la década de los 80, aplicando un procedimiento utilizado en el tratamiento de las estenosis secundarias a la úlcera péptica por Lee y Papaioannou (57). Desde entonces se han descrito hasta 15 técnicas distintas (58), con el objetivo primordial de preservar tejido intestinal y abordar las complicaciones de la EC de una manera conservadora (46). El método fundamental de la estricturoplastia es la incisión longitudinal sobre la estenosis seguida de cierre transversal, sin resección de tejido intestinal (Figura 4 y Tabla 5).

Resección
ileocecal



ADAM.

Figura 3. Diagrama de una resección ileocecal (modificado de www.adamimages.com)

Tabla 5. Estricturoplastias: indicaciones y contraindicaciones

| Indicaciones | Contraindicaciones |
|--|--|
| Múltiples estenosis en áreas extensas de intestino delgado | Inflamación intestinal grave |
| Resección intestinal previa amplia (>100cm) | Estenosis asociada a abscesos o flemones |
| Retraso de crecimiento | Estenosis asociada a perforación |
| Estenosis recurrentes en menos de 12 meses de una cirugía previa | Estenosis en la vecindad de una zona a resecar |

| | |
|---|---|
| Estenosis de la anastomosis ileo-cólica | Hipoalbuminemia |
| Estenosis duodenales | Sospecha de carcinoma |
| Pacientes con riesgo de síndrome de intestino corto | Alta probabilidad de tensión en el cierre de la estricturoplastia |
| | Falta de experiencia |

El abordaje de todas las técnicas intraabdominales se puede hacer tanto por vía abierta (laparotomía) como laparoscópica, siendo ambas comparables (59). En dos meta-análisis que comparan ambas vías se ha concluido que la cirugía laparoscópica en el EC está asociada a mayores tiempos quirúrgicos pero menor duración del íleo post-operatorio, menor estancia hospitalaria, menor incidencia de complicaciones post-operatorias inmediatas y menor incidencia de obstrucción post-operatoria de intestino delgado (60,61). Contraindicaciones al abordaje laparoscópico son: pacientes en estado crítico que no pueden tolerar el neumoperitoneo por hipotensión o hipercapnia, aquellos con adherencias intraabdominales conocidas o sospechadas o sepsis intraabdominal extensa, perforación y casos con dificultad para la identificación anatómica (cirugía previa, obesidad, adherencias). De todas formas, con el advenimiento de técnicas laparoscópicas asistidas manualmente (62), estas contraindicaciones son actualmente relativas.

1.6 Recurrencia post-quirúrgica: *consecuencia inevitable?*

A pesar del papel importante de la cirugía en la EC, este no es un tratamiento curativo. Posteriormente a la resección intestinal, la aparición de nuevas lesiones en segmentos intestinales previamente sanos (57) 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 zona proximal a la anastomosis (neo-íleon terminal) aquella más proclive a la aparición de nuevas lesiones (63,64).

Al año de una resección intestinal el 60-80% de los pacientes han presentado recurrencia endoscópica si no se realiza tratamiento profiláctico alguno, y hasta un 10-20% han presentado recidiva clínica y hasta un 5% han requerido nuevo tratamiento quirúrgico (65).

La recurrencia post-quirúrgica puede definirse por diferentes parámetros. La **recurrencia clínica** fue durante muchos años la forma más utilizada para definir este proceso (66). Ha sido definida como la incapacidad de mantener el peso normal, los estados de desnutrición que no responden a tratamiento, la presencia de fístulas, masas intraabdominales, sangrado intestinal (67) o cualquier clínica que sugiera actividad de la enfermedad (64). Se ha de tener en cuenta que tras la resección intestinal, los pacientes pueden experimentar síntomas debido a otros fenómenos diferentes a la recurrencia, entre los que están la malabsorción de sales biliares, el síndrome adherencial o el sobrecrecimiento bacteriano.

Sin embargo, los estudios de Paul Rutgeerts y colaboradores (65), permitieron conocer más detalladamente la historia natural de la

recurrencia. Así, la aparición de lesiones mucosas (detectadas mediante ileocolonoscopía y que definen a la llamada **recurrencia endoscópica**) precede a las manifestaciones clínicas y constituye un parámetro más objetivo que la existencia de un conjunto de síntomas no siempre sinónimo inequívocamente de recurrencia. Además, la recurrencia endoscópica puede gradarse en gravedad según el índice endoscópico de Rutgeerts (65) (Tabla 6), el cual se correlaciona con el riesgo de recurrencia clínica: a mayor gravedad de la lesión endoscópica mayor probabilidad de recurrencia clínica (Figura 5).

Tabla 6. Índice endoscópico de Rutgeerts

| | |
|----|--|
| i0 | Sin lesiones |
| i1 | < 5 aftas |
| i2 | > 5 aftas con mucosa intralesional sana o úlceras confinadas a < 1cm de la anastomosis |
| i3 | Ileitis aftosa difusa |
| i4 | Inflamación difusa con úlceras grandes, nódulos y/o estenosis |

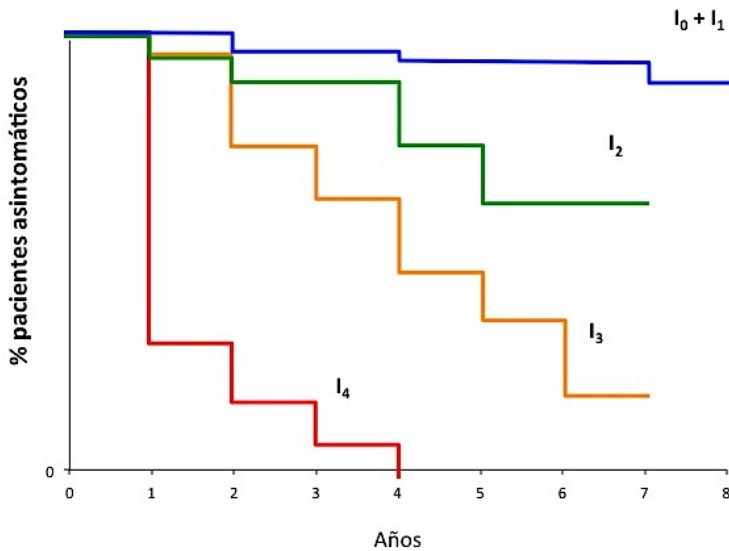


Figura 4. Probabilidad acumulada de permanecer libre de recurrencia clínica en relación de la gravedad de las lesiones de recurrencia endoscópica evaluadas según el índice de Rutgeerts (65).

Existen, asimismo, dos conceptos adicionales que complementan el concepto de recurrencia post-quirúrgica: la **recurrencia radiológica** es un tipo de recurrencia *morfológica* que aparece cuando la presencia de inflamación en el neo-íleon terminal se hace evidente mediante técnicas de imagen convencional como la ecografía, la enterografía por tomografía computada o la enterografía por resonancia magnética (68–71) y la **recurrencia quirúrgica** que constituiría 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 calidad de vida del paciente (72). En relación a la recurrencia radiológica cabe destacar que no se ha demostrado correlación con el riesgo de recurrencia

clínica pero sí con el grado de recurrencia endoscópica, aunque es poco sensible para determinar la presencia de lesiones superficiales, como serían las aftas (69) lo que hace que de momento la exploración más adecuada para la valoración de la recurrencia sea la ileocolonoscopía, siempre y cuando se acceda al neo-íleon terminal.

Otro aspecto importante en la historia natural de la recurrencia post-quirúrgica es el momento de su aparición. Ya en los estudios clásicos (64) se describían dos tipos de recurrencia clínica: la **tardía**, que se situaría entre los 5 y 10 años posteriores a la intervención quirúrgica, y la **precoz**, constatada en los primeros 2 años posteriores a la cirugía, siendo este último el periodo de mayor riesgo de recurrencia (63,64).

Desde un punto de vista patogénico, la recurrencia post-quirúrgica representa la oportunidad de asistir al proceso que conduce a la manifestación fenotípica de la EC *de novo* (73,74), particularmente en etapas precoces tras la intervención (75). Por este motivo el seguimiento tras una resección intestinal por EC supone un escenario que permite estudiar los cambios que se producen a nivel histológico e inmunológico y las posibles interacciones de factores inmunológicos, genéticos y ambientales, la mayoría de ellos sólo parcialmente conocidos.

1.7 Factores de riesgo para la recurrencia post-quirúrgica

Dada la relevancia de esta complicación en la historia natural de la EC múltiples estudios han intentado identificar factores de riesgo de recurrencia post-quirúrgica. Se han estudiado múltiples factores

clínicos y epidemiológicos (sexo, edad al diagnóstico de la EC, tiempo desde el diagnóstico a la cirugía, comportamiento de la EC, presencia de enfermedad perianal, historia familiar de EC), factores relacionados con la cirugía (tipo de anastomosis, medida del segmento intestinal resecado, requerimientos transfusionales, complicaciones post-operatorias), características histológicas (presencia de granulomas, plexitis mientérica, afectación en los márgenes de resección), marcadores serológicos (proteína C reactiva, anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae*, niveles de interleuquina (IL) 10), polimorfismos genéticos (NOD2-CARD15) e incluso la microbiota intestinal (presencia de Firmicutes) (73,76,77). Los resultados son muy heterogéneos y a menudo contradictorios, probablemente como reflejo de utilizar distintas definiciones de recurrencia post-quirúrgica y de la naturaleza retrospectiva en la mayoría de ellos (78). El hecho de utilizar distintas definiciones de recurrencia hace que se introduzcan sesgos. La recurrencia clínica definida en algunos estudios podría deberse a clínica secundaria a síndrome de intestino corto o a malabsorción de sales biliares ya que ésta no siempre se acompaña de evidencia de recurrencia morfológica. Por otra parte, el hecho de que la mayoría de estudios que analizan los factores de riesgo sean retrospectivos impide asegurar que las resecciones quirúrgicas realizadas hayan sido con intención “curativa”, por lo que los hallazgos de estos estudios quedan debilitados. Otro factor a tener en cuenta es el tiempo de seguimiento, ya que se sabe que para que un paciente con patrón estenosante presente recurrencia clínica es necesario un seguimiento más largo, por lo que en la mayoría estudios no se ha encontrado el patrón estenosante como un factor de riesgo y sí en cambio el patrón

penetrante, siendo este resultado probablemente un sesgo de seguimiento. Éstas podrían ser las razones del porqué la mayoría de estos factores de riesgo no se han podido confirmar en estudios prospectivos donde el objetivo principal era evaluar la recurrencia endoscópica. Con todo, el único factor clínico de riesgo de recurrencia post-quirúrgica bien consolidado es el tabaquismo activo (79,80), que es además un factor de riesgo modificable (81,82).

Capítulo 2.

ENFERMEDAD DE CROHN Y RECURRENCIA POST-QUIRÚRGICA: Patogenia

La hipótesis actualmente más aceptada propone que la enfermedad de Crohn es el resultado de una respuesta inflamatoria exagerada y sostenida frente a los microorganismos intestinales en un huésped genéticamente susceptible, lo que produce una respuesta inflamatoria aberrante facilitada por defectos en la función barrera del epitelio intestinal y el sistema inmune de la mucosa.

Estudiar la patogenia de la recurrencia post-quirúrgica puede proporcionar claves para entender los mecanismos que determinan la génesis de la enfermedad de Crohn.

El conocimiento de la patogenia de la EC ha ido evolucionando con el tiempo. La hipótesis en que más se trabaja actualmente es la de la autoinmunidad o, lo que es lo mismo, de una respuesta aberrante a bacterias entéricas no patógenas originada en un huésped susceptible. Otras teorías que se han postulado han incluido la de la inmunodeficiencia (defectos fundamentalmente en la inmunidad innata) o la teoría de la infección micobacteriana (83–85). De hecho, todas estas hipótesis tienen un fondo común, comparten mecanismos patológicos y es probable que describan fenómenos que pueden coexistir en la enfermedad que fenotípicamente se ha conocido como EC, pero que es probable que represente diversas entidades (86).

El escenario clínico que se da tras la resección intestinal, permite estudiar con detalle el proceso de aparición *de novo* de la enfermedad. Es razonable pensar que los mismos factores que sustentan la patogénesis de la EC sean los responsables de los cambios propios de la recurrencia de la EC posterior a una resección intestinal (73). Esto se hace más evidente todavía si se tiene en cuenta que ésta suele recurrir con el mismo fenotipo que ocasionó el requerimiento quirúrgico (87).

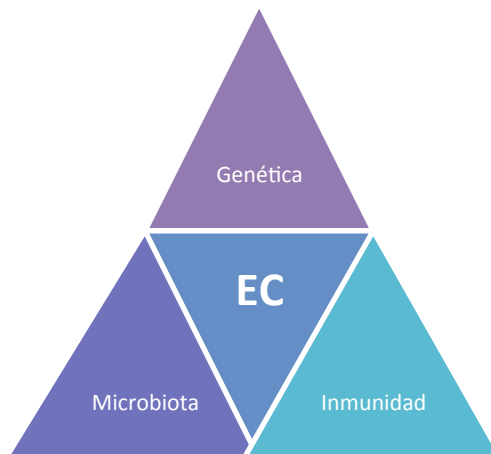


Figura 5. Etiopatogenia de la EC.

A pesar de estudiarse por separado, los tres pilares patogénicos de la EC (Figura 5) están íntimamente ligados. En pocas palabras, la susceptibilidad del huésped (y su respuesta inmune) a la flora bacteriana intestinal viene determinada por predisposición genética. De todas formas, para conseguir abordar todos los elementos de una manera explicativa, se intentará caracterizarlos de forma independiente, subrayando las áreas de íntima relación.

2.1 Sistema inmune intestinal: *protagonista clave en la EC*

El sistema inmune intestinal constituye el escenario donde suceden los fenómenos patogénicos que llevarán a la manifestación de la EC. Está conformado por la mucosa intestinal, el microbioma y el sistema vascular (88).

Mucosa intestinal: La mucosa intestinal representa una de las interfases más extensas de contacto entre el huésped y el medio

externo: 400m². Es una barrera física (constituida por el epitelio intestinal) que se encuentra entre el microbioma y el sistema inmune intestinal, que constituye una segunda línea defensiva. Una barrera epitelial intacta depende de las uniones intercelulares que sellan el espacio existente entre células epiteliales vecinas (espacio paracelular). Las uniones estrechas (*tight junctions*) son elementos clave de sellado para impedir el tráfico de macromoléculas con capacidad antigénica o de microorganismos (89), pero a la vez, permitiendo el paso de agua e iones hacia la circulación. La impermeabilización del subepitelio (o *lamina propria*) se completa con las uniones adherentes (*adherens junctions*) y los desmosomas que vinculan las uniones paracelulares con el mantenimiento del citoesqueleto y la polaridad celular. El moco intestinal cubre el epitelio en su totalidad, limitando el contacto entre microorganismos y células epiteliales, y alberga altas concentraciones de moléculas antimicrobianas como son la inmunoglobulina A (IgA) o las defensinas. La capa de moco es simple en el intestino delgado y doble en el colon. Es precisamente en el moco intestinal donde se genera un microhabitat donde las bacterias están en proximidad y sintropía, compartiendo nutrientes y evitando el efecto lavado del peristaltismo intestinal continuo (90).

En el epitelio intestinal coexisten distintas estirpes de células epiteliales (Figura 6), que se dividen en dos grupos especializados: las de linaje absortivo (o enterocitos) y las de linaje secretor (91). Este último grupo incluye las células caliciformes (*goblet cells*), las células de linaje enteroendocrino y las células de Paneth, estas últimas localizadas exclusivamente en las criptas, junto con las células madre

(*stem cells*). Los enterocitos, que se disponen en una capa simple, se encuentran de forma abundante en el intestino delgado, delimitando su porción luminal, secretan hidrolasas y absorben nutrientes. Las células caliciformes regulan la producción de moco y de factores que contribuyen a la reparación epitelial y la regulación de la inflamación. Las células de linaje enteroendocrino se diferencian según el tipo de hormona que producen: serotonina, sustancia P o secretina, representando una pequeña porción del total de las células especializadas (1%). Las células de Paneth son exclusivas del intestino delgado y el colon ascendente y se encuentran en la base de las criptas secretando péptidos antimicrobianos como las α -defensinas, las criptidinas y las lisozimas. El comportamiento de las células madre (que luego dará lugar a los diferentes tipos específicos de células epiteliales especializadas) está regulado por varias vías como son la Wnt (nombre resultado de dos prooncogenes: int y Wg), *Notch pathway*, *Hedgehog pathway* y de las proteínas morfogenéticas del hueso (*bone morphogenetic proteins: BMP*) (92).

