

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina



**ESTUDIO DEL POLIFORMISMO GENÉTICO DE UN
SOLO NUCLEÓTIDO NO SINÓNIMO DE LA DIAMINO
OXIDASA (REFSNP ID RS1049793) EN LA ENFERMEDAD
DE CROHN**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Natalia López Palacios

Bajo la dirección de los doctores
Manuel Díaz-Rubio García y Carlos Taxonera Samsó

Madrid, 2009

• **ISBN: 978-84-692-1086-4**

©Natalia López Palacios, 2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de medicina



**ESTUDIO DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DE UN SOLO
NUCLEÓTIDO NO SINÓNIMO DE LA DIAMINO OXIDASA
(refSNP ID: rs1049793) EN LA ENFERMEDAD DE CROHN**

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:
Natalia López Palacios

DIRIGIDA POR:
Prof. D. Manuel Díaz-Rubio García
Carlos Taxonera Samsó

Madrid 2008

"El mundo no puede permitirse la pérdida de los talentos de la mitad de las personas, si estamos aquí para resolver la multitud de problemas que nos preocupan"

(Rosalyn Yalow)

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte de la autora y sus directores de tesis, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré.

A mis directores de tesis, el profesor D. Manuel Díaz-Rubio y el Dr. Taxonera Samsó, por su valiosa dirección y apoyo en la conclusión de la misma.

A todos los miembros del Área de Farmacología del Departamento de Terapéutica Médico-Quirúrgica, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Extremadura que me proporcionaron todas las facilidades necesarias para realizar el proyecto.

A todos los miembros que componen el Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico San Carlos donde me he formado e iniciado mi carrera como especialista

Al equipo de enfermería de hospitalización, Hospital de Día y de la Unidad de EII del Hospital Clínico San Carlos por su buen hacer.

Al Servicio de Estadística, en especial a Manuel y Náyade, por su interés y consejo en la obtención de resultados.

A todos los pacientes de enfermedad de Crohn y voluntarios sanos que confiaron en el proyecto y decidieron participar en este proyecto.

A mis padres, mi marido y hermano les agradezco su apoyo, su guía y confianza en mi. Esta tesis es suya.

A todos mi mayor reconocimiento y gratitud.

Abreviaturas

ABP1	Proteína de unión a amiloride 1
Ach	Acetilcolina
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
AO	Anticonceptivos orales
APC	Célula presentadora de antígenos
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
5-ASA	Ácido 5-aminosalicílico
ATI	Anticuerpos anti-Infliximab
AZA	Azatioprina
CARD	Dominio de reclutamiento y activación de caspasas
CD	Células dendríticas
CDAI	Índice de actividad de la EC
CE	Corticoides
CEIC	Comité de Ética e Investigación Clínica
CI	Colitis indeterminada
CU	Colitis ulcerosa
DAO	Diamino oxidasa
DE	Desviación estándar
DLG5	Discs Large Homolog 5
EAs	Efectos adversos
EC	Enfermedad de Crohn
E.C.	Enzyme Clasification
ECCO	European Crohn's and Colitis Organisation
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
Fc _ε RI	Receptor de alta afinidad para IgE
GALT	Tejido linfoide asociado al sistema gastrointestinal
Gly	Glicina
GM-CSF	Factor de crecimiento de colonias de granulocitos y macrófagos.
His	Histidina
HNMT	Histamina N-metiltransferasa
IC	Intervalo de confianza
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
ID	Intestino delgado
IEL	Linfocitos intraepiteliales
IFN	Interferón
IFX	Infliximab
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IS	Inmunosupresores
JAMA	Journal of The American Medical Association
Kb	Kilobase
Kg	Kilogramo
Leu	Leucina
LPS	Lipopolisacárido
LRR	Secuencias repetidas ricas en leucina
MadCAM	Molécula de citoadhesión adresina mucosal
MCP-1	Proteína 1 quimiotáctica de los monocitos
Mg	Miligramo

Abreviaturas

MDP	Mureína del petidoglicano
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
6MP	6 - mercaptopurina
MTX	Metotrexato
NAT	N-acetiltransferasa
NBD	Dominio de unión a nucleótidos
NCBI	Centro Nacional de información biotecnológica
NF- κ B	Factor de transcripción Kappa B
NOD	Dominios de oligomerización de nucleótidos
OCTN	Genes transportadores de cationes orgánicos
OR	Odds Ratio
PAF	Factor activador de plaquetas
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
Pb	Pares de bases
PCR	Proteína C reactiva
PHW	Principio de Hardy-Weinberg
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
RANTES	Regulador de la activación de las células T normalmente secretadas y expresadas
RIQ	Rango intercuartílico
RFLPs	Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción
RR	Riesgo relativo
SHM	Hipermutación somática
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
Subsp	Subespecie
TAC	Tomografía Axial Computerizada
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Linfocitos T helper
TIR	Dominio intracelular del receptor Toll-like homólogo al receptor de interleucina 1 (Toll-IL-1R)
TLR	Receptores toll-like
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
Tr	Linfocitos T reguladores
Trp	Triptófano
RNM	Resonancia Nuclear Magnética
USE	Ultrasonografía endoscópica
VSG	Velocidad de sedimentación globular

ABREVIATURAS	I
INDICE	III
TABLAS	VI
FIGURAS Y GRÁFICOS	VII
I. INTRODUCCIÓN	15
II. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	16
1.- DEFINICIÓN	17
2.- ORIGEN	18
3.- EPIDEMIOLOGÍA	19
3.1.- Incidencia y prevalencia	19
3.2.- Edad	20
3.3.- Sexo	20
.....3.4.- Etnia	21
4.- FACTORES GENÉTICOS	22
4.1.- Estudios epidemiológicos	22
4.2.- Estudios genéticos	23
4.2.1.- Estudio clonado posicional	23
4.2.2.- Estudio del gen candidato	24
4.3.- Gen NOD2/CARD15	24
5.- FACTORES AMBIENTALES	27
5.1.- Dieta	27
5.2.- Tabaco	27
5.3.- Anticonceptivos orales (AO)	28
5.4.- Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)	29
5.5.- Agentes infecciosos	29
5.6.- Lactancia materna y eventos perinatales	29
5.7.- Apendicectomía	30
6.- CRITERIOS DIAGNÓSTICOS Y CLÍNICOS DE LA EC	31
6.1.- Sospecha diagnóstica	31
6.1.1.- Dolor abdominal	31
6.1.2.- Diarrea	31
6.1.3.- Otros síntomas y signos	31
6.1.4.- Clasificación según el comportamiento clínico	32
6.1.4.1.- Clínica inflamatoria	32
6.1.4.2.- Clínica estenosante	32
6.1.4.2.- Clínica penetrante	32
6.1.4.2.- Enfermedad perianal	32
6.1.5.- Manifestaciones extraintestinales	34
6.2.- Clasificación clínica de la EC	34
6.2.1.- Clasificación de Viena	34
6.2.2.- Clasificación de Montreal	36
6.3.- Pruebas complementarias	37
6.3.1.- Endoscopia	37
6.3.1.1.- Colonoscopia con ileoscopia	37
6.3.1.1.1.- Hallazgos endoscópicos	38
6.3.1.1.2.- Hallazgos histológicos	38
6.3.1.2.- Esofagogastroduodenoscopia o endoscopia alta	40
6.3.1.3.- Enteroscopia	40
6.3.1.4.- Cápsula endoscópica	40
6.3.1.5.- Ultrasonografía endoscópica	41
6.3.2.- Radiología convencional	41
6.3.2.1.- Examen del ID	41
6.3.2.2.- Examen del colon	42
6.3.3.- Ecografía transabdominal	43
6.3.4.- TC y RNM	43

7.- TRATAMIENTO DE LA EC	44
7.1.- Fármacos en la EC	45
7.1.1.- Antibióticos	45
7.1.2.- Sulfasalazina	45
7.1.3.- Aminosalicilatos (5-ASA)	46
7.1.4.- Corticoides	47
7.1.4.1.- Budesonida	48
7.1.4.2.- Corticoides sistémicos	48
7.1.5.- Inmunosupresores (IS)	49
7.1.5.1.- AZA y 6MP	49
7.1.5.2.- MTX	50
7.1.6.- Terapia biológica	50
7.1.6.1.- Anticuerpos monoclonales anti-TNF alfa	50
7.2.- Cirugía	51
7.3.- Manejo de tratamiento de la EC según la ECCO	52
III. FISIOLÓGÍA INTESTINAL	54
1.- MUCOSA INTESTINAL	55
1.1.- Célula epitelial	55
1.2.- El moco	56
1.3.- Defensinas y proteasas	56
2.- SISTEMA INMUNE	56
2.1.- Inmunidad innata	59
2.1.1.- Receptores endocíticos	60
2.1.2.- Receptores activadores	60
2.2.- Inmunidad adaptativa	64
IV. INMUNOPATOGENIA DE LA EC	67
1.- MICROFLORA INTESTINAL EN LA EC	68
2.- DEFECTOS EN LA BARRERA INTESTINAL	68
3.- SISTEMA INMUNOLÓGICO	69
3.1.- Inmunidad innata	69
3.2.- Inmunidad adaptativa	70
4.- MASTOCITOS, HISTAMINA Y EC	71
4.1.- Mastocitos	71
4.1.1.- Funciones de los mastocitos a nivel intestinal	74
4.1.2.- Mastocitos y EII	74
4.1.2.1.- Aumento del número de los mastocitos en la EII	75
4.1.2.2.- Diferente contenido de los gránulos de mastocitos en la EC	75
4.1.2.3.- Mediadores de activación de mastocitos en la EII	76
4.1.2.4.- Evidencia de la degranulación de los mastocitos en la EC	76
4.1.2.5.- Evidencia del efecto de los mastocitos en la EII	76
4.2.- La histamina	77
4.2.1.- Estructura química	78
4.2.2.- Síntesis, almacenamiento y degradación	78
4.2.3.- Histamina en la EII	79
4.2.3.1.- Secreción aumentada de histamina	80
4.2.3.2.- Efecto de la histamina en pacientes con EII	80
4.2.3.3.- Actividad de las enzimas que degradan la histamina	80
4.3.- Diamino oxidasa	80
4.3.1.- Estructura genética del gen DAO el intestinal	81
4.3.2.- Polimorfismos genéticos de la DAO	82
4.3.2.1.- Polimorfismos genéticos de la DAO y la EIIa EII	86
HIPÓTESIS	87
OBJETIVOS	89
1.- OBJETIVO PRIMARIO	90
2.- OBJETIVOS SECUNDARIOS	90
PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS	91
1.- POBLACIÓN A ESTUDIO	92

2.- PURIFICACIÓN DEL ADN GENÓMICO	93
3.- GENOTIPADO	94
3.1.- Técnica de PCR	95
3.2.- Termociclador	95
3.3.- Electroforesis	95
3.4.- Precipitación de las muestras	97
3.5.- Corte de las muestras	97
4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	98
RESULTADOS	100
1.- DESCRIPTIVO GENERAL DE LOS PACIENTS CON EC	101
2.- EQUILIBRIO GENÉTICO DE POBLACIONES	105
3.- DIFERENCIAS DEL POLIMORFISMO GENÉTICO NO SINÓNIMO (refSNP ID: rs1049793) DE LA DAO ENTRE SUJETOS CON EC Y CONTROLES SANOS	106
4.- EVALUACIÓN DE POSIBLES DIFERENCIAS EN LA FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO GENÉTICO NO SINÓNIMO (refSNP ID: rs1049793) DE LA DAO SEGÚN EL FENOTIPO DE EC	107
DISCUSIÓN	114
CONCLUSIONES	119
BIBLIOGRAFÍA	121

Tabla 1.- Incidencia en España de la EII	19
Tabla 2.- Efectos deletéreos del tabaco en la EC	28
Tabla 3.- Clasificación de las fístulas	34
Tabla 4.- Clasificación de Viena	36
Tabla 5.- Clasificación de Montreal	37
Tabla 6.- Diferencias endoscópicas entre EC y CU	39
Tabla 7.- Diferencias histológicas entre EC y CU	41
Tabla 8.- Principales efectos secundarios de los esteroides	50
Tabla 9.- Guía de tratamiento según localización y actividad de la EC	53
Tabla 10.- Guía de tratamiento según el comportamiento de la EC	54
Tabla 11.- Argumentos sobre el papel de la flora intestinal en la EII	69
Tabla 12.- Argumentos sobre el papel de la barrera intestinal en la EII	69
Tabla 13.- El análisis de frecuencia para SNP del gen de la DAO entre casos y controles	107
Tabla 14.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación a las características demográficas e historial médico	109
Tabla 15.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación a la clasificación de Montreal	110
Tabla 16.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación a las manifestaciones extraintestinales	111
Tabla 17.- Riesgo Relativo entre portadores (homocigotos y heterocigotos) y no portadores de la mutación en relación a las manifestaciones cutáneas	111
Tabla 18.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación a las fístulas	112
Tabla 19.- Evaluación de las variables cuantitativas de las fístulas entre portadores y no portadores de la mutación	112
Tabla 20.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación al resto de complicaciones intraabdominales	113
Tabla 21.- Evaluación de las variables cuantitativas del resto de las complicaciones intraabdominales entre portadores y no portadores de la mutación	113
Tabla 22.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación al tratamiento requerido por la gravedad de la enfermedad	114
Tabla 23.- Frecuencias del alelo mutado del SNP no sinónimo de la enzima DAO (refSNP ID:rs1049793)	117

FIGURAS Y GRÁFICOS

Figura 1.- Burrill B. Crohn	18
Figura 2.- Incidencias según la edad y el sexo del estudio Colaborativo Europeo sobre EII	21
Figura 3.- Estructura del gen NOD2/CARD15	24
Figura 4.- Clasificación de Parks de las fístulas	34
Figura 5.- Cálculo del CDAI	46
Figura 6.- Sistema inmune innato y adaptativo	58
Figuras 7 y 8.- Sistema inmune asociado al tracto gastrointestinal	60
Figuras 9 y 10.- Los diferentes receptores TLRs	62
Figura 11.- Cascada de señalización tras la activación de TLRs	63
Figura 12.- Estructura de la proteína NOD	64
Figura 13.- Cascada de señalización NOD 1 y NOD 2	64
Figura 14.- Variantes de NOD2 en la EC	64
Figura 15.- Interacción entre las proteínas NOD y los receptores TLRs	65
Figura 16.- Respuesta inmune en individuos normales y pacientes con EC con defectos en la función NOD2	65
Figura 17.- Estructura molecular de la histamina	79
Figura 18.- Síntesis y metabolismo de la histamina	80
Figura 19.- Estructura genética de DAO	82
Figura 20.- Diagrama esquemático del gen de la DAO humana	83
Figura 21.- Polimorfismos genéticos SNP en el gen de la DAO	84
Gráfico 1.- Características demográficas de los pacientes con EC	102
Gráfico 2.- Clasificación de Montreal de los pacientes con EC	103
Gráfico 3.- Distribución de las manifestaciones extraintestinales en los pacientes con EC	103
Gráfico 4.- Distribución de las fístulas en los pacientes con EC	104
Gráfico 5.- Distribución de las complicaciones intraabdominales en pacientes con EC	105
Gráfico 6.- Requerimientos quirúrgicos en los pacientes con EC	105
Gráfico 7.- Distribución de los pacientes de EC a recibir terapia inmunosupresora o biológica por la gravedad clínica	105
Gráfico 8.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación con respecto a las características demográficas e historial médico	108
Gráfico 9.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación a la clasificación de Montreal	110
Gráfico 10.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación a las manifestaciones extraintestinales	111
Gráfico 11.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación a las fístulas	112
Gráfico 12.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación al resto de complicaciones intraabdominales	113
Gráfico 13.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación al tratamiento requerido por la gravedad de la enfermedad	114

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Crohn (EC) se caracteriza por una inflamación crónica del tracto digestivo con una etiopatogenia aún desconocida. La teoría más aceptada indica una regulación alterada de la respuesta inmune del huésped frente a la flora bacteriana residente y a otros antígenos intraluminales en sujetos susceptibles genéticamente.

La búsqueda de genes de susceptibilidad para padecer EC es difícil debido a la complejidad de los factores genéticos, como son la ausencia de un patrón de transmisión mendeliana simple, la penetrancia incompleta de los genes, la heterogeneidad genética y la implicación de varios genes de susceptibilidad (enfermedad poligénica).

De los múltiples factores y células que parecen explicar los mecanismos fisiopatológicos de la EC, uno de ellos se centra en un incremento de la histamina en los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Uno de los motivos parece deberse a una capacidad reducida de la degradación de la histamina por la enzima diamino oxidasa (DAO), también llamada proteína de unión a amiloride (ABP) o histaminasa. Sin embargo, la razón por la que existe un descenso de dicha actividad enzimática no es aún conocida. Tal alteración puede ser explicada en parte por el polimorfismo genético de la enzima DAO que ha sido recientemente descrito.

Este trabajo de investigación se centra en el estudio de un polimorfismo genético de un solo nucleótido (SNP) no sinónimo de la enzima DAO (refSNP ID:rs1049793) y su posible susceptibilidad genética para la EC, así como su repercusión en los distintos fenotipos de la enfermedad.

Seguidamente, para poder entender este trabajo, revisaremos algunos conceptos básicos de la EC y la histamina. También intentaremos resumir los conocimientos existentes respecto a la relación entre ambos.

II. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

1.- DEFINICIÓN

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

Ambas enfermedades son de etiología desconocida y se caracterizan por la cronicidad y por la heterogeneidad en su forma de presentación, curso clínico, pronóstico y desarrollo de complicaciones. El curso clínico de estas enfermedades consiste en una alternancia de períodos de actividad (recidiva o brotes), de variable intensidad o gravedad, con períodos de quiescencia o inactividad (remisión). Es importante realizar la distinción clínica entre CU y EC ya que la evidencia demuestra que el curso clínico, el pronóstico, la respuesta al tratamiento médico, la necesidad de tratamiento quirúrgico y la tasa de recurrencia tras la cirugía difieren de forma significativa entre las dos entidades.

La EC es un trastorno inflamatorio crónico que puede afectar cualquier segmento del tracto gastrointestinal desde la boca hasta el ano, de forma focal, segmentaria, asimétrica y discontinua. El proceso inflamatorio es transmural y puede afectar todas las capas del intestino, con la consiguiente aparición de fisuras, fístulas o abscesos.

El proceso inflamatorio en la CU afecta exclusivamente al colon. La inflamación difusa de la mucosa se inicia en el recto y, de forma continua y simétrica, se extiende de forma proximal a otros segmentos del colon.

2.- ORIGEN

La EC se llama así por Burrill B. Crohn, un médico del hospital Mount Sinai de Nueva York, quien identificó la ileitis como enfermedad en el año 1932 junto con sus colegas Ginzburg y Oppenheimer (ver figura 1). [1]



Figura 1.- Burrill B. Crohn (1884-1983).

Perteneciente a una familia inmigrante judío-alemana que llega a Nueva York a comienzos del siglo XX. A los 13 años (1907), Burrill ingresa en la "City University of New York", graduándose a los 18 años. Cuatro años después obtiene el título de médico en la Universidad de Columbia. Publica 14 casos, con las primeras descripciones sobre una enfermedad, que denomina "enteritis regional", en el JAMA (Journal of The American Medical Association). Los doctores Gordon Oppenheimer y Leon Ginzburg y Richard Marshak contribuyeron de forma importante en las descripciones sobre la enfermedad de Crohn, su evolución y opciones de tratamiento quirúrgico y médico. En 1935 fue electo presidente de la Asociación Americana de Gastroenterología.

3.- EPIDEMIOLOGÍA

3.1.- Incidencia y prevalencia.

Desde principios de este siglo se ha experimentado un cambio en la epidemiología y curso de la EII. Con un notable aumento de la incidencia, en especial en los últimos 30 años, en todos los países desarrollados donde comienza a estabilizarse. Con una incidencia actual de EC de entre 10 y 15 casos/100.000 habitantes/año [2], siendo en las mismas poblaciones la incidencia de la CU algo mayor [3].

Los datos disponibles en Europa indican que existe un gradiente norte-sur tanto de incidencia como de prevalencia, con unas mayores tasas de EII en el norte de Europa y las más bajas en el sur. Estudios más recientes demuestran que estas diferencias se están igualando, estabilizándose en el norte de Europa e incrementándose en los países mediterráneos, lo que permite suponer que en un futuro próximo las tasas de todos los países desarrollados serán similares. Por este motivo, actualmente se prefiere hablar de gradiente este-oeste [2], indicando que la EII se distribuye de forma paralela al nivel socio-económico de los distintos países.

En las primeras series publicadas en España entre los años 1975 -1988 [4-9], la incidencia de este grupo de enfermedades fue baja (incidencia para CU: 0,4 – 4 y para EC: 0,2 – 3,33) en relación a la presentada en estudios europeos, en parte debido a que se trata de estudios antiguos, retrospectivos y no poblacionales. Sin embargo, en los últimos trabajos [10-16] los resultados objetivan tasas crecientes, y en algunos casos similares a las publicadas en los países nórdicos, como se refiere en el estudio colaborativo europeo [17] (ver tabla 1).

Tabla 1.- Incidencia en España de la EII

Autor	Región	Año	Tipo	CU	EC	CU/EC
E. Garza (12)	Teruel	1983-93	R,H	3,1	0,9	3,44
Arin Letamendia (13)	Pamplona	1983-93	R,PO	3,75	2,47	1,51
E. Brullet (10)	4 áreas	1991-93	P,PO	8	5,5	1,45
F. Gomollón (14)	Zaragoza	1992-93	P,PO	5,1	3	1,7
R. Monferrer (15)	Castellón	1992-96	R,PO	6,8	1,9	3,57
EIICEA (11)	Asturias	1994-97	P,PO	9,52	5,95	1,6
C. Saro (16)	Gijón	1994-97	P,PO	9,63	6,08	1,58
Shivananda (17)	Europa	1991-93	P,PO	10,3	5,6	1,83

R: Retrospectivo; P: Prospectivo; H: Hospitalario; PO:Poblacional; EIICEA: EII Estudio Asturiano

Este incremento de las tasas de incidencia a lo largo de los años puede tener varias interpretaciones. La teoría más aceptada es la mejora socio-cultural de las poblaciones, con

cambios en el nivel de vida, industrialización, cambios en los hábitos dietéticos, diferente tratamiento de las aguas y la higiene [18]. Otras hipótesis son un mejor acceso a una medicina de calidad, un defecto de metodología en la obtención de los datos, o ambas cosas que pueden inducir unos resultados sesgados en los estudios más antiguos.

Hasta hace poco tiempo disponíamos de datos muy limitados que no procedieran de Europa occidental y EEUU. Según los últimos estudios, existe un aumento de la incidencia en países del este de Europa [19, 20], Asia [21] y sur de América [22], que comenzó en la década de 1990, en paralelo con cambios en los sistemas de gobierno y desarrollo social.

3.2.- Edad

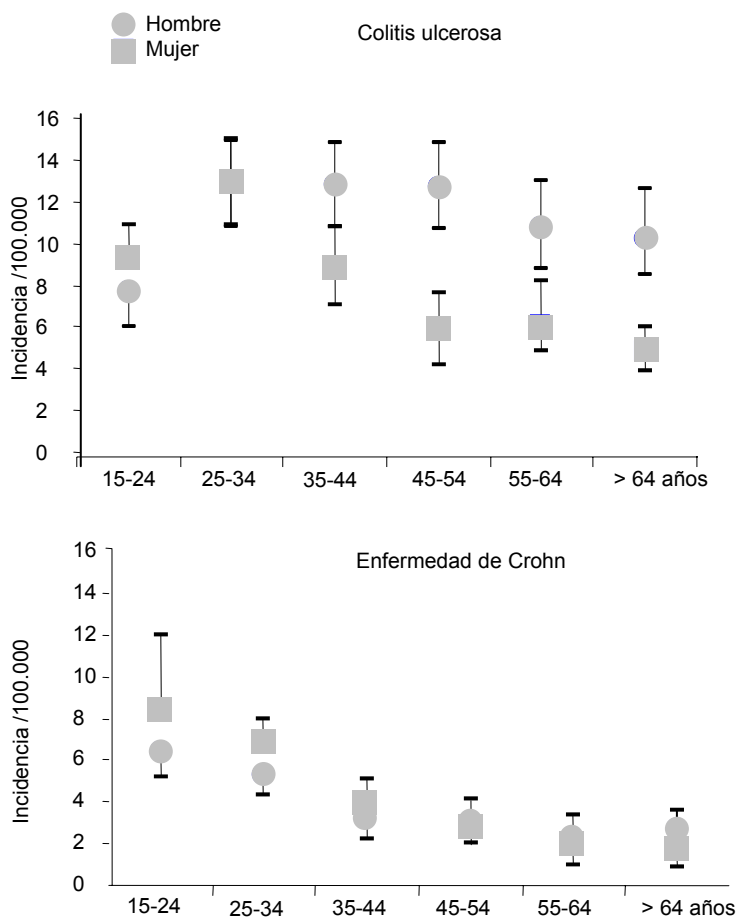
La distribución de la incidencia por grupos de edad en la EC muestra un descenso progresivo con la edad, con un pico máximo entre los 15 y 34 años y un segundo pico más pequeño entre los 45 y 64 años (ver figura 2) [10, 23].

Con respecto a la CU la mayor parte de los individuos inician su enfermedad entre los 15 y 40 años, con un segundo pico entre los 55 y 65 años [10, 17]. La edad al diagnóstico de los pacientes con CU es mayor que en la EC [24].