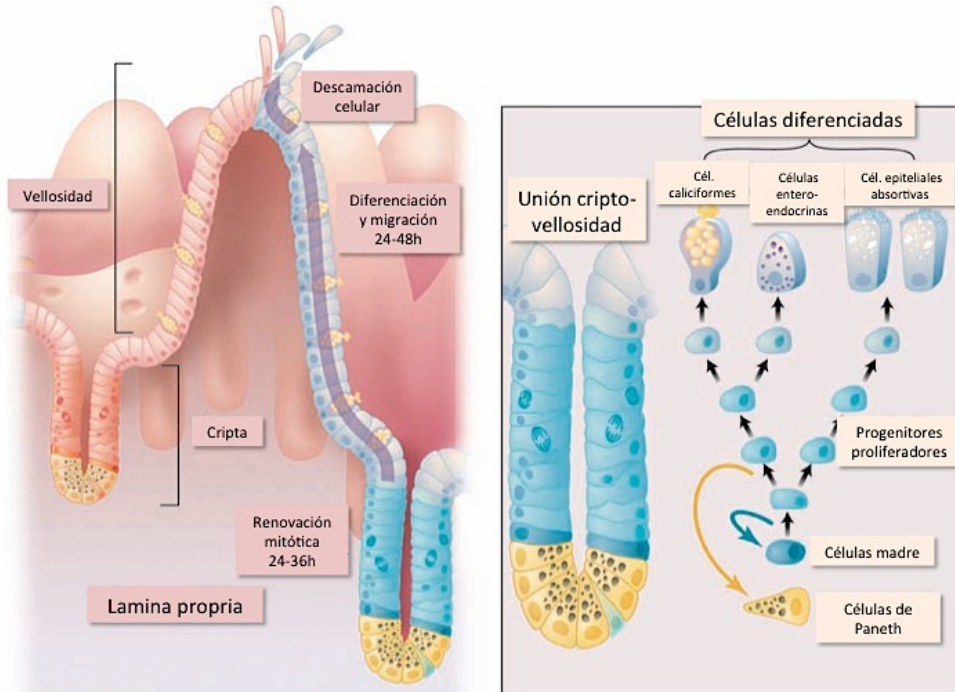


Figura 6. Anatomía del epitelio intestinal (intestino delgado). El epitelio está conformado por criptas y vellosidades (imagen de la izquierda). En la imagen de la derecha se muestra el linaje de las células especializadas. Modificado de Radtke y Clevers (91).

La *lamina propria* intestinal contiene una población compleja de células de la inmunidad que mantienen el equilibrio necesario para la inmunotolerancia frente a la microbiota intestinal. La respuesta inmune inicial hacia la microbiota intestinal se encuentra estrechamente regulada y es esta regulación la que determina si la respuesta generada será de tolerancia o de respuesta inflamatoria defensiva. Esta respuesta inicial es la conocida como reconocimiento inmune innato. Las células que lo conforman manifiestan receptores para el reconocimiento de patrones antigénicos, sobre todo microbianos, en contraste con el reconocimiento específico de

antígenos por los receptores del sistema inmune adaptativo. La capa de epitelio intestinal expresa diversos tipos de receptores de la inmunidad innata que, además de ser de las primeras líneas de defensa, condicionan a las células presentadoras de antígenos subepiteliales para inducir mecanismos de tolerancia intentando mantener la homeostasis en el intestino (Figura 7). La familia de los receptores de patrones antigénicos engloba a *toll-like receptors* (TLR) que se encuentran en la membrana celular y a las proteínas del dominio de la oligomerización de nucleótidos (*nucleotide oligomerization domain* o *NOD*), ubicadas en la membrana y/o en el citosol de las células epiteliales, macrófagos y células dendríticas. Estos receptores detectan patrones conservados microbianos de bacterias, hongos y virus, además de factores no microbianos, como iones, productos de muerte celular o componentes de la matriz extracelular (93). En condiciones normales la activación de los TLR y NOD limita el proceso inflamatorio y fomenta la tolerancia. Los mecanismos regulados por los TLR y NOD proporcionan al intestino un estado de inflamación controlada que mantiene en alerta continua al epitelio intestinal y a las células dendríticas, además de contribuir al fortalecimiento de la función barrera intestinal. Cuando se activan las células presentadoras de antígenos (sobre todo las células dendríticas, que actúan de 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 (recubiertas por células M), los ganglios linfáticos o los folículos linfoides aislados. Esta interacción inicia la respuesta inmune adaptativa, a partir de la que se generan los linfocitos activos

especializados en distintas funciones inflamatorias o reguladoras. Una de las características más remarcables de la respuesta inmune adaptativa es la reacción rápida, robusta y específica que se da a consecuencia del desafío que genera un antígeno, lo que se conoce como memoria inmunológica. En este sentido las células B, que son otro grupo de linfocitos con características reguladoras, que cuando se activan se diferencian en células plasmáticas capaces de generar anticuerpos clave en el control microbiológico.

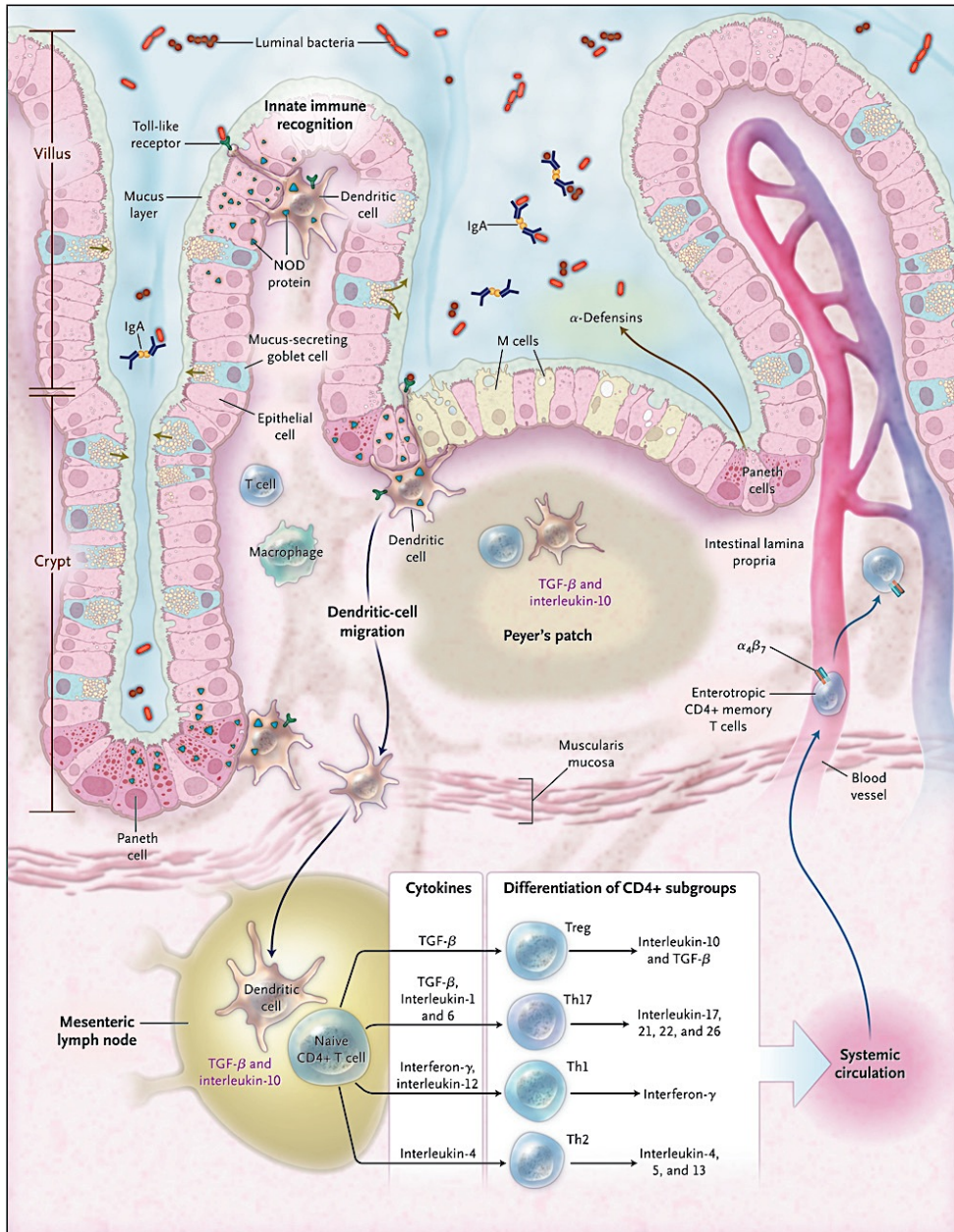


Figura 7. El sistema intestinal inmune en estado de homeostasia. Tomado de Abraham y Cho (88).

Células T. Las células T efectoras (T helper: Th) como las Th1 (esenciales para la defensa frente a patógenos intracelulares), Th2

(fundamentales para el reclutamiento de eosinófilos al sitio de la inflamación y para la resolución de infecciones parasitarias) y Th17 (inductoras de la respuesta inflamatoria basada en la activación de neutrófilos y que facilitan la producción de defensinas), junto con células T reguladoras (Treg) como la Foxp3+ y las Th3 (protectoras de la superficie mucosa del intestino de antígenos externos no patogénicos), todas ellas subgrupo de las células T CD4+, secretan citoquinas características (Figura 7). Las células T efectoras tienen un rol crítico en la defensa frente a patógenos y la entrada excesiva de microbiota intestinal a través del epitelio. Las células Treg mantienen la inmunoregulación mediante el consumo (privación) o la producción de citoquinas y mediante la estimulación directa de otras células presentadoras de antígenos o las mismas células T efectoras (94). La regulación de las células T es fundamental para el control del sistema inmune intestinal, procurando el equilibrio entre las células T efectoras y las Treg en condiciones de homeostasis. La expansión de las células T está limitada por la apoptosis, que es la destrucción o muerte celular programada, auto-infligida con el fin de auto-controlar su desarrollo y crecimiento.

Células B. Los linfocitos o células B son los leucocitos responsables de la inmunidad mediada por anticuerpos. Sus funciones incluyen la generación de anticuerpos específicos, servir como células presentadoras de antígenos, transformarse en células B de memoria después de la activación por la interacción con un antígeno, y liberar citoquinas fundamentales para diversas vías de regulación inmune. A nivel intestinal, las células B producen anticuerpos IgA, que se

segregan a la luz intestinal, contribuyendo así a la protección inmune sin provocar inflamación.

Autofagia. Considerado como otro mecanismo fundamental de la respuesta inmune innata, la autofagia es un proceso catabólico que incluye la degradación de los componentes celulares mediante la maquinaria lisosomal. La autofagia juega un papel fundamental en la destrucción de algunas bacterias intracelulares y en la limpieza de los residuos celulares. Un determinado grado de autofagia tiene lugar en todas las células como un fenómeno homeostático para el reciclaje de proteínas y organelas. Para el mantenimiento de la funcionalidad de las células secretoras es fundamental el plegamiento coordinado de proteínas y el tráfico fluido de proteínas secretoras mediante la interacción del sistema del retículo endoplasmático-aparato de Golgi con las vesículas autofágicas (86). La autofagia puede ser activada por el NOD2 y por otros procesos como el desarrollo celular, la inanición, el estrés oxidativo y el mal plegamiento de proteínas (95).

Microbioma intestinal: Está conformado por los microorganismos que habitan en el intestino (la microbiota), sus elementos genéticos y la interacción medioambiental a nivel intestinal. La población microbiana luminal está influenciada por factores ambientales como el pH, los niveles de oxígeno y el acceso al alimento, lo que crea una biodistribución de sus especies en distintos nichos a lo largo del intestino, provocando que el huésped adapte distintos mecanismos inmunitarios para una correcta tolerancia en cada segmento intestinal (96). Se estima que el intestino alberga alrededor de 1800 géneros y entre 15000 y 36000 especies de bacterias (97), algunas de

ellas todavía desconocidas, constituyendo en conjunto un mayor número de células procariotas que el de las células somáticas y germinales de un ser humano (90). El intestino distal es la porción más densamente poblada de ecosistemas microbianos en todo el planeta con una cantidad de 10^{12} organismos confinados en un mililitro o gramo de contenido luminal. Casi la totalidad de la flora comensal está formada por 4 grupos bacterianos: Firmicutes (64%, formado por los grupos XIV y IV de la familia de los Clostridia), Bacteroidetes (23%), Proteobacteria (8%, siendo la *Escherichia coli* parte de este grupo) y Actinobacteria (4%). La microbiota intraluminal es fundamental para el desarrollo del sistema inmune intestinal, provee elementos nutricionales y modula el metabolismo energético de los mamíferos (98–101). Estos microorganismos se adquieren durante el nacimiento pero su composición varía notablemente en el primer año de vida. En adultos, la población microbiana personal se mantiene relativamente estable, existiendo variaciones en respuesta a estímulos del medio ambiente, del desarrollo y de las enfermedades (88). Se ha demostrado que la genética juega un papel muy relevante en el establecimiento y la modulación de la microbiota intestinal, hecho que se hace evidente en el estudio de gemelos monocigóticos ya que su microbiota es más parecida que el de los hermanos no gemelares (102). La microbiota intestinal en sujetos sanos se caracteriza por ser de alta biodiversidad, rica en especies comensales y Firmicutes, y baja en concentración de patógenos intestinales. Las interacciones huésped-microbioma pueden ser mutuamente beneficiosas o deletéreas, como en el caso de la EC, donde las bacterias son fundamentales para que se produzca la respuesta inflamatoria, como se verá más adelante. Se ha demostrado que la

flora bacteriana exhibe una influencia anti-inflamatoria y protege a las células epiteliales: las especies de *Bacteroides* y *Clostridium* inducen expansión de células Treg, reduciendo la inflamación intestinal (103), mientras que el género de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Faecalibacterium* protegen al huésped de la inflamación de la mucosa intestinal al inducir una disminución de citoquinas pro-inflamatorias (104) o estimular la secreción de IL-10 (105), una de las más conocidas citoquinas anti-inflamatorias. También se ha demostrado que la microbiota comensal ejerce un efecto directo en la función de las células dendríticas, parte fundamental de la respuesta inmune innata, al inducir la secreción de citoquinas -proinflamatorias en el caso de la EC- (106).

Sistema vascular intestinal: La circulación intestinal y, en particular, su endotelio regula la entrada de leucocitos al intestino y mantiene un riego sanguíneo adecuado. El acceso de células hacia el tejido intestinal está modulado por moléculas de adhesión (selectinas, integrinas) y quimioquinas (sustancias celulares secretadas que atraen a otras células).

2.1.1 El sistema inmune intestinal en la EC

Son varias las alteraciones que se han descrito del sistema inmune intestinal en la EC (Figura 8). Estas alteraciones podrían ser tanto alteraciones primarias en la EC como la consecuencia de un proceso inflamatorio persistente. Ellas son:

- Epitelio intestinal:
 - Aumento de la permeabilidad en el espacio paracelular

- Regulación alterada de las *tight junctions*
- Disminución de la secreción de defensinas
- Disminución de la secreción de moco
- Respuesta inflamatoria:
 - La activación de los TLR provoca una intensa infiltración en la *lamina propria* por células de la inmunidad innata (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células T asesinas naturales-*natural killer*, *NK*-) y células de la respuesta adaptativa (células T efectoras y B activadas).
 - Un aumento en número e intensidad de activación de estas células (Th1-Th17) produce un aumento de citoquinas de la cascada inflamatoria como son el factor de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor α* , *TNF- α*), la IL-1 β , el interferón- γ y otras citoquinas de la vía IL23-Th17.
 - Estas citoquinas causan una respuesta inflamatoria destructiva y favorecen la resistencia a la apoptosis de las células Th1, perpetuando así la secreción de más citoquinas pro-inflamatorias.
 - Disfunción de las células Treg, bloqueando así su efecto supresor de las células T efectoras.
- Autofagia:
 - Los defectos de la autofagia en la EC producen respuestas intracelulares ineficaces, con una destrucción microbiana inadecuada, facilitando la exposición a las bacterias comensales y la activación de las células T.

- El estrés en el retículo endoplasmático debido, entre otros fenómenos, al mal plegamiento de proteínas, activa la autofagia de manera aberrante.
- Sistema vascular:
 - En la EC activa se produce un aumento del reclutamiento de monocitos y polimorfonucleares desde el torrente sanguíneo hacia la pared intestinal mediante diversos mecanismos: rodamiento, adhesión endotelial, diapédesis (paso de células sanguíneas a través de una pared intacta) y migración.
- Microbiota intestinal: aunque este aspecto se trata ampliamente más adelante dada su relevancia en la patogenia de la EC, en resumen, se podría concluir que su alteración en la EC se caracteriza por presentar:
 - Baja biodiversidad
 - Disbiosis
 - Aumento de la concentración de patógenos intestinales

una respuesta efectora Th1-T17 con la producción excesiva de citoquinas que además de mantener la respuesta de activación generan destrucción celular.

2.1.2 El sistema inmune intestinal en la recurrencia post-quirúrgica de la EC

Como ya se ha comentado previamente, la mucosa inflamada de los pacientes con EC presenta un patrón típico de respuesta Th1-Th17 con abundancia de TNF e IFN- γ . Estudios recientes sugieren que la inflamación en etapas tempranas de la EC está dominada por citoquinas de la vía Th1 mientras que en áreas donde las lesiones ya están establecidas o en EC de más tiempo de evolución la respuesta inmune suele contener una cierta combinación de componentes de las vías Th1/Th17 (108). También se ha descrito un patrón de citoquinas distinto y típico de las etapas “tempranas” de la EC con concentraciones bajas de IFN y altos niveles de IL-4, que es una citoquina típica de la respuesta Th2 inmunoreguladora (108,109). La IL-4 atenúa la función barrera en el epitelio intestinal y podría permitir un aumento del traspaso de agentes nocivos a través del epitelio. Se ha demostrado que, al incubar monocitos/macrófagos con IL-4, se estimula la producción de IL-12 y TNF lo que podría explicar el cambio de patrón de Th2 a Th1 (110). También se ha visto que uno de los primeros fenómenos en la recurrencia precoz es el aumento en la producción de IL-5 e IgE, así como la presencia de un infiltrado eosinófilo (111,112). Otra citoquina pro-inflamatoria, conocida en la cascada inflamatoria de la EII, y que podría ser relevante en la recurrencia precoz es la IL-6 ileal (113). Consistente

con los hallazgos a nivel general en la EC, se ha demostrado que la IL-10, importante citoquina antiinflamatoria, se encuentra disminuida en el tejido ileal al momento de la resección intestinal, siendo la persistencia de una baja concentración de esta sustancia un buen predictor de recurrencia en los primeros 3 meses posteriores a la cirugía (114).

Es posible que la recurrencia post-quirúrgica también sea debida a un mecanismo anormal de reparación, donde existe un excesivo crecimiento de las capas de la *muscularis mucosae* y favorecimiento de los fenómenos de fibrosis, lo que más adelante podría dar lugar a enfermedad transmural y a la formación de estenosis. Esta hipótesis se ha sugerido en vista de los resultados de un estudio donde se objetivó la presencia de altos niveles del factor de transformación- β 1 (*transforming growth factor beta 1* -TGF- β 1-) en el tejido intestinal no inflamado de pacientes que posteriormente desarrollarían recurrencia de forma precoz (115).

Todavía no se ha dilucidado por qué la EC recurre en el íleon inmediatamente proximal a la anastomosis. Estudios de microscopía óptica han demostrado que la tríada consistente en alteraciones arquitecturales de la mucosa, formación de puentes en el epitelio e hiperplasia/hipertrofia de células caliciformes se puede encontrar en casi todas las muestras de resección quirúrgica, tanto en la zona afectada como en el margen sano proximal a la resección (116). Se podría especular que la EC macroscópica (endoscópica) es simplemente una transición de los hallazgos en a nivel microscópico (Figura 9).

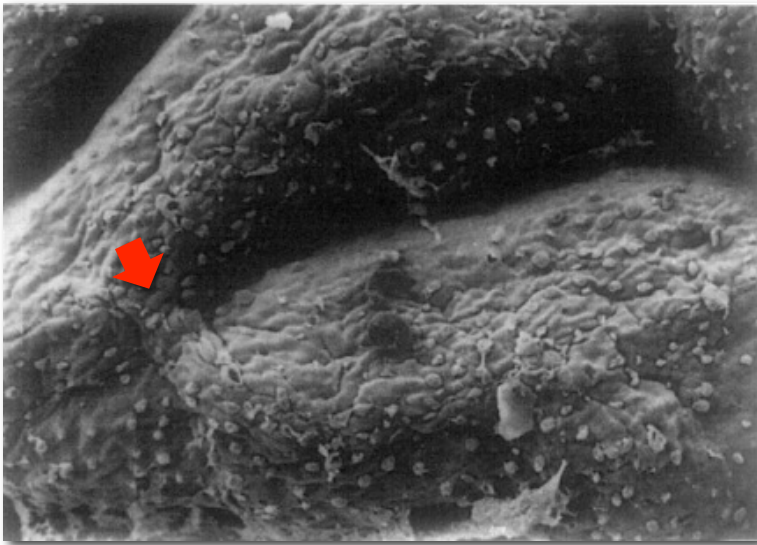


Figura 9. Imagen de microscopía electrónica del margen ileal de una resección ileocecal. La mucosa ileal es macroscópicamente sana pero histológicamente alterada en grado leve. Aquí se observa la presencia de vellosidades acortadas y engrosadas, parecidas a pliegues; la formación de puentes epiteliales (flecha roja); y la hiperplasia e hipertrofia de células caliciformes (SEM 250x; escala, 0.1mm). Tomado de Nagel *et al* (116)

Un hallazgo relevante en la recurrencia post-quirúrgica precoz es el de la plexitis mientérica, como se ha descrito ya al analizar los factores de riesgo de la recurrencia (Capítulo 1). 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 (117,118). Se ha especulado que este hallazgo representa un reflejo de la ofensiva antigénica luminal o podría ser la respuesta neuronal a la alteración de la integridad neuronal (118).

El neo-íleon terminal exhibe cambios vasculares tempranos, consistentes en ruptura y daño de la pared de los capilares endoteliales, si bien es cierto que no se sabe con precisión si estos son fenómenos primarios (siendo en ese caso la isquemia de la zona de la anastomosis el inicio de la cascada inflamatoria) o consecuencia de cambios inflamatorios iniciados en otros compartimentos del tejido intestinal (119).

Otro fenómeno histológico que se ha relacionado con la recurrencia post-quirúrgica de la EC es la disminución de los vasos linfáticos en el borde proximal de la pieza de resección quirúrgica, incluso en zonas sin inflamación, lo que hace de este fenómeno un evento precoz (120). Se ha demostrado que el tráfico de la linfa desde los lugares iniciales de inflamación y los ganglios linfáticos de drenaje es fundamental para limitar la progresión de la inflamación (121). 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, un factor de riesgo conocido para la EC y en particular para la patogenia de la recurrencia post-quirúrgica, parece ejercer su influencia actuando directamente sobre la inmunidad celular y humoral, pero también ocasionando isquemia de la pared intestinal por trombosis (por sus componentes oxidantes) y alterando la capa superficial de moco (122).

2.2 Ambiente: *participación fundamental de la microbiota intestinal*

El ambiente está formado por varios factores fuera del huésped que entran en íntimo contacto con el sistema inmune intestinal y lo influyen de forma directa. Sea cual sea el factor ambiental, este se traduce en cambios a nivel del microbioma intestinal, constituyendo un aspecto fundamental en la patogenia de la EC.

Uno de los factores más influyentes en la composición microbiana es la dieta, y a pesar de que no se ha demostrado que una dieta en particular induzca o proteja de la aparición o perpetuación de la EC sí que es ampliamente conocida la influencia de la nutrición enteral en su tratamiento, como se ha comentado en el Capítulo 1. Además de su efecto en la inmunidad intestinal, la nutrición enteral ha demostrado modular el microbioma de forma directa (123,124). De todas formas, la información en relación a este tema sigue siendo escasa (125) dado el desafío que supone un estudio controlado a gran escala.

Como ya se ha comentado, la incidencia de la EC en edades tempranas está aumentando (8). Este rango de edad es donde la microbiota intestinal altera su diversidad y estabilidad. En edades tempranas la microbiota es poco compleja y poco estable y está afectada por la vía del parto, fluctuando por factores como el cambio de nutrición (de la lactancia materna a la comida sólida), la ocurrencia de enfermedades o el inicio de la pubertad (126). A pesar de que al llegar a la edad adulta el microbioma expresa su mayor complejidad, se ha descrito una disminución de su estabilidad en etapas tardías (127) (alrededor de los 60 años, que es a su vez que es cuando se

produce el segundo pico de incidencia de la EC). Dadas las características diferenciales del microbioma en diferentes etapas del crecimiento es posible que juegue un papel diferente en el inicio y la progresión de la enfermedad (124).

La microbiota no sólo está formado de bacterias. Otros miembros que lo conforman tales como hongos, virus, arqueas (microorganismos unicelulares que carecen de núcleo y son por tanto procariontes) y fagos (virus que parasitan bacterias) también se han visto relacionados con un rol importante en las enfermedades gastrointestinales (128,129). Su influencia en la patogenia de la EC no es conocida por lo que la evidencia disponible se basa en el efecto casi exclusivo de las bacterias. Un resumen de la amplia evidencia que demuestra que la flora bacteriana intestinal es uno de los pilares de la patogenia de la EC están resumidos en la Tabla 7.

Tabla 7. Argumentos que sugieren que la flora entérica juega un rol en la patogenia de la EC.

-
- Efectos fisiológicos de la flora endógena en la estructura mucosa, en el recambio celular, la motilidad, y el funcionamiento y desarrollo inmune (130–132)
 - Reactividad inmunológica hacia la flora en pacientes con EII (pérdida de tolerancia) (133,134)
 - Composición microbiana anormal en pacientes con EII (135)
 - Atenuación de la inflamación en modelos animales de EII cuando se encuentran en condiciones exentas de bacterias (136)
-

-
- Transferencia experimental de colitis mediante células T reactivas hacia antígenos bacterianos (137)
 - Lesiones en la EII que ocurren de predominio en sitios con la mayor exposición bacteriana (íleon y colon) (138)
 - Respuesta clínica a la derivación del contenido fecal, recidiva ante la restauración o la exposición de materia fecal en pacientes con EC (139)
 - Eficacia de los antibióticos y probióticos en pouchitis y para la prevención de recurrencia post-quirúrgica (140,141)
-

Cuando la microbiota intestinal se ve perturbada se genera un medio ideal para la expansión de microorganismos patógenos. Por otra parte, cuando se altera la homeostasis en el epitelio intestinal, la misma flora comensal actúa como un patógeno y perpetúa la respuesta inflamatoria (142). De todas formas, aún ahora no está dilucidado cómo se genera inflamación intestinal mediada por los microorganismos intestinales y si estos fenómenos a nivel de la microbiota son causa, consecuencia o ambos, del proceso inflamatorio. Mecanismos potenciales incluyen la disrupción transitoria de la mucosa epitelial con iniciación de una respuesta inflamatoria que se auto-perpetúa en un huésped susceptible, incluso después de que la infección inicial haya sido resuelta. Otro mecanismo sería el de la infección persistente y su consecuente respuesta inflamatoria. Los mecanismos teóricos de la influencia microbiana en la EC quedan reflejados en la Figura 10.

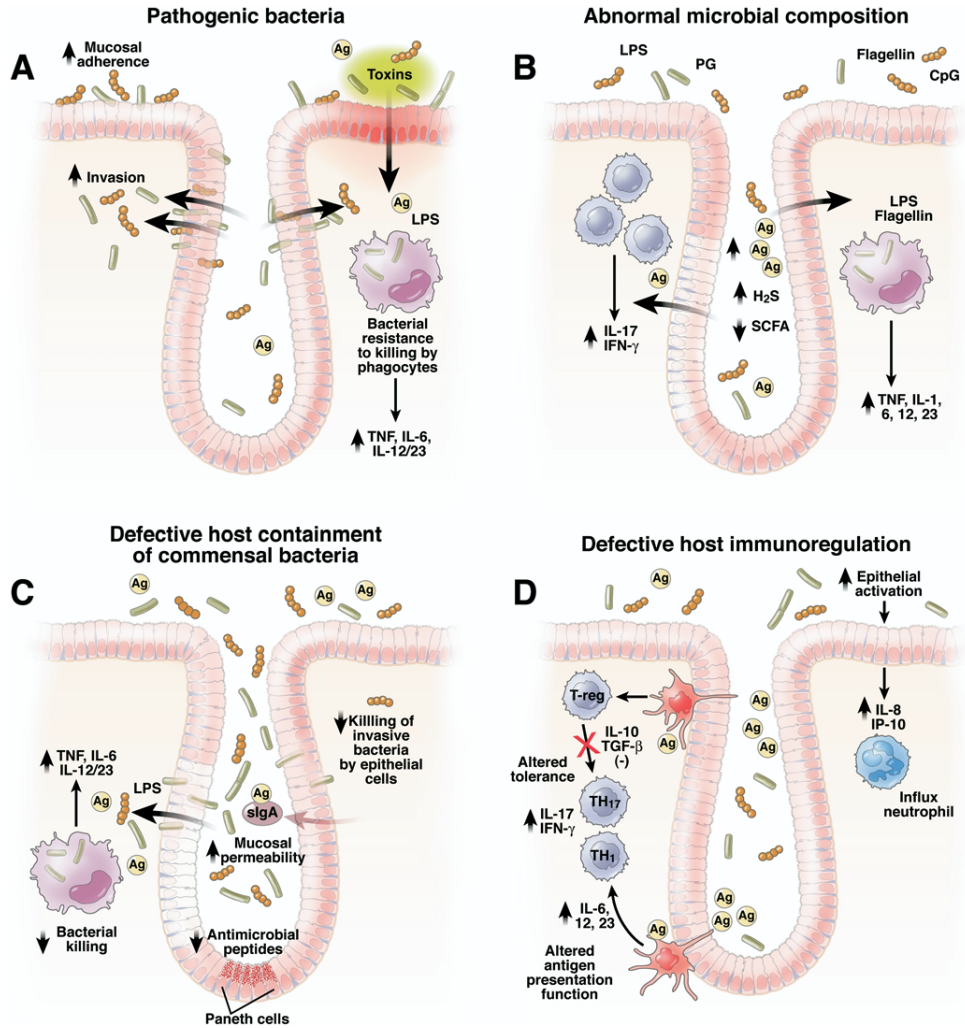


Figura 10. Mecanismos potenciales en los que las bacterias entéricas y los hongos pueden inducir daño intestinal crónico mediado por la inmunidad. Tomado de Sartor (100). A: patogenicidad propia de las bacterias, B: disbiosis, C: contención defectuosa de la flora comensal y D: inmunoregulación defectuosa

Algunos microorganismos se han propuesto como agentes etiológicos en la EC: *Mycobacterium paratuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* (*E. coli*), así como el virus del sarampión, pero ninguno ha demostrado ser un agente causal definitivo (85,143,144). La tendencia actual sugiere una respuesta inadecuada a la propia flora comensal. En este contexto, varias

especies comensales pueden inducir enfermedad de forma selectiva en huéspedes con diversos trasfondos genéticos y también pueden causar distintos fenotipos de enfermedad en un único huésped. Algunas bacterias son agresivas, algunas protectoras y otras neutrales. Una de las bacterias más estudiadas en la patogenia de la EC es *E. coli*. Esta bacteria es el aerobio facultativo predominante en la flora intestinal humana. Algunas especies de *E. coli* son patógenas debido a diversos factores (enteroinvasivo, enterotoxigénico, enteropatogénico, enterohemorrágico, enteroagregativo, enteroadhesivo). Los pacientes con EC (sobre todo aquellos con afectación ileal) exhiben mayor número de cepas enteroadhesivas/enteroinvasivas de *E. coli* en comparación de los controles sanos (145). Estas cepas son además más propensas a sobrevivir y replicarse dentro de los macrófagos que generan altos niveles de TNF α en respuesta a la infección (146–148). Se han descrito diversos factores de virulencia asociados a otras bacterias comensales y que también podrían inducir enfermedad (citotoxina en *B. fragilis*, citotoxina del *Clostridium difficile*, superoxidasa en el *E. faecalis*, etc) (143,149,150). Poder definir las vías que se activan por bacterias comensales en principio no patógenas y entender como los microorganismos residentes suprimen o resaltan de manera selectiva estas vías son aspectos críticos aún no totalmente establecidos.