3.3.- Sexo

En cuanto al sexo y la EII los datos son controvertidos. Según algunos estudios la incidencia en la EC no es distinta para ambos sexos [10, 17], sin embargo en otros se presenta con mayor frecuencia en mujeres (ver figura 2) [3]. Existe una diferencia en la edad específica de incidencia de CU en hombres y en mujeres disminuyendo con la edad en el caso de las mujeres y no en los hombres [10, 17].

Figura 2.- Incidencias según la edad y el sexo del estudio Colaborativo Europeo sobre EII [17].



3.4.- Etnia

La EII afecta principalmente a individuos de raza blanca, con una menor prevalencia entre afroamericanos e hispanos y mínima en asiáticos [25], aunque en los últimos años se ha observado un aumento de la incidencia en estos últimos.

Dentro de la población blanca, la etnia judía es la población con mayor prevalencia. El riesgo de EII en la población judía inmigrante europea y americana está aumentado en 3 ó 4 veces en relación con la población nativa (blancos no judíos) [26-29]. Entre los judíos, la prevalencia de EII es mayor en los judíos Askhenazi (originarios de Europa central y del este) que entre los judíos sefardíes u orientales [29]. Estos hallazgos fueron interpretados como debidos a una mayor predisposición en la etnia judía (Askhenazi), posiblemente genética, a padecer EII y a un marcado efecto de los factores ambientales [30].

4.- FACTORES GENÉTICOS

Son numerosos los factores etiológicos (fundamentalmente ambientales, infecciosos y genéticos) que parecen implicados en la etiopatogenia de la EII. La hipótesis más aceptada por la comunidad científica es la de Satsangi [31], que sugiere que se trata de enfermedades poligénicas, compartiendo ambas enfermedades (EC y CU) algún o algunos genes que confieren susceptibilidad, mientras que otros genes predispondrían únicamente a la EC o a la CU. Todo ello, junto con las modificaciones ambientales, podría explicar la amplia variación fenotípica de ambas enfermedades.

En 1934, Burrill B. Crohn y colaboradores describieron la primera agregación familiar de casos de esta enfermedad, fundamentando la primera base genética de la misma. Desde entonces múltiples investigadores han confirmado que la EII, fundamentalmente la EC, se asocia a un componente familiar. Hasta hace poco tiempo el papel de la genética en la susceptibilidad a la EII provenía de datos indirectos y fundamentalmente de la epidemiología genética. Las principales líneas de investigación incluían estudios en gemelos, diferencias étnicas en la prevalencia de la enfermedad, estudios de agregación familiar y su asociación con síndromes genéticos reconocidos.

4.1.- Estudios epidemiológicos

El principal factor de riesgo descrito para padecer EII es tener un miembro afecto en la familia [32]. Entre un 10-20% de los enfermos tiene antecedentes de EII entre sus familiares [33, 34]. Los familiares de primer grado (hijos, hermanos y padres) de los pacientes tienen el mayor riesgo, especialmente los hermanos, de presentar la misma enfermedad que ellos. Además, las dos enfermedades pueden darse en la misma familia.

En los últimos años se ha publicado que la agregación familiar es mucho más alta en la EC (entre 4,5–18,8%) que en la CU. El riesgo relativo (RR) para los hermanos de un paciente con EC varía entre 12 y 35, siendo considerablemente menor (entre 4 y 12) en la CU, resultando ser los pacientes con más riesgo los hijos de dos progenitores con la enfermedad [35, 36].

Los estudios epidemiológicos en familias con múltiples miembros afectados de EII muestran una elevada concordancia en el tipo de enfermedad (EC o CU) y posiblemente de la localización de la misma [33, 37, 38]. En cuanto a la anticipación genética que hace referencia a la aparición

del primer brote de actividad en los hijos a una edad más temprana, no existe evidencia científica actualmente [39].

Los estudios en gemelos son muy útiles para evaluar el papel relativo de los factores genéticos y ambientales. En la EC existe una concordancia significativamente superior en gemelos homocigotos (37%) que en gemelos heterocigotos (7%). Mientras en la CU el grado de concordancia, tanto en gemelos mono como dicigotos (10 y 3%, respectivamente), sugiere una menor influencia de los factores genéticos [40, 41].

4.2.- Estudios genéticos

Las dos estrategias básicas para la identificación de determinantes genéticos en la EII son: la clonación posicional (basada en técnicas de ligamiento) y el estudio del gen candidato (basado en estudios de asociación, por ejemplo, con genes del sistema del complejo mayor de histocompatibilidad) [42]

4.2.1.- Estudio de clonado posicional

El estudio de clonado posicional es una búsqueda a través del genoma humano con la intención de identificar variaciones en regiones altamente polimórficas entre los afectados y no afectados. Rastrea todo el genoma a través de análisis de ligamiento y estudios de asociación intrafamiliar. Se evalúa el parecido entre los miembros afectos para un gran número de marcadores altamente polimórficos. Si se detecta un exceso de parecido, la región donde se localiza el marcador se estudia con mayor profundidad. Así, este método es capaz de detectar genes de susceptibilidad que no aparecían *a priori* como candidatos relevantes, e incluso puede detectar genes no conocidos. El principal inconveniente de este método es la falta de potencia, a causa del gran número de regiones genéticas que se evalúan, por lo que a menudo se necesitan grandes muestras para poder demostrar diferencias.

Con el barrido del genoma se han identificado un número de regiones (o locus) generadoras de susceptibilidad para la EII como las halladas en los cromosomas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 16, 19 y X. Sólo siete locus de susceptibilidad (denominados IBD1-IBD7) cumplen criterios de reproducibilidad en estudios independientes [43-49]. Sin embargo, ningún locus ha sido detectado de forma constante en todos los estudios, lo cual sugiere la existencia de una heterogeneidad genética. Las regiones cromosómicas identificadas mediante barridos del

genoma son grandes y pueden contener varios centenares de genes candidatos. Por ello se han propuesto diversas estrategias para identificar los genes de susceptibilidad. La primera es fijarse en genes candidatos relevantes previamente identificados en los cromosomas de interés, denominados genes candidatos posicionales.

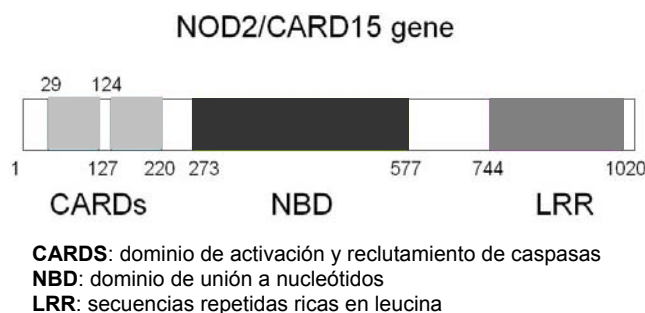
4.2.2.- Estudio del gen candidato

Los estudios de genes candidatos comparan las frecuencias alélicas entre pacientes portadores de la enfermedad y controles emparejados. Las diferencias pueden apuntar a la implicación del gen en la patogénesis de la enfermedad estudiada. Esta estrategia necesita siempre de una hipótesis previa que establezca una relación fisiopatológica entre el gen candidato y la enfermedad. Uno de los grandes problemas de estos estudios es la correcta selección de los controles.

4.3.- Gen NOD2/CARD15

Los primeros estudios de identificación de genes mediante una estrategia de clonación posicional en trastornos genéticos complejos fueron los realizados con el NOD2. Este enfoque consistió en un análisis detallado de la región pericentromérica del cromosoma 16 seguido de estudios de asociación intrafamiliar, lo que permitió identificar el NOD2 como el gen IBD1 (16q12). Identificado en el año 2001 por dos grupos independientes utilizando dos técnicas distintas, ya previamente descritas, como son la clonación posicional [50] y la estrategia del gen candidato [51]. El gen recientemente rebautizado CARD15 (ver figura 3) por el Comité de Nomenclatura HUGO, está implicado en la susceptibilidad a la EC, pero no en la predisposición a padecer CU.

Figura 3.- Estructura del gen NOD2/CARD15.



Este gen codifica una proteína que se expresa en monocitos y macrófagos y, en niveles más bajos, en granulocitos y linfocitos. Actúa como receptor intracelular de componentes bacterianos.

La estructura básica de la proteína sintetizada se divide en tres regiones:

- Región amino terminal con dos dominios N-terminales, implicados en la activación de caspasas (dominio de activación y reclutamiento de caspasas o CARD). Este dominio ha dado nombre al gen y a su proteína.
- Región central con un dominio de unión a nucleótidos (NBD).
- Región C-terminal con diez secuencias repetidas ricas en leucina (LRR), de forma similar a los dominios extracelulares de los receptores de membrana toll-like (TLR), implicados en reconocer patógenos extracelulares.

El gen NOD2/CARD15 codifica una proteína implicada en el reconocimiento del dipéptido derivado de la mureína del peptidoglicano (MDP) de bacterias gram negativas y positivas [52], activando la ruta de señalización del factor de transcripción Kappa B (NF- κ B) [53]. En este gen se han identificado aproximadamente 30 mutaciones asociadas a EC, siendo sólo 3 de ellas frecuentes (Leu1007fsinsC, Gly908Arg y Arg702Trp). Estas tres mutaciones, también denominadas SNP8, SNP12 y SNP13, son responsables de más del 80% de los alelos mutados, siendo poco probable que la contribución de las restantes variantes sea significativa al estar presentes en un escaso número de individuos.

La mayoría de los estudios se han realizado en poblaciones de raza blanca, los datos comunicados en estudios multicéntricos [54] indican que del 30 al 40% de los pacientes son heterocigotos para una de las tres mutaciones y entre el 3 y el 15 % son homocigotos o heterocigotos compuestos (dos mutaciones diferentes, una en cada cromosoma), en comparación con la población de controles sanos, en la que un 7-12% son heterocigotos y un 0 -1 % homocigotos. El riesgo relativo de desarrollar EC en portadores de una mutación es de 2 a 3, pero aumenta hasta un 20 - 40 en el caso de dos mutaciones (heterocigoto compuesto u homocigoto), lo que sugiere un efecto de dosis génica para las tres mutaciones. Sin embargo, la penetrancia es reducida, menos del 10% de los pacientes portadores de dos alelos de riesgo NOD2/CARD15 desarrollará la enfermedad, lo que implica que otros genes y estímulos medioambientales están también implicados en la génesis de la misma [55].

El valor de las mutaciones genéticas en la EC se ha analizado teniendo en cuenta el sistema de clasificación de Viena (ver tabla 4), que incluye la localización de la enfermedad, su curso o patrón evolutivo y la edad a la que se diagnostica. Los resultados obtenidos objetivan una mayor asociación entre las mutaciones del CARD15 y: 1.- la localización ileal [56]; 2.- el comportamiento clínico estenosante [57]; 3.- la presentación temprana de la enfermedad [58]; 4.- familiares de los pacientes portadores de mutaciones [56] y 5.- cuando hay cirugía previa, fundamentalmente resecciones ileales. Se objetiva además un mayor riesgo de reintervenciones entre los portadores de mutaciones [59, 60]. No se encuentra asociación con el desarrollo de manifestaciones extraintestinales [58] ni en relación con factores medioambientales (fumadores y no fumadores) [58]. No se dispone de datos que relacionen la presencia de las variantes de CARD15 con la respuesta al tratamiento con esteroides (CE), antibióticos o inmunosupresores (IS).

Otros genes menos estudiados implicados en la susceptibilidad de la EC son: la región IBD5 en el cromosoma 5q31-33 (locus IBD5) [61]. El gen concreto implicado dentro de la región no es conocido con certeza, aunque se presta una atención particular a las variaciones en los genes transportadores de cationes orgánicos OCTN1 y OCTN2 [62]. Otros determinantes genéticos que se han relacionado con menor solidez con la EC incluyen el DLG5 en el cromosoma 10 [63], NOD1 [64] y TLR4 y 9 [65]. Mas recientemente el gen ILR3 en el cromosoma 1p31 (que codifica una subunidad del receptor para la citocina proinflamatoria IL-23) se ha asociado con la EC [66].

5.- FACTORES AMBIENTALES

Las variaciones observadas en la frecuencia de la EII entre diferentes áreas geográficas y su variabilidad en el tiempo no pueden ser explicadas solamente por cambios genéticos. Esto ha sugerido el posible papel que determinados factores ambientales podrían desempeñar en su desarrollo. Son muchos los factores que hipotéticamente pueden actuar como precipitantes o desencadenantes de la EII; sin embargo, los estudios al respecto no son concluyentes, exceptuando quizás en lo referente al hábito de fumar, el uso de anticonceptivos orales (AO) y las infecciones perinatales.

5.1.- Dieta

Existen razones para suponer que la dieta pueda estar involucrada en la patogenia de la EII, puesto que los antígenos de la dieta representan la mayoría de los antígenos no bacterianos presentes en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, la realización de estudios relacionados con la dieta es muy difícil, por la dificultad de reconstruir las dietas de los pacientes y de establecer una relación secuencial en el tiempo entre el factor considerado y la aparición de lesiones o síntomas. Hasta ahora no existen pruebas de que algún alimento en particular favorezca la recidiva de la enfermedad, por lo que se recomienda que los pacientes con EII sigan una dieta libre [67].

5.2.- Tabaco

En la EII el tabaco juega un papel opuesto según la enfermedad de la que se trate; tiene un papel protector en la CU, mientras que en la EC el consumo de tabaco aumenta la susceptibilidad a la enfermedad y predispone a formas más graves.

En el metaanálisis clásico de Calkins la posibilidad de presentar EC es significativamente superior en fumadores que en no fumadores con un odds ratio de 2.0 (IC 95%: 1.65-2.47) [68].

En el estudio de Regueiro la influencia del tabaco es mayor en mujeres y en pacientes con EC de debut tardío (>40 años) pero no en la EC de aparición más precoz [69].

El tabaco también afecta negativamente el curso de la enfermedad (ver figura 2). Los fumadores tienen más brotes de EC que los no fumadores, y el abandono del tabaco extiende el beneficio a los ex fumadores [70]. Comparado con los no fumadores los pacientes de EC que fuman sufren más recaídas clínicas y desarrollan un mayor número de complicaciones con

evolución a formas estenosantes y penetrantes [71-73]. Los pacientes con EC que fuman precisan mayor número de reintervenciones que los que no fuman [72, 73]. Los pacientes de EC que dejan de fumar presentan un curso clínico más benigno, con menos recaídas y menor necesidad de corticoides y de inmunosupresores [70]. De igual manera abandonar el tabaco protege a los pacientes con EC de futuras reintervenciones por recurrencia [72]. El beneficio evaluable de abandonar el tabaco en la EC se considera equivalente al que produce el tratamiento de mantenimiento con inmunosupresores tiopurínicos.

Tabla 2.- Efectos deletéreos del tabaco en la EC

<ul style="list-style-type: none">- Incremento de la necesidad de terapia corticoidea e inmunosupresores- Incremento de la recidiva clínica y endoscópica- Incremento de la progresión a formas estenóticas y penetrantes- Mayor riesgo de cirugía precoz- Incremento de riesgo de recurrencia clínica, endoscópica y quirúrgica en la post-cirugía

La CU es una enfermedad más frecuente en no fumadores. Tanto en el metaanálisis de Calkins, con un odds ratio de 0.41 (IC 95%: 0.34-0.48) [68], como en el más reciente estudio de Bridger [74] se objetiva que la CU es menos frecuente en fumadores, cuando se compara con no fumadores o exfumadores (OR: 0,25; IC 95%: 0,2-0.4). En el estudio de Abraham fumar se asocia a una disminución en el riesgo de desarrollo de CU, pero la ausencia de antecedentes de tabaquismo no se asocia a un incremento en el riesgo [75]. Son los pacientes que fumaban y que dejan de fumar los que desarrollan con mayor frecuencia CU [75].

A diferencia de lo que sucede en la EC, la CU tiene un curso clínico más benigno en los fumadores, con menos brotes de la enfermedad, menos hospitalizaciones y menor necesidad de corticoides e inmunosupresores [76]. En algún estudio el riesgo de colectomía es también ligeramente inferior en fumadores comparados con no fumadores [77].

5.3.- Anticonceptivos orales (AO)

El uso de AO como factor relacionado con la susceptibilidad a padecer EC es más controvertido. Un meta-análisis que incluye nueve estudios, dos de ellos de cohortes y siete estudios casos-control, obtuvo un riesgo relativo conjunto asociado al consumo de AO de 1,4 (IC 95%: 1.12-1.86) para la EC, lo que sugiere una asociación discreta entre el uso de AO y el riesgo de desarrollar EC [78]. El mecanismo de cómo los AO aumentan el riesgo de EII no está

aclarado, aunque parece relacionarse con un mayor riesgo de fenómenos tromboembólicos, produciendo un cuadro de isquemia vascular.

5.4.- Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)

En diferentes publicaciones se ha sugerido que el consumo de AINES tiene un papel inductor en la EII [79], así como, su asociación con la recidiva [80] y con un aumento de las complicaciones de la EII [81].

5.5.- Agentes infecciosos

Una variedad de microorganismos, y en algunos casos sus metabolitos, han sido investigados como posibles agentes causales de la EC [82]. Son muchos los agentes infecciosos involucrados en la etiología de la EII, como la flora endógena, los virus, especialmente el del Sarampión [83], *Listeria* [84], *Mycobacterium paratuberculosis* [85], *Escherichia coli* [86]. Sin embargo, no se ha podido aislar un único agente infeccioso que presente una clara relación con el desarrollo de la EII. De acuerdo con Thayer y Chitnavis [82], “La evidencia de un agente infeccioso es tentadora pero todavía no convincente”. Ellos especulan con que múltiples microorganismos pueden estar involucrados o que varios organismos, que no son individualmente patógenos, pueden interactuar, así podría explicarse el fracaso en la identificación de un agente específico.

Actualmente hay muchos estudios en relación con la *Mycobacterium avium* subespecie de *paratuberculosis*. Causante de la enfermedad de Johne, una enteritis crónica que afecta principalmente a rumiantes. Dichos estudios sugieren que la infección en humanos por este microorganismo puede ser el causante en parte o totalmente de la EC. Si la asociación de esta bacteria y la EC es causal o coincidente se desconoce por el momento [87, 88].

5.6.- Lactancia materna y eventos perinatales

Se ha intentado relacionar la presencia o ausencia de EII con el tipo de lactancia recibida y con el desarrollo de procesos infecciosos gastrointestinales en la infancia; sin embargo, al igual que con otras variables o factores de riesgo valorados, los resultados de los diferentes estudios carecen de uniformidad. En la actualidad se sugiere que los procesos inflamatorios e infecciosos perinatales, el uso excesivo de antibióticos y la amigdalectomía favorecen la

aparición posterior de EII [89], mientras que la lactancia materna parece ofrecer una protección a padecerla [90].

5.7.- Apendicectomía

Se ha sugerido desde el punto de vista experimental que el tejido linfoide del apéndice sería el punto de partida de las células que participarían en el desarrollo de la inflamación intestinal, con un papel protector de la apendicectomía en el desarrollo de EC, aunque no todos los estudios lo confirman [91, 92].

6.- CRITERIOS DIAGNÓSTICOS Y CLÍNICOS DE LA EC

El diagnóstico de EII se establece con la combinación de los datos clínicos y biológicos, los hallazgos proporcionados por las técnicas de imagen (especialmente la radiología baritada y la endoscopia) y el estudio histológico.

6.1.- Sospecha diagnóstica

La presentación clínica de la EC es muy diversa, al manifestarse de forma aguda, subaguda o crónica. Esta relativa heterogeneidad clínica de la EC es atribuible a la variación en la edad de inicio, extensión, localización anatómica y gravedad del proceso [93].

6.1.1.- Dolor abdominal

El dolor abdominal es el síntoma más frecuente de la EC. Sus características dependen del patrón clínico o localización de la misma [94].

6.1.2.- Diarrea

La diarrea está típicamente presente cuando la EC está activa, siendo el síntoma más frecuente en la EC de afectación de colon. En la valoración clínica de estos pacientes hay que definir las características de las deposiciones. Considerar el número, consistencia, composición (sangre, moco o pus) y su duración en el tiempo. Si se trata de un volumen escaso sugiere un origen colónico, mientras que si es importante indica afectación del intestino delgado o colon proximal. El síndrome rectal, definido con urgencia, tenesmo o incontinencia rectal, aunque es más frecuente en la CU, también puede aparecer en la EC.

6.1.3.- Otros síntomas y signos

Son la fiebre, la pérdida de peso y la masa abdominal palpable [94]. La presencia de fiebre puede ser una expresión del propio proceso inflamatorio o como consecuencia de alguna complicación como la aparición de un absceso, perforación o sobreinfección bacteriana. La pérdida de peso, más frecuente en la EC que en la CU, es una manifestación sistémica de la EII, en relación con déficit nutricionales acontecidos ante las alteraciones de la absorción y con una actividad catabólica incrementada como consecuencia de la actividad inflamatoria. Además en pacientes con estenosis, el miedo a presentar cuadros suboclusivos les lleva a la disminución del aporte alimentario.

6.1.4.- Clasificación según el comportamiento clínico

6.1.4.1.- *Clinica inflamatoria*

En pacientes de EC con afectación ileal se manifiesta como dolor leve o moderado en la fosa iliaca derecha sin signos de peritonismo y asociado o no a un dolor periumbilical intermitente. En el caso de EC de colon, el dolor se suele referir en el hemiabdomen inferior junto con diarrea, hematoquezia, tenesmo y urgencia rectal.

6.1.4.2.- *Clinica estenosante*

El dolor es más frecuente que se refiera a tipo cólico y con carácter suboclusivo con dificultad para la expulsión de gases o heces, meteorismo, náuseas y vómitos. En la mayoría de los casos es de afectación ileal. Se suele asociar con pérdida de peso en especial por miedo al paciente a ingerir alimento y en ocasiones con fiebre por sobrecrecimiento bacteriano.

6.1.4.3.- *Clinica penetrante*

Dentro del término penetrante se incluye la presencia de perforación libre, abscesos intraabdominales, fístulas internas (entero-entéricas, entero-ureterovesicales y entero-vaginales) y externas (entero-cutáneas y perianales). Con síntomas muy variados según los distintos tipos.

Los abscesos y las perforaciones pueden dar una clínica silente e inespecífica como astenia, febrícula, pérdida de peso y deterioro del estado general. Hasta cuadros más claros de dolor, fiebre, masa abdominal o abdomen agudo.

La sospecha de fístulas internas lo determinarán los síntomas o signos asociados:

- Fístula entero-vesical: infecciones urinarias de repetición, neumaturia o fecaluria;
- Fístula entero-vaginal: la expulsión de gases o heces por la vagina;
- Fístulas entero-entéricas: la mayoría son silentes, cuando dan síntomas son diarrea secundaria a malabsorción.

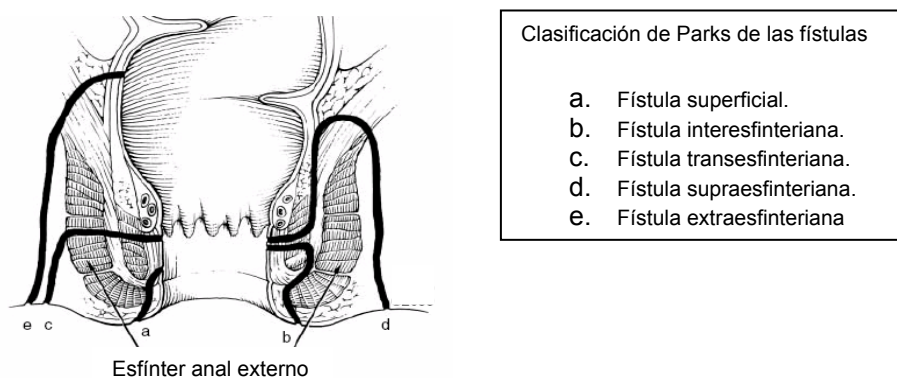
6.1.4.4.- *Enfermedad perianal*

La enfermedad perianal en la EC incluye: la presencia de colgajos cutáneos perianales, úlceras, erosiones, hemorroides, abscesos perianales y perineales, fisuras de localización atípica (fuera de la línea media) y la presencia de fístulas simples o más frecuentemente

complejas. Las lesiones se caracterizan por ser poco sintomáticas, múltiples y con una localización atípica. Después de los repliegues cutáneos las fístulas perianales son la segunda manifestación en orden de frecuencia. Generalmente son crónicas e indoloras presentando varios orificios externos (en región perianal y a distancia).

Es difícil hacer una clasificación sistemática de las lesiones perianales. La clasificación de Hughes-Cardiff [95] se basa en la presencia de tres alteraciones: 1) úlceras, 2) fístulas o abscesos y 3) estenosis pero su aplicabilidad clínica puede ser compleja. La clasificación de Parks [96] es anatómicamente más precisa, utiliza el esfínter anal interno y externo como referencia para clasificar las fístulas, en simples (superficiales, interesfinterianas y transesfinterianas bajas) y complejas (transesfinterianas altas, supraesfinterianas, extraesfinterianas, orificio interno por encima de la línea dentada, múltiples orificios externos).

Figura 4.- Clasificación de Parks de las fístulas



De una forma más esquemática las fístulas pueden ser englobadas en dos grandes grupos: simples y complejas (tabla 3). Su clasificación es fundamental para determinar el tratamiento.

Tabla 3.- Clasificación de las fístulas

Fístulas simples
- Bajas (superficial, interesfinteriana, transesfinteriana baja)
- Orificio externo único
- No dolor ni fluctuación
Fístulas complejas
- Altas (Inter.- o transesfinteriana alta, supra- o extraesfinteriana)
- Múltiples orificios
- Dolor/fluctuación
- Actividad rectal
- Recto-vaginal
- Estenosis anal

6.1.5.- Manifestaciones extraintestinales

Valoraremos la presencia o antecedentes de manifestaciones extraintestinales asociadas a la EII como son las oro-cutáneas (estomatitis aftosa, eritema nodoso y pioderma gangrenoso, entre otras), articulares (espondiloartropatías) y oculares (epiescleritis, uveítis, escleritis y enfermedad corneal).