La EC se caracteriza por presentar un desequilibrio en la composición de la microbiota intestinal, lo que se conoce como disbiosis (151) (Tabla 8). Los individuos afectados de EC presentan una flora inestable (152) que se caracteriza por una reducción de la diversidad en las

familias más abundantes de la flora intestinal, sobre todo las asociadas a la mucosa, tales como *Firmicutes* (bacterias gram positivas que incluyen la familia de *Clostridium* y *Bacillus*) y *Bacteroidetes* (97). Otras especies que se encuentran disminuidas son *Dialister invisus* (del grupo de *Clostridium*), *Faecalibacterium prausnitzii* y *Bifidobacterium adolescentes* (153). Así mismo, presentan un aumento de *Enterobacteriaceae*, *Proteobacteria* y *Fusobacteria* (154). Llama la atención cómo miembros de la familia de los Clostridiales (*Faecalibacterium* y *Roseburia*) se encuentran claramente disminuidos en fases de intensa actividad en los pacientes con EC ileal. Estos grupos son potentes fuentes de ácidos grasos de cadena corta, como el butirato, el cual ha demostrado proteger la mucosa en los modelos murinos de colitis (86). Por el contrario, *Ruminococcus gnavus* (153) está aumentada. Estas bacterias tienen capacidad para degradar la mucina por lo que esto, sumado al hecho de la baja producción de butirato, podría ser una de las razones por la que la disbiosis podría alterar la barrera epitelial intestinal (153). Inicialmente se pensaba que la disbiosis era resultado de la inflamación, por ejemplo por las diferencias en las condiciones ecológicas del medio intestinal debidas a la inflamación, con cambios en el pH, el potencial redox y en la disponibilidad de sustratos (100). Actualmente se sabe que existe disbiosis en los pacientes con EC aún en ausencia de inflamación (154).

Por otra parte, parece que la disbiosis podría ser uno de los vínculos entre genética y microbiota, ya que se ha visto que en familiares sanos de pacientes con EC tienen también cierto grado de disbiosis (menor cantidad de *Collinsella aerofaciens* y de un miembro no

identificado de la familia *E.coli-Shigella*, así como aumento de *Ruminococcus torques*) que los diferencia de sujetos sanos sin antecedentes familiares de EC (153).

Tabla 8. Cambios en el microbioma asociados a la EII. Modificado de Kostic *et al.* (124)

| | |
|-------------------------------|---|
| Composición microbiana | <p>Disminución en la α-diversidad (o riqueza de especies en términos de ecología)</p> <p>Disminución en <i>Bacteroides</i>, <i>Clostridium</i>, <i>Ruminococcaceae</i>, <i>Bifidobacterium</i>, <i>Lactobacillus</i>, <i>Fecalibacterium prausnitzii</i> y Firmicutes</p> <p>Aumento en <i>Bacteroides</i>, <i>Pectinatus</i>, <i>Sutterella</i>, <i>Fusobacterium</i>, <i>Verrumicrobium</i>, <i>Clostridia</i>, <i>Mycobacterium paratuberculosis</i>, <i>Mycobacterium paramyxovirus</i>, <i>Listeria monocitogenes</i>, <i>E. coli</i></p> <p>Presencia de <i>E coli enteroadhesiva-enteroinvasiva</i></p> <p>Presencia de <i>Fusobacterium</i></p> |
| Función microbiana | <p>Disminución en butirato y otros ácidos grasos de cadena corta</p> <p>Disminución del metabolismo del butirato y el propionato</p> <p>Disminución de la biosíntesis de amino ácidos</p> <p>Aumento de la auxotrofia (incapacidad de proliferar de un microorganismo sin el soporte de sustancias externas)</p> <p>Aumento del transporte de amino ácidos</p> |

Aumento del transporte de sulfatos

Aumento del estrés oxidativo

Aumento de la secreción de toxinas

Estos cambios funcionales se han demostrado recientemente en un estudio de proteómica donde se sugiere que los cambios proteínicos producidos por la activación patológica de la flora comensal podrían ser utilizados como biomarcadores en la EC (155).

A pesar de los avances en el estudio de la influencia del microbioma en la patogenia de la EC quedan aún asuntos importantes por abordar en profundidad que demuestren una relación causa-efecto entre las alteraciones del microbioma y la EC: identificar el rol potencial del microbioma intestinal para iniciar la enfermedad, determinar si la composición microbiana puede predecir el riesgo subsecuente de brotes de actividad, o examinar si la flora luminal puede predecir la respuesta al tratamiento (124).

2.2.1 Rol de la flora intestinal en la recurrencia

Los factores microbianos pueden tener diversos efectos en diferentes etapas evolutivas de la EC (por ejemplo en el inicio o en la perpetuación del proceso inflamatorio) (156,157), por lo que su estudio en la recurrencia post-quirúrgica es un tema especialmente atractivo. Es posible que la recurrencia de la EC no sea debida simplemente a una neo-colonización por bacterias patógenas, sino

también a un incapacidad del huésped de mantener las especies comensales protectoras (105).

Tras la resección, la mucosa ileal permanece indemne hasta el nuevo contacto con el contenido fecal (158). Casi inmediatamente después de restablecer el tránsito fecal se ha observado un marcado aumento de activación de macrófagos (CD68), presentación antigénica, transformación epitelioides y reclutamiento leucocitario transendotelial, fenómenos que ocasionan cambios a nivel de la arquitectura de las vellosidades, daño epitelial superficial y parcheado, y necrosis y acumulación de células mononucleares y macrófagos en la *lamina propria* en el ápice vellositario (75). La infusión de contenido ileal ultrafiltrado (exento sobre todo de bacterias intactas o de partículas alimentarias grandes ($>0.22\mu$)) no ocasiona lesión histológica (139) por lo que se puede concluir que todos estos cambios son consecuencia del contenido bacteriano del tránsito fecal. De hecho, las tasas de recurrencia son menores cuando no se practica una anastomosis ileocecal (159) o cuando se administran antibióticos nitroimidazólicos inmediatamente después de la resección quirúrgica lo que produce una reducción de la carga bacteriana anaeróbica (160).

Después de una resección intestinal, la ausencia de válvula ileocecal, así como la estasis y el sobrecrecimiento bacteriano secundarios producen cambios ecológicos a consecuencia de un reflujo del contenido cólico (74). Estas bacterias neocolonizadoras podrían ser reconocidas como “extrañas” por lo que su presencia podría desencadenar efectos a nivel de la inmunidad local provocando la

respuesta del huésped, lo que posteriormente se manifestaría como recurrencia de la EC (73).

Existe una mayor disminución de *Faecalibacterium prausnitzii* en el tejido ileal inflamado de los fumadores en comparación con los no fumadores (161). En la misma línea, pacientes con características clínicas de riesgo de recurrencia (fumadores, patrones penetrantes, más de una resección intestinal) tienen menor cantidad de Bifidobacteria tanto en el tejido inflamado como en el no inflamado, y tanto al momento de la cirugía como en el seguimiento posterior, cuando se comparan con pacientes con bajo riesgo de recurrencia. Se postula, por tanto, que los factores de riesgo de recurrencia podrían estar relacionados estrechamente con la disbiosis (162). Los pacientes que no desarrollan recurrencia post-quirúrgica tienen una microbiota diversa, estable y parecida a los controles sanos, a diferencia de aquellos pacientes con recurrencia precoz (154,157). En el momento de la resección ileocecal, se ha demostrado que los pacientes que presentarán recurrencia post-quirúrgica tienen menor abundancia de *Lachnospiraceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Rhodobacteraceae* (un tipo de *Alphaproteobacteria*) y una *Proteobacteria* no conocida, así como más *Enterococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Veillonella spp* y un tipo de *Clostridium* proteolítico (154,157). Por otra parte, en muestras obtenidas en el seguimiento endoscópico se ha visto mayor cantidad de *Clostridium spp*, *Desulfotomaculum putei*, *Thiotrix eikelboomi*, *Sphingomonas spp*, *Bacteroides fragilis*, *Rhizobium* (otra *Alphaproteobacteria*), *E.coli* enteroadhesiva/enteroinvasiva (hasta en un 100%) y *Bacillus spp* (154,157,163–165) y prácticamente ausencia

de *Ruminococcus* y *Subdoligranulum spp* (157) en aquellos pacientes que presentan recurrencia.

Los pacientes con EC presentan una microbiota que favorece la fermentación generada a partir de proteínas así como la producción de ácido láctico (157). Estas especies proteolíticas se han asociado a la acumulación de productos finales del metabolismo que son tóxicos para los colonocitos (166). En cambio, los pacientes que se mantienen en remisión después de una resección ileocecal mantienen una microbiota que fundamentalmente fermenta hidratos de carbono produciendo butirato, que es el sustrato energético preferido de los colonocitos (167). De hecho, el butirato se ha implicado en la prevención de la colitis y ha demostrado mantener la barrera epitelial (168).

Datos a favor de la importancia de la flora bacteriana para la aparición de la recurrencia post-quirúrgica de la EC, incluso de relevancia superior a la predisposición genética individual, procede del modelo animal de colitis espontánea en ratones *knockout* para la IL10. Estos animales suelen presentar inflamación cólica y cecal de forma espontánea en condiciones convencionales de estabulación. Con la resección ileocecal se consigue que desarrollen inflamación ileal, pero sólo si son mantenidos en condiciones convencionales, porque en un ambiente sin bacterias y a pesar de la resección ileocecal no presentan inflamación. Además, los ratones *wild type* con resección ileocecal no presentan recurrencia, incluso en condiciones convenciones, es decir, en contacto con la flora bacteriana (169).

2.3 Genética

Varias observaciones han sugerido que la EC está influida por factores genéticos (Tabla 9). De hecho, en la descripción original de la enfermedad ya se mencionaba su tendencia a la agregación familiar (170). Un antecedente familiar de EC sigue siendo el mayor factor independiente de riesgo para el desarrollo de la enfermedad (107). En familias con padres e hijos afectados se ha demostrado la presencia de la anticipación genética, fenómeno de presentar la enfermedad en edades más tempranas que los progenitores y evento conocido en diversas enfermedades monogénicas (como las enfermedades neurodegenerativas) (171).

De todas maneras, la ausencia de una herencia mendeliana simple sugiere que la influencia es debida a múltiples factores genéticos que contribuyen al riesgo individual de desarrollar la enfermedad. La heterogeneidad genética, donde distintos grupos de genes producen una expresión fenotípica similar en diferentes grupos de pacientes, complica aún más los intentos para identificar los genes de la enfermedad (172) como ocurre en la EII.

Tabla 9. Evidencia de la susceptibilidad debida a factores genéticos en la EII.

Modificado de Podolsky (173)

| Estudios en humanos |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • La prevalencia varía en diferentes poblaciones • El riesgo está incrementado en familiares de primer grado de pacientes afectos • Existe mayor concordancia entre gemelos monocigóticos que en dicigóticos • Los síndromes que recuerdan a la EII cosegregan en familias |

con enfermedades genéticas raras (p.ej. enfermedad del almacenamiento del glucógeno tipo IB, síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome de Hermansky-Pudlak)

- Habitualmente existe concordancia en el comportamiento y localización de la afectación en familiares con diversos miembros afectados
- Se han identificado numerosos genes candidatos con asociaciones alélicas putativas en la EII
- El estudio de marcadores de microsatélites de DNA ha identificado el vínculo genómico en los cromosomas 16 (IBD1, exclusivo de la EC), 3,5, 7, 12 (exclusivo en la CU), 18, 19 y X

Estudios en animales

-
- Experimentos en roedores con alteraciones genéticas conferidas por técnicas transgénicas o de supresión de genes aboca al desarrollo hereditario de colitis similar a la de la EII
 - La sobre-expresión transgénica o por supresión exclusiva de un gen mediante recombinación homóloga puede generar EII
 - El fenotipo resultante de una alteración genética individual está modulada por otro *loci* genético
 - Ningún gen se asocia únicamente al desarrollo de la EII; la colitis es un resultado de alteraciones en un subgrupo de genes que codifican proteínas relacionadas tanto con la barrera epitelial como con la respuesta inmune mucosa
 - Las alteraciones genéticas confieren susceptibilidad pero no son suficiente para inducir la enfermedad (p.ej. líneas murinas mutantes mantenidas en un ambiente libre de patógenos no manifiestan EII)
 - Las bacterias comensales son un requisito fundamental para el desarrollo de EII en un huésped susceptible
-

2.3.1 Genes específicos relacionados con la EC: *evolución de los estudios de la influencia de la genética*

El estudio de la influencia de la genética en la fisiopatología de la EC empieza formalmente a mediados de los 90, con los primeros estudios de ligamiento, aquellos que identifican regiones del genoma humano relacionadas a determinadas enfermedades al evaluar una serie de **alelos** (una de dos o más versiones de una secuencia genética con una localización particular en el genoma) de cosegregación (ligamiento) con la presencia de la enfermedad evaluando varias familias (o una familia grande con múltiples miembros afectados). De 1996 a 2004 se realizaron 11 estudios de ligamiento en la EC (174). En estos estudios se identificó un *locus* de susceptibilidad significativa en una región del cromosoma 16 (conocido como IBD1). En 2001 se pudo conocer las mutaciones específicas que conformaban este *locus*: R702W, G908R y L1007Fs, todas parte del gen **NOD2** (conocido en ese momento también como **CARD15**) (175,176).

Con este descubrimiento, uno de los mayores logros en el estudio de la patogenia de la EC, se demostró la importancia de los defectos de inmunidad innata. Estas variantes suponen un riesgo relativo de padecer la enfermedad de 2-4 en heterocigotos y de 20 a 40 en homocigotos, estando por lo menos una de estas variantes en hasta el 40% de los pacientes con EC en comparación con un 6-7% del resto de población europea sin la enfermedad (174). 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 (177). La asociación de las

mutaciones del NOD2 con la EC de localización ileal sugieren la existencia de una diferencia importante en los mecanismos de inmunotolerancia entre el íleon y el colon (146). Estas variantes también se han asociado a un debut temprano de la EC, a una EC ileal complicada, mayor riesgo de resecciones intestinales, así como a una mayor translocación de DNA bacteriano (178).