6.2.- Clasificación clínica de la EC

Como hemos referido previamente la forma de expresarse la enfermedad varía mucho de unos sujetos a otros. Esta variabilidad se halla en la extensión, formas de presentación clínica y en la respuesta a los distintos tratamientos. Por esta razón se han intentado definir subgrupos de la enfermedad según distintos parámetros.

6.2.1.- Clasificación de Viena

La clasificación con más éxito ha sido la presentada en el Congreso Mundial de Viena de 1998 (ver tabla 4), que incluye tres variables: la edad (A), la localización (L) y el comportamiento clínico (B) [97].

- *Edad al diagnóstico*: La edad en el momento de inicio de los síntomas y del diagnóstico influye en el patrón de enfermedad. Los pacientes diagnosticados a edad temprana presentan con mayor frecuencia una localización ileal, historia familiar y más complicaciones estenóticas y fistulizantes. Los pacientes con una edad al diagnóstico más avanzada tienen con mayor frecuencia afectación colónica exclusiva.

- *Según la localización*: La mínima lesión requerida en una localización para considerar su afectación es la lesión aftoide o la úlcera; la presencia de eritema o edema mucoso no es suficiente.

- L1 o ileal: Se considera como tal la enfermedad limitada al íleon terminal, entendiendo como tal el tercio distal del intestino delgado (ID), con o sin participación del polo cecal en continuidad.
- L2 o colónica: Supone la afectación de cualquier localización entre recto y ciego sin participación del ID ni del tracto gastrointestinal superior.

- L3 o ileo-colónica: Enfermedad que afecta al íleon terminal, con o sin participación de ciego en continuidad, y a cualquier localización de colon.
- L4 o gastrointestinal alto: Se considera como tal la enfermedad que afecta a cualquier localización proximal al íleon distal independientemente de que exista o no afectación del íleon terminal o del colon asociada.

- Según el comportamiento clínico:

- B1 o inflamatorio: Las lesiones mucosas iniciales consisten en ulceraciones superficiales de pequeño tamaño (aftas) que progresan a úlceras profundas lineales rodeadas de una mucosa en empedrado. Cursa en forma de brotes con clínica inflamatoria.
- B2 o estenosante: Definido como estenosis fibrosa sin respuesta al tratamiento médico y que precisa cirugía resectiva, estricturoplastia o dilataciones endoscópicas. La sintomatología más frecuente es la presencia de cuadros suboclusivos junto con ausencia de marcadores biológicos de inflamación.
- B3 o fistulizante: Se produce con el desarrollo de perforaciones libres, abscesos intrabdominales, fístulas internas (entero-entéricas, entero-vesicales y entero-vaginales) y fístulas entero-cutáneas. También incluye la enfermedad perianal como son las fístulas y abscesos perianales y úlceras profundas ano-rectales.

Tabla 4.- Clasificación de Viena

Edad al diagnóstico (A)	
A1	≥ 40 años
A2	< 40 años
Localización (L)	
L1	Íleon terminal (tercio distal del íleon, con o sin extensión a ciego)
L2	Colon (incluye recto, excluye íleon terminal)
L3	Ileo-cólica (íleon distal, con colon)
L4	Tracto digestivo alto (con o sin afectación de otros tramos)
Comportamiento clínico (B)	
B1	Inflamatorio (no estenosante, no penetrante)
B2	Estenosante (incluye todo tipo de estenosis)
B3	Penetrante (incluye perianal, masa y absceso)

6.2.2.- Clasificación de Montreal

Recientemente en Montreal [98] (ver tabla 5) se acaba de presentar una nueva propuesta donde se mantiene básicamente la clasificación de Viena, con los siguientes cambios:

- *Edad al diagnóstico*: Se añade un subtipo para los pacientes en los que el debut es antes de los 16 años. Dado que en la edad pediátrica la EC evoluciona con mayor frecuencia a fenotipos complicados de la enfermedad.

- *Según la localización*: Se añade como epígrafe descriptivo en la localización L4 a los pacientes que teniendo otra localización primaria además tengan afección gastroduodenal.

- *Según el comportamiento clínico*: distintos estudios sugieren que la enfermedad perianal es un fenotipo diferente al penetrante, es por ello por lo que se elimina la forma perianal como subtipo de la penetrante, y a cambio se introduce el epígrafe “p” cuando en cualquiera de los fenotipos (inflamatorio, estenosante o penetrante) coexista enfermedad perianal.

En ambas clasificaciones siempre se asigna el comportamiento más grave de los presentados en cualquier momento de la evolución.

Tabla 5.- Clasificación de Montreal

Edad al diagnóstico (A)			
A1	16 años o menos		
A2	17-40 años		
A3	> 40 años		
Localización (L)			
L1	Íleon terminal (tercio distal del íleon, con o sin extensión a ciego)	L1+L4	Íleon terminal+tracto digestivo alto
L2	Colon (incluye recto, excluye íleon terminal)	L2+L4	Colon+tracto digestivo alto
L3	Ileo-cólica (Íleon distal, con colon)	L3+L4	Ileo-cólica+tracto digestivo alto
L4	Tracto digestivo alto (con o sin afectación de otros tramos)		
Comportamiento clínico (B)			
B1	Inflamatorio (No estenosante, no penetrante)	B1p	Inflamatorio con afección perianal asociada
B2	Estenosante (Incluye todo tipo de estenosis)	B2p	Estenosante con afección perianal asociada
B3	Penetrante (Incluye perianal, masa y absceso)	B3p	Penetrante con afección perianal asociada

6.3.- Pruebas complementarias

Ante la sospecha clínica de EC debe procederse a la realización de una serie de exploraciones encaminadas a confirmar el diagnóstico y a valorar la extensión y actividad de las lesiones. Como pruebas convencionales para el diagnóstico de EII se deberá de realizar: 1.- un exámen de las heces, con cultivo para descartar proceso infeccioso; 2.- parámetros de laboratorio básicos, que incluyen la realización de hemograma, bioquímica básica con valoración de hierro, albúmina y marcadores de actividad inflamatoria (fibrinógeno, VSG y PCR), y 3.- pruebas de imagen, donde la colonoscopia con ileoscopia juega un papel principal en establecer el diagnóstico de EII. Si se presupone una enfermedad de ID deberá iniciarse el estudio con un tránsito intestinal baritado, aunque nuevas técnicas diagnósticas, como el papel de la cápsula endoscópica, enteroscopia, tomografía axial computerizada (TAC) y resonancia nuclear magnética (RNM) (usando enteroclis, en las dos últimas) ha ido aumentando en importancia. La cápsula endoscópica podría ser una herramienta de valor diagnóstico en pacientes con sospecha de EC que no ha sido confirmada usando técnicas estándar.

6.3.1.- Endoscopia

La endoscopia es, tanto en su modalidad diagnóstica como terapéutica, de gran ayuda para el manejo de los pacientes con EII. Sus capacidades son: 1.- permite el diagnóstico inicial de EII; 2.- distingue entre EC y CU; 3.- establece la extensión, actividad y gravedad de la enfermedad; 4.- monitoriza la respuesta a tratamientos; 5.- vigila la aparición de displasia o neoplasia, y 6.- en algunos casos permite un tratamiento endoscópico de las estenosis, mediante la dilatación de las mismas.

Desde el punto de vista clínico, la endoscopia digestiva, está indicada en el estudio de pacientes con diarrea crónica, rectorragia, dolor abdominal, rectorragia con cambio del ritmo intestinal, fiebre o afectación del estado general, sospecha fístula intestinal y ante cualquier indicio de EII.

6.3.1.1.- Colonoscopia con ileoscopia

Es la técnica más utilizada y debería realizarse como estudio inicial en todos los pacientes con sospecha de EII. Este procedimiento permite la visión directa con tomas de biopsia de la

mucosa de recto, colon e íleon terminal. Permite distinguir entre una ileítis por EC de una ileítis por afectación retrógrada en la CU, que puede aparecer hasta en un 10% de las pancolitis.

6.3.1.1.1.- Hallazgos endoscópicos

Los hallazgos endoscópicos diferenciales más típicos de la EC son la afectación segmentaria con preservación del recto, la afectación ileal, la presencia de lesiones anales, las erosiones aftoides y la mucosa en empedrado. No existe una buena correlación entre la gravedad endoscópica y la clínica. Las diferencias endoscópicas entre CU y EC se especifican en la tabla 6.

Tabla 6.- Diferencias endoscópicas entre EC y CU.

Características	EC	CU
Hiperemia de la mucosa	Parcheada	Difusa
Superficie mucosa	Nodular y polipoidea	Granular (fina)
Úlceras	Si (sacabocados/aftas)	Sólo en casos graves
Afectación rectal	50%	95%
Distribución de las lesiones	Discontinua	Continua
Estrechez de la luz	Frecuente	Infrecuente
Afectación de íleon terminal	Frecuente	10% (ileítis por reflujo)
Pseudopólipos	Infrecuentes	Frecuentes

6.3.1.1.2.- Hallazgos histológicos

El estudio histológico de las muestras de biopsias o de las piezas quirúrgicas es, junto con la endoscopia, el método fundamental para el diagnóstico de la EII, ya que permite el diagnóstico definitivo entre EC y CU en algo más del 89% de casos [99].

La toma de biopsias debemos realizarla tanto de las lesiones como de la zona adyacente a las mismas, así como en diferentes segmentos de recto, colon e íleon; se deben guardar en recipientes por separado debidamente etiquetados. Para conocer la extensión de la enfermedad se precisa la toma de biopsias de los segmentos presuntamente sanos, dado que el criterio anatomopatológico de afectación por inflamación es superior al criterio endoscópico.

El criterio diagnóstico más característico de la EC son los granulomas no caseificados que constituyen el criterio fundamental aunque se hallan únicamente en un 10-30% de las biopsias endoscópicas y en el 50% de las piezas de resección. Son cuatro las categorías principales que se utilizan en la evaluación de las muestras: 1.- la arquitectura de la mucosa; 2.- la celularidad de la lamina propia; 3.- la infiltración de polimorfonucleares neutrófilos; y 4.- la anormalidad de las células epiteliales. La presencia de inflamación transmural, ulceraciones y

agregados linfoides sin centro germinal son también altamente sugestivos de EC y se incluyen dentro de los criterios diagnósticos clásicos. Asimismo, la presencia de inflamación de carácter discontinuo, inflamación submucosa con arquitectura epitelial conservada y la presencia de fisuras son aspectos que pueden respaldar el diagnóstico de EC. En aproximadamente un 10% de los casos los clínicos y los patólogos no son capaces de distinguir entre una EC colónica y CU refiriéndose a estos casos como colitis indeterminada (CI).

- Características macroscópicas de la EC: Son evidentes tanto en la vertiente mucosa como en la vertiente serosa de la pared intestinal. Las lesiones afectan diversos segmentos separados por áreas aparentemente sanas con una longitud de los mismos variable. El aspecto de la mucosa es heterogéneo, suele haber lesiones de distinto tamaño (y, probablemente, de distinto tiempo de evolución). La combinación de úlceras longitudinales y transversales en una mucosa edematosa es la responsable del aspecto característico de empedrado. Las ulceraciones son más frecuentes en el borde mesentérico del ID. Las lesiones mucosas precoces de la EC son habitualmente pequeñas, 1-2 mm, múltiples y aparecen como placas eritematosas o pequeños nódulos que pueden estar erosionados. Con el tiempo, las lesiones confluyen produciendo úlceras longitudinales que pueden llegar a formar fisuras y con ello ocasionar abscesos o fístulas. Las fístulas se definen como comunicaciones anormales entre la luz del intestino con el mesenterio, con otras vísceras, con la pared abdominal y con la piel. Al tratarse de una enfermedad transmural, la pared intestinal está engrosada con afectación de la submucosa, muscularis propia, subserosa y grasa mesentérica. El mesenterio de la zona afecta está habitualmente engrosado y retraído.

- Características microscópicas de la EC: los hallazgos en la EC son los granulomas epitelioides, la relativa preservación de las criptas o la distribución segmentaria de atrofia y distorsión de las mismas, junto a una inflamación focal o parcheada, preservación de la mucina en el epitelio del borde de las úlceras, y presencia de muestras normales e inflamadas en un conjunto de biopsias tomadas de la misma área (ver tabla 7).

Tabla 7.- Diferencias histológicas entre EC y CU

Características	EC	CU
Distribución	Parcheada	Difusa
Localización	Desde boca hasta ano	Recto ± colon
Recto	Recto en 50%	Recto 95%
Íleon	Íleon terminal 30%	Íleon terminal 10%
Afectación	Transmural	Mucosa y submucosa
Tipo de úlceras	Úlceras en empedrado/ Fisuras.	Mucosa granular ulcerada
Vascularización	Poco llamativa	Importante
Fibrosis / Estenosis	Si	Raro
Fístulas	Si	No
Poliposis inflamatoria	Poco frecuente	Frecuente
Malignización	Rara	Frecuente
Lesiones anales	75%	25%
Edema	Marcado	Poco
Hiperplasia linfoide	Todas las capas	Mucosa y submucosa
Fisuras	Frecuentes	No
Depleción de mucina	Ocasional	Habitual
Metaplasia de células de Paneth	Ocasional, focal	Frecuente
Abcesos criptas	Ocasional	Típico
Irregularidad arquitectura criptas	Focal, atrofia y descenso número	Difusa
Neutrófilos libres en lamina propia	Típico, focal	Infrecuente
Granulomas	Característico	No

6.3.1.2.- Esofagogastroduodenoscopia o endoscopia alta

Está indicada en la EC ante la sospecha de afectación del tracto digestivo superior, hecho que ocurre entre un 2–56 %.

6.3.1.3.- Enteroscopia

Su uso se limita a los pacientes con afectación en el ID diagnosticados por otros medios (cápsula endoscópica, TAC, tránsito gastrointestinal) que precisa corroboración histológica o intervención terapéutica. Los aspectos más relevantes de la enteroscopia en la EC son la posibilidad de obtener biopsias, y sobre todo su aplicación terapéutica como la hemostasia o dilataciones de las estenosis.

6.3.1.4.- Cápsula endoscópica

Nos permite la visualización del ID pudiendo apreciar pequeñas lesiones erosivas o ulceradas, difíciles de diagnosticar por otros medios de diagnóstico por imagen. Puede ser de gran utilidad

en fases iniciales de la EC con lesiones mínimas, para detectar recurrencias de la enfermedad, extensión de la misma, respuesta al tratamiento y para el diagnóstico diferencial entre EC y CI.

Las principales limitaciones de la cápsula endoscópica son la imposibilidad de tomar muestras de tejido, y la aplicación de la terapéutica, así como la posible retención de la cápsula por una reducción del calibre de la luz por estenosis. Cuando por la clínica del paciente se sospecha la posibilidad de una estenosis, se debe realizar un estudio radiológico baritado previo a la exploración con cápsula. No obstante en un 22% pueden existir estenosis asintomáticas.

Las pequeñas lesiones erosivas o ulceradas visualizadas mediante cápsula endoscópica en yeyuno e íleon no son específicas de la EC puesto que también se pueden visualizar en pacientes con infecciones intestinales, isquemia, enteritis post-radiación o enteropatía por fármacos [100].

6.3.1.5.- Ultrasonografía endoscópica

La ecografía convencional y ultrasonografía endoscópica (USE) han sido utilizadas para la evaluación de la actividad de la enfermedad, grado de afectación transmural y el estudio de fístulas y abscesos. En pacientes con EC perianal, la USE permite caracterizar las lesiones, delimitar con precisión la existencia de abscesos ocultos o de lesión esfinteriana y puede utilizarse para monitorizar el tratamiento médico o quirúrgico de la enfermedad fistulosa [101, 102].

6.3.2.- Radiología convencional

Las técnicas de radiología convencional con contraste todavía cuentan con un papel activo en la evaluación de la EII, estando indicadas cuando las técnicas convencionales endoscópicas no pueden ser usadas. Los estudios con contrastes permiten la observación del contorno de la mucosa y del calibre, así como determinadas complicaciones de la enfermedad como la presencia de áreas de motilidad reducida o la presencia de contraste fuera del intestino [103].

6.3.2.1.- Examen del ID

El estudio del ID está indicado en todos los pacientes con EII para evaluar la presencia de enfermedad en el ID y diferenciar la EC de la CU. Además se recomienda antes de una cirugía programada por estenosis en la EC para descartar la afectación a otros niveles.

Hay diferentes pruebas radiológicas para examinar el ID como son: el tránsito intestinal, la enteroclisia y el neumocolon peroral, con un buen nivel de precisión para el diagnóstico de la EC de esta área de intestino. El tránsito intestinal es más simple de realizar, tiene menos efectos secundarios y una mayor aceptación por parte del paciente, por lo que se prefiere en la práctica habitual.

6.3.2.2.- Examen del colon

Los estudios de colon con contraste pueden realizarse como pruebas diagnósticas con contraste simple o doble. Aunque la colonoscopia ha sustituido al enema con bario en la evaluación de la EII, esta última prueba todavía proporciona información valiosa en el diagnóstico de la colitis, al aportar imágenes de áreas de colon que no pueden alcanzarse en caso de colonoscopias incompletas. Es capaz de demostrar lesiones estructurales en la pared del colon (estenosis), informar de la profundidad de las úlceras y evidenciar fístulas.

- Hallazgos radiológicos de intestino delgado y colon

Tienen dos componentes principales: aquellos que afectan a la mucosa y los que afectan a la configuración del tracto digestivo.

- Alteraciones de la mucosa: Los cambios radiológicos más precoces incluyen la presencia de mínimas alteraciones como pueden ser la irregularidad de la mucosa, la espiculación y la presencia de pequeñas ulceraciones. La progresión de estas lesiones se traduce en la aparición de un patrón en empedrado donde las ulceraciones longitudinales y fisuras transversales alternan con islotes de mucosa sana. Las úlceras profundas pueden complicarse con la aparición de fístulas, abscesos, adherencias y perforaciones. En el colon es más frecuente la aparición de pólipos inflamatorios, pseudopólipos y pólipos post-inflamación.
- Configuración de la pared del tracto digestivo: Dado que la afectación es transmural y segmentaria, da lugar alteraciones del calibre en forma de estenosis. En situaciones más avanzadas pueden hallarse dilataciones pre-estenóticas o aparecer fístulas ciegas, entre asas o a órganos vecinos. La alteración clásica del íleon distal es el denominado signo de la cuerda que se refiere a la estenosis ileal. La afectación

asimétrica de la pared intestinal puede dar lugar a la formación de pseudodivertículos por retracción del borde mesentérico intestinal.

6.3.3.- Ecografía transabdominal

Uno de los aspectos más importantes en el manejo de los pacientes con EC es la detección precoz de las complicaciones intestinales. La ecografía transabdominal es capaz de diagnosticar y localizar la inflamación intestinal transmural en la EC y detectar complicaciones tales como fístulas, estenosis y abscesos.

6.3.4.- TC y RNM

La TC abdomen y la RNM con enteroclasia son muy útiles en la evaluación de las características de la pared abdominal del ID (engrosamiento segmentario, estenosis o dilataciones preestenóticas) y en la detección de posibles complicaciones extraluminales (abscesos, adenopatías y afectación mesentérica) [104]. En el caso de la enfermedad perianal, es especialmente útil la RNM de pelvis para valorar los abscesos, fístulas y la extensión de la enfermedad. Su sensibilidad y especificidad es similar a la encoendoscopia anal [105]. La utilización conjunta de dos de tres métodos (RNM, ecoendoscopia y exploración bajo anestesia) permite el diagnóstico de la enfermedad fistulosa perianal con una sensibilidad y especificidad superior al 90%.

7.- TRATAMIENTO DE LA EC

El tratamiento actual de la EC se basa en planes de acción individualizados en función de qué zonas del aparato digestivo estén afectas y de la gravedad de la enfermedad.

Incluye dos fases: la inducción y el mantenimiento de la respuesta o la remisión. La heterogeneidad de la EC tanto en su forma de presentación como en su evolución, ha motivado a los especialistas a intentar identificar subgrupos de pacientes que permitan administrar la terapéutica más apropiada a cada situación específica. La elección del tratamiento vendrá determinada en primer lugar por la gravedad de la inflamación. Para ello se han identificado una serie de índices de actividad que proporcionan una estimación cuantitativa de esta gravedad y, por tanto, son de ayuda en la elección del tratamiento. En la EC no existe una buena correlación entre la semiología clínica, los parámetros de laboratorio y los exámenes endoscópicos y radiológicos. Es decir, la actividad inflamatoria y la gravedad clínica no van parejas.

El índice de Best o índice de actividad de EC (CAI) [106] sigue siendo el más utilizado en los ensayos clínicos controlados. Incluye ocho variables, siete de ellas clínicas y sólo un parámetro analítico (ver figura 5). Es por ello un índice más de gravedad clínica que de actividad inflamatoria. Pese a todos los intentos por encontrar un índice adecuado en la EC que valore la actividad de la enfermedad, que monitorice la respuesta al tratamiento y que pueda predecir la recidiva, la necesidad de cirugía y la recurrencia, ninguno ha sido considerado ideal. Casi 20 años después del diseño del CAI éste sigue siendo el único validado y el más utilizado en los ensayos clínicos protocolizados. Sin embargo, hay otros aspectos que deben tenerse en cuenta, como la posibilidad de la existencia de complicaciones locales o manifestaciones extraintestinales, que requieren un manejo específico. Otras variables clínicas, como el fenotipo de la enfermedad, la localización o la edad de inicio, se han considerado importantes en la elección del tratamiento. Además, recientemente se han demostrado asociaciones entre variantes genéticas del huésped y la toxicidad o la eficacia para el caso de los corticoides (CE), el metotrexato (MTX), las tiopurinas y el Infliximab (IFX). Estudios futuros, usando una combinación de variantes genéticas y test serológicos como un panel para predecir la evolución tras el tratamiento, pueden permitir la individualización de la terapia entre líneas genéticas.

Figura 5.- Cálculo del CDAI

	Días	1	2	3	4	5	6	7	Suma x Factor = Subtotal	
1. N° heces líquidas o muy blandas		_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	2	_____
2. Dolor abdominal (0=no; 1=leve; 2=moderado; 3=grave)		_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	5	_____
3. Estado general (0=bueno; 1=regular; 2=malo; 3=muy malo; 4=pésimo)		_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	7	_____
4. N° de las siguientes manifestaciones clínicas:										
Artritis/artralgia										
Iritis/uveítis										
Eritema nodoso/pioderma/aftas										
Fisura anal/fistula/abceso										
Otras fístulas										
Fiebre > 38,5 en la última semana					_____				20	_____
5. Tomando antidiarreicos (0=no;1=si)						_____			30	_____
6. Masa abdominal (0=no;1=si)						_____			10	_____
7. Hematocrito						_____			6	_____
Hombre (47%) / Mujer (42%) – Valor actual										
8. Peso corporal _____ Peso estándar _____						_____			1	_____
Porcentaje por debajo del peso estándar										
										CDAI: _____

Los apartados 1,2 y 3 hacen referencia a lo ocurrido al paciente en los 7 días previos
Tras la suma se obtendrá una puntuación que corresponderá a:
CDAI < 150 = no activo / CDAI 150-220 = brote leve / CDAI > 220 = brote moderado / CDAI > 450 = brote grave

7.1.- Fármacos en la EC

7.1.1.- Antibióticos

Actualmente se utilizan en complicaciones sépticas, síntomas atribuibles a sobrecrecimiento bacteriano o enfermedad perianal. No se recomienda su uso en las formas ileales salvo sospecha de complicaciones sépticas. Tampoco se considera como primera línea terapéutica en la afectación de colon salvo en casos seleccionados donde se desee evitar la administración de corticoides [107].

7.1.2.- Sulfasalazina

Fue diseñada inicialmente para el tratamiento de la Artritis Reumatoide. Su beneficio en la EII fue descrito por primera vez en 1942 por Nanna Svartz, cuando observó que los pacientes con EII que recibían sulfasalazina para la Artritis Reumatoide también mejoraban de sus síntomas intestinales.

Está compuesta de ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) ligado a la sulfapiridina a través de un enlace diazo. Este enlace se separa fácilmente por azorreductasas bacterianas en el colon para producir los dos componentes. De los dos, el 5-ASA es el componente terapéuticamente

activo, mientras que la sulfapiridina es la molécula transportadora y responsable de sus efectos secundarios [108].

Tras su ingestión, el 20-30% se absorbe en el ID y llega al hígado, eliminándose con la bilis. Casi la totalidad de la molécula inalterada pasa a la parte distal del intestino y al colon, donde gracias a las enzimas bacterianas se rompe el enlace azo, desdoblándose la molécula, en sulfapiridina y 5-ASA. Posteriormente la sulfapiridina es acetilada a *N*-acetilsulfapiridina por el polimorfismo de la *N*-acetiltransferasa 2 (NAT2) [EC 2.3.1.5] en el hígado [109]. La tasa de acetilación está determinada genéticamente y sigue una distribución bimodal con el resultado de individuos clasificados en acetiladores lentos y rápidos.

Aproximadamente el 60% de la población caucásica tienen un fenotipo de acetilación lenta. Estos sujetos muestran una vida media plasmática prolongada (14,8 horas) para la sulfapiridina seguida de altos niveles plasmáticos y una acumulación de mayores niveles plasmáticos con respecto a los acetiladores rápidos (10,4 horas). Los estudios demuestran mayores efectos adversos en los individuos acetiladores lentos [110].

Indicaciones:

- Efectiva en formas agudas leves de colon tanto en CU como en EC.
- Eficaz en mantener la remisión en CU pero es cuestionable en los pacientes con EC.

Pese a sus indicaciones, el 50% de los pacientes que reciben sulfasalazina presentan efectos secundarios dosis dependiente como cefalea, náuseas y dolor abdominal, derivados de la fracción inactiva de la molécula que obligan a suspender la medicación hasta en un 10-20% de las ocasiones. Otros efectos secundarios idiosincrásicos descritos son alteraciones hematológicas (leucopenia, pancitopenia, anemia hemolítica), toxicidad renal y hepática.

Es por ello que su uso queda casi reservado para formas agudas y de mantenimiento cuando se asocian a afectación articular reactiva.

7.1.3.- Aminosalicilatos (5-ASA)

Son aquellos fármacos que contienen en su estructura una molécula del ácido 5-aminosalicílico.

Los efectos secundarios relacionados con la fracción de sulfapiridina, especialmente aquellos efectos dependientes de la dosis, generó más de una década de investigaciones con la intención de encontrar sistemas alternativos para la administración del 5-ASA.

La administración de 5-ASA sin enlace o sin recubrimiento reveló que se absorbía fácilmente en la parte superior del yeyuno pero sin alcanzar concentraciones terapéuticas en el colon. Por ese motivo, se han diseñado diferentes formas de liberación de 5-ASA a nivel intestinal que intentan evitar los efectos adversos de la sulfasalazina mientras mantienen sus beneficios terapéuticos.

- a) Las formas conjugadas (sulfasalazina, olsalacina, blasalazida) profármacos dependientes de la acción de las bacterias azorreductasas del colon.
- b) Las formulaciones de liberación retardada pH dependientes (recubiertos de un copolímero del ácido metacrílico, Eudagrit L o S), y
- c) Los preparados de liberación prolongada, microgránulos de 5-ASA recubiertos de una membrana semipermeable de etilcelulosa que facilita su liberación independientemente del pH intestinal o de la acción de las enzimas.

Los estudios iniciales mostraban que los 5-ASA orales eran efectivos en el tratamiento de la EC activa leve de afectación ileal, ileocólica o colónica, llegando a ser un medicamento popular con limitada toxicidad para la enfermedad leve.

La mesalazina se ha utilizado ampliamente en la inducción y mantenimiento de la remisión en la EC, aunque actualmente su uso en la EC es motivo de controversia. Para inducir la remisión, sólo dosis altas (4g/día de mesalazina) han demostrado ser capaces de disminuir la actividad de la enfermedad [111], aun así, su eficacia terapéutica es inferior a la de los CE, incluida la budesonida. La eficacia de la mesalazina en el mantenimiento de la remisión también ha sido ampliamente debatida, sin que se haya alcanzado un consenso. A partir de estudios recientes con muestras amplias, así como varios meta-análisis, se puede concluir que, en el mejor de los casos, la mesalazina tiene un efecto muy modesto en el mantenimiento de la remisión de la EC y no evita más allá del 10% de las recidivas a dos años vista [112].

Los efectos adversos (EAs) de 5-ASA son la diarrea, cefalea, náusea, rash y trombocitopenia siendo estos últimos raros. La intolerancia aguda que sucede en el 3% de los casos puede semejar un brote de colitis. La mayor precaución la debemos tomar con la aparición de una insuficiencia renal (síndrome nefrótico o nefritis intersticial) aunque es rara e idiosincrásica.

7.1.4.- Corticoides

Se consideran la piedra angular del tratamiento de la EC.

7.1.4.1.- *Budesonida*

La budesonida es un corticoide sintético no halogenado. Se metaboliza de forma extensa por hidroxilación, siendo la isoenzima CYP3A4 de la citocromo P450, que se expresa de forma muy abundante en los hepatocitos y en las células epiteliales intestinales, la principal responsable de su rápida eliminación.

Después de la administración oral y de su absorción, la budesonida sufre un 90% de metabolismo de primer paso hepático formando 6- β -hidroxibudesonida y 16- α -hidroxiprednisolona; teniendo ambas menos de un 1% de la potencia corticoidea respecto de la que tiene la budesonida. Esa es la causa de que sólo tenga una biodisponibilidad oral del 10%, lo cual reduce en gran parte sus efectos a nivel sistémico.

Para que sea efectivo en la EC, el fármaco debe liberarse localmente, de tal forma que las formulaciones actualmente disponibles sólo permiten el tratamiento de la EC confinada al íleon terminal y colon derecho y sólo se utiliza en pacientes con enfermedad leve o moderada baja. Su eficacia es superior a 5-ASA y placebo, pero inferior a la de los CE clásicos [113].

La budesonida presenta menos efectos adversos que los corticoides sistémicos y cuando aparecen estos suelen ser leves o moderados. Se han descrito la dispepsia, cambios en el comportamiento, tales como nerviosismo, insomnio y cambios del estado de ánimo, calambres musculares, temblor, palpitaciones, visión borrosa o erupción cutánea, entre otros.

7.1.4.2.- *Corticoides sistémicos*

Los CE sistémicos son los fármacos más empleados para la inducción de la remisión de los brotes moderados y graves de la EII (CU y EC de cualquier localización) [114], pero sólo una minoría (40-50%) mantiene una respuesta prolongada después de recibir este tratamiento. El resto desarrollan una corticodependencia (30-40%) o corticorretractariedad (10-30%).

Los EAs y la falta de eficacia para mantener la remisión a largo plazo limitan el uso prolongado de los CE (ver tabla 8). Además, la mitad de los pacientes serán corticodependientes o refractarios, y, en conjunto, alrededor del 70% de enfermos recidivan durante el primer año, lo que obliga a buscar alternativas terapéuticas en un porcentaje elevado de pacientes a corto o medio plazo.

Tabla 7.- Principales efectos secundarios de los esteroides

Inmediatos	Aspecto cushingoide, acné, irritabilidad, insomnio, infecciones
Tardíos	Osteoporosis, miopatía
Por hipersensibilidad	Necrosis avascular, cataratas
Exacerbación de enfermedades subyacentes	Diabetes, hipertensión, psicosis

La corticorretractariedad se define como la actividad persistente que no responde al tratamiento corticoideo, tras dos semanas de tratamiento intravenoso en la enfermedad grave, o como máximo un mes de tratamiento por vía oral cuando la actividad es moderada o leve. La corticodependencia se define como la reaparición de los síntomas que se presenta cuando se reduce la dosis de corticoides o el desarrollo de dos o más brotes que precisen corticoides para su control en el período de un año (ó 6 meses).

7.1.5.- Inmunosupresores (IS)

Los fármacos que han demostrado un claro efecto en el mantenimiento de la remisión son la azatioprina (AZA), la 6-mercaptopurina (6MP) y el MTX fundamentalmente.

7.1.5.1.- AZA y 6-MP

La AZA es un profármaco que rápidamente es convertido a 6-MP. Son antimetabolitos de las purinas y los inmunomoduladores más utilizados en pacientes con EII. Las indicaciones actualmente aceptadas en la EC son la inducción a remisión (junto a corticoides) y la prevención de recidiva en los pacientes con corticodependencia y corticorretractariedad, la prevención de la recurrencia post-cirugía y el tratamiento de la enfermedad fistulizante, especialmente las fístulas de localización perianal [115, 116]. Además, tiene un importante efecto ahorrador de CE. La dosis recomendada de la AZA es de 2,5 mg/kg/día y de 6-MP de 1,5 mg/kg/día.

Aproximadamente entre un 15-30% de los enfermos presentan EAs durante el tratamiento que obligan a la retirada del fármaco. Hay dos tipos de efectos secundarios: idiosincrásicos y dependientes de dosis. Entre los primeros se ha descrito la aparición de náuseas y vómitos, rash, pancreatitis, artralgiás o fiebre. El EAs dependiente de dosis más importante es la mielosupresión, aunque la hepatotoxicidad se ha descrito tanto como EAs idiosincrásico como dependiente de dosis. Otros EAs observados son el aumento de incidencia de infecciones víricas y bacterianas a largo plazo.

7.1.5.2.- MTX

Inhibe la proliferación celular (especialmente de los linfocitos) a través de la inhibición de la síntesis de ADN por bloqueo de la dihidrofolato reductasa. Está indicado en la inducción de la remisión y prevención de la recidiva en los pacientes con EC activa, especialmente en los no respondedores a tiopurínicos o que presentan intolerancia a los mismos [117]. También consigue reducir significativamente la necesidad de CE. Las dosis eficaces para la inducción de la remisión son 25 mg/semana y para mantenimiento de la remisión en torno a 15 mg/semana. La biodisponibilidad de la vía oral es muy variable y los estudios que avalan su uso usan la vía intramuscular, siendo la vía subcutánea una alternativa válida. Los EAs incluyen neumonitis, osteopatía, hiperhomocisteinemia, toxicidad hematológica, neurológica y hepática.

7.1.6.- Terapia biológica

A pesar del avance que han supuesto los tratamientos clásicos que incluyen los CE e IS, existe un porcentaje importante de enfermos en los que no se logra un control adecuado de la enfermedad. El mejor conocimiento de la patogenia de la EC y el desarrollo de las técnicas de biología molecular han permitido identificar múltiples dianas terapéuticas potenciales del proceso inflamatorio y desarrollar moléculas que actúan sobre ellas. El término de agentes biológicos engloba una serie de mecanismos terapéuticos que incluyen la administración de sustancias biológicas naturales, tales como productos derivados de la sangre o microorganismos, péptidos recombinantes o proteínas, anticuerpos monoclonales contra sustancias inflamatorias y ácidos nucleicos.

7.1.6.1.- *Anticuerpos monoclonales anti-TNF α* (factor de necrosis tumoral alfa)

Estos nuevos agentes terapéuticos tienen una acción antiinflamatoria selectiva. De todos ellos, solo infliximab y adalimumab son utilizados en la práctica clínica diaria, aunque puede utilizarse como uso compasivo certolizumab.

El IFX es un anticuerpo monoclonal anti-TNF α de clase IgG1 quimérico de administración endovenosa. La dosis de inducción es de 5mg/kg/día a las 0, 2 y 6 semanas. La dosis de mantenimiento es de 5mg/kg/día cada 8 semanas.

Las indicaciones de IFX son la inducción a la remisión en la EC luminal activa de patrón inflamatorio en pacientes con enfermedad grave corticorrefractaria y en la EC

corticodependiente ante el fracaso o contraindicación de tratamiento inmunosupresor. Es eficaz en el mantenimiento de la remisión a largo plazo en los pacientes con EC luminal activa que responden a la pauta de inicio. También induce la remisión y previene la recidiva en pacientes con EC fistulizante no controlada con inmunosupresores.

Los EAs abarcan desde reacciones locales relacionadas con la infusión hasta reacciones sistémicas de hipersensibilidad, complicaciones infecciosas, como el aumento de infecciones oportunistas y tuberculosis, y neoplasias. Se han descrito casos aislados de linfoma, especialmente linfoma hepatoesplénico de células T, en pacientes tratados al mismo tiempo con AZA y anti-TNF- α .

La inmunogenicidad asociada a IFX ocasiona la formación de anticuerpos anti-IFX (ATI) que conllevan un aumento de las reacciones agudas de infusión, que se asocian con frecuencia a la pérdida de respuesta al fármaco. Cuando esto ocurre en la práctica clínica es necesario buscar alternativas terapéuticas que incluyen otras terapias anti-TNF α como adalimumab o certolizumab.

El adalimumab es eficaz también en la inducción de remisión y mantenimiento para EC luminal con ganancias frente a placebo muy similares a las del IFX.

7.2.- Cirugía

La mayoría de los pacientes con EC requerirá al menos una cirugía en el transcurso de su vida. Del 75 al 90% de los pacientes serán intervenidos pasados 20 y 30 años del comienzo de los síntomas, respectivamente. La historia natural de la enfermedad tras la cirugía se caracteriza por la tendencia a la recurrencia, siendo la misma entre el 8 y el 10 % al año [118, 119]. Independientemente del procedimiento a utilizar, el tratamiento quirúrgico no es curativo y el objetivo de la cirugía es tratar las diversas complicaciones, intentando conservar la mayor cantidad de intestino posible. No obstante la cirugía resectiva es la medida terapéutica que consigue mayor tiempo libre de enfermedad en los pacientes con EC grave. Existen diversos procedimientos quirúrgicos que van desde amplias resecciones como la colectomía total hasta técnicas más conservadoras como la estricturoplastia.

7.3.- Manejo de tratamiento de la EC según la ECCO.

Existe una guía consenso para el tratamiento según la localización, la actividad y el comportamiento de la EC (ver tabla 9 y 10) [107].

Tabla 9.- Guía de tratamiento según la localización y la actividad de la EC

	Fármacos (otras opciones terapéuticas)	Grado de recomendación
Afectación de íleon		
Brote leve	Tratamiento de elección: budesonida 9 mg/día	nivel de evidencia 2a grado de recomendación B.
	El beneficio de la mesalazina es limitado	nivel de evidencia 1a grado recomendación B.
	No se recomiendan los antibióticos	nivel de evidencia 1b grado de recomendación A.
	No tratar es una opción para algunos pacientes con síntomas leves	nivel de evidencia 5 grado recomendación D.
Brote moderado	Tratamiento de elección: budesonida 9 mg/día o Corticoides sistémicos	nivel de evidencia 1a grado recomendación A.
	Si se sospechan complicaciones sépticas asociar antibióticos	nivel de evidencia 5 grado de recomendación D.
Brote grave	Tratamiento de elección: corticoides sistémicos	nivel de evidencia 1a grado de recomendación A.
	Si recaída con CE: se debe añadir la AZA o 6-MP	nivel de evidencia 1a grado de recomendación B.
	En el caso de intolerancia a AZA o 6-MP: considerar el metotrexato	nivel de evidencia 1a grado re recomendación B.
	Si existe refractariedad o intolerancia a CE o IS: infliximab	nivel de evidencia 1b grado de recomendación A.
	La opción quirúrgica debe ser considerada y discutida	
Afectación de colon		
Enfermedad distal	Tratamiento tópico debe de considerarse cuando existe afectación distal	nivel de evidencia 5 grado de recomendación D.
Brote leve	sulfasalazina	nivel de evidencia 1b grado de recomendación A.
Brote moderado	Corticoides sistémicos	nivel de evidencia 1a grado de recomendación A.
Brote grave	los corticoides sistémicos	nivel de evidencia 1a grado de recomendación A.
	Si recaída con CE: se debe añadir la AZA o 6-MP	nivel de evidencia 1a grado de recomendación B.
	En el caso de intolerancia a AZA o 6-MP: considerar el metotrexato	nivel de evidencia 1a grado re recomendación B.
	Si existe refractariedad o intolerancia a CE o IS: infliximab	nivel de evidencia 1b grado de recomendación B.
	La opción quirúrgica debe ser considerada y discutida	
Afectación esofágica o gastroduodenal		
	Tratamiento de elección: inhibidores de la bomba de protones	nivel de evidencia 5 grado de recomendación D
	Si es necesario junto con corticoides sistémicos y AZA o 6MP, o si intolerancia con metotrexato	nivel de evidencia 4 grado de recomendación C nivel de evidencia 4 grado de recomendación D.
	En caso de enfermedad refractaria una alternativa es Infliximab	
	Con síntomas obstructivos: dilatación o cirugía	nivel de evidencia 4 grado de recomendación C.

Tabla 10.- Guía de tratamiento según el comportamiento de la EC

Comportamiento	Fármacos (otras opciones terapéuticas)	Grado de recomendación
Corticodependientes		
	Tratamiento de elección: AZA o 6MP	nivel de evidencia 1a grado de recomendación A.
	Si intolerancia o ineficacia de AZA o 6MP: considerar metotrexato.	nivel de evidencia 1b grado de recomendación B
	Si fracasan los IS: infliximab	nivel de evidencia 1a grado de recomendación A,
	La opción quirúrgica debe ser considerada y discutida.	
Corticorefractarios		
	Tratamiento de elección: AZA o 6MP	nivel de evidencia 1a grado de recomendación B.
	Si intolerancia o ineficacia de AZA o 6MP: considerar metotrexato	nivel de evidencia 1b grado de recomendación B.
	Si fracasan IS o se requiere una rápida respuesta, en ausencia de complicaciones sépticas: infliximab.	nivel de evidencia 1b grado de recomendación B.
	La opción quirúrgica debe ser considerada y discutida	
Mantenimiento de la remisión		
dudosa efectividad / no efectivos	Los 5-ASA no hay evidencia consistente de su eficacia	nivel de evidencia 1b grado de recomendación D.
	La efectividad de la sulfasalazina no ha sido establecida.	
	Los corticoides sistémicos no son efectivos	nivel de evidencia 1a.
	La budesonida puede retrasar la recaída, pero no es efectiva el mantenimiento de la remisión para 12 meses.	
Efectividad	AZA (2–2.5 mg/kg/day) o 6MP (1.5mg/kg/día)	nivel de evidencia 1a.
	MTX (15 mg/semana) en pacientes cuya remisión ha sido alcanzado con este agente	nivel de evidencia 1b.
	La administración regular de infusiones de IFX 5 o 10 mg/kg cada 8 semanas son efectivas en el mantenimiento de respuesta inducida por IFX.	nivel de evidencia 1b.
Profilaxis tras resección quirúrgica		
	Tratamiento de elección: mesalazina a dosis de 2 g diarios	nivel de evidencia 1a grado de recomendación B.
	Los antibióticos tipo imidazol son efectivos después de una resección ileo-colon	nivel de evidencia 1a grado de recomendación A.
	En pacientes con alto riesgo (ser fumador, localización de colon y afectación extensa) el tratamiento de elección: AZA o 6MP	nivel de evidencia 2b grado de recomendación C.
Fístulas perianales simples		
Asintomáticas	No hacer nada.	
Síntomáticas	Colocación de un seton (en el caso de proctitis) o fistulotomía	nivel de evidencia 3 grado de recomendación D.
	Se recomienda asociar antibióticos: metronidazol (750–1500 mg/día), o ciprofloxacino (1000 mg/día)	nivel de evidencia 3 grado de recomendación D.
Fístulas perianales complejas		
	De primera elección: los antibióticos y la AZA o 6MP en combinación con cirugía a pesar de la falta de ensayos clínicos	nivel de evidencia 4 grado de recomendación D.
	El Infliximab como una segunda línea de tratamiento	nivel de evidencia 1b grado de recomendación B.
	El setón debe de recomendarse en el caso de proctitis	nivel de evidencia 4 grado de recomendación D.
	Dependiendo de la gravedad del cuadro, una ostomía derivativa puede ser realizada o una proctectomía como última opción	nivel de evidencia 5 grado de recomendación D.
De mantenimiento	AZA o 6-MP, con o sin colocación de seton de drenaje	nivel de evidencia 2b grado de recomendación C.
	Si fracasa: añadir IFX para la inducción y mantenimiento por al menos 1 año	nivel de evidencia 1b grado de recomendación A.

III. FISIOLÓGÍA INTESTINAL

La microbiota intestinal constituye un complejo ecosistema integrado por más de 500 especies bacterianas, que comienza a adquirirse después del nacimiento, donde tanto la velocidad de colonización como el tipo de microorganismos tienen gran repercusión en el huésped. Tiene tres funciones primarias: 1. función de nutrición y metabolismo; 2. función de protección previniendo la invasión de agentes infecciosos o el sobrecrecimiento de especies residentes con potencial patógeno y 3. función trófica sobre la proliferación y diferenciación del epitelio intestinal y sobre el desarrollo y modulación del sistema inmune.

El tracto gastrointestinal constituye una interfase para el contacto y comunicación entre el individuo y el medio externo, donde tiene que establecer un equilibrio adecuado distinguiendo entre patógenos y microbios comensales. Su función protectora depende de los componentes estructurales y funcionales de la mucosa intestinal, del sistema inmune asociado y de sus interacciones con la microbiota intestinal residente y en tránsito.

Las células del epitelio intestinal, el moco que cubre la mucosa, el flujo sanguíneo que la irriga y las secreciones (fosfolípidos, bilis, péptidos antimicrobianos, etc) constituyen de forma conjunta una barrera física y química que contribuye a la defensa del huésped.

1.- MUCOSA INTESTINAL

1.1.- Célula epitelial

La célula epitelial juega un papel muy importante como barrera física y en la logística del sistema inmune. Su posición en primera línea y en contacto con la luz intestinal es crucial para el reconocimiento inicial de moléculas foráneas y para la generación de señales que se transmiten a las células inmunocompetentes del tejido adyacente. Primero existe un reconocimiento a través de receptores innatos o preformados que detectan componentes estructurales conservados y comunes a bacterias o virus, pero ausentes en las células eucariotas. Esto se realiza en el medio extracelular mediante los receptores TLRs de la membrana, y en el medio intracelular mediante las proteínas NOD del citosol [120]. La activación de estos sensores genera inmediatamente señales que convergen en la migración de factores de transcripción al núcleo celular, donde activan la expresión de genes responsables de la síntesis de proteínas proinflamatorias [121], básicamente citocinas y enzimas inducibles con capacidad para generar eicosanoides y óxido nítrico. De este modo, las células epiteliales comienzan a liberar mediadores inflamatorios con capacidad de atraer y

activar leucocitos, aumentar el flujo sanguíneo e incrementar la permeabilidad capilar. Los enterocitos pueden expresar moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II, de modo que en determinadas circunstancias también pueden actuar como células presentadoras de antígenos, sugiriendo que su rol no se limita a la defensa innata sino que también participan en el escalón inicial de las respuestas de tipo adquirido (expansión de clones linfocitarios específicos y generación de anticuerpos).

1.2.- El moco

El moco está integrado por mucinas (glucoproteínas), que son potenciales sitios de adhesión para las bacterias y es producido por las células de Goblet. La síntesis y la composición de las mucinas están reguladas genéticamente en cada individuo; además, las bacterias intestinales pueden contribuir a la regulación del repertorio de mucinas mediante la modificación de la expresión génica de glucosiltransferasas del huésped y por acción de sus propias enzimas glucolíticas [122].

1.3.- Defensinas y proteasas

La síntesis de péptidos antimicrobianos (defensinas) y proteasas en las células de Paneth constituye un mecanismo adicional de defensa del huésped frente a agentes patógenos. Tanto la producción de las defensinas como de las enzimas que las activan puede ser modulada por la microbiota comensal. Por el contrario, algunos gérmenes patógenos están desarrollando mecanismos de resistencia a esta barrera mediante la reducción de la expresión de dichos péptidos [123].

2.- SISTEMA INMUNE

Cuando la barrera intestinal falla, el sistema inmune innato y adaptativo (ver figura 6) colabora para eliminar la invasión bacteriana con una reacción inflamatoria controlada y limitada. Es capaz de reconocer determinados agentes exógenos como componentes estructurales o toxinas microbianas y secretar mediadores celulares como inmunoglobulinas y citocinas responsables del desencadenamiento de la respuesta inmune. La secreción de inmunoglobulina A es una de las primeras defensas de la mucosa frente a microorganismos

patógenos y su inducción en las placas de Peyer y la lámina propia depende de su interacción con la microbiota comensal.

Figura 6 .- Sistema inmune innato y adaptativo

CARACTERÍSTICAS DE LAS RESPUESTA INMUNE	
innata, natural o inespecífica	adaptativa, adquirida o específica
Antígeno-independiente	Antígeno-dependiente
Inmediata	Fase de latencia
Antígeno-inespecífica	Antígeno-específica
No memoria inmunológica	Memoria inmunológica

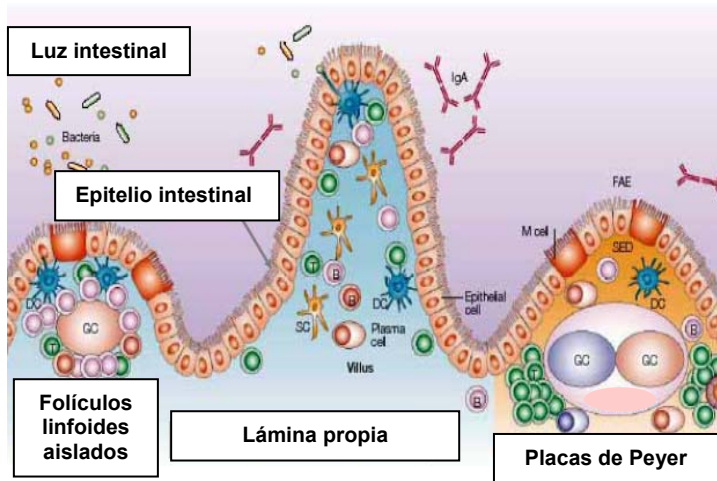
El mecanismo por el cual el huésped es capaz de discriminar entre la microbiota comensal y la patógena se desconoce, pero se supone que existen distintas secuencias señal en los dos grupos de microorganismos cuyo reconocimiento por el huésped desencadena, a su vez, diversas respuestas proinflamatorias o no inflamatorias. La microbiota comensal se considera implicada en el desarrollo de la estructura y la funcionalidad del epitelio intestinal y especialmente de la inmunidad celular y humoral durante el período neonatal.