A pesar del éxito inicial al identificar el NOD2 como mutación relacionada con la EC, los resultados de nuevos estudios de ligamiento fueron inconsistentes (174). El fracaso de este enfoque puso en evidencia la complejidad de la enfermedad donde, a diferencia de las enfermedades con herencia mendeliana, las variantes alélicas comunes presentan un efecto discreto. A pesar de la imposibilidad de buscar marcadores de asociación en el genoma entero, el siguiente enfoque supuso la exploración de marcadores en genes individuales (seleccionados por su relevancia conocida *a priori*), lo que se conoce como estudios de asociación de gen candidato. Esto se lleva a cabo genotipando un grupo de marcadores en el gen de interés en una muestra de pacientes y controles, y analizando la existencia de diferencias en la frecuencia alélica. Si se encuentra una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos, el alelo más prevalente en el grupo de pacientes es designado como un gen asociado con la enfermedad. De todas formas este enfoque puede dar asociaciones espurias resultado de diferencias entre pacientes y controles que sean distintas a la propia enfermedad, como por ejemplo el origen étnico (171). Los resultados de la mayoría de estos estudios en la EC fueron también decepcionantes, sin conseguir hallazgos consistentes ni reproducibles, probablemente por el estudio

en muestras pequeñas, por la presencia de asociaciones falsamente positivas o por sesgos de publicación (179). En esta etapa se puso de manifiesto que era imprescindible la utilización de alta tecnología en muestras mucho mayores.

Coincidiendo con las fases finales del proyecto del Genoma Humano, a principios de 2000, este tipo de estudios se llevó a cabo intentando explorar todas las variaciones de la genética humana a nivel poblacional. Para el año 2007 ya se habían descrito 3.1 millones de polimorfismos de nucleótido único (*single nucleotide polymorphism, SNP*) (180,181). Al mismo tiempo, los avances tecnológicos en materia de *microarrays* permitió que fuera posible realizar el genotipado de cientos de miles de SNPs dispersos por todo el genoma (182). Estos eventos permitieron el inicio de los estudios asociación a través del genoma (*genome-wide association studies, GWAS*) para poder identificar los *loci* asociados a rasgos complejos o riesgo de padecer determinada enfermedad. Los estudios de GWAS buscan encontrar la diferencia significativa de frecuencias alélicas entre un gran número de pacientes con una enfermedad específica y controles sanos evaluando cientos de miles de SNPs dispuestos en todo el genoma, sin partir de una hipótesis predeterminada. Los SNPs que muestran una asociación significativa con una enfermedad determinada se ubican en regiones del genoma que muy probablemente contengan genes relevantes para el riesgo de aquella enfermedad. A diferencia de los estudio de ligamiento, los estudios de GWAS no están restringidos a su determinación en pares de hermanos y familias, y, por otra parte, tienen un mayor poder estadístico para detectar *loci* importantes pero con un tamaño

pequeño. La capacidad de estos estudios de discernir señal verdadera de “ruido de fondo” es dependiente de la magnitud de la señal así como del tamaño muestral. El primer estudio de GWAS en la EC data de 2005 (183) y a partir de este momento se han estudiado entre 100.000 y 600.000 SNPs. Gracias al desarrollo de protocolos de control de calidad en los estudio de GWAS, así como los criterios estrictos de significación estadística para su asociación y replicación (184), la gran mayoría de SNPs que muestran diferencia significativa entre casos y controles son verdaderos positivos. A partir de estos hallazgos se han descrito genes y vías que han permitido inferir los procesos biológicos y los tipos celulares involucrados en la patogenia de la EC, así como el fenotipo final de la enfermedad (185). Así, estos nuevos descubrimientos resaltan la importancia de la función-barrera intestinal, las respuestas microbianas específicas (autofagia, estrés del retículo endoplasmático, fagocitosis) y la complejidad de las respuestas de inmunidad innata (proteínas NOD, TRL) y adaptativa (vía de las Th17) (186). Otra ventaja de los estudio de GWAS ha sido el demostrar la superposición entre la EC y otras enfermedades relacionadas con la autoinmunidad. Hasta un 30% de las variantes de asociación se comparten con la CU, mientras hasta un 50% de los *loci* se han encontrado también asociados a diabetes tipo 1, celiaquía o artritis reumatoide (187). Lo interesante del estudio de polimorfismos es que son fijos para cada individuo y no dependen de la duración de la enfermedad ni que el fenotipo de la EC se manifieste en su totalidad. En la Tabla 10 se resaltan los *loci* mejor estudiados en la EC.

Tabla 10. Asociaciones genéticas en la EC más conocidas. Modificado de Abraham & Cho (88).

| Gen | Descripción | Función |
|--------------------------------|---|---|
| Respuesta inmune innata | | |
| NOD2 | <i>Nucleotide-binding oligomerization domain 2</i> | Percibe el peptidoglicano bacteriano para activar las señales celulares |
| ATG16L1 | <i>Autophagy-related, 16-like</i> | Componente del complejo de la autofagia y en la función de las células de Paneth |
| IRGM | <i>Immunity-related GTPase M</i> | Rol en la autofagia, fundamental para la eliminación de patógenos intracelulares |
| ITLN1 | <i>Intelectin 1 (galactofuranose binding)</i> | Mantenimiento de la barrera epitelial y el funcionamiento de las células de Paneth |
| CARD9 | <i>Caspase recruitment domain family, member 9</i> | Integra señales desde muchos receptores de la inmunidad innata que reconocen todo tipo de microorganismos, incluidos los hongos. Estrés oxidativo |
| REL | <i>v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog</i> | Fundamental para la producción de IgA de mucosas |
| Vía de la IL23-Th17 | | |
| IL23R | <i>Interleukin-23 receptor</i> | Único componente del receptor de la IL23. Activa la vía Th17 |
| IL12B | <i>Interleukin-12B, p40 subunit</i> | Componente de la IL-23, común a la IL12 |

| | | |
|--------------|---|---|
| STAT3 | <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i> | Común para varias citoquinas: IL6, 10, 17, 21, 22 y 23. Fundamental para la reparación epitelial |
| CCR6 | <i>Chemokine [C-C motif] receptor 6</i> | Proteína de la membrana celular, importante para la migración y el reclutamiento de células de la inflamación |
| JAK2 | <i>Janus kinase 2</i> | Citoquina fundamental para la respuesta a interferón gamma |

Otros genes

| | | |
|------------------|---|--|
| PTEGR4 | <i>Prostaglandin E receptor 4</i> | Uno de los receptores del mediador inflamatorio PGE2 |
| ZNF365 | <i>Zinc finger protein 365</i> | Rol en la mitosis |
| SLC22A4 | <i>Solute-carrier family 22, organic-cation transporter</i> | Proteína de membrana poliespecífica y de transporte |
| PTPN2 | <i>T-cell protein tyrosine phosphatase</i> | Múltiples interacciones con las proteínas STAT. Protección frente a la permeabilidad inducida por IFN γ . |
| CMH (MHC) | Complejo mayor de histocompatibilidad | Clase I y II: modulan las vías de presentación de antígenos exógenos en la EC |
| NKX2-3 | <i>NK2-transcription factor-related, locus 3</i> | Fundamental en el desarrollo linfático y esplénico |
| MST1 | <i>Macrophage stimulating 1</i> | Rol en la quimiotaxis y activación de macrófagos como respuesta de señales |

proinflamatorias

| | | |
|--------------|---|---------------------|
| FASLG | <i>Fas ligand (TNF superfamily, member 6)</i> | Rol en la apoptosis |
|--------------|---|---------------------|

De las vías mejor caracterizadas mediante los estudios genéticos, además de la inmunidad innata que orchestra el NOD2, se encuentran la de la autofagia y la de la IL23-R.

La vía de la **autofagia** se ha descrito gracias a la implicación de genes como ATG16L1, IRGM, ULK1 (*unc-51 like autophagy activating kinase*) y NCF4 (*neutrophil cytosolic factor 4*). Como ya se comentó previamente, la autofagia es un proceso catabólico en el que la célula es capaz de reciclar sus organelas dañadas mediante la maquinaria lisosomal. Por otra parte, la autofagia también juega un papel importante en la defensa contra bacterias intracelulares y la presentación antigénica realizada por las células fagocíticas. Defectos en el gen ATG16L1 se han asociado con la autofagia ineficaz frente a *Salmonella typhimurium* (188), mientras que las células deficientes de IRGM tienen una respuesta inadecuada frente a organismos intracelulares como *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium tuberculosis* (189). También se ha demostrado que tanto ATG16L1 como IRGM son importantes para el control de la *Escherichia coli* enteroadhesiva-enteroinvasiva (190), bacteria conocida por su capacidad de colonizar las lesiones ileales de EC. Recientemente se ha demostrado que IRGM no sólo controla la autofagia sino que también tiene capacidad de inducir la apoptosis (191).

La vía del **receptor de la IL23 (IL23R)** se ha vinculado a la EC desde hace casi una década (192). La IL23 se ha asociado con la vía Th17 (193), muy relevante en la patogenia de la EC. De forma sucinta, la IL23 actúa amplificando de forma potente la cascada inflamatoria a través de la vía de respuesta inmune adaptativa conocida como Th17. La producción de IL23 parece circunscrita a las células del sistema inmune innato, particularmente las células dendríticas y macrófagos. El IL23-R también se expresa en las células dendríticas maduras así como las NK. Es por eso que los polimorfismos que resalten la producción de IL23 por la vía de inmunidad innata podrían ser considerados como factores genéticos de riesgo de padecer EC (194). A la luz de estos hallazgos se ha priorizado esta vía para como diana terapéutica: la administración de anticuerpos anti-p40, que bloquean la IL23, ha demostrado ser efectivos en el tratamiento de inducción y mantenimiento de la EC (195,196).

Una forma de estudiar SNPs relacionados con una enfermedad determinada de forma más acotada es la utilización del Inmunochip que es un *microarray* de SNP que tiene dos objetivos fundamentales: la replicación de señales conocidas previamente por los GWAS (en este caso se incluyen las primeras 2000 asociaciones independientes) y el mapeo exhaustivo de los *loci* descubiertos por los estudios de GWAS. Esto se consigue sin filtrar los SNPs por los espacios entre SNPs ni por el desequilibrio de ligamiento, que es algo que se utilizaba en las etapas tempranas de los estudios de GWAS. Una ventaja importante es su coste, 80% menor que el de un GWAS, con lo que se puede permitir la inclusión de más sujetos en un estudio determinado. Esta tecnología ha dado sus frutos de forma reciente,

por ejemplo demostrando el rol de los niveles de vitamina D en el riesgo de presentar EC (197). De todas formas esta tecnología también tiene importantes limitaciones. Su diseño se basa en un estudio piloto (*1000 Genomes Pilot data*) que fue puesto en marcha en el año 2010 y eso hace que tenga una cobertura incompleta, sobre todo para las variaciones de baja frecuencia o los *loci* de reciente hallazgo. Su enfoque se basa más en el contenido que en la estructura de los SNP. Se basa en individuos de origen europeo por lo que puede no ser extrapolable a otras razas (198).

Existen también los estudios de secuenciación de todo el exoma, que cubre solo porciones codificantes del genoma y que son considerablemente más baratos que la secuenciación de todo el genoma (GWAS). Otra ventaja importante de la secuenciación del exoma es que permite una cobertura más profunda y por tanto mayor posibilidad de certeza en los descubrimientos recientes. Se utiliza sobre todo para identificar una mutación aislada en los pacientes con EII de muy temprana edad (199).

2.3.2 El estudio genético más allá de los GWAS: *limitaciones y herencia no conocida*

A pesar del éxito de los estudio de GWAS (y otros enfoques de asociación como el Inmunochip o el estudio del exoma) se ha demostrado, con la excepción del NOD2, que el efecto de los *loci* de susceptibilidad en la EC es modesto ($OR < 1.3$), por lo que los *loci* identificados sólo consiguen explicar una fracción del componente

genético en el riesgo de la EC (resaltando el problema de la “herencia no conocida” (200)). Como resultado de esta necesidad se ha creado el International IBD Genetics Consortium (IIBDGC: www.ibdgenetics.org) para conseguir vincular a todos los investigadores y las bases de GWAS en EII disponibles hasta la fecha a nivel mundial. El estudio más reciente utilizando esta herramienta demuestra la presencia de 140 *loci* de susceptibilidad para la EC (201). Estos junto a los 23 *loci* relacionados con la CU componen los 163 *loci* asociados a la EII, uno de los conjuntos de *loci* más extensos en el estudio de cualquier enfermedad compleja hasta la fecha (202). Aún así, se tiene que considerar que una importante desventaja de los estudios de GWAS es que la localización de los genes encontrados con este enfoque se obtiene de manera aproximada y su ubicación precisa requiere un estudio adicional.

La **herencia no conocida** podría ser debida a la relación entre componentes genéticos, epigenéticos e incluso no genéticos (como el medio ambiente). Este tipo de herencia se puede explicar por variantes raras (frecuencia alélica menor del 1%), mutaciones privadas, interacciones entre genes (conocida como epistasis, lo que significa que el efecto fenotípico no puede ser inferido por ninguno de los genes de forma aislada) e incluso variantes estructurales (variantes del número de copias *-copy number variants-* como inserciones o deleciones o variaciones neutrales *-copy neutral variations-* como inversiones o translocaciones) que no se han encontrado con la generación actual de los estudios de GWAS, así como por la presencia de variantes comunes con efectos discretos,

por lo que su hallazgo requiere una muestra mucho mayor para su detección (200,203,204).

No todos los SNPs presentes en el genoma humano exhiben un efecto funcional significativo. De hecho, la prueba directa del rol de un SNP en una enfermedad requiere una demostración experimental, y no únicamente la presencia de una diferencia alélica entre pacientes y controles, que son los resultados que arrojan todos los estudios de asociación. Tanto más exigente es la caracterización de un SNP no codificante, ya que presenta un efecto más sutil en la expresión proteica a través de mecanismos específicos del tejido y del contexto a estudio (194). Una muestra de esto radica en una publicación del proyecto ENCODE (*Encyclopaedia of DNA elements*) de 2012 donde se demostró que la proporción de secuencias de DNA que codifican proteínas (exoma) es pequeña si se compara con las regiones de DNA que regulan la biología del RNA y la transcripción (205). Un número importante de los SNPs relacionados hasta la fecha con la EC no residen en el exoma (198).

2.3.3. Biología de sistemas: enfoques “-ómicos”

Juntando los resultados de los estudio de ligamiento, GWAS y de secuenciación, a pesar de las limitaciones antes descritas, la arquitectura de la EC se manifiesta como la de una enfermedad compleja y multifactorial, donde la combinación de múltiples genes alterados, bajo la influencia del medio ambiente, desembocan en la manifestación fenotípica (202) y donde un defecto aislado en una de las capas que mantienen la regulación intestinal es insuficiente para

inducir o perpetuar la respuesta inflamatoria aberrante de la EC (84,86,206) (Figura 11).

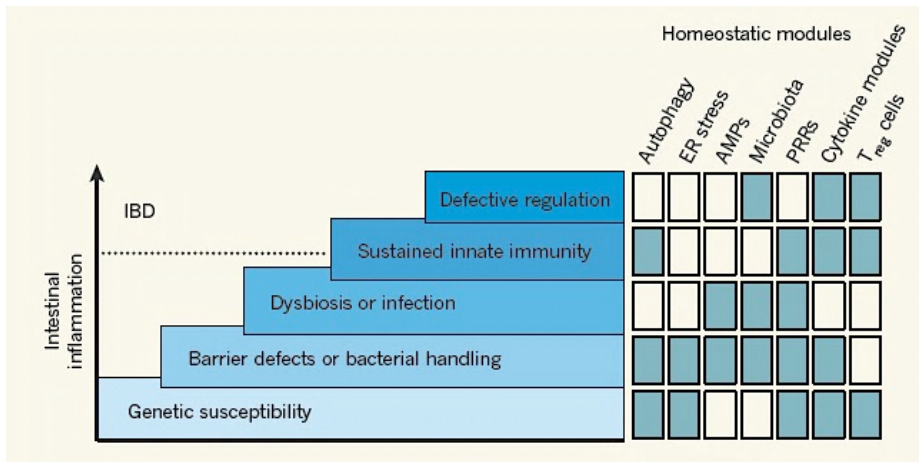


Figura 11. Modelo de la fisiopatología de la EII. ER: *endoplasmic reticulum*, AMPs: *antimicrobial proteins*, PRRs: *pattern recognition receptors*. Tomado de Maloy & Powrie (86).

Uno de los mayores retos actuales al que se enfrenta la investigación en la EII es la dificultad de integrar el gran volumen de datos procedentes de distintas fuentes de información generada mediante tecnología "ómica". Métodos de computación y bioanálisis avanzados permiten integrar toda la información "ómica" para generar nuevas hipótesis más reduccionistas, capaces de ser demostradas experimentalmente (207).

Un sistema es una entidad que mantiene su existencia mediante la interacción de sus partes. Un enfoque basado en sistemas requiere de 4 pasos: (a) identificar las partes del sistema; (b) caracterizar las

propiedades de esas partes; (c) identificar las interacciones entre las partes; y (d) evaluar las interacciones entre las partes y el medioambiente (208). Este enfoque puede ser aplicado a la EC precisamente en base a la complejidad de la enfermedad, intentando identificar y comprender las interacciones entre los diferentes tipos celulares (partes) en el tracto digestivo (sistema) para determinar si estas interacciones están desreguladas en la patogenia de la enfermedad. El desarrollo de tecnología para analizar todo el genoma (genómica), las modificaciones epigenéticas (epigenoma) y la regulación transcripcional (transcriptómica) ha permitido integrar todos estos datos “ómicos” en el campo de la biología de sistemas. El análisis en red (*network analysis*) puede contribuir a la construcción del interactoma molecular de la EC (209). Una ventaja del análisis en red es la posibilidad de revelar retroalimentaciones positivas y negativas, así como de colaboración entre diferentes vías de señalización (210). Este enfoque puede ser de utilidad para el estudio de los sistemas celulares en la EC que a su vez actúen como biomarcadores, inferencia de los microorganismos en la patogenia e incluso el descubrimiento de nuevas terapias para la enfermedad (207).

El **transcriptoma** es el conjunto de transcritos de RNA, producidos por el genoma en una célula en una estado de desarrollo específico o condición fisiológica (211). Los objetivos de la transcriptómica, o estudio del transcriptoma, son: (i) catalogar todos los tipos de transcritos, incluyendo RNA mensajero (mRNA), RNA no codificantes y RNA pequeños; (ii) determinar la estructura transcripcional de los genes, sus patrones de división y otras modificaciones post-

transcripcionales; y (iii) cuantificar los cambios de expresión de cada transcripto durante el desarrollo y bajo diferentes condiciones (212). Junto con los estudios de traducción y los de interacción proteína-proteína, la transcriptómica compone lo que se conoce como **genética funcional**, que es un campo de la biología molecular donde se abarcan los aspectos dinámicos de los genes (en oposición a los aspectos estáticos de la información genómica como la secuencia de DNA o su estructura). La tecnología utilizada para el estudio de la transcriptómica es la de *microarrays* de cDNA (DNA complementario que es sintetizado por un mRNA por acción de la transcriptasa reversa), consiguiendo estudiar la expresión genética entre dos o más condiciones. Existe un perfil diferencial en el transcriptoma del mismo paciente con EC y la zona estudiada (sea colon y sus diferentes segmentos o íleon) lo que hace pensar en una caracterización anatómica exclusiva en base al transcriptoma (213). Las diferencias más estudiadas entre zonas intestinales afectadas de indemnes son aquellas que exploran las vías de la inflamación (214). De todas formas, con el conocimiento creciente de la expresión génica, se ha hecho más evidente que la transcripción es un elemento más en la regulación genética, donde participan diversos procesos añadidos y que se comentarán más adelante.

Los **microRNA (miRNA)** son un tipo de RNA de cadena simple, no codificantes, endógenos y de pequeño tamaño (18-24 nucleótidos). Regulan la expresión genética mediante el control de la estabilidad y translación de los mRNA que codifican proteínas (215). Regulan, así mismo, diversos procesos biológicos como la diferenciación celular, proliferación, apoptosis y el control del ciclo celular (216). Por tanto,

su desregulación se ha asociado a diversas enfermedades, entre ellas la EII; como ejemplo está el miR-196 que es un miRNA que se encuentra sobre-expresado en los pacientes con EC y que ha demostrado regular la expresión de IRGM (217). El rol de los miRNA en la EII supone, al igual que la epigenética, una nueva manera de entender esta enfermedad y permite su utilización como estrategia potencial de tratamiento (diana terapéutica) (218). Estudiando sangre periférica se han identificado miRNA con capacidad de distinguir subtipos de EII, por lo plantean la posibilidad de ser utilizados también como biomarcadores de la enfermedad (219–221). Los miRNA asociados a EII también pueden servir de delineadores de la expresión génica, ya que controlan de forma estrecha los niveles de mRNA específicos. De esa forma, pequeñas alteraciones en los niveles de mRNA producen cambios importantes en la síntesis de proteínas (222), como por ejemplo se ha demostrado que la disminución entre la unión del miRNA Let-73 y el Let-7f al gen IL23R da como resultado un aumento en los niveles de mRNA y su producción proteica lo que a su vez conlleva a una desregulación de la vía de señalización IL-23R en la EII (223). En resumen, la desregulación en la respuesta inflamatoria intestinal podría ser secundaria a la disrupción del balance entre la actividad de miRNA y el nivel de sus mRNA diana (genes con funciones importantes en la homeostasis intestinal) lo que produce una expresión inapropiada de genes y por tanto de enfermedad (224). De todas formas queda mucho tramo por recorrer para poder dilucidar el transcriptoma de la EC, ya que por ejemplo no se ha llevado ningún estudio donde se investigue el rol de los RNA grandes no codificantes (*long non-coding RNA: lincRNA*).

La **epigenética** podría ser el vínculo de unión entre el genoma humano, el medio ambiente y el desarrollo fenotípico de la EC y podría explicar también la herencia desconocida en la EC (Figura 12). Uno de los aspectos más llamativos de la EC, y que se abordó en el capítulo 1, es el aumento de incidencia de la enfermedad durante las últimas décadas, lo que sugiere la potencial influencia de factores ambientales en su patogenia. Un gran número de factores ambientales ha demostrado inducir cambios epigenéticos incluyendo tabaco, polución ambiental, asbestos, metales, sílice y bencenos (225). De forma clásica, la epigenética engloba los cambios del fenotipo heredados e independientes a las secuencias de DNA. Representa los eventos asociados a la cromatina que regulan un amplio espectro de procesos que dependen del DNA, incluyendo la transcripción genética (224). Los avances recientes en el conocimiento de la epigenética se deben en gran medida al conocimiento cristalográfico de la estructura del nucleosoma, que es la unidad básica en empaquetamiento de la cromatina (226). El centro proteínico de la histona dentro del nucleosoma puede ser modificado de múltiples maneras (acetilación, metilación, ubiquinación, fosforilación y SUMOilación, así como mediante la interferencia del RNA y el posicionamiento de los nucleosomas) alterando de forma dinámica la estructura de la cromatina y la expresión genética en respuesta a señales del medioambiente (227). Como ya se comentó, la mayoría de los SNP relacionados con la EC o sus alelos están localizados en regiones no codificantes del genoma lo que sugiere que pueden tener un rol en la regulación de la expresión génica (228). Los primeros estudios de factores epigenéticos en la EII

mostraron un perfil diferencial de miRNA (que también actúan como reguladores epigenéticos de la expresión génica) en la mucosa cólica de pacientes con EC en comparación de controles sin EC (229). Datos recientes han demostrado que las modificaciones de cromatina están relacionadas con la activación transcripcional de los genes del colágeno de tipo I en la transición intestinal endotelio-mesenquimal, lo que sugiere que los cambios de epigenética se asocian a la regulación de los genes pro-fibrogénicos y por tanto a la fibrogénesis intestinal (230). Así mismo, se ha demostrado que las bacterias pueden regular la expresión génica epitelial y la respuesta inmune intestinal mediante mecanismos epigenéticos (231). El conocimiento de varios componentes clave en el campo de la patogenia de la EC ha servido de vínculo para asociar la genética con la exploración de la epigenética. Por ejemplo, las células dendríticas que expresan variantes del NOD2 fracasan en su intento por sobre-regular la producción de miRNAs que regulan la respuestas inmunes a nivel celular mediadas por las vías Th1 y Th17 (232). Uno de los trabajos más remarcables en el estudio de la interacción de las alteraciones epigenéticas muestra variaciones en la línea germinal y sus efectos funcionales, sobre todo en la xenofagia (proceso en el que la célula dirige la autofagia hacia patógenos) (233,234).

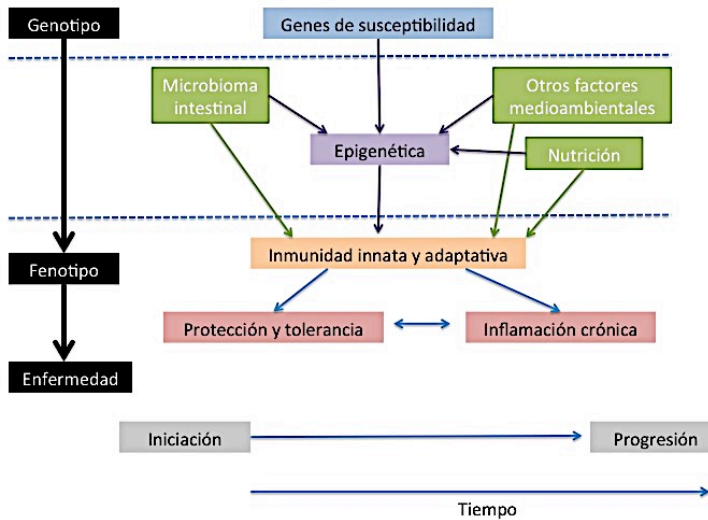


Figura 12. Rol de la epigenética en la patogénesis de la EC. Modificado de Ventham *et al* (199).

El **proteoma** es el conjunto de proteínas expresadas en una determinada situación, incluyendo sus diferentes isoformas y modificaciones. Incluye no solo la estructura y función de las proteínas, si no también su localización y translocación (235,236). Una amplia selección de enfoques proteómicos se han llevado a cabo para caracterizar la patogenia de la EII investigando la naturaleza dinámica del proteoma (237). Actualmente, el mayor interés de las aplicaciones de la proteómica reside en la identificación de biomarcadores en biofluidos (como suero u orina) y que son específicos de los tejidos y de su momento evolutivo (por ejemplo, la capacidad de predecir el apareamiento precoz de la recurrencia post-quirúrgica en la EC).

El **metaboloma** incluye todas las pequeñas moléculas que se transforman químicamente durante el metabolismo y permite una lectura de la bioquímica celular (238). Se ha intentado discriminar pacientes con EII de controles mediante el estudio metabolómico en biomateriales humanos (agua fecal, suero sanguíneo y orina) (135).

Cada vez que se hace referencia a la influencia del medio ambiente se entiende que se está hablando de agentes, sustancias o productos (alimentos o drogas) que se encuentran en el medio exógeno del huésped o han sido introducidos por humanos (agentes de la polución o xenobióticos). Existe una categoría recientemente conocida que vendría a formar parte del medio ambiente *endógeno* del paciente. Esta categoría está formada por los patrones moleculares asociados a daño (*damage-associated molecular patterns: DAMPs*). Los **DAMPs** representan componentes celulares y acelulares liberados al medio tisular como consecuencia de la necroptosis (muerte celular necrótica) (239). Los DAMPs mejor caracterizados son DNA, RNA, ATP, proteínas nucleares como IL-1 α , IL-18, el ácido úrico y componentes de la matriz extracelular (240). Ninguno de estos productos está presente en los tejidos sanos porque la muerte celular fisiológica ocurre por apoptosis, proceso en el que la membrana celular permanece intacta lo que previene la salida de los componentes celulares. En eventos tales como traumatismos, quemaduras, isquemia, crecimiento neoplásico o ulceración, la muerte celular predominante es la necrosis por lo que los DAMPs son liberados induciendo lo que se conoce como la “inflamación estéril” como puede ser la respuesta inmune inflamatoria en ausencia de un agente infeccioso (241). Los DAMPs

sugieren un concepto relativamente nuevo en la patogenia de la EI, aunque parece lógico pensar en su relevancia, por lo menos de forma teórica. Son varios los laboratorios donde se están llevando a cabo investigaciones donde ya se observa que los lisados de las células epiteliales intestinales producen grandes cantidades de IL-1 α , y ella a su vez genera una producción masiva de IL-6 e IL-8 por las células endoteliales y mesenquimales locales (242). Podrían ser los DAMPs la clave para entender el proceso inflamatorio autoperpetuado y característico en la EC y deberían también ser integrados en el análisis de las diferentes capas de la patogenia de la enfermedad como otro elemento funcional.

La arquitectura genética de la EC se está construyendo mediante el conocimiento de un gran número de procesos biológicos que determinan la patogenia de la enfermedad. La integración del exoma con los datos de secuenciación de los estudios de GWAS, el conocimiento de la regulación de la transcripción de genes clave, la realización de experimentos específicos según tipos celulares y los datos de la ecología compleja que representa la microbiota intestinal conforman el mayor reto actualmente (186). Es por esto que el futuro del estudio genético de la EC se centrará no solo en determinar genes causales, sino además en la demostración de vías relevantes en la enfermedad ensamblando estos genes en vías moleculares y redes celulares para poder poner en relevancia las hipótesis clínicas (por ejemplo qué pacientes evolucionarán a fenotipos complicados, quiénes presentarán una progresión lenta de la EC, cuál será la frecuencia de los brotes de actividad, cómo predecir el fracaso terapéutico o quiénes presentarán recurrencia post-quirúrgica

precoz). Así mismo, dada la variedad de mecanismos que confluyen en la EC, será también fundamental asociar y estratificar estos hallazgos con tecnologías “ómicas” de medida de RNA, proteínas, moléculas pequeñas, modificaciones químicas del DNA y de la microbiota del huésped de acuerdo al fenotipo de los pacientes (243).

2.3.4 Genética y recurrencia post-quirúrgica

De todos los pilares de la patogenia de la recurrencia post-quirúrgica, el de la genética es el menos estudiado. Casi todos los estudios se han centrado en la influencia de las mutaciones del NOD2 en la recurrencia, con resultados discordantes (244–247). A pesar de que las mutaciones de NOD2 se han asociado a un mayor riesgo de resecciones intestinales en pacientes con EC, en un meta-análisis reciente se ha demostrado que el tener un polimorfismo del NOD2 no implica mayor riesgo de recurrencia post-quirúrgica, por lo que no podría ser considerado un biomarcador de la misma (248). Un gen que podría estar implicado en la recurrencia es SMAD3. Este gen es un mediador de la señalización de la vía del TGF- β , que es una citoquina multifuncional y que regula muy variadas respuestas biológicas. Así mismo, SMAD3 favorece a la fibrosis y cicatrización patológica, por lo que podría estar relacionado con una cicatrización inadecuada causando recurrencia post-quirúrgica precoz y mayor riesgo para una nueva resección intestinal, aunque parece no influir en el requerimiento inicial de una resección intestinal (249). Otro estudio ha demostrado que mutaciones en el gen de la autofagia IRGM se asocian a mayor número de intervenciones quirúrgicas por

paciente y menor tiempo para presentar recurrencia quirúrgica: una nueva resección intestinal se realizó un promedio de 6,8 años en pacientes con la mutación rs4958847 en comparación con los 11,4 años de aquellos con el genotipo salvaje (250). Un estudio reciente ha asociado el hecho de ser portador del alelo de riesgo de CARD8 (rs2043211) como factor de riesgo independiente para una nueva intervención quirúrgica después de la aparición de recurrencia. Al ser el CARD8 un regulador negativo del factor nuclear- κ B (NF- κ B) así como un supresor de la apoptosis, se sugiere que los pacientes homocigotos para el alelo de riesgo tienen mayores posibilidades de requerir varias resecciones intestinal durante la evolución de su enfermedad dada a una alteración en la correcta activación del NF- κ B (251). También se ha descrito que las alteraciones en las células de Paneth están vinculadas a la recurrencia post-quirúrgica precoz y que estas alteraciones a su vez a las mutaciones en otro gen de la autofagia: ATG16L1 (252). A pesar de que parece que la concentración de IL10 en zonas no afectadas de la mucosa intestinal al momento de la cirugía podrían predecir la recurrencia post-quirúrgica, un estudio del genotipo G de los microsatélites de IL10 no se ha asociado con el apareamiento de esta complicación (114). Por último, las concentraciones altas de TIMP (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) y MMP-9 (*matrix metalloproteinases*) (inhibidores proteolíticos y generadores del anclaje de proteínas a la matriz intestinal, respectivamente) se han asociado con un patrón de recurrencia “favorable” frente a aquellos pacientes con una mutación (+372 T) del TIMP-1. Dicha mutación ocasiona una baja expresión proteica de TIMP-1, lo que se relaciona con un mayor riesgo de

recurrencia y a que esta se produzca más precozmente en la evolución post-operatoria (253).