El sistema inmune asociado a la mucosa intestinal está constituido por un tejido linfoide asociado al sistema gastrointestinal (GALT) que incluye células M, linfocitos y células inmunes asociadas, como macrófagos, eosinófilos, mastocitos y neutrófilos. Los linfocitos se organizan en agregados como las placas de Peyer en el ID, ganglios linfáticos mesentéricos, ganglios linfáticos aislados y células inmunes aisladas, que constituyen los elementos linfoides no organizados de la mucosa e incluyen los linfocitos intraepiteliales y los linfocitos de la lámina propia (ver figuras 7 y 8). Las estructuras organizadas están cubiertas por epitelio especializado que contiene las células M que transportan los microorganismos o estructuras antigénicas desde la luz hasta el tejido linfoide subyacente. Así, la inducción de la respuesta inmune de tipo adquirido tiene lugar fundamentalmente en estas estructuras. Los antígenos son captados por células M, transportados a través del epitelio por dichas células, procesados por macrófagos y células dendríticas (CD) y después presentado a los linfocitos T locales, que estimulan a su vez a linfocitos B locales. Los linfocitos B migran y proliferan en la lámina propia

de la mucosa y producen anticuerpos, IgA sobre todo. Cierta proporción de linfocitos migran hacia las placas de Peyer y hacia los ganglios linfáticos mesentéricos, desde donde pasan a circulación y se distribuyen por el organismo para terminar alojándose en áreas efectoras como la lámina propia y el epitelio intestinal. Ambos sistemas se caracterizan por la localización de señales a través de las cuales linfocitos activados derivados de una superficie mucosa pueden recircular y localizarse selectivamente en la misma o en otras superficies mucosas.

Los antígenos procesados se presentan a linfocitos T en estado *naïve*, con una posterior expansión clonal de células T que pueden dar lugar a linfocitos *helper* (células Th) con distinto fenotipo: Th1, Th2 o T reguladoras (Th3, Tr1 o células CD4-CD25). Las células T reguladoras desempeñan un papel central en la inmunotolerancia porque segregan citocinas reguladoras, de carácter anti-inflamatorio (IL-10, TGF- β) en respuesta a antígenos que se reconocen como comensales y no patógenos. Los linfocitos T *helper* participan también en la selección y activación clonal de células B antígeno específicas para su diferenciación en plasmocitos que segregarán anticuerpos específicos (predominantemente IgA). Las células B y T migran a los ganglios mesentéricos por vía linfática hasta que alcanzan la circulación sanguínea y se distribuyen por el organismo para terminar alojándose en áreas efectoras como la lámina propia y el epitelio intestinal. Uno de los sistemas que tiene más influencia sobre el sistema inmune es el sistema nervioso. Las alteraciones sobre las respuestas inmunes que producen los estados de estrés conllevan a un agravamiento de los procesos inflamatorios. Anatómicamente se ha descrito una íntima relación entre las terminaciones nerviosas intestinales y diferentes tipos celulares inflamatorios e inmunitarios, entre ellos, los mastocitos, hecho que todavía se observa de forma más evidente en los pacientes afectados por EII. Los productos de las células inmunes e inflamatorias sensibilizan los terminales nerviosos aferentes, despolarizan las neuronas entéricas y estimulan el músculo liso y las células epiteliales de la mucosa.

Figuras 7 y 8 .- Sistema inmune asociado al tracto gastrointestinal [124-127]

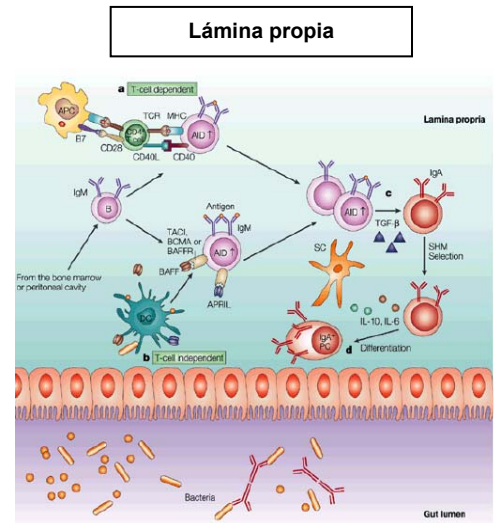
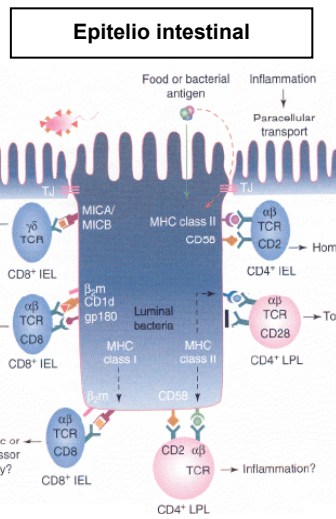
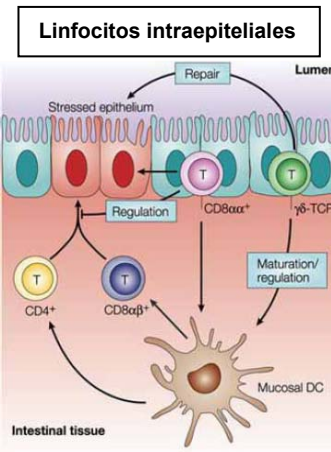


Mecanismos de activación inmune:

- En el epitelio intestinal existen linfocitos intraepiteliales (IEL).
- En la lámina propia de todo el intestino se localizan folículos linfoides, donde encontramos linfocitos T y B, células plasmáticas secretoras de IgA, CD y macrófagos.
- En la capa submucosa, encontramos las Placas de Peyer del ID, compuestas de unos 30 a 40 folículos linfoides.

Términos: FAE, Folículo asociado al epitelio; SED, Cúpula subepitelial; GC, Centro germinal.

Imagen tomada de Nat Rev Immunol 2003;3(4):331-41.



Mecanismos de respuesta inmune: los IEL, las células epiteliales intestinales y la lámina propia donde residen células plasmáticas, linfocitos T, CD, macrófagos, mastocitos y PMN.

Términos: MICA, Genes relacionados con el MHC clase I ; MICB, Genes relacionados con el MHC clase I; TACI, un activador de transmembrana modulador de calcio y ligando de ciclofilina; BCMA, Antígeno de maduración de células B; BAFF, Factor activador de células B perteneciente a la familia de TNF; BAFF-R, Receptor de BAFF; TCR, Receptores de células T.

Imágenes tomadas de Nat Rev Immunol 2003; 3(4):331-41; Nat Rev Immunol 2004; 4(4): 290-300; Immunol Today 2000; 21(3):123-8.

2.1.- Inmunidad innata

Representa la primera línea de defensa contra los patógenos. Se basa en una serie de receptores codificados en la línea germinal que reconocen un número limitado de estructuras altamente conservadas que se encuentran en los microbios. Estas estructuras incluyen los lipopolisacáridos bacterianos, los peptidoglicanos, los ácidos lipoteicoicos, el ADN bacteriano y la flagelina y se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Los PAMPs son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) expresados en las células epiteliales, macrófagos, CD y células B. Este mecanismo de reconocimiento permite a

las células fagocíticas poner en marcha un sistema rápido de defensa, sin embargo, carecen de memoria inmunológica y no pueden mejorar su respuesta tras un segundo contacto con el mismo patógeno.

Entre los receptores de membrana que participan en la respuesta inmune innata implicados en el reconocimiento de patógenos se pueden distinguir: los receptores endocíticos que participan en el proceso de fagocitosis, los receptores activadores que inducen otras respuestas inmunes como la secreción de quimocinas y citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IL-8, IL-1, y TNF α) y la iniciación de la respuesta adaptativa a través de las CD y las proteínas NOD.

2.1.1.- Receptores endocíticos

La activación de los receptores endocíticos pone en marcha las diferentes fases del proceso de fagocitosis que resulta en la ingestión y destrucción de las partículas o microorganismos fagocitados. Entre los principales receptores implicados en el proceso de endocitosis destacan los receptores depuradores presentes principalmente en los macrófagos y que participan en la eliminación de microorganismos y de lipoproteínas modificadas (oxidadas o acetiladas), los receptores de manosa y los receptores de glucano presentes también en las CD.

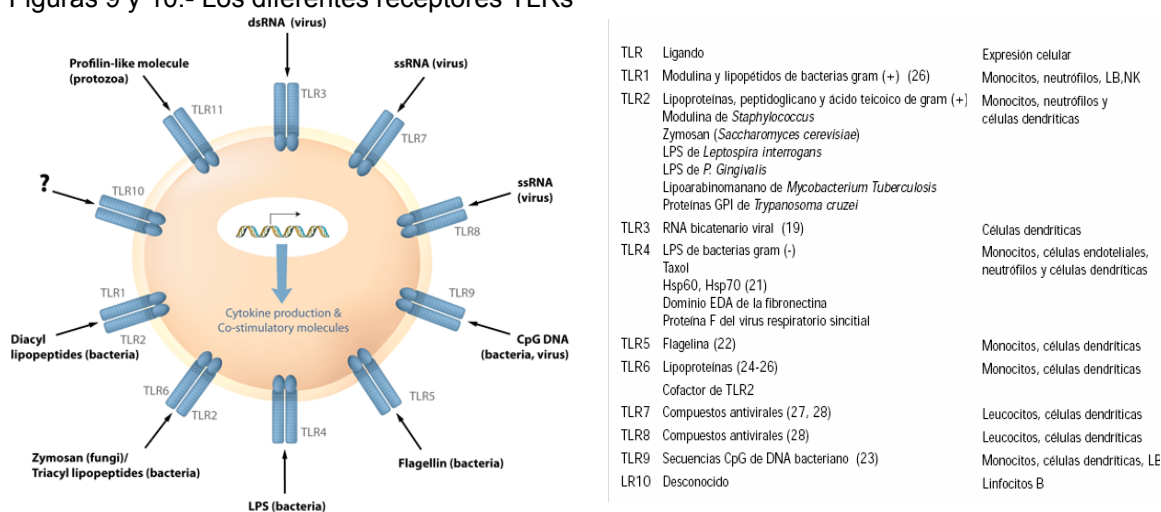
2.1.2.- Receptores activadores

Los receptores *Toll* se describieron inicialmente en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* como moduladores de la polarización dorsoventral durante el desarrollo embrionario. Posteriormente se estableció que eran parte fundamental de la inmunidad innata de la mosca para su defensa en contra de infecciones bacterianas y micóticas. En los mamíferos, existe un sistema de receptores de reconocimiento de PAMPs que por su semejanza en estructura y función con el sistema Toll de *Drosophila* se denominan receptores semejantes a Toll o TLRs. Los receptores TLRs son una familia de proteínas transmembrana con un dominio extracelular caracterizado por LRR y un dominio intracelular homólogo al receptor de IL1 de los mamíferos denominado TIR (Toll-IL-1R), cuya función es el reconocimiento de los PAMPs. Los TLRs se expresan en varios tipos celulares, incluyendo células epiteliales, neutrófilos, macrófagos, CD así como en linfocitos B y T y juegan un papel importante en la iniciación de la respuesta inmune. Son capaces de generar diferentes efectos

sobre los tipos celulares en los que se expresan, protegen al huésped al tiempo que garantizan la tolerancia [128].

Los diferentes TLRs identificados hasta el momento difieren en los ligandos que reconocen, en el patrón de expresión y probablemente los genes que inducen. Los TLRs están implicados en el reconocimiento de una gran variedad de PAMPs. En mamíferos se han identificado diez receptores tipo Toll si bien algunos de los ligandos no han sido aun identificados (ver figuras 9 y 10).

Figuras 9 y 10.- Los diferentes receptores TLRs



La activación del TLR tras reconocer a su ligando específico, induce una cascada de señales intracelulares cuyo último paso es la liberación de NF- κ B, involucrado en la regulación transcripcional de muchos genes inflamatorios. Este es un camino de señal de transducción crucial para la producción de citocinas y quimiocinas, así como la expresión de moléculas co-estimuladoras. Además, pueden inducir la síntesis de péptidos antimicrobianos con capacidad de lisar microorganismos (ver figura11) [129].

La activación de los TLRs en las CD induce su maduración, produciendo cambios en la expresión de receptores de quimiocinas que van a favorecer su movilización a los ganglios linfáticos, producción de citoquinas proinflamatorias (IL12, TNF α) y aumento de la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86). Las CD maduras poseen mayor capacidad de actuar como célula presentadora de antígenos (APC) y estimulan a los linfocitos T e inician la respuesta inmune adaptativa. Por tanto, la activación de los TLRs sirve de enlace entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa [129].

Figura 11.- Cascada de señalización tras la activación de TLRs.

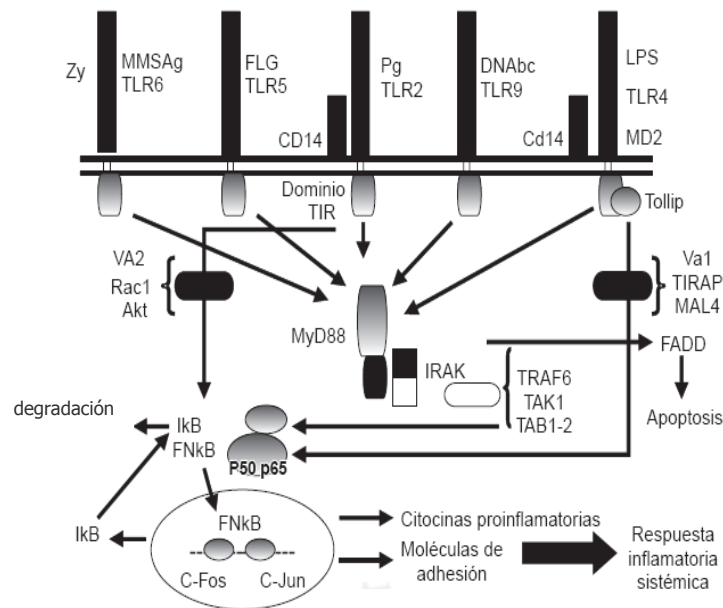


Imagen tomada de <http://web.ula.ve/medicina/webidic/docs/clases/iahula/tema6.pdf>

FLG, Flagellin; Zy: Zymosan; MMSAg: Antígenos de Mycobacteria, Mycoplasma y Espiroqueta; Pg: Peptidoglicano. DNAbc: DNA bacteriano; LPS: Lipopolisacárido; CD14: Proteína de membrana CD14; MD-2: Proteína de membrana MD-2; TIR: Dominio intracelular de TLRs; Tollip: Toll-interacting protein; MyD88: Myeloid differentiation factor 88; IRAK: IL-1 receptor associated kinase; Va1: Vía alterna 1 de activación de factor nuclear kappa Beta; TIRAP: TIR domain containing adaptor protein; MAL-4: MyD88 adaptor-like; VA-2: Vía alterna 2 de activación de factor nuclear kappa Beta; Rac1: Familia de proteínas Rho GTP asa; Akt: Sistema de proteincinasa; TRAF6: TNF receptor-associated factor; TAK-1: Transforming growth factor B activated kinase; TAB1-2: TAK 1 binding proteins; FADD: Fas-associated death domain protein; FNkB: Factor nuclear kappa Beta; IκB: Inhibidor de Factor Nuclear kappa Beta; c-Fos, c-Jun: Genes de respuesta inflamatoria.

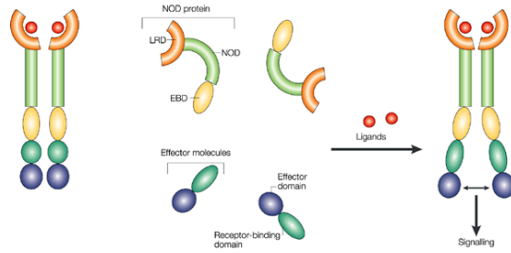
En la EII parece existir una expresión alterada de los patrones de TLRs en la superficie del epitelio intestinal. Los TLRs asociados en la actualidad con la EII son TLR1-TLR2, TLR 2-TLR6, y TLR 4 [130, 131]. Una mayor expresión de éstos receptores toll-like en el epitelio de los pacientes con EII conlleva un importante incremento de la respuesta inflamatoria intestinal [132].

Hay varios estudios sobre el polimorfismo genético de los receptores TLR en la EII, en los que se objetiva una asociación del polimorfismo D299G (Asp299Gly) del gen TLR4 con la EC (OR:2.31-2.45) y CU (OR: 2.05) [65]. En otros estudios, sin embargo, estos polimorfismos no influyen en una mayor susceptibilidad de la enfermedad aunque sí en el fenotipo de ésta [131].

Las proteínas NOD, constituyen un subgrupo diferente de PRRs, se localizan en el citoplasma y reconocen productos bacterianos que entran en la célula, iniciando una respuesta inmune innata (ver figura 12 y 13) [133].

Como se ha expuesto con anterioridad el gen NOD2/CARD15 está implicado en la susceptibilidad a la EC (ver figura 14) y parece estar involucrado en la regulación del estímulo de TLR2. Un defecto de función de NOD2 produce un aumento de citocinas pro-inflamatorias a través de los TLR2, que contribuye a una mayor inflamación en la EC (ver figura 15 y 16) [134].

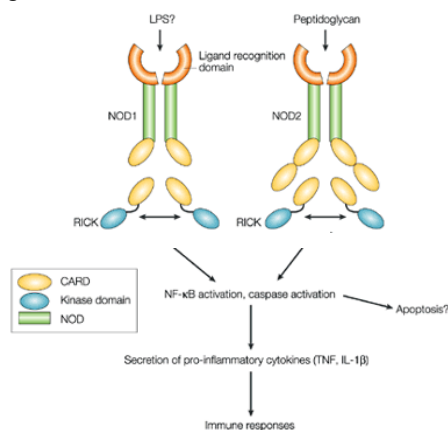
Figura 12.- Estructura de la proteína NOD.



Las sustancias exógenas o endógenas son reconocidas a través del dominio de reconocimiento de ligandos (ligand-recognition domain: LRD) mediante la proteína dominio de oligomerización de la unión a nucleótidos (nucleotide-binding oligomerization domain: NOD), que induce una respuesta a través del dominio de unión efector (effector-binding domain: EBD). La oligomerización es necesaria para la activación de las moléculas efectoras.

Imagen tomada de www.nature.com/.../v3/n5/images/nri1086-f1.gif

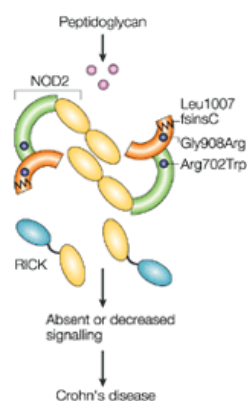
Figura 13.- Cascada de señalización NOD 1 y NOD 2.



La señalización a través de NOD1 y NOD2 está mediado a través de la quinasa RICK, que interactúa con NOD1 y NOD2 mediante interacción homofílica CARD-CARD. RICK media la activación del factor nuclear-κB (NF-κB) a través de un complejo inhibidor común de quinasa NF-κB (IKK) y promotor de activación de caspasa que conduce a la secreción de citocinas pro-inflamatorias. NOD2 reconoce los peptidoglicanos bacterianos. NOD1 reconoce los lipopolisacáridos.

Imagen tomada de www.nature.com/.../v3/n5/thumbs/nri1086-f3.gif

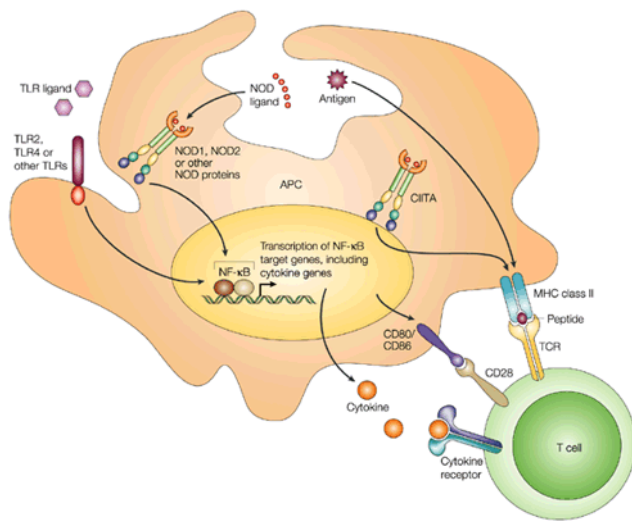
Figura 14.- Variantes de NOD2 en la EC.



Las variantes de NOD que están asociadas a EC (Leu1007fsinsC, Gly908Arg y Arg702Trp) están localizadas en LRRs. Estas tres variantes de EC tienen un defecto de reconocimiento de los peptidoglicanos bacterianos, lo que induce una ausencia o menor activación. El fracaso para identificar ciertas bacterias en el TGI parece disparar una respuesta inflamatoria inapropiada a través de mecanismos independientes de NOD2.

Imagen tomada de www.nature.com/.../v3/n5/thumbs/nri1086-f3.gif

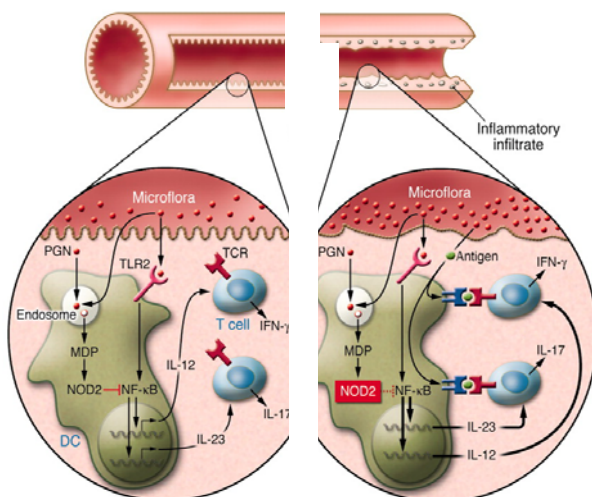
Figura 15.- Interacción entre las proteínas NOD y los receptores TLRs [133]



El reconocimiento intracelular de los ligandos por las proteínas NOD y los ligandos extracelulares por los receptores TLRs inician una cascada de activación que incluye al factor nuclear-κB (NF-κB). Con la consiguiente secreción de citoquinas por la APC, así como la expresión de moléculas co-estimuladoras (por ejemplo, CD80 y CD86) en la superficie de las células APC. La señalización a través de los receptores de células T (TCR) y receptores co-estimuladores, tales como CD28, conduce al desarrollo de células efectoras de antígeno específicas. CIITA: Transactivador del MHC clase II.

Imagen tomada de www.nature.com/.../v3/n5/thumbs/nri1086-f3.gif

Figura 16.- Respuesta inmune en individuos normales y pacientes con EC con defectos en la función NOD2 [135].



En individuos sanos, los PGN son reconocidos por TLR2 en la superficie de las CD en la lamina propia intestinal que conduce a una activación de NF-κB y la producción de citoquinas proinflamatorias. Los PGN, además, se transforman en muramil dipéptido en el endosoma. El MDP es detectado por el NOD2 que inicia un mecanismo de inhibición de la activación de NF-κB con una menor producción de citoquinas inducidas por TLR.

En pacientes con EC con mutaciones en NOD2, se potencia la respuesta inmune innata intestinal con una mayor producción de citoquinas proinflamatorias.

Imagen tomada de J. Clin. Invest. 2007;117(3):514

2.2.- Inmunidad adaptativa

En algunos casos la inmunidad innata resulta insuficiente para eliminar la infección entrante precisándose la activación de la inmunidad adaptativa, que proporciona una respuesta inmune más específica e intensa contra los patógenos. La inmunidad adaptativa, se hace efectiva tras varios días; tiempo requerido para que los linfocitos T y B reconozcan a dichos antígenos, se diferencien y se conviertan en células efectoras.

Las características de la inmunidad adaptativa a diferencia de la inmunidad innata son:

- 1.- Especificidad: Debido a que este tipo de respuesta va dirigida específicamente a una determinada molécula antigénica, la porción del antígeno que es reconocida por los linfocitos se denomina determinante antigénico o epítope;
- 2.- Especialización: el sistema inmune responde de forma distinta a los diferentes antígenos;
- 3.- Memoria: Se refiere al incremento en la intensidad de respuesta ante los subsiguientes contactos con el mismo antígeno;
- 4.- Autolimitación: las respuestas inmunes normales disminuyen a lo largo del tiempo tras la estimulación del antígeno, ya que con la progresión de la respuesta se elimina el antígeno y por consiguiente el estímulo que activa los linfocitos;
- 5.- Discriminación entre propio y extraño: es capaz de reconocer, responder y eliminar los antígenos extraños, mientras permanece inactivo frente a sustancias propias con características antigénicas, que recibe el nombre de tolerancia;
- 6.- Heterogeneidad o diversidad: el sistema inmune de los mamíferos puede discriminar como mínimo 10^9 epítotos distintos;
- 7.- Multifactorialidad: La respuesta inmune depende de múltiples factores, tanto del agente biológico (el tipo, la virulencia, la cantidad y su vía de penetración) como del huésped (edad y su base genética).

La respuesta inmune adaptativa se desarrolla mediante dos mecanismos fundamentales: respuesta inmune humoral donde los linfocitos B juegan un papel preponderante y respuesta inmune celular donde los linfocitos T son las células fundamentales. El proceso comienza con el contacto entre las CPA y los linfocitos *naïves* o inactivos. Entre las CPA, figuran las células M, que transportan los antígenos intraluminales hacia los folículos linfoides o hacia las placas de Peyer y las CD. Éstas últimas a través de las células M o mediante la emisión de prolongaciones entre los enterocitos, son capaces de captar y presentar antígenos intraluminales a las células T *naïves* de los folículos linfoides y de las placas de Peyer. Los linfocitos así activados maduran hacia células T efectoras (Th1 o Th2) o bien hacia células T reguladoras (Th3 o Tr1) y posteriormente se dirigen hacia el sitio de la infección.