**ESTUDIO: PERFIL GENÉTICO FUNCIONAL EN LA
ENFERMEDAD DE CROHN. EFECTO SOBRE EL
DESARROLLO DE RECURRENCIA POST-
QUIRÚRGICA**

Proyecto financiado con una beca del Ministerio de Economía y
Competitividad

Instituto de Salud Carlos III

FIS PS09/01294

1. Antecedentes y Justificación

La cirugía resectiva juega un papel importante en el manejo de la enfermedad de Crohn (EC), fundamentalmente para el tratamiento de sus complicaciones penetrantes o estenosantes. Sin embargo, la resección intestinal no es un procedimiento curativo y, por tanto, la enfermedad suele reaparecer en el sitio de la anastomosis y/o proximalmente, fenómeno conocido como **recurrencia post-quirúrgica**. A pesar de los avances en las medidas preventivas, la recurrencia es un fenómeno habitual en el seguimiento a largo plazo. Desde un punto de vista patogénico, la recurrencia post-quirúrgica representa la oportunidad de asistir al proceso que conduce a la manifestación fenotípica de la EC *de novo* (73,74), particularmente en etapas precoces tras la intervención (75), ya que supone un escenario que permite estudiar distintos factores (inmunológicos, genéticos, ambientales) y sus interacciones en individuos que se sabe que padecen la EC pero antes y durante el desarrollo de las lesiones histológicas.

La influencia de la genética en la EC se conoce desde hace ya mucho tiempo (170). De todas formas, la recurrencia post-quirúrgica es el aspecto menos estudiado con el enfoque de la genética. Parece lógico pensar que el momento de la recurrencia en la EC constituye también un momento ideal para poder identificar variables a nivel de expresión genética (genética funcional) que se relacionen con la recurrencia tras la cirugía en individuos susceptibles.

Los estudios genéticos actuales se realizan con grandes series de pacientes con el objetivo de detectar variantes polimórficas que

predispongan a padecer la EC (los estudio de asociación o GWAS). A pesar de un esfuerzo de varios investigadores a nivel mundial, este enfoque únicamente consigue explicar una cuarta parte de la influencia de la genética en la EC (202). Por otra parte, el carácter poligénico de esta enfermedad y la influencia del ambiente (principalmente la microbiota intestinal) conforman un sistema patológico complejo con una gran variabilidad fenotípica y funcional difícil de estudiar en grandes series de pacientes. Un enfoque menos complejo (en relación al número de sujetos a estudio) pero más eficiente y preciso supone la demostración de los hallazgos de los estudios de asociación a nivel efector, es decir demostrando la influencia que una mutación determinada puede tener sobre una proteína particular en un tejido específico que a su vez se encuentre en un momento puntual de su desarrollo. La evaluación de la producción de mRNA constituye una interesante aproximación a la actividad genética particular del intestino generada tanto por señales fisiológicas como por aquellas procedentes de la microbiota (254). Este enfoque permite asociar diferentes patrones de expresión génica con distintas manifestaciones fenotípicas y complicaciones de la EC. Además, la presencia de polimorfismos, conocidos o no, puede modificar los perfiles de expresión de RNA y, consecuentemente, ayudar a comprender el significado funcional de estas alteraciones génicas en los pacientes con EC.

2. Hipótesis

1. Los pacientes con EC exhiben un perfil de expresión génica (transcriptoma) a nivel intestinal diferente al de sujetos controles.
2. El transcriptoma intestinal de pacientes con EC que presentan recurrencia post-quirúrgica precoz es diferente al de aquellos que no la presentan.
3. Las alteraciones en la expresión genética preceden en el tiempo a la recurrencia post-quirúrgica en los pacientes con EC.

3. Objetivos

Principales:

1. Estudiar en profundidad los perfiles de expresión intestinal (ileocecal) en un grupo bien caracterizado de pacientes con EC,
2. Identificar los mecanismos biológicos asociados al desarrollo de la recurrencia post-quirúrgica de la EC.

Secundarios:

1. Identificar factores moleculares y celulares predictivos de recurrencia post-quirúrgica de la EC, y
2. Evaluar la influencia genética sobre el transcriptoma del íleon terminal y la existencia de sub-fenotipos moleculares en la EC.

4. Materiales & Métodos

Este estudio se inició después de la aprobación por el Comité Científico de Investigación del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, a fecha 28 de noviembre de 2008 (Anexo 1). Tanto pacientes como controles dieron su consentimiento firmado para la inclusión en este estudio.

4.1 Criterios de inclusión de los pacientes. Variables clínicas y endoscópicas recogidas.

Criterios de inclusión:

1. Ser mayor de edad
2. Firmar el consentimiento informado
3. Requerir una resección ileocecal como parte del tratamiento de la enfermedad de Crohn. No era necesario que fuera la primera cirugía resectiva.
4. En el caso de los controles: que no tuvieran enfermedad inflamatoria intestinal y que requirieran una resección ileocecal por otro motivo.

Criterios de exclusión:

1. Que requiriera una resección ileocecal con ileostomía definitiva o transitoria.
2. En el caso de los controles, existencia de antecedentes familiares de enfermedad inflamatoria intestinal.

Para el registro de los datos de los pacientes incluidos se generó una base Access (Office 2007) donde se recogieron datos referentes a las características basales (edad al diagnóstico, localización de la enfermedad y comportamiento clínico según la clasificación de Montreal (16), tabaquismo, tratamiento basal, índice de masa corporal, antecedentes familiares de EII); características de la resección intestinal (indicación, segmento resecado, técnica quirúrgica, complicaciones) y de la propia recurrencia post-quirúrgica (tipo de recurrencia, tratamiento preventivo de la recurrencia, tiempo hasta recurrencia, tratamiento de la recurrencia, índice de actividad endoscópica de Rutgeerts (Tabla 6, capítulo 1) (65)).

En el caso de los controles se registraron únicamente los datos demográficos y los antecedentes personales y familiares.

4.2 Diseño experimental: recogida de muestras y definiciones

Se obtuvieron muestras de tejido macroscópicamente no inflamado e inflamado provenientes de **piezas de resección ileocecal** en pacientes consecutivos con EC refractaria al tratamiento médico. A partir de la pieza quirúrgica resecada se obtuvieron 2 cm de corte transversal de intestino inflamado, 2 cm de corte transversal de intestino macroscópicamente no inflamado, que a su vez se dividió en 4 secciones.

Así mismo, de forma prospectiva se obtuvieron **biopsias endoscópicas** secuenciales en las ileocolonoscopias de seguimiento

para poder correlacionar los hallazgos con la determinación basal y la existencia o no de recurrencia endoscópica:

- Si no existía recurrencia: de la vertiente ileal de la anastomosis,
- Si existía recurrencia: de la zona de recurrencia,
- Si existía actividad fuera de la zona ileo-cecal: de la zona de actividad (además de la vertiente ileal de la anastomosis).

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 es una modificación propuesta por Domènech y colaboradores (255) al índice clásico de actividad endoscópica de Rutgeerts (Tabla 6, capítulo 1) (65)), subdividiendo el grado i2 ($>$ 5 aftas con mucosa intra-lesional sana o úlceras confinadas a $<$ 1cm de la anastomosis) en i2a si la lesión es únicamente una úlcera confinada a la anastomosis (y que podría ser un reflejo de isquemia post-quirúrgica y no recurrencia propiamente) y en i2b si la lesión consiste en $>$ 5 aftas con mucosa interlesional sana. Se consideró que la recurrencia post-quirúrgica era **precoz** si esta aparecía hasta 18 meses posteriormente a la resección ileocecal.

Tanto las muestras de la resección quirúrgica como las de las biopsias endoscópicas de seguimiento se procesaron de la siguiente manera (Figura 13):

- Para el análisis múltiple con *microarrays* de expresión así como para el estudio proteómico se sumergieron las muestras en RNAlater® (Ambion®, España) (solución acuosa y no tóxica

que se utiliza para almacenar tejido, permitiendo la estabilización y protección celular del RNA). Se mantuvieron las muestras a 4°C 24 horas y posteriormente se congelaron a – 80°C en tubos libres de RNasa sin RNAlater®.

- Para el análisis histopatológico se realizaron técnicas convencionales aplicadas en muestras parafinadas por el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol.



Figura 13. Protocolo de preparación *in situ* tanto de las muestras de resección quirúrgica (en quirófano) como de las biopsias endoscópicas (en la sala de endoscopias).

Se obtuvo también **sangre periférica** (13ml): 3,5ml fueron congelados inmediatamente (para estudio de DNA, únicamente una muestra por paciente, al momento de la cirugía) y 10ml (para la obtención de plasma, tanto al momento de la cirugía como en las ileocolonoscopias

de seguimiento) fueron centrifugados a 4°C 3000rpm 15 min. Para la congelación se utilizó nieve carbónica desde la toma de las muestras hasta su traslado al laboratorio central. Se preservaron las muestras a -80°C.

En los **sujetos control** sólo se obtuvo sangre periférica y tejido ileal durante el acto quirúrgico, sin seguimiento posterior.

Después del procesamiento indicado para cada tipo de muestra, esta se almacenaron y procesaron en la Fundació Institut Germans Trias i Pujol como parte del biobanco de la Institución.

4.3 Análisis histopatológico convencional

A partir de la sección longitudinal (resección quirúrgica) o las biopsias endoscópicas fijadas en formol al 4% y posteriormente incluidas en parafina, se realizaron cortes de 5µm que fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) para la valoración de las muestras mediante parámetros del grado de afectación.

4.4 Estudio de polimorfismos

Extracción de DNA y análisis de polimorfismos (SNP): A partir de la muestra de sangre total periférica se extrajo DNA genómico mediante el sistema de purificación de DNA robotizado *Purification Protocol for 3ml of Human Blood using the Chemagic Magnetic Separation Module I and the Chemagic Dispenser* (Chemagen, Baesweiler, Alemania),

realizado por la Unidad de Genómica del Institut Germans Trias i Pujol. Se determinó la calidad del DNA extraído mediante absorbancia. La proporción 260/230nm estuvo situada entre 1,7 y 2,1, y la proporción 260/280nm fue siempre mayor a 1,8 demostrando una buena calidad de DNA.

Este análisis se realizó en la muestra de DNA de los 10 controles de este trabajo y de un total de 104 pacientes: los 20 incluidos para todos los ensayos de este trabajo, así como otros pacientes que conforman el biobanco de muestras de recurrencia post-quirúrgica del Institut Germans Trias i Pujol, con el objetivo de aumentar potencia a los hallazgos de este estudio de asociación.

Se seleccionaron para este estudio los SNP situados en los genes descritos hasta el momento en la patogenia de la EC(201), agrupados en una lista que se encuentra en el Anexo 2. Estos SNP fueron analizados mediante PCR en tiempo real utilizando el kit TaqMan SNP *Genotyping assay* (Applied Biosystems, Foster City, EEUU) y siguiendo las instrucciones del fabricante, que se configuró con sondas específicas para cada SNP. Este procedimiento se realizó en la plataforma CIC Biogune (Bilbao, España) a partir de muestras con una concentración de 50ng/μL.

El análisis de asociación se realizó mediante el programa *GenomeStudio™* versión 1.9.4.

Quedaron excluidos del análisis de asociación:

- Cualquier SNP con valores en menos de un 20% de la muestra de los pacientes estudiados,

- Cualquier SNP que en los pacientes tuviera una frecuencia alélica del alelo menos presente inferior al 2%,
- Cualquier SNP monofórmico, porque no aporta información al estudio de asociación, dado que no varía en el genotipo, y
- Cualquier SNP con una variación de frecuencia del genotipo en controles con una $P < 0,005$ (χ^2).

Para estudiar la asociación entre las variables de recurrencia precoz y cada uno de los SNP restantes, se ajustaron 4 modelos en función del modelo de herencia: codominante (los dos alelos son equipotentes, y por tanto no hay dominancia; los híbridos presentan las características de las dos razas/condiciones puras a la vez), dominante (un alelo no deja que el otro-recesivo- se manifieste), recesivo (ambos alelos de un par son recesivos, por lo que la condición se puede manifestar) y aditivo (variación genética atribuida a las diferencias entre diferentes características alélicas). Estos modelos se ajustaron para las variables de edad y tabaco, consideradas de relevancia clínica para la EC y la presencia de recurrencia.

Se consideró que un SNP estaba asociado a la presencia de recurrencia si el valor de P asociado era menor a 0,05, para un nivel de confianza del 95%.

4.5 Estudio del transcriptoma

Se procedió a la extracción y análisis de mRNA utilizando el kit miRNeasy Mini (QIAGEN, Madrid, España) en el sistema de extracción

de ácidos nucleicos QIAcube (QIAGEN, Madrid, España) según técnicas convencionales que incluyen: fragmentación, homogenización, purificación de RNA, comprobación de pureza e integridad del RNA (Anexo 3).

Síntesis y amplificación de aRNA (*antisense* RNA): Se utilizó el protocolo *RNA Reverse transcription and amplification into aRNA MessageAmp™ II-Biotin Enhanced kit (AM1791 Ambion)*, (Ambion®, España), siguiendo las instrucciones del fabricante y que incluye retrotranscripción del mRNA a cDNA, síntesis y purificación del dsDNA (cDNA de doble cadena), transcripción y síntesis de aRNA, que es el material que se utilizó para realizar los *microarrays* de expresión. Así mismo, se cuantificó la muestra, valorando su pureza e integridad mediante la utilización del Nanodrop y la estación Experion, como se describe en el Anexo 3.

Expresión de mRNA: Se realizó mediante el protocolo de hibridación *Human Whole Genome Microarray* (Applied *microarrays*, CodeLink, Bionova, España) con los equipos disponibles de la Unidad de Genética Funcional del Institut Germans Trias i Pujol. Este protocolo incluye:

- hibridación en el TrayMix (Arrayit, California, EEUU):
 - utilizando 10µg de aRNA de la muestra de interés
 - los siguientes buffers:
 - 1M TrisHCL pH 7,6
 - 1xTNT
 - 0,75xTNT
 - 0,1xSSC/0,05%Tween 20, y

- llevando a cabo el protocolo de hibridación de 16h a 37°C
- captación de las imágenes con el escáner InnoScan 770 (Innopsys, Francia) con el software Mappix,
- obtención de archivos GPR, y
- análisis con el software CodeLink

4.6 Bioanálisis

En todos los programas de bioanálisis se realizaron de forma predeterminada las siguientes comparaciones:

- pacientes con EC vs. controles sin EC, y
- pacientes con recurrencia post-quirúrgica precoz vs. pacientes sin recurrencia post-quirúrgica precoz.

LIMA-R: Se trata de un lenguaje y un entorno de programación para análisis estadístico y gráfico (256,257). Es un proyecto de software libre y muy utilizado en el campo de la investigación biomédica y la bioinformática. Este análisis fue realizado en la plataforma de Bioinformática del Centro de Investigación Biomédica en Red sobre enfermedades hepáticas y digestivas (<http://bioinfo.ciberehd.org>) (CIBERehd, Instituto Carlos III). Este es el primer paso del tratamiento de los datos crudos obtenidos del *microarray* de RNA con el que se consigue eliminar el “ruido de fondo” de señal no proveniente del RNA y también normalizar las muestras para su posterior comparación. Con este enfoque se compararon los perfiles de

expresión de todo el genoma entre pacientes y controles y entre aquellos con recurrencia post-quirúrgica precoz de los que no la presentaron. Dado que se trata de un análisis con numerosas comparaciones y variables (genes) los criterios de significación deben estar ajustados a la comparación múltiple, utilizando criterios de *false discovery rate* (FDR) en lugar del valor de P. En este estudio se seleccionaron los genes que presentaron $FDR < 0,005$ y únicamente si ningún gen presentaba FDR de 0 en una comparación específica se exigía un valor de $P < 0,005$. Por otra parte los cambios de expresión se miden por aumentos o decrementos en la expresión de un gen según dos comparaciones lo que en inglés se conoce como *fold change* (FC). En este estudio se seleccionaron los genes que presentaban un $FC \leq -2$ o ≥ 2 (o $FC \leq -1,5$ o $\geq 1,5$ para la comparación entre pacientes con recurrencia post-quirúrgica precoz de aquellos que no la presentaron).

Gene set enrichment analysis (GSEA)

El análisis de grupos de genes enriquecidos (o *gene set enrichment analysis*) se lleva a cabo mediante un método computacional de acceso libre (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) que determina si en un grupo predefinido de genes existen diferencias entre dos estados biológicos (por ejemplo enfermedad si-no) de forma significativa, permitiendo así descubrir funciones biológicas relevantes (258,259). Para este estudio se utilizó todo el transcriptoma, con los siguientes criterios de selección:

- base de grupos de genes (*gene set database*) = c5.all.v3.0.symbols.gmt (ontología genética clásica) + c2.cp.v3.0,
- plataforma del chip = *Codelink Human Whole Genome*,
- número máximo de grupos por fenotipo = 100,
- permutaciones con grupos de genes (*gene set permutations*),
- significación estadística = FDR < 0,025 o un valor de P < 0,001.

GeneCodis

La herramienta informática *on-line* (<http://genecodis.cnb.csic.es>) y de uso libre GeneCodis (actualmente en su tercera versión) (260–262) permite el análisis ontológico de listas grandes de genes. Se utiliza para predicción de vías de señalización. En esta herramienta se introdujeron la lista de genes que en análisis por LIMA-R resultaron como infra-expresados o sobre-expresados con los criterios de FC antes descritos para las comparaciones realizadas.

QLucore

Este programa es una herramienta de exploración y visualización que sirve para desentrañar estructuras ocultas o patrones específicos en el transcriptoma (<http://www.q lu core.com/home>). Permite la generación de mapas de expresión (*heat maps*) así como la visualización de resultados utilizando el análisis dinámico de componentes principales (*principal component analysis: PCA*), facilitando la manipulación interactiva del trabajo en tiempo real. En este programa se utilizó todo el transcriptoma, que se introdujo incluyendo también variables clínicas de los pacientes y controles. Su

utilidad en este estudio fue la de determinar la presencia de *outliers* y la correcta caracterización de pacientes, controles, recurrencia post-quirúrgica precoz o no recurrencia mediante agrupaciones de genes (con agrupaciones jerárquicas). Los datos se normalizaron considerando la media de variación = 1 y seleccionando entre todas las comparaciones los primeros 30 genes.

PubMed

Motor de búsqueda de acceso libre (de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos) con más de 24 millones de citas de literatura biomédica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Además contiene el acceso a una base actualizada de genes donde se incluyen todos los nombres previos del gen así como las características específicas y las referencias bibliográficas donde se menciona al gen a estudio (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). En este estudio todos los genes seleccionados mediante los programas antes descritos se caracterizaron utilizando la información disponible en la base de genes de PubMed.

Un resumen del trayecto desde la obtención del tejido para este estudio hasta el análisis bioinformático se encuentra en Figura 14.

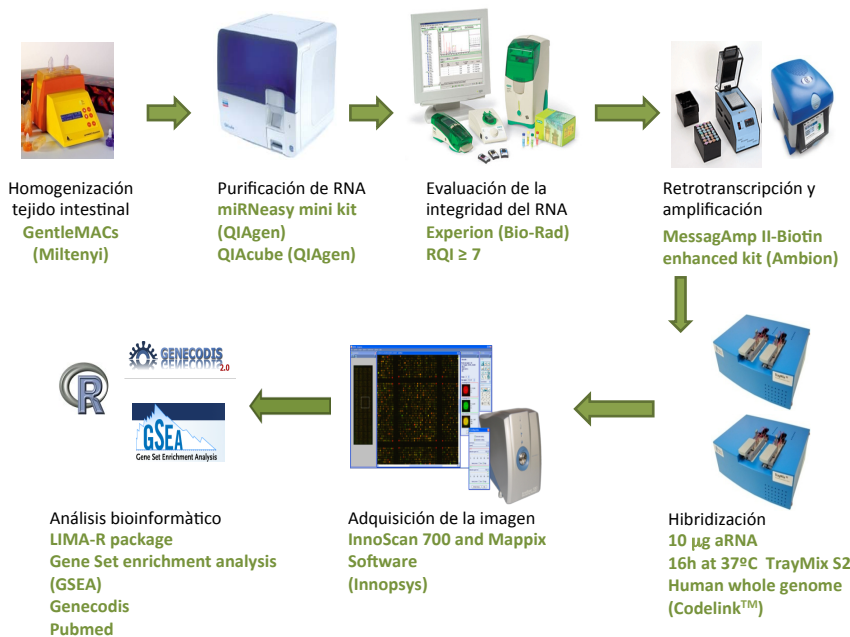


Figura 14. Flujo de trabajo desde la obtención del tejido hasta el análisis bioinformático

4.7 Corroboración del *microarray*

Para confirmar los cambios más relevantes detectados en la expresión de mRNA se realizó una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (*reverse transcription polymerase chain reaction*: RT-qPCR) a tiempo real que es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual amplifica y cuantifica el producto de la amplificación: cDNA. Se mide la fluorescencia después de cada ciclo de amplificación y es por esto que se le denomina PCR en tiempo real.

Para la retrotranscripción de mRNA a cDNA se utilizó el kit *PrimeScript™ RT reagent kit (Perfect Real Time)* de Takara (Shiga, Japón) siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 4).

Se analizó la expresión por PCR a tiempo real mediante sondas TaqMan® (LifeTechnologies, Madrid, España) de los siguientes genes: MUC2, TMIGD1, MST1, CCNY, PKIB, MAML2, SLC22A5, SMAD3, HNF4g y HNF4a, utilizando a GAPDH, como gen de referencia o *housekeeping gen* (HKG) (Tabla 11). El HKG normaliza la expresión de los genes a estudio, equilibrando las posibles variaciones de carga de cDNA entre muestras.

Tabla 11 Sondas TaqMan® de los genes a estudio

| Nombre del gen | Sonda de Taqman® (LifeTechnologies) |
|-----------------------|--|
| MUC2 | Hs03005103_g1 |
| TMIGD1 | Hs00417645_m1 |
| MST1 | Hs04194509_g1 |
| CCNY | Hs01554032_m1 |
| PKIB | Hs00261162_m1 |
| MAML2 | Hs00287205_m1 |
| SLC22A4 | Hs01548718_m1 |
| SMAD3 | Hs00969210_m1 |
| GAPDH | Hs02758991_g1 |
| HNF4g | Hs01071345_m1 |
| HNF4a | Hs00230853_m1 |

El software del equipo indicó para cada muestra, el primer ciclo de la PCR en el que detectó fluorescencia (Ct) (Figura 15). El Ct es inversamente proporcional a la cantidad de mRNA de partida por muestra. La expresión génica se cuantificó de forma relativa mediante

el método $2^{-\Delta Ct}$, lo que significa que cada caso se referenció a su valor de HKG, tal y como que queda reflejada en la siguiente fórmula:

$$2^{-\Delta Ct} : \Delta Ct = (Ct \text{ muestra} - Ct \text{ HKG})$$

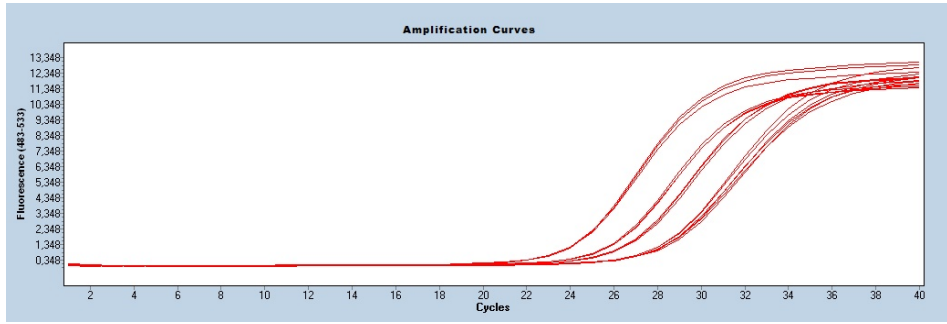


Figura 15. Imagen de los ciclos de la qPCR.

GenEx

El GenEx es un software para el procesamiento y análisis de PCR (<http://genex.gene-quantification.info>). En este estudio se utilizó para la confirmación de que los genes de referencia pre-seleccionados se comportaban como tal mediante algoritmos presentes en el programa (NormFinder). También se utilizó para confirmar que los hallazgos del transcriptoma eran válidos, correlacionándolos con los de la RT-qPCR, en asociación a la estadística de correlación del paquete estadístico IBM-SPSS® (SPSS Inc, Chicago, EEUU, v21). Se consideró que la correlación biológica era significativa si el coeficiente de correlación de Pearson era $\geq 0,45$ con un valor de $P \leq 0,0005$.

4.8 Caracterización de marcadores (*targets*)

El estudio del transcriptoma no concluye con su demostración a nivel bioinformático ni tampoco con la confirmación de su eficiencia mediante comprobación por RT-qPCR. Estos hallazgos deben quedar traducidos a nivel molecular y tisular para confirmar su localización pero también intentar determinar su función de forma demostrativa (como mínimo a nivel experimental). La caracterización de *targets* es la demostración final del estudio del transcriptoma y, en este estudio los cambios propuestos se comprobaron a nivel molecular y celular mediante la caracterización de cambios en proteínas y por evaluaciones histológicas, respectivamente.

La **purificación de proteínas** se llevó a cabo según técnica convencional (Anexo 5). Para la **cuantificación** del total de proteínas se utilizó el protocolo estándar del ensayo de microplacas de 250µl (*Quick Start™ Bradford Protein Assay*, Bio-Rad, España). Para medir la absorbancia a 595nm de los estándares y de las muestras desconocidas (del estudio) se utilizó el espectrofotómetro (VarioSkán™, ThermoScientific, España). Este procedimiento se aplicó a la totalidad de las muestras intestinales del estudio (pacientes y controles), además de muestras colónicas de ratón C57BL/J6 (Charles River, Francia) y de células (HT-29), cultivadas de forma rutinaria y cedidas amablemente por la Dra. Martínez Balibrea (ICO-IGTP, Badalona, España), con el objetivo de servir como controles pluri o monocelulares, respectivamente, en los estudios para la caracterización de proteínas de interés.

Alternativamente, para complementar este estudio y verificar los resultados mediante otro protocolo de extracción proteica, se procedió a la extracción de la proteína total por otro método en el cual el tejido ileal de pacientes y controles se homogeneizó en tubos M con buffer de lisado RIPA (Anexo 6).

Immunoblotting

Mediante la técnica de *western blot* se determinaron los niveles de la proteína más relevante entre la comparación de pacientes vs. controles: TMIGD1 y los niveles de la proteína HK: GAPDH, según técnica convencional. Para el desarrollo del *western blot* se preparó la muestra para la etapa de electroforesis y transferencia (separación de bandas), y posterior hibridación con anticuerpos específicos para identificar proteínas (Anexo 7).

Estudio de deglicosilación

Para determinar las características estructurales de las proteínas a estudio se utilizó un protocolo convencional de deglicosilación mediante el kit de N-deglicosilación por PNGasa (Sigma-Aldrich # PP0201, EEUU) (Anexo 8).

Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

La inmunohistoquímica se utiliza para localizar un antígeno relacionado con células específicas para identificarlas (por ejemplo, anti-lisozima para las células de Paneth o anti-LGR5 para las células madre intestinales). Su función es comprobar si los cambios a nivel molecular repercuten sobre los distintos linajes de células epiteliales

del íleon. Por otra parte, la inmunofluorescencia, que es realmente una inmunofluorescencia doble, sirve para co-localizar varias proteínas y ver si existe interacción. Los procedimientos para estas dos técnicas se recogen en el Anexo 9.

Para la detección de células caliciformes se usó la tinción histológica de azul de Alcian, según técnica convencional (Anexo 10). Se cuantificó el número de células de Paneth (anti-lisozima), células madre (LGR5+), células caliciformes (tinción de azul de Alcian) y de enterocitos Ki67+, distinguiendo entre cripta y columna vellositaria.

Array de proteínas

Los *arrays* de proteínas permiten el análisis masivo, en paralelo y simultáneo de proteínas de interés (263), lo que permitirá comprobar los cambios detectados en el transcriptoma a nivel proteínico. Para este estudio se diseñó el *array* de proteínas a medida utilizando la plataforma RayBio® (*human biotin-label based antibody arrays*) RayBiotech Inc (Norcross, Georgia, EEUU) para la construcción y análisis de los *microarrays* proteínicos. El *array* de proteínas incluyó la determinación de proteínas relacionadas con las vías de estudio del destino celular, proteínas de secreción y señalización. La lista de todas las proteínas estudiadas se describe en la Tabla 12. Los servicios técnicos de RayBiotech Inc. (Norcross, Georgia, EEUU) realizaron las medidas de las proteínas de interés, lo que consistió en la hibridación de los extractos proteínicos y posterior lectura: <http://www.raybiotech.com/services-en.html>

Tabla 12 Proteínas incluidas en el *array* de proteínas

| Secreción | Vía Wnt | Vía Bmp | Vía Notch | Señalización |
|---------------------|------------|------------|-----------|--------------|
| S100A8 | APC | BMPR1B | NOTCH1 | IL17 |
| S100A9 | KLF4 | BMPR2 | NOTCH2 | IL17F |
| TFF3 | CECACAM | BMPR1AALK3 | CyclinD1 | TGFB1 |
| DEFB1 | DSG2 | SMAD7 | ADAM17 | GP96 |
| MUC1 | β-catenina | SMAD4 | HES1 | ATF2 |
| MUC2 | | TGFII | DLL1 | |
| HP | | | MAML1 | |
| | | | JAG1 | |
| HNF1A, HNF4A, HNF4G | | | | |

Para el estudio de la secuencia y de la información funcional de las proteínas se utilizó la base de datos, de acceso libre [UniProt](#) (*The Universal Protein Resource*).

4.9 Estudio estadístico

Los estudios estadísticos con grandes volúmenes de datos se han detallado en el apartado del estudio bioinformático, pero para la comparación de variables demográficas, moleculares y celulares entre pacientes vs. controles y variables clínicas, histológicas, endoscópicas, moleculares y celulares entre pacientes con recurrencia post-quirúrgica precoz vs. pacientes sin recurrencia se emplearon técnicas de análisis estadístico convencional. Las variables cuantitativas se compararon mediante la *t* de Student para datos paramétricos y el test de Mann-Whitney para datos no paramétricos, mientras que las variables cualitativas se compararon mediante el test de la χ^2 o el test exacto de Fisher. Se consideró como estadísticamente

significativo los hallazgos con un valor de $P \leq 0,05$. Los resultados se expresaron en media/mediana e intervalo intercuartil/desviación estándar según se utilizaran test paramétricos o no paramétricos, respectivamente. La correlación entre la expresión de mRNA en el transcriptoma y el resultado de RT-qPCR se llevó a cabo mediante el coeficiente de la correlación de Pearson, significativo si es $\geq 0,45$ con un valor de $P \leq 0,0005$, como se ha expuesto previamente.

Dado que los pacientes estudiados fueron únicamente 20 no se realizó ningún análisis de supervivencia de la aparición de recurrencia endoscópica ni análisis multivariante de regresión de riesgo proporcionales.

Todas las técnicas de estadística convencional se llevaron a cabo con la ayuda del software IBM-SPSS (SPSS Inc, Chicago, EEUU, v21).