La respuesta adaptativa se desarrolla en las siguientes fases:

1. Fase de reconocimiento: consiste en la unión del antígeno extraño a los receptores específicos existentes en la membrana de los linfocitos maduros. Los linfocitos B que median la inmunidad humoral expresan moléculas de anticuerpos sobre su superficie, las cuales se unen a proteínas extrañas, polisacáridos o lípidos en su forma soluble; los linfocitos T responsables de la inmunidad celular, expresan los llamados receptores de célula T (TCR), que reconocen pequeñas secuencias de péptidos antigénicos, pero solamente si éstos se encuentran unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad sobre la CPA. Los primeros en efectuar este reconocimiento son los linfocitos T CD4.

2. Fase de activación: secuencia de eventos que se producen en los linfocitos como resultado del reconocimiento antigénico específico. Todos los linfocitos experimentan dos cambios fundamentales: a) Proliferación: expansión de los clones antígeno específicos y amplificación de la respuesta protectora, en la que asume una función preponderante el linfocito T CD4, capaz de activar a los linfocitos B y T CD8. b) Diferenciación: etapa en la cual se forman las células efectoras y las de memoria.

3. Fase efectora: los linfocitos T diferenciados en células efectoras migran hacia los sitios de agresión, donde desarrollan sus funciones de eliminación de los patógenos, mientras los linfocitos B las ejecutan en los propios órganos linfoides. Muchas de estas acciones efectoras promueven la participación de células no linfoides y de mecanismos de inmunidad innata, como la fagocitosis por parte de macrófagos y neutrófilos; anticuerpos que activan el sistema de complemento; IgEs que estimulan la degranulación de los mastocitos y citocinas segregadas por los linfocitos T.

Una de las consecuencias más importantes de la respuesta inmune adaptativa es el establecimiento del estado de memoria inmunológica, que estriba en la habilidad del sistema inmune para responder más rápida y eficazmente a microorganismos que han infectado previamente al huésped y refleja la preexistencia de una población clonalmente expandida de linfocitos antígeno específicos.

IV: INMUNOPATOGENIA DE LA EC

La patogenia de la EII depende de la interacción entre la susceptibilidad del huésped determinada genéticamente, la inmunidad de la mucosa y la microflora intestinal. Se han identificado defectos en la barrera epitelial, en la inmunidad innata y adquirida así como en los sistemas reguladores encargados de contrarrestar la inflamación.

1.- MICROFLORA INTESTINAL EN LA EC

Los argumentos que sugieren un papel de la flora endógena que conlleva a una respuesta inflamatoria de la mucosa en individuos susceptibles se resumen en la tabla 11 [136].

Tabla 11.- Argumentos que sugieren un papel de la flora intestinal en la EII

- Efectos fisiológicos de la microflora intestinal en las células inmunes y epitelio intestinal
- Fracaso de la inducción de colitis en animales libre de microorganismos
- La proteína NOD2 (mutación asociada con EC) es responsable del reconocimiento de dipéptido-muramilo bacteriano expresado en la mucosa intestinal.
- Las lesiones en la EII ocurren en áreas de alta exposición bacteriana
- El "refluir" de las heces induce la recaída en EC ileal
- La composición de las heces y la flora de la mucosa difiere entre los pacientes con EII y sujetos sanos
- Pérdida de tolerancia a los componentes de la flora endógena en pacientes con EII
- Influencia de los antibióticos y probióticos en animales de experimentación y en algunas situaciones clínicas (como pouchitis, recaída post-cirugía de EC, recaída de CU)

2.- DEFECTOS EN LA BARRERA INTESTINAL

Se han identificado defectos en la barrera epitelial tanto en modelos animales como en humanos como parte de la patología de la EC (ver tabla 12) [62, 63, 137-139].

Tabla 12.- Argumentos que sugieren un papel de la barrera intestinal en la EII

- Ratones con defectos en N-cadherina (componente de unión entre células epiteliales) con desarrollo espontáneo de colitis
 - Ratones SAM^{*}P1/yit con desarrollo espontáneo de ileitis
 - Ratones SAM^{*}P1/yit presentan una acumulación de células globet y células de Paneth, expresión de niveles elevados de NOD2, expresión deficiente de claudina-2 (molécula presente entre las uniones epiteliales)
 - Pacientes con EC y familiares de primer grado presentan alteración de la permeabilidad intestinal
 - Mutación de dos genes de mantenimiento de la integridad barrera intestinal (OCTN1-2 y gen que codifica la guanilato quinasa DLG5)
 - La administración de AINE, AAS e indometacina incrementa la permeabilidad intestinal
- *SAM: Ratón con envejecimiento acelerado

Del estudio con modelos animales en la EII (libre de gérmenes) hemos aprendido que la colitis no se produce en ausencia de bacterias intestinales y que los componentes de la microflora

intestinal normal son necesarios para desarrollar la EII. En el caso de estudios en humanos destacamos que el número de bacterias asociadas con la mucosa inflamada es superior en la EII que en los sujetos control, que la concentración de bacterias en la mucosa se relaciona con la gravedad de la inflamación intestinal y que en la EII se pierde la tolerancia inmunológica de la microflora autóloga generando una respuesta inapropiada y persistente contra ella.

3.- SISTEMA INMUNOLÓGICO

Este sistema representa el brazo ejecutor de la patología en la EII. La respuesta inmune intestinal induce una respuesta inflamatoria con pérdida de tolerancia inmunológica lo que conlleva una persistencia de la inflamación. Disponemos de escasos datos en relación a cómo y por qué se inicia la inflamación aunque sí disponemos de información sobre las células y los productos solubles que median dicha inflamación.

3.1.- Inmunidad innata

Actualmente, se considera que las CD que dirigen la respuesta inmune son responsables de los mecanismos de tolerancia o activación de la respuesta inflamatoria, determinan si el tipo de respuesta debe ser Th1 o Th2 y ligan la inmunidad innata y adaptativa. En pacientes con EC, se ha encontrado que determinadas CD producen niveles elevados de TNF- α en respuesta al LSP. Se han descrito alteraciones de las CD de la mucosa [140] y en la expresión de los TLR en la EII [141], con una significación de estos últimos difícil de esclarecer en el contexto de la patogenia de la EII. Otros hallazgos son una expresión deficiente de las defensinas en las células de Paneth [142] y de forma más importante en pacientes con mutaciones de NOD2 [143].

La asociación de las mutaciones NOD2/CARD15 con la EC es especialmente interesante, ya que este gen está directamente implicado en la respuesta inmunológica innata frente a las bacterias, a través de la regulación de la expresión del NF- κ B, involucrado en la regulación transcripcional de muchos genes inflamatorios. En estos estudios se demuestra no sólo la mera asociación estadística, sino que se sugiere una relación con alteraciones funcionales de la regulación de la respuesta inmune que podrían tener importancia en la génesis de la EC, bien

por facilitar la sobreexpresión de factores proinflamatorios, o bien al contrario por inhibir la expresión de factores anti-inflamatorios [50, 51].

3.2.- Inmunidad adaptativa

La EC expresa principalmente una respuesta Th1, que comienza con la activación de las CPA. Estas células, una vez activadas, presentan los antígenos a linfocitos T inmaduros con la secreción de IL-12, IL-18 y IL-23 con la diferenciación de la célula en Th1 y de IL-6 y TGF- β con la diferenciación en Th17. A su vez, las células Th1 producen IL-2 e interferón- γ (IFN- γ). El IFN- γ aumenta la expresión de las moléculas de adhesión en las células endoteliales lo que facilita el reclutamiento de células inflamatorias y activa los macrófagos. Estos últimos, a su vez, producen radicales libres y grandes cantidades de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18).

Se ha demostrado que los linfocitos T de la mucosa intestinal de los pacientes con EC son resistentes a la apoptosis lo que conduce a la acumulación de células T y a la perpetuación de la respuesta inflamatoria. Este fenómeno parece depender de la IL-6, que es capaz de activar genes anti-apoptóticos en los linfocitos T intestinales.

La inflamación producida en la mucosa intestinal se encuentra amplificada por el reclutamiento de células T *naïve*, células T activadas y polimorfonucleares desde el torrente circulatorio hasta las zonas inflamadas, mediante la interacción entre moléculas de adhesión expresadas en la superficie de los linfocitos y en las células endoteliales. De esta forma, los linfocitos T *naïve* son captados por los ganglios mesentéricos mediante la interacción de L-selectinas asociadas a las células T y su ligando ICAM-1, mientras que los linfocitos T activados se dirigen hacia las placas de Peyer mediante la interacción de la integrina $\alpha 4\beta 7$ y la molécula de citoadhesión adresina mucosal (MadCAM-1) [144].

En conclusión la base fundamental de la EII esta en la presencia de uno o más defectos determinados genéticamente que resultan en una respuesta inmune local que actúa sobre constituyentes normales de la microflora intestinal. Estos defectos en la barrera intestinal potencian la exposición al sistema inmune local de componentes de la microflora. Es importante entender sin embargo, que a pesar de los defectos particulares, el proceso de la enfermedad es inevitablemente canalizado hacia una vía inmunopatológica común comprometiendo una inflamación mediada por células Th1.

4.- MASTOCITOS, HISTAMINA Y EC

Varios estudios sugieren un papel de los mastocitos en el desarrollo de la EII donde la histamina parece estar involucrada. Por ello desarrollaremos la información de que disponemos para luego exponer los fundamentos de nuestra tesis.

4.1.- Mastocitos

Fue Paul Ehrlich quién en 1877, describió los mastocitos por primera vez, llamándolos células cebadas, al observar la gran cantidad de gránulos que llenaban su citoplasma. Se denominan también, de forma más descriptiva, células granulares del tejido conectivo. Pero además de las diferencias morfológicas e histoquímicas, también se diferencian por su contenido de mediadores [145] y en sus respuestas a secretagogos mastocitarios y a agentes estabilizadores.

Los mastocitos son una población de células muy heterogénea que derivan de las células precursoras de la médula ósea y migran a tejidos periféricos como células inmaduras diferenciándose in situ. De esta forma, las características definitivas de los mastocitos van a variar en función del tejido en el que hayan completado su maduración [146]. Los mastocitos maduros son abundantes en los tejidos que están en contacto con el medio externo como ocurre en el tracto digestivo. Más del 40% del volumen total del mastocito está ocupado por las membranas de los gránulos de secreción que se originan en el aparato de Golgi [147]. Sus gránulos contienen gran cantidad de histamina y otras sustancias entre las que destacan diversas proteasas, principalmente dos tipos, las triptasas y las quimasas, que son serínproteasas que se almacenan de forma activa en los gránulos. Entre sus efectos, la triptasa incrementa la permeabilidad vascular [148] y degrada las proteínas de la matriz extracelular [149] permitiendo la migración de las células a través de los tejidos. Las funciones de las quimasas son atraer a los linfocitos, neutrófilos y eosinófilos [150], la reorganización de la matriz extracelular por la degradación de la fibronectina [151] y la activación de otras proteasas de la matriz [152] como son las metaloproteasas. Otros mediadores incluyen eicosanoides y factor activador de plaquetas (PAF).

De la activación inmunológica de los mastocitos resulta la liberación del ácido araquidónico desde los fosfolípidos de la membrana celular que vía lipooxigenasa y ciclooxigenasa da lugar a la formación de prostaglandina D2 y leucotrieno C4 [153].

Otra característica de los mastocitos es que presentan en su superficie gran cantidad de moléculas de adhesión, receptores de la respuesta inmune y otros tipos de receptores que les confieren la capacidad de reaccionar frente a múltiples estímulos específicos e inespecíficos.

Inicialmente se describieron dos tipos de mastocitos, los mastocitos T que sólo contienen triptasa y se localizan en las mucosas y el tejido alveolar y poseen estructuras cristalinas características en sus gránulos, y los mastocitos TC con quimasa, tripasa y carboxipeptidasa A que se encuentran en las submucosas y la piel y se caracterizan por tener unos gránulos amorfos carentes de estructuras cristalinas [154]. A estos dos tipos se ha añadido un tercero, el mastocito C que sólo contiene quimasa, pero no triptasa y se localiza en algunas submucosas como la intestinal y la nasal [155].

Los mastocitos pueden activarse tanto por mecanismos inmunológicos como por estímulos no inmunológicos.

- La activación inmunológica a su vez se divide en dos: 1.- Activación específica (mediada por IgE) se produce al unirse un antígeno específico a las fracciones variables de la IgE, la cual está a su vez unida a través de sus fracciones constantes a un receptor de alta afinidad para IgE denominado $Fc_\epsilon RI$. Es la responsable de la reacción de hipersensibilidad inmediata; 2.- Activación inespecífica (independiente de IgE) que se debe al reconocimiento de componentes bacterianos, neuropéptidos o ionóforos de calcio, proteína catiónica de los eosinófilos, entre otros. Donde los mediadores inflamatorios liberados por los eosinófilos pueden estimular los mastocitos sin mediación de IgE. La respuesta a una estimulación independiente de IgE está condicionada por el fenotipo del mastocito.

- La activación no inmunológica: Entre los mecanismos no inmunológicos se encuentran los neurotransmisores liberados en los terminales nerviosos del tracto gastrointestinal.[156].

Tras estos estímulos los mastocitos pueden producir dos tipos de respuesta, la llamada respuesta inmediata y la respuesta en fase tardía.

- Respuesta inmediata: consiste en liberar, mediante secreción y en pocos minutos, las sustancias almacenadas en los gránulos de secreción, como aminas biógenas (histamina, serotonina), proteoglicanos (heparina, sulfato de condroitina), proteasas y TNF- α .

- Respuesta en fase tardía: implica la síntesis de novo, a 2-4 horas del estímulo inicial, de nuevos precursores como mediadores lipídicos (prostaglandinas, leucotrienos, factor de agregación plaquetaria) y citocinas (TNF- α , IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-16, GM-CSF, MCP-1, IFN- γ) que regulan muchas funciones de las células inflamatorias.

Algunos mediadores mastocitarios de nueva síntesis son factores quimiotácticos, de crecimiento y reguladores, que reclutan y activan otras células pro-inflamatorias como linfocitos, neutrófilos y eosinófilos. Algunas de estas células participan en el mantenimiento de una permeabilidad intestinal aumentada, característica de patologías como la alergia alimentaria y la EII. El tipo de citocinas que contienen son IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-16, IL-18, IL-25, TNF- α , GM-CSF, MCP-1, MCP-3 y MCP-4, regulando la activación de células T y la expresión y secreción de quimiocinas (RANTES y eotaxina) con capacidad de atraer poblaciones leucocitarias [157].

Otra función del mastocito además de su papel en la defensa del organismo es intervenir en la reorganización de tejidos, como la cicatrización de heridas. Estimula la proliferación de los fibroblastos, a la vez que puede iniciar o modular por sí mismo la angiogénesis, que es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes, necesario en todo proceso de remodelación de tejidos [158].

4.1.1.- Funciones de los mastocitos a nivel intestinal

Los mastocitos están presentes en todas las capas del intestino, pero se localizan predominantemente en la lámina propia, en la submucosa y en contacto con las fibras nerviosas, indicando el potencial de estas células en el transporte de iones y en las propiedades de barrera intestinal. Tanto estudios en animales como más recientemente en humanos confirman el papel de los mastocitos en el aumento de la secreción de iones a nivel intestinal [159-163]. La activación de los mastocitos usando anticuerpos IgE resulta en una secreción de cloro que involucra la histamina, los eicosanoides y al sistema nervioso entérico

(SNE) [160]. Además, los mastocitos activados disminuyen la integridad de la barrera intestinal [164].

4.1.2.- Mastocitos y EII

Existen evidencias crecientes de que las enfermedades inflamatorias intestinales no alérgicas están mediadas por mecanismos inmunológicos [164]. Estos mecanismos implican la infiltración y activación de mastocitos y eosinófilos [165] que conllevan cambios en la permeabilidad, transporte y motilidad intestinal junto con la hiperalgesia del intestino [166].

Son McGovern y Archer (1957) los primeros en sugerir que el componente inflamatorio agudo en la CU estaba mediado por los mastocitos. Posteriormente Hiatt y Katz (1962) lo notificaron para la EC [167].

En modelos animales, la administración de sustancias que producen una inflamación intestinal (daño en la mucosa y edema) se acompaña de una hiperplasia y posterior activación de mastocitos. Sin embargo, el mismo tratamiento tuvo poco efecto lesivo en los ratones con déficit de mastocitos, lo que implica la importancia de éstos en el desarrollo de la EII [168].

Existe una asociación entre el estrés, la activación del eje cerebro-intestino y los mastocitos con los mecanismos que median la EII. Se ha evidenciado que el estrés causa una activación de mastocitos más pronunciada en pacientes con EII quiescente que en controles sanos [169].

Las células cebadas desempeñan un papel muy especial y probablemente importante en la activación de los mecanismos proinflamatorios en la pared del tubo digestivo. La relación entre los mastocitos y la EII se basan en los siguientes datos:

4.1.2.1.- Aumento del número de mastocitos en la EII

Se ha observado un incremento de mastocitos en la mucosa del íleon y del colon de pacientes con EC [170, 171]. Sin embargo, en otras publicaciones el número de mastocitos hallados en íleon, colon y recto fue menor comparado con los controles. La casi ausencia de mastocitos en áreas afectadas de EC parece deberse no a la disminución en el número de éstos sino a que con la degranulación no es posible reconocerlos por microscopia convencional. Los estudios

con microscopia electrónica han mostrado un incremento de la degranulación de los mastocitos en las lesiones de EC [167].

El aumento de secreción de histamina induce un edema masivo de la mucosa intestinal y la dilatación de los vasos linfáticos [172]. Además, el incremento del número de mastocitos se ha visto asociado con otras enfermedades relacionadas con la EII como la colangitis esclerosante primaria, que muestra un patrón similar de infiltración por mastocitos [173].

4.1.2.2.- Diferente contenido de los gránulos de mastocitos en la EC

La laminina, una glicoproteína multifuncional no colágena, que es encontrada normalmente en la matriz extracelular, fue detectada en los mastocitos de la muscularis propia (pero no en submucosa) de pacientes con EC, indicando que los mastocitos pueden estar activamente involucrados en la remodelación del tejido en la EC [171]. El número de mastocitos que secretan TNF- α fue también mayor en pacientes con EC que en sujetos sanos, más en áreas inflamadas que no inflamadas [174]. Así, el éxito del tratamiento de la EC con anticuerpos anti-TNF- α podría relacionarse con la neutralización de una excesiva secreción de TNF- α por los mastocitos, lo que apoyaría la contribución de éstos en el desarrollo de la EC. También se ha observado un incremento en la cantidad de mastocitos que secretan IL-16, que se correlaciona con un aumento en el número de linfocitos CD4+ en pacientes con EC activa, lo que indica que esta quimiocina puede atraer selectivamente linfocitos CD4+ involucrados en el área inflamatoria [175].

Las diferentes acciones de los mediadores mastocitarios en la EII sugieren que debe existir un balance entre mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios. Si se altera este equilibrio puede desencadenarse la EII. Existen además mecanismos de amplificación de la señal de degranulación que son el elemento clave en el proceso fisiopatológico de respuesta local de larga duración de los mastocitos asociada con enfermedades como la EII. Hasta el momento se conocen dos vías de amplificación, la histamina y la triptasa, que pueden actuar sobre mastocitos adyacentes de forma autocrina o paracrina.

4.1.2.3.- *Mediadores de activación de mastocitos en la EII*

Son muchos los mediadores y sustancias estudiados en la EII que activan los mastocitos intestinales, como son los componentes asociados a las células epiteliales de ID y colon humanos, c-kit, IL3, la sustancia P, IgE y anti-IgG4 [176-179].

4.1.2.4.- *Evidencia de la degranulación de los mastocitos en la EC*

En 1975, Lloyd y colaboradores observaron que hay una marcada degranulación de mastocitos y células que contienen IgE en la pared intestinal de pacientes con EC [167]. En 1980, Dvorak y colaboradores describieron con más detalle la degranulación de los mastocitos en el íleon de pacientes con EC con técnicas de microscopía electrónica [170]. Posteriormente este hecho fue demostrado mediante técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para la triptasa o quimasa [180].

4.1.2.5.- *Evidencia del efecto de los mastocitos en la EII.*

La evidencia de una marcada degranulación de los mastocitos en las áreas afectas de EC podría explicar ciertas características histológicas de la EC; el marcado edema de la mucosa puede deberse a la liberación de aminas vasoactivas mientras que la ulceración de la mucosa podría resultar de la liberación de enzimas proteolíticas. En modelos con ratas, los mastocitos liberan aminas vasoactivas que son capaces de abrir los espacios intercelulares y crear una hiperpermeabilidad a macromoléculas [167]. La activación de los mastocitos conduce a una hiperemia de la mucosa en el ID en modelos animales [181].

Datos *in vitro* muestran que los mastocitos y eosinófilos podrían estar involucrados en la modulación de la fibrosis en la EC por influencia directa en las propiedades de los fibroblastos [182].

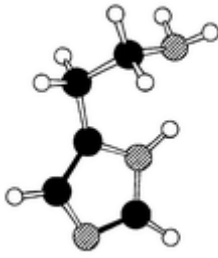
En la EII el papel regulador de los mastocitos en el transporte de iones del tracto gastrointestinal parece estar alterado, con una reducción de la respuesta secretora de iones [183]. En condiciones normales, la activación de los mastocitos resulta en un aumento de la secreción de iones que involucra a la histamina, eicosanoides y el SNE. Esta disminución de la secreción de iones en la EC colónica parece estar relacionada con un defecto a nivel del epitelio colónico [184].

4.2.- La histamina

Pertenece al grupo de las aminas biógenas, que son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que se forman principalmente por descarboxilación de aminoácidos. Atendiendo a su estructura química se pueden clasificar en alifáticas (putrescina, espermidina, espermita, cadaverina), aromáticas (tiramina, feniletilamina) o heterocíclicas (histamina, triptamina) y en función del número de grupos aminas de la molécula podemos hablar de monoaminas (histamina, feniletilamina, tiramina), diaminas (putrescina, cadaverina) o poliaminas (espermidina, espermina).

La historia de la b-aminoetilimidazol o histamina es paralela a la de la acetilcolina. Los dos compuestos fueron sintetizados como curiosidades químicas antes de identificarse su importancia biológica. Se detectaron por primera vez como sustancias que estimulaban el útero en los extractos del cornezuelo de centeno, de los cuales fueron más tarde aislados; ambos resultaron ser contaminantes del cornezuelo por acción bacteriana. Dale y Laidlaw [185, 186] efectuaron estudios farmacológicos con la histamina y descubrieron que ésta estimulaba el músculo liso y tenía intensa acción vasodepresora. Sin embargo, no fue sino hasta casi 20 años después, en 1927, cuando Best, Dale, Dualery y Torpe [187] la aislaron de muestras frescas de hígado y pulmón. Este hallazgo estableció, sin dudas, que la histamina es un constituyente natural de los tejidos. Mientras tanto, Lewis y colaboradores [188] obtuvieron pruebas de que las células de la piel después de estímulos lesivos liberaban una sustancia con las propiedades de la histamina (sustancia H) confirmándose posteriormente que la sustancia H de Lewis era la propia histamina. Se sabe ahora que dicha sustancia producida por el organismo (endógena) interviene en la respuesta alérgica inmediata y es una reguladora importante de la secreción ácida gástrica; también se ha definido su participación como neurotransmisora en el sistema nervioso central.

4.2.1.- Estructura química



La histamina es una molécula hidrófila compuesta de un anillo imidazol y un grupo amino unidos por dos grupos metileno (ver figura 17).

Figura 17.- Estructura molecular de la histamina.

4.2.2.- Síntesis, almacenamiento y degradación

- *Síntesis:* Este autacoide es el producto de la descarboxilación (eliminación de CO₂) de un aminoácido: L-histidina.

- *Almacenamiento:* 1.- En forma de complejos con un polisacárido sulfatado, heparina o condroitina, y una proteína ácida; 2.- Gránulos en los mastocitos [189], leucocitos y basófilos donde la velocidad de recambio es lenta y; 3.- En la piel, músculo, mucosa gástrica e intestinal, pulmones, hígado, SNC, SNA y células de tejidos en regeneración o con proliferación rápida, donde la velocidad de recambio es rápida.

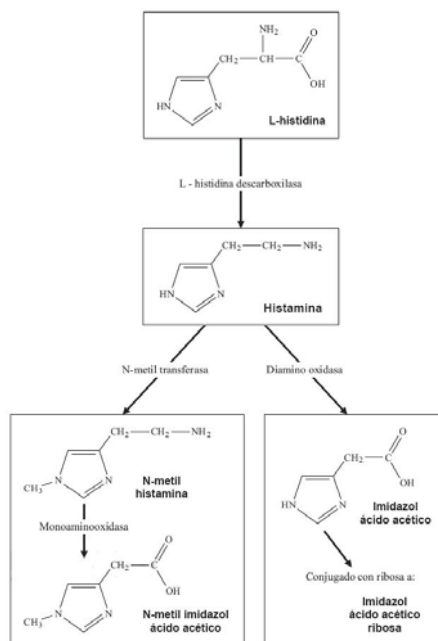
- *Distribución de la histamina:* 1.- Células de síntesis y almacenamiento: mastocitos, basófilos y gránulos de depósito; 2.- Células de síntesis y liberación continua: células de epidermis, mucosa gástrica, neuronas histaminérgicas y; 3.- Tejidos: tracto gastrointestinal, mucosa del árbol bronquial, sistema nervioso central, tejidos en regeneración y síntesis por bacterias gastrointestinales

- *Liberación:* Se libera desde los gránulos (como transmisor periférico) por exocitosis debido a diferentes estímulos como son: 1.- Procesos fisiológicos como la secreción gástrica; 2.- Procesos patológicos como la inflamación; 3.- Agentes químicos como los venenos y algunos fármacos (succinilcolina, morfina, medios de contraste, expansores de plasma y vancomicina); 4.- Agentes físicos como las radiaciones, el frío, el calor y los traumatismos; 5.- Los niveles aumentados de GMP_c facilitan la liberación y; 6.- Desde las neuronas se libera igual que otros neurotransmisores.

- *Inactivación o metabolismo de la histamina:* 1.- Más del 50% se convierte en ácido metilimidazol acético. La histamina sufre la metilación del anillo por la enzima histamina-N-metiltransferasa (HNMT), posteriormente gran parte del producto, N-metilhistamina, es transformado por la monoaninoxidasa a ácido N-metilimidazol acético [190]; 2.- Aproximadamente el 25 % se

convierte en ácido imidazol acético mediante la desaminación oxidativa por acción de la diamino oxidasa. Ambos metabolitos, el ácido N-metilimidazol acético y el ácido imidazol acético, poseen poca o nula actividad y son excretados por la orina (ver figura 18). 3.- El resto se elimina como histamina libre o metilhistamina.

Figura 18.- Síntesis y metabolismo de la histamina.



4.2.3.- Histamina en la EII

Los datos de que disponemos en relación con la histamina y la EII son:

4.2.3.1.- Secreción aumentada de histamina

La histamina está involucrada en la patogenia de la EC tal como lo demuestran Knutson y colegas al hallar que la secreción de histamina está incrementada en los pacientes con EC comparados con controles sanos, y que dicha secreción se relaciona con la actividad de la enfermedad [191]. Se han detectado además niveles elevados de N-metilhistamina en la orina de los pacientes con EC activa [192, 193] y fecales en pacientes con EII, comparado con controles sanos [194]. Otros datos a favor del papel de la histamina en la EC son los obtenidos por Fox y colaboradores que demuestran cómo los mastocitos aislados de la resección de colon de pacientes con EC activa liberan más histamina que aquellos de pacientes con colon normal, cuando eran estimulados por un mismo antígeno [176]. Las muestras endoscópicas colorrectales cultivadas de pacientes con EC secretan más histamina estimuladas por la

sustancia P aislada o la sustancia P con anti-IgE que las muestras de sujetos controles. Así, parece probable que exista una interacción de los mastocitos con el sistema nervioso entérico que regula la liberación de la histamina en la EC [178].

4.2.3.2.- Efecto de la histamina en pacientes con EII

Son escasos los datos de que disponemos sobre la histamina y los efectos que produce en la EII. La histamina produce una mayor secreción de cloro en las células epiteliales, debido por una parte al incremento del metabolismo del ácido araquidónico, con un aumento de prostaglandinas y leucotrienos [195] y por otra parte al interaccionar con los receptores H1 incrementando la secreción de sodio e inhibiendo la absorción de cloro, lo que sugiere que la histamina puede ser un mediador de respuesta para la diarrea en la EII [196]. Sin embargo, otros estudios revelan que en la EC colónica, la secreción de iones está disminuida, probablemente debido a la alteración de la barrera epitelial [184].

4.2.3.3.- Actividad de las enzimas que degradan la histamina

En el intestino humano se han hallado las enzimas que degradan la histamina, HNMT (E.C. 2.1.1.8.) y DAO (E.C.1.4.3.6) o también denominada proteína de unión a amiloride (ABP) [197, 198].

HNMT es una enzima citosólica involucrada en la inactivación de la histamina intracelular, mientras que la enzima DAO es secretada y juega un papel en la inactivación y eliminación de la histamina extracelular [199]. Una capacidad reducida de degradación de la histamina debida a una disminución de la actividad de la DAO en la mucosa intestinal parece ser un componente crítico en el desarrollo y progresión de la EII [200]. Estudios sobre la enzima HNMT establecen una escasa contribución de ésta en el metabolismo de la histamina en la mucosa intestinal, ya que la actividad de HNMT es casi insignificante comparada con la actividad de la DAO [201].

4.3.- Diamino oxidasa (DAO)

La DAO degrada las aminas primarias en aldehído, peróxido de hidrógeno y amonio. Cataboliza una gran variedad de sustratos incluyendo la histamina, y es principalmente expresada en el riñón y mucosa intestinal así como placenta, timo y vesículas seminales [202]. Esta enzima parece jugar un papel importante en la inactivación y eliminación de la histamina

extracelular [199]. También está involucrada en la regulación de la división o diferenciación celular en los tejidos de rápida proliferación, como son la médula ósea y la mucosa intestinal, y puede actuar como un ligando neurotrópico [202].

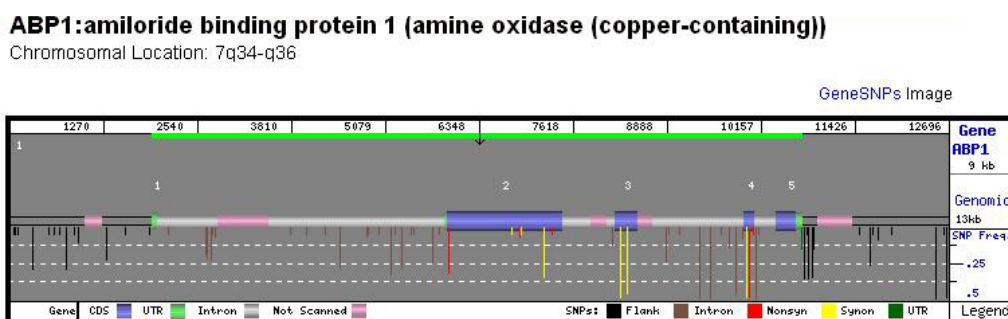
La actividad de la DAO está aumentada durante la hiperplasia adaptativa después de un daño en el tracto gastrointestinal [203] y es usada como un marcador de la integridad de la mucosa. De hecho, la actividad sérica de la enzima es modificada por varios factores, como son quemaduras graves o daño intestinal como en el causado por enteropatías graves y cirugías abdominales, quimioterapia y daño renal [202].

La actividad de la DAO en la mucosa intestinal esta disminuida aproximadamente un 50% entre los pacientes con EII, tanto en la EC como en la CU, comparado con individuos sanos [197, 204, 205]. Se objetiva una correlación entre la menor actividad de la enzima y la gravedad de los índices histológicos. Tambien se objetiva una mayor tasa de recurrencia de EC postcirugía en pacientes con baja actividad. La DAO podría ser un marcador útil para predecir el riesgo de recurrencia o complicaciones anastomóticas en la EC [204]. Sin embargo, la razón por la que existe un descenso de la actividad enzimática de la DAO no es bien conocida, pero parece que puede explicarse en parte por el polimorfismo genético de la misma.

4.3.1.- Estructura genética de la DAO.

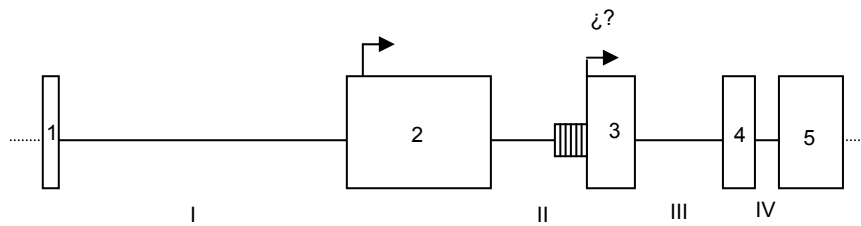
La secuencia genética de la DAO humana ha sido obtenido dentro de un fragmento de 9 kilobases (Kb) localizado en el cromosoma 7q34-q36 [206]. El gen esta compuesto por 5 exones y 4 intrones (ver figuras 19 y 20).

Figura 19.- Estructura genética de DAO. <http://egp.gs.washington.edu/data/abp1/>



Términos. CDS , Exones; UTR,Regiones no traducidas flanqueantes.

Figura 20.- Diagrama esquemático del gen de la DAO humana.



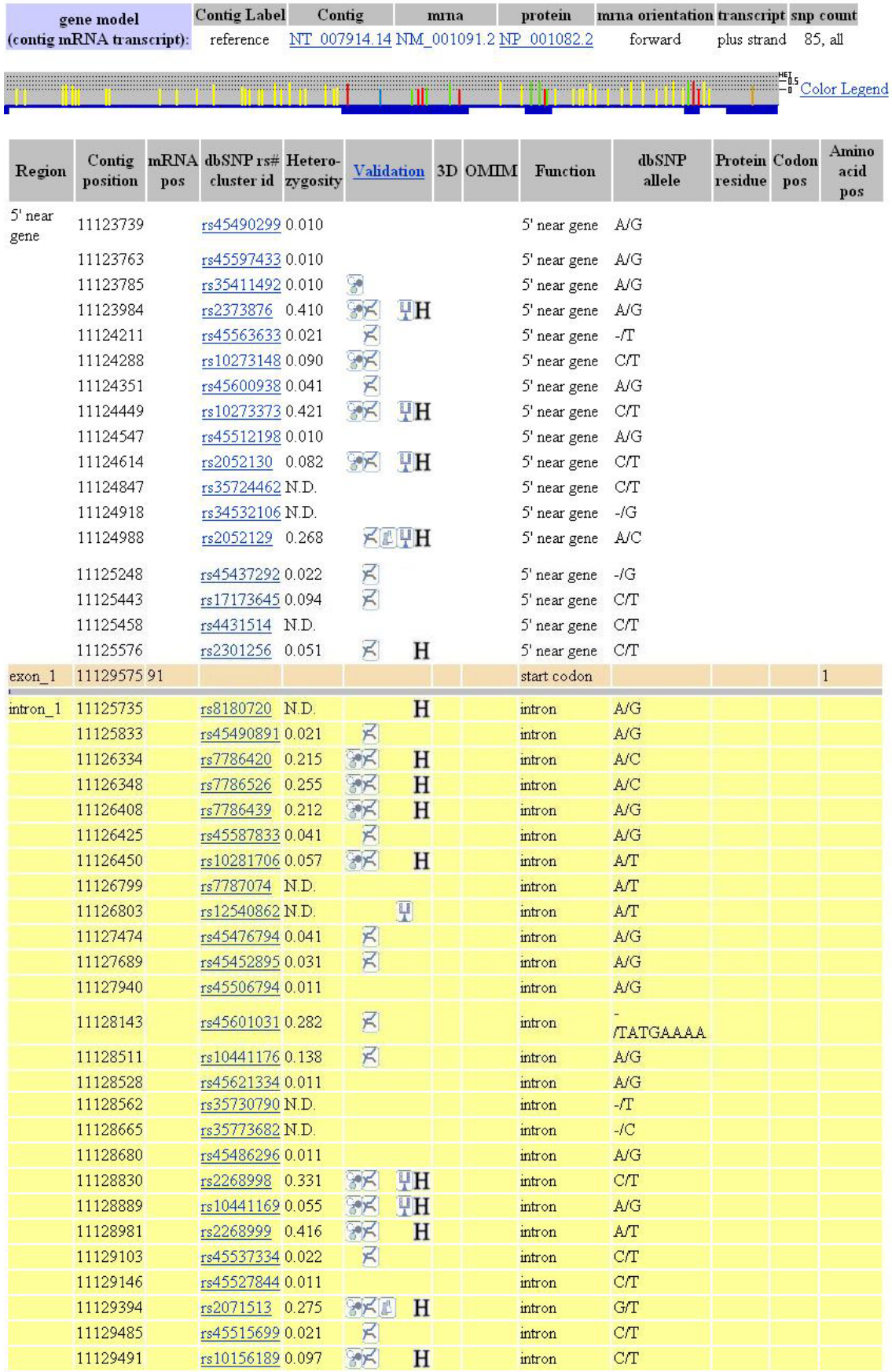
Los cinco exones vienen representados por cajas blancas y el número arriba. Los intrones están representados por líneas continuas y sus números en romano. El inicio de la traducción del gen ABP1 está representado por una flecha al comienzo del exón 2. El promotor interno alternativo en el intrón II está representado por una caja con líneas cuya iniciación viene representado por una flecha con interrogantes.

El primer exón es muy corto, contiene una secuencia no codificante y está separado del segundo exón por un gran intrón de 4,5 kilobases. El segundo intrón participa en el control de la expresión del gen. El ARN mensajero contiene la secuencia de exones 3, 4 y 5 y un fragmento homólogo del segundo intrón de la secuencia [207]. Son muchas las diferencias halladas entre la secuencia de exones e intrones en este gen que son debidas a su polimorfismo genético [208].

4.3.2.- Polimorfismos genéticos de la DAO

El gen que codifica para la DAO es polimórfico. Son un total de 85 los polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP) localizados e identificados en el gen humano de la DAO (17 localizados en los exones; 7 de ellos con sustitución de aminoácidos, denominados SNP no sinónimos) según datos del Centro Nacional de información biotecnológica (NCBI) (ver figura 21) [209].

Figura 21.- Polimorfismos genéticos SNP en el gen de la DAO



exon_2	11129621	137	rs10156191	0.368					missense	T	Met [M]	2	16
				0.368					contig reference	C	Thr [T]	2	16
	11130053	569	rs34502771	N.D.					frame shift	A	Lys [K]	2	160
				N.D.					contig reference	-		2	160
	11130468	984	rs45568935	0.051					synonymous	T	Ser [S]	3	298
				0.051					contig reference	C	Ser [S]	3	298
	11130536	1052	rs35929142	0.025					missense	A	Asp [D]	2	321
				0.025					contig reference	G	Gly [G]	2	321
	11130569	1085	rs1049742	0.122			Yes		missense	T	Phe [F]	2	332
				0.122			Yes		contig reference	C	Ser [S]	2	332
	11130600	1116	rs41465145	0.071					synonymous	T	Gly [G]	3	342
				0.071					contig reference	C	Gly [G]	3	342
	11130903	1419	rs2071514	0.432			Yes		synonymous	A	Ala [A]	3	443
				0.432			Yes		contig reference	G	Ala [A]	3	443
	11131011	1527	rs45558339	0.010					missense	A	Ile [I]	3	479
				0.010					contig reference	G	Met [M]	3	479
intron_2	11131563		rs2301257	0.462			H		intron	C/T			
	11131826		rs45455308	0.215					intron	A/G			
exon_3	11131931	1725	rs10893	0.500			Yes		synonymous	G	Pro [P]	3	545
				0.500			Yes		contig reference	A	Pro [P]	3	545
	11132018	1812	rs1049748	0.500			Yes		synonymous	C	Pro [P]	3	574
				0.500			Yes		contig reference	T	Pro [P]	3	574
	11132071	1865	rs6943147	N.D.			Yes		missense	G	Arg [R]	2	592
				N.D.			Yes		contig reference	C	Thr [T]	2	592
	11132072	1866	rs6943420	N.D.			Yes		synonymous	C	Thr [T]	3	592
				N.D.			Yes		contig reference	G	Thr [T]	3	592
intron_3	11132168		rs11981217	N.D.					intron	A/G			
	11132386		rs13235484	N.D.					intron	C/G			
	11132452		rs13235592	N.D.			H		intron	C/G			
	11132466		rs13235597	N.D.			H		intron	C/G			
	11132546		rs45453396	0.358					intron	A/G			
	11132589		rs45467300	0.043					intron	C/T			
	11132732		rs45538435	0.011					intron	A/G			
	11132896		rs11981415	0.113			H		intron	C/G			
	11133008		rs10952294	0.500					intron	C/T			
	11133142		rs4725968	0.500					intron	A/G			
	11133302		rs45580934	0.033					intron	-/AAAAAG			
	11133406		rs45615934	0.246					intron	A/G			
	11133487		rs2071515	0.496					intron	C/G			
	11133594		rs11771771	0.069					intron	A/G			
exon_4	11133638	1980	rs4725373	0.499			Yes		synonymous	A	Ser [S]	3	630
				0.499			Yes		contig reference	G	Ser [S]	3	630

	11133681	2023	rs1049793	0.500		H	Yes	missense	G	Asp [D]	1	645
				0.500		H	Yes	contig reference	C	His [H]	1	645
	11133723	2065	rs35070995	0.037				missense	C	His [H]	1	659
				0.037				contig reference	A	Asn [N]	1	659
intron_4	11133764		rs3735076	0.500				intron	C/T			
	11133810		rs45498500	0.021				intron	C/G			
exon_5	11134382	2415	rs12539	0.238		H		3' UTR	C/T			
3' near gene	11134415		rs2071517	0.428		H		3' near gene	A/G			
	11134449		rs45615242	0.011				3' near gene	C/T			
	11134470		rs34090933	0.457				3' near gene	-/CA			
	11134531		rs4725969	0.450				3' near gene	C/T			
	11134541		rs4725374	0.256				3' near gene	C/T			
	11134627		rs4725970	0.222		H		3' near gene	C/T			
	11134725		rs4725375	N.D.		H		3' near gene	A/G			

Términos: rs, referencia de SNP; A, adenina; C, citosina; G, guanina; T, timina.

De los SNP no sinónimos hallados para el gen de la DAO sólo el SNP con referencia refSNP ID: rs1049793 y localizado en el exón 3 C2029G, que codifica para una proteína alterada con la sustitución del aminoácido histidina por aspártico en la posición 645, ha demostrado una menor actividad de la enzima [202]. Un estudio realizado en 134 sujetos de raza blanca demostró que aquellos individuos con la sustitución del aminoácido Asp645His presentaban menor actividad de la DAO comparado con no portadores con un efecto significativo dosis gen. Los individuos heterocigotos mostraron valores de actividad enzimática V_{max}/K_m de 66% y los homocigotos de 51% comparado con los no portadores de variantes [202], con una mayor actividad en mujeres respecto a los hombres [210]. Estudios preliminares indican que este SNP ocurre con una frecuencia global cercana al 0.30 (es decir, el 30% de los alelos mutados), con frecuencias de la variante de 0.305 (en 118 genes europeos), 0.30 (en 120 genes europeos), 0.318 (en 88 genes europeos) y 0,306 (en 268 genes europeos) [202, 211].

Otros SNP no sinónimos estudiados no demuestran cambios en la actividad enzimática de la DAO [202]. En el caso del SNP no sinónimo con referencia refSNP ID: rs4558339 con cambio de aminoácido de metionina a isoleucina en la posición 479 y el SNP con referencia refSNP ID: rs35070995 con cambio de aminoácido asparagina por histidina en la posición 659, no parece existir una mayor alteración en las propiedades de la enzima porque en ambos casos los aminoácidos son sustituidos por otros de similar tamaño y propiedades. Otros SNP con referencia refSNP ID: rs10156191 con cambio de aminoácido treonina a metionina en la

posición 16 y con referencia refSNP ID:rs1049742 con la sustitución de serina por fenilalanina en la posición 332 no se asocian a cambios en la actividad enzimática.

4.3.3.- Polimorfismos genéticos de la DAO y la EII

Son muy escasos los estudios realizados sobre la EII en relación al polimorfismo genético de la DAO y su actividad enzimática. En la EII el análisis de los diferentes polimorfismos genéticos de la DAO (mediante polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) como son Sspl, Dral, Hindi y Stul) no evidencia efecto de estas mutaciones en la actividad de la enzima DAO ni en la expresión fenotípica de la enfermedad [212-214].

El primer estudio que relaciona en la EII un SNP no sinónimo para la enzima DAO con cambios relevantes en el fenotipo, se realizó en pacientes con CU [201]. Este estudio demostró que la gravedad de la enfermedad está influida por el SNP no sinónimo con referencia refSNP ID: rs1049793, que codifica para una proteína alterada his645asp. Los individuos portadores de la mutación muestran una mayor susceptibilidad para la CU y mayor actividad de la enfermedad, precisando con frecuencia un tratamiento inmunosupresor o cirugía para el control de la enfermedad. Se ha postulado que esta mutación específica podría ser un marcador de refractariedad para terapias estándar de la CU (sulfasalazina, aminosalicilatos y corticoides) [201].

Este SNP no sinónimo que ha demostrado su influencia en la susceptibilidad y la expresión fenotípica de pacientes con CU, no ha sido estudiado en pacientes con EC. Aunque la CU y la EC tienen bases etiopatogénicas y expresiones fenotípicas diferenciadas, nos planteamos si el polimorfismo no sinónimo con referencia refSNP ID: rs1049793 puede relacionarse con la susceptibilidad a padecer EC, e influir sobre su fenotipo y respuesta al tratamiento.

HIPÓTESIS

La EC es una inflamación crónica del tracto digestivo que parece deberse a una alteración de la regulación de la respuesta inmune del huésped frente a la flora bacteriana residente y a otros antígenos intraluminales en sujetos susceptibles genéticamente. De entre los múltiples factores y células que parecen participar en los mecanismos fisiopatológicos de la EC, uno de ellos es un incremento de la histamina, que en parte parece deberse a una capacidad reducida de la degradación de la histamina por la enzima DAO.

La hipótesis de este proyecto de investigación es que un determinado polimorfismo genético de la enzima degradante de la histamina, la DAO puede influir sobre la susceptibilidad genética para la EC y repercutir en los distintos fenotipos (modos de expresión clínica) y respuesta terapéutica.

OBJETIVOS

1.- OBJETIVO PRIMARIO

Evaluar si hay una mayor proporción del polimorfismo genético de un sólo nucleótido no sinónimo (refSNP ID: rs1049793), que produce una sustitución de un aminoácido en la región codificante de la enzima DAO, en pacientes con EC comparado con controles sanos.

2.- OBJETIVOS SECUNDARIOS

Evaluar si existen diferencias en la proporción de éste polimorfismo genético de la DAO en relación con las distintas variables fenotípicas de la EC. Las variables estudiadas son la edad, antecedentes familiares, tabaquismo, cirugías previas, localización (íleon, colon, íleo y colon o tracto gastrointestinal superior), comportamiento (inflamatorio, estenosante, penetrante), existencia de enfermedad perianal, complicaciones intraabdominales (abscesos, perforación, fístulas, cirugía), manifestaciones extraintestinales y tratamiento concomitante (inmunosupresor, terapia biológica y resección intestinal).

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

1.- POBLACIÓN A ESTUDIO

Se incluyen un total de 210 pacientes consecutivos de raza blanca con EC controlados en la Unidad de Enfermedad Inflamatoria Intestinal de un centro de referencia terciario (Hospital Clínico San Carlos) en Madrid, España. De los 210 pacientes, 117 (55,2%) son mujeres (media de edad de $42,12 \pm 13,54$ años) y 95 (44,8%) son hombres (media de edad de $41,74 \pm 13,87$ años), con una mediana de duración de la enfermedad de 8,7 años y un intervalo intercuartílico (RIC) de 4,07-14,52 años.

El diagnóstico de EC se obtuvo mediante datos clínicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos, de acuerdo a los criterios de Lennard-Jones. Las características fenotípicas de los pacientes se establecieron mediante una revisión de la historia clínica, una entrevista personal con los pacientes y la cumplimentación de un cuestionario clínico. Este cuestionario incluía datos como: fecha de nacimiento, sexo, antecedentes familiares de EII (definidos como la presencia de enfermedad en familiares de 1^{er} ó 2^o grado), edad al diagnóstico, seguimiento en años, historia de tabaquismo, cirugías previas (adenoidectomía, amigdalectomía, apendicectomía), manifestaciones clínicas extraintestinales (articular, cutánea, ocular y hepática), clasificación de Montreal, complicaciones intraabdominales (presencia y tipo de fístulas, perforaciones intestinales, abscesos, cirugías precisadas) y tratamientos previos que sugieren una mayor gravedad de la enfermedad (inmunosupresores, terapia biológica o intervención quirúrgica resectiva).

La terapia inmunosupresora es definida por el uso de azatioprina, 6-mercaptopurina o metotrexato durante al menos un mínimo de 3 meses de tratamiento continuo con las recomendaciones estándar para el control de la actividad de la EC.

La terapia biológica es definida por el uso de infliximab u otro anti-TNF α por lo menos durante 2 meses de tratamiento con las recomendaciones estándar para el control de la actividad de la EC.

La clasificación usada para la EC se basó en el índice de Montreal según la edad, localización y comportamiento clínico, considerando de manera separada la afectación perianal.

Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron reclutados por los médicos de la Unidad de EII que desconocían el genotipo de cada paciente.

Un total de 261 sujetos sanos controles fueron reclutados de un mismo área geográfica. Todos los pacientes eran de raza blanca y residentes en Madrid y alrededores. Los sujetos controles fueron seleccionados entre el staff de las universidades y el hospital participantes en el estudio. Ciento cuatro son mujeres (media de edad de $45,42 \pm 12,91$ años) y 157 hombres (media de edad de $43,51 \pm 10,62$ años). La historia clínica y la exploración física se obtuvieron de todos los individuos. Se excluyeron a los sujetos con historia personal o familiar (hasta familiares de 2º grado) de EII, enfermedades autoinmunes o alérgicas.

El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Clínico San Carlos (Madrid), y todos los pacientes y los controles fueron incluidos en el estudio después de firmar el consentimiento informado. Todos los pacientes con EC y alrededor del 95% de los sujetos sanos preseleccionados estuvieron de acuerdo en participar en el presente estudio.

2.- PURIFICACIÓN DEL ADN GENÓMICO

Se extraen 10 ml de sangre venosa del antebrazo y se depositan en tubos de venoject que contienen EDTA. La sangre se traslada a viales de plástico y se congela a -80 °C hasta su utilización. El ADN genómico se extrae de los leucocitos [215], como se describe a continuación:

- 1.- Se descongela la sangre, dejándola a temperatura ambiente aproximadamente 60 minutos, posteriormente se deposita en tubos Falcon (Becton Dickinson) de 50 ml. Se añaden 3 volúmenes de tampón de hemólisis (NH_4Cl 155 mM; KHCO_3 10 mM; EDTA 0,1 mM; pH 7,4; almacenado a 4°C). Se agitan los tubos suavemente durante 20 minutos.
- 2.- A continuación se centrifuga la sangre a 6000 r.p.m. a 4°C, durante 10 minutos, se descarta el sobrenadante.
- 3.- Se añaden 10 ml de tampón de hemólisis al sedimento de leucocitos, se agita durante 20 minutos y se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones. Se descarta el sobrenadante.
- 4.- Se le añade el sedimento de leucocitos 5 ml de solución S.E. (NaCl 75 mM; EDTA 25mM).
- 5.- A esta suspensión se le añaden 150 μl de proteinasa K (10 mg/ml) y 150 μl S.D.S. 20 %.
- 6.- Se agitan los tubos durante toda la noche a 5 r.p.m y a temperatura ambiente.

7.- Al día siguiente se le añade a esta solución el mismo volumen de fenol (5 ml), se agita suavemente durante 30 minutos y se centrifuga a 6000 r.p.m. durante 10 minutos.

8.- A continuación se extrae la fase acuosa (superior) muy suavemente con cuidado de no extraer la fase inferior de fenol, esta fase acuosa se va depositando en otro tubo Falcon estéril y la fase superior se desecha.

9.- A la fase acuosa se le vuelve añadir el mismo volumen de una mezcla de fenol/cloroformo (5ml) (1:1), se mezcla en el agitador a 25 r.p.m. durante 20 minutos, se centrifuga en las mismas condiciones ya señaladas y se vuelve a recoger la fase superior acuosa depositándola en otro tubo Falcon estéril.

10.- A esta fase se le añade el mismo volumen de una mezcla de cloroformo/isoamilalcohol (5ml) (24:1). Se vuelve a mezclar en el agitador en las condiciones ya señaladas y se centrifuga igualmente, se vuelve a extraer la fase superior o acuosa y se pasa a otro tubo Falcon estéril.

11.- A continuación se añade isopropanol a temperatura ambiente, en la misma cantidad que tenemos de fase acuosa, en este caso no es necesario añadir acetato amónico para precipitar el ADN, porque la fase acuosa ya contiene sales que estaban presentes en el tampón S.E.

12.- Se mezclan bien las fases hasta que se forme un flóculo, que es el ADN genómico. Se extrae este flóculo con una pipeta Pasteur con la punta doblada, se lava el flóculo con etanol 70% a -20°C y lo introducimos en un tubo estéril, cortando la punta de la pipeta Pasteur, para asegurarnos de que todo el ADN queda dentro del tubo.

13.- Los restos de etanol que quedan en el ADN se evaporan en una campana de vacío, durante 10 minutos y se añaden 250 μl de solución de TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 8). Para que el ADN se resuspenda adecuadamente se agita a 5 r.p.m. a 4°C durante al menos 12 horas.

14.- Se almacena el ADN genómico a 4°C hasta su uso.

3.- GENOTIPADO

El ADN genómico fue obtenido desde los leucocitos periféricos y purificados de acuerdo con procedimientos estándar, según lo referido previamente.

3.1.- Técnica de PCR

La presencia de SNPs fue investigada mediante la amplificación-restricción y electroforesis en gel de agarosa. Respecto al SNP C2029G dentro del gen de la DAO, se usaron los siguientes *primers* (basados en el gen de secuencia de la DAO del Gene Bank Accession No. X78212): GGT CAC CTG AAC CCG GTT AAC y TTG TGA CCT CTG AAC TTG CCG.

Se toma un tubo de Eppendorf (25 μ l) al cual se le añade: 1.- 1,5 μ l de ADN de una de las muestras; 2.- 2,5 μ l de Buffer (PCR + Mg); 3.- 2,5 μ l de nucleótidos; 4.- 0,625 μ l de primer forward; 5.- 0,625 μ l de primer reverso; 6.- 17,5 μ l de agua y 7.- 0,25 μ l de Eco-Taq. Toda esta mezcla se agita en el vórtex y se centrifuga aproximadamente de 3-5 segundos.

3.2.- Termociclador

Después de un paso inicial de 2 minutos a 94 °C, la amplificación con PCR fue realizada mediante 40 ciclos de 25 segundos a 94 °C, 1 min a 61°C y 1 min a 72 °C, y al final un periodo de extensión de 5 min a 72 °C. La duración aproximada del proceso es de 2 horas y media.

3.3.- Electroforesis

La electroforesis es el movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico. La electroforesis en gel es una técnica muy utilizada para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos. Los materiales más comunes para separar éstas moléculas son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa. Estos geles se colocan en la cubeta de electroforesis, sumergidos en un tampón de pH alrededor de 8. De esta forma, las moléculas de ADN o ARN sometidas a electroforesis se desplazarán al polo positivo ya que a pH superior a 5 poseen carga negativa. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de ADN de diferente tamaño van a emigrar de forma distinta en un gel de electroforesis. La distancia recorrida por cada fragmento de ADN va a ser inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Es importante la utilización de marcadores de tamaño conocido porque nos permitirán calcular los pesos moleculares de las muestras de ADN problema.

En el caso de los geles de agarosa, se añade bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases del ADN y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Debido a esta propiedad es un agente mutágeno y debe manipularse con cuidado. Tras la electroforesis, se

visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se verán las bandas correspondientes a las muestras de ADN aplicado y los marcadores de peso molecular.

La agarosa es un polisacárido extraído de algas marinas que tiene la propiedad de mantenerse en estado sólido a temperatura ambiente pero que a altas temperaturas se torna líquida. Esta característica permite una fácil preparación de una matriz porosa para ser usada en electroforesis. La ventaja que posee la agarosa es que no es un compuesto tóxico y además permite el análisis de ácidos nucleicos con pesos moleculares muy variados.

Una electroforesis típica consiste de los siguientes pasos:

1. Preparar un gel de agarosa a la concentración requerida.
2. Mezclar las muestras a analizar con un amortiguador adecuado y un colorante (azul de bromofenol) el cual indica el frente de avance de la electroforesis.
3. Montar las muestras en el gel.
4. Realizar la electroforesis.
5. Visualizar los ácidos nucleicos.

La fabricación de un gel de agarosa se realiza disolviendo en una cubeta de cristal 250 ml de una solución amortiguadora de Tris-Boratos-EDTA (TBE) X1 y 4 g de agarosa D-1 baja EEO. Se calienta de 3 a 4 minutos hasta que comience a hervir, después se agita con movimientos circulares hasta que se disuelvan todas las partículas de agarosa y se vuelve a hervir aproximadamente 2 minutos hasta que el líquido quede transparente.

Se incorporan 15 μ l de bromuro de etidio en la solución caliente de agarosa, agitando con movimientos circulares. Como ya se ha dicho previamente, el bromuro de etilo es un carcinógeno y debe manejarse con cuidado. Hay que evitar que se derrame la disolución o tener contacto directo con ésta. La punta que contiene bromuro de etidio debe ser descartada en un recipiente especial para desechar material contaminado con bromuro de etidio.

El soporte para "chorrear" el gel debe estar limpio y seco. Se ajusta en el molde portagel o tabla niveladora y se colocan los peines que generarán los pozos para aplicar las muestras. Posteriormente se vierte en el centro de la bandeja para gel evitando la formación de burbujas.

Se deja reposar ya que el gel tarda de 20–40 minutos en solidificar a temperatura ambiente.

Una vez solidificado el gel se quitan los peines.

Posteriormente se traslada el soporte para el gel hasta la cámara de electroforesis, colocando los pozos mas cercanos al borde hacia el polo negativo (de color negro) debido a que las muestras migrarán hacia el ánodo (de color rojo) durante la electroforesis. Se agrega TBE hasta sumergir el gel unos 2 a 6 mm.

Se preparan las muestras que van a correr en el gel de agarosa. En un tubo de Eppendorf añadimos 6 μ l de la muestra y 1,5 μ l de tampón carga (colorante azul) con una micropipeta se aspira la muestra preparada previamente. Se coloca la micropipeta en forma perpendicular al gel de agarosa, introduciéndola hasta el fondo del pozo, liberando su contenido mientras se va sacando lentamente la punta del pozo. Se deja el primer pocillo para introducir nuestra muestra control, 6 μ l de marcador de peso molecular Ecoladder 4 (Ecogen).

Para iniciar la electroforesis, se coloca la tapa asegurándose que los electrodos estén en contacto y conectados a la fuente de energía. La electroforesis se realiza a 180 V, durante 30 minutos aproximadamente.

Finalizada la electroforesis, se examina el gel bajo la lámpara de luz ultravioleta para determinar si la muestra ha amplificado.

3.4.- Precipitación de las muestras

Una vez obtenida la PCR de las muestras en estudio, seguiremos los siguientes pasos:

- Añadir a cada una de las muestras que están congeladas 56,2 μ l de etanol.
- Dejar 10 minutos en hielo para que precipiten.
- Centrifugar 10 minutos a 13.000 r.p.m.
- Aspirar el sobrenadante con cuidado de no tocar el precipitado.
- Poner en la campana de vacío 5 minutos.
- Añadir 8 μ l de agua estéril congelada.

3.5.- Corte de las muestras

Una vez obtenidas las muestras precipitadas y con H₂O, seguimos los siguientes pasos:

- 1.- Añadimos a las muestras 1 μ l de tampón A.
- 2.- Damos un golpe de centrifuga durante 5 segundos.

- 3.- Mezclamos bien en el vórtex.
- 4.- Volvemos a centrifugar otros 5 segundos.
- 5.- Añadimos 1 μ l de enzima "Avall", ésta debe mantenerse en el termo todo el tiempo.
- 6.- Se vuelven a repetir los pasos 2,3 y 4.
- 7.- Poner las muestras en el baño a 37°C , un mínimo de 4 horas, tiempo máximo 24 horas.
- 8.- Pondremos 2 μ l de tampón carga (colorante).
- 9.- Repetir de nuevo los pasos 2,3, y 4.
- 10.- Poner a migrar las muestras. El gel será el mismo que para la PCR. Lo dejamos migrar a 180 V, durante 20 minutos.

La amplificación de fragmentos de 476 pares de bases contienen un lugar de restricción constitutivo para la endonucleasa Avall y un sitio de restricción específico variante-alélico. Tras la digestión de la endonucleasa el gen de tipo salvaje es digerido en dos fragmentos de 369 y 107 pb mientras que el gen mutado es digerido a fragmentos de 252, 117 y 107 pb.

4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables cualitativas se presentan con su distribución de frecuencias. Las variables cuantitativas se resumen con su media y desviación estándar (DE) y, las variables que no siguen una distribución normal se expresan como mediana y rango intercuartílico (RIQ).

Se evaluó el equilibrio o ley de Hardy-Weinberg en la distribución genética de los controles mediante test de la Chi al cuadrado con un grado de libertad.

El principio de Hardy-Weinberg (PHW) es una expresión de la noción de una población que está en "equilibrio genético", y es un principio básico de la genética de poblaciones.

En genética de poblaciones, el PHW establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúe la selección natural ni ningún otro factor y no se produzca ninguna mutación. Afirma que tras una generación de apareamiento al azar, las frecuencias de los genotipos de un locus individual se fijarán en un valor de equilibrio particular. Estas frecuencias de equilibrio se pueden representar como una función sencilla de las frecuencias alélicas en ese locus.

En el caso más sencillo, con un locus con dos alelos A y a, con frecuencias alélicas de p y q respectivamente, el PHW predice que la frecuencia genotípica para el homocigoto AA es p^2 , la del heterocigoto Aa es $2pq$ y la del otro homocigoto, aa, es q^2 .

Con la ley de Hardy-Weinberg se asentaron los cimientos de la genética de poblaciones, según la cual la alteración genética de una población sólo puede darse por factores como mutaciones, selección natural, influencias casuales, convergencias o divergencias individuales, de modo que el cambio genético implica la perturbación del equilibrio establecido por la ley de Hardy-Weinberg.

Es una exposición en términos matemáticos del principio de que las frecuencias genotípicas permanecen constantes en una población grande en condiciones de apareamiento aleatorio, siempre que no haya mutación, selección, ni migración. En genética humana se utiliza para calcular las frecuencias alélicas a partir de la prevalencia de una enfermedad

La comprobación de la desviación del PHW se suele llevar a cabo utilizando la prueba del Chi al cuadrado de Pearson, utilizando las frecuencias genotípicas observadas que se han obtenido de los datos y las frecuencias genotípicas esperadas obtenidas mediante el PHW.

Se calcularon las odds ratio junto a sus intervalos de confianza al 95% en la comparación de casos y controles.

Las comparaciones de medias se realizaron con el test de la t de Student, previa realización del test de homogeneidad de varianzas de Levene, si las variables siguieran una distribución normal en los grupos a comparar y, con la prueba de la mediana cuando las variables no siguen una distribución normal. Se evaluó la asociación entre variables cualitativas con el test de la Chi al cuadrado, o la prueba exacta de Fisher en el caso de que más de un 25% de los esperados fueran menores de 5. Se presentan los riesgos relativos junto a sus intervalos de confianza al 95%.

Para todas las pruebas se aceptó un valor de significación del 5%. Para las comparaciones múltiples en el análisis de subgrupos se utilizó el método de ajuste para contrastes múltiples de Bonferroni, de tal manera que si se efectúan k contrastes, para mantener la probabilidad global ($p < 0,05$) de rechazar incorrectamente en nuestro estudio la hipótesis nula, el nivel de corte a utilizar en cada contraste debe ser $0,05/k$.

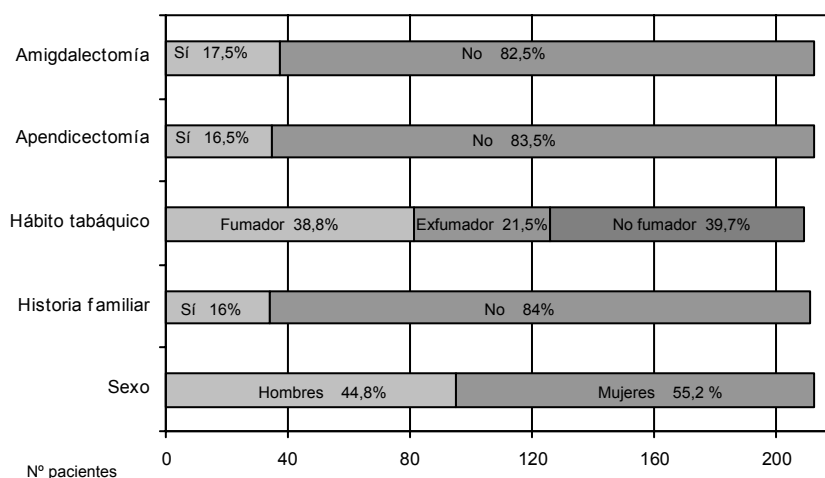
El procesamiento y análisis de los datos se realizó mediante el paquete estadístico SPSS 12.0.

RESULTADOS

1.- DESCRIPTIVO GENERAL DE LOS PACIENTES CON EC

Del total de 212 pacientes con EC, 117 son mujeres (55,2%) y 95 hombres (44,8%), con una edad media de $31,76 \pm 14,09$ años y una mediana de duración de la enfermedad de 8,7 (RIC 4,07-14,52) años. De ellos 34 sujetos (16%) tienen familiares afectados con EII. Según sus antecedentes personales, 81 pacientes (38,8%) son fumadores, 45 exfumadores (21,5%) y 83 no fumadores (39,7%). Treinta y cinco sujetos (16,5%) han sido apendicectomizados y 37 sujetos (17,5%) amigdalectomizados (ver gráfico 1).

Gráfico 1.- Características demográficas de los pacientes con EC



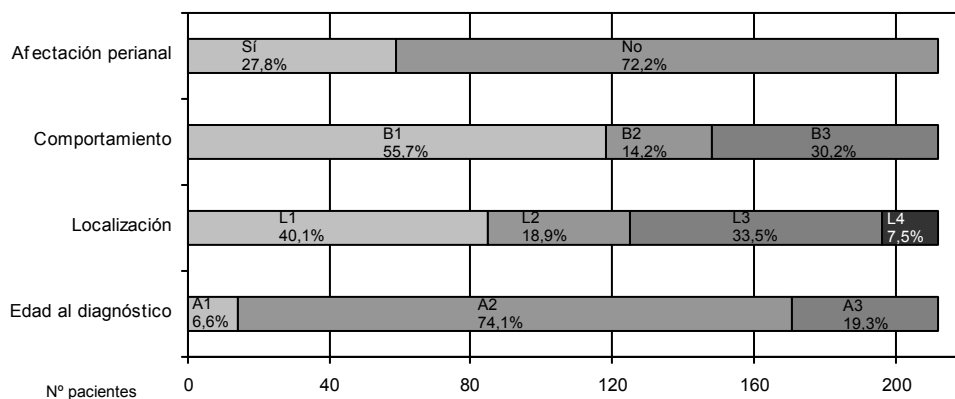
En relación con la Clasificación de Montreal (ver gráfico 2) según las diferentes categorías encontramos:

- *Según la edad al diagnóstico:* el grupo comprendido entre los 17 y 40 años (A2) es el más numeroso con 157 sujetos (74,1%), le sigue el grupo de mayores de 40 años (A3) con 41 sujetos (19,3%) y por último, los menores de 17 años (A1) con 14 sujetos (6,6%).
- *Según la localización (de mayor a menor frecuencia):* En primer lugar, los sujetos con afectación exclusiva de íleon terminal (L1) con un total de 85 pacientes (40,1%); en segundo lugar aquellos con localización en íleon y colon (L3) que son 71 pacientes (33,5%); en tercer lugar, 40 pacientes (18,9%) con sólo el colon afecto (L2); y por último, en menor proporción los sujetos con afectación del tracto gastrointestinal superior, un total de 16 pacientes, de ellos 2 (0,9%) tienen exclusivamente lesiones en tracto gastrointestinal superior mientras que en el resto están asociadas a otras localizaciones (7 sujetos (3,3%) a L1, en 3 sujetos (1,4%) a L2 y en 4 sujetos (1,9%) a L3).

- Según su comportamiento clínico (de mayor a menor frecuencia): En primer lugar, el tipo inflamatorio (B1) con un total de 118 sujetos (55,7%), seguidamente del tipo penetrante (B3) con 64 sujetos (30,2%) y por último, el tipo estenosante (B2) con 30 sujetos (14,2%).

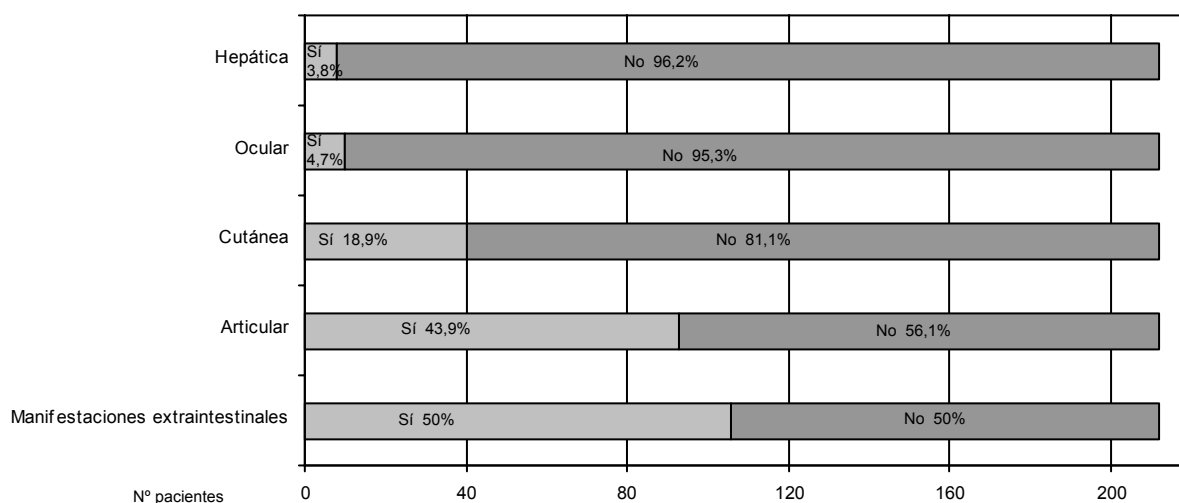
Cincuenta y nueve pacientes (27,8%) tienen afectación perianal asociada. De ellos, 32 pacientes (15,1%), 10 pacientes (4,7%) y 17 pacientes (8,0%) tienen un comportamiento inflamatorio, estenosante y penetrante, respectivamente.

Gráfico 2.- Clasificación de Montreal de los pacientes con EC



Un total de 155 manifestaciones extraintestinales han sido detectadas en 106 pacientes (50%) con EC (ver gráfico 3). De ellas, la manifestación más prevalente es la articular con 93 pacientes (43,9%), seguida de la cutánea con 40 pacientes (18,9%), y en menor proporción la ocular y hepática con un total de 10 pacientes (4,7%) y 8 pacientes (3,8%), respectivamente.

Gráfico 3.- Distribución de las manifestaciones extraintestinales en los pacientes con EC.

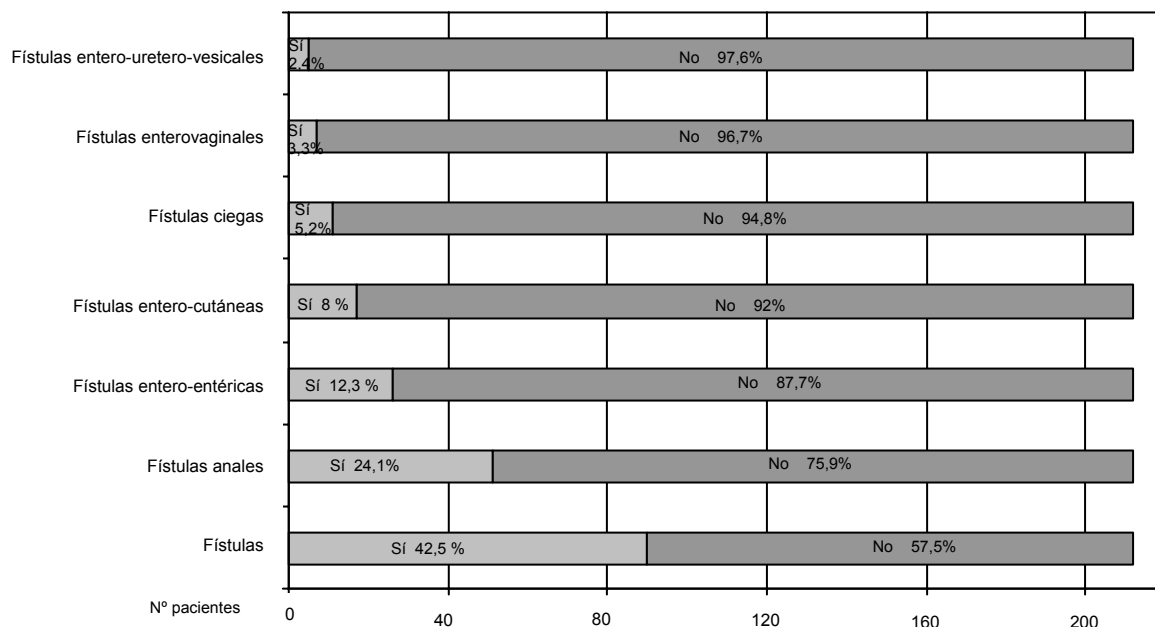


De entre las complicaciones intra-abdominales que pueden presentarse en la EC, como la presencia de fístulas, perforaciones, abscesos abdominales y anales junto con las cirugías requeridas, observamos que:

- Fístulas:

En un total de 90 pacientes (42,45%) se ha diagnosticado la presencia de 115 fístulas, con una mediana de 1 (RIC: 1 - 2). El tipo de fístula más prevalente es la fístula perianal hallada en 51 pacientes (24,06%), seguida de las fístulas entero-entéricas en 26 pacientes (12,3%), las fístulas entero-cutáneas en 17 pacientes (8%), las fístulas ciegas en 11 pacientes (5,2%), las fístulas entero-vaginales en 7 pacientes (3,3%) y por último, las fístulas entero-uretero-vesicales en 5 pacientes (2,4%) (ver gráfico 4).

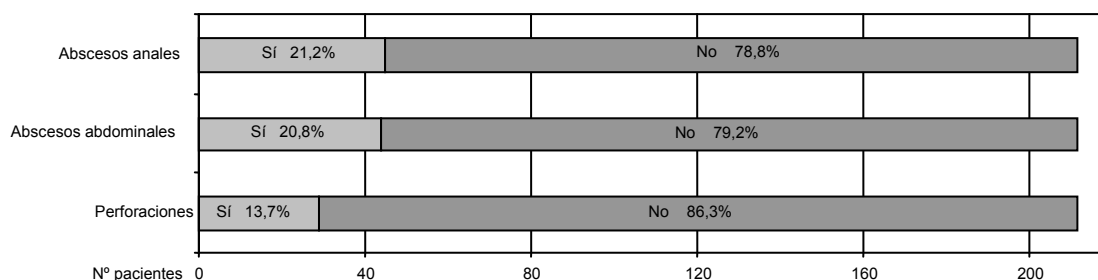
Gráfico 4.- Distribución de las fístulas en los pacientes con EC.



- Perforaciones y abscesos (ver gráfico 5):

29 pacientes (13,68%) han presentado alguna perforación intestinal a lo largo de la evolución de la EC con una mediana de 1 (RIQ 1-1). Cuarenta y cuatro pacientes (20,75%) tienen historia de abscesos intraabdominales con una mediana de 1 (RIQ 1-2) y 45 pacientes (21,2%) abscesos anales con una mediana de 1 (RIQ 1-3).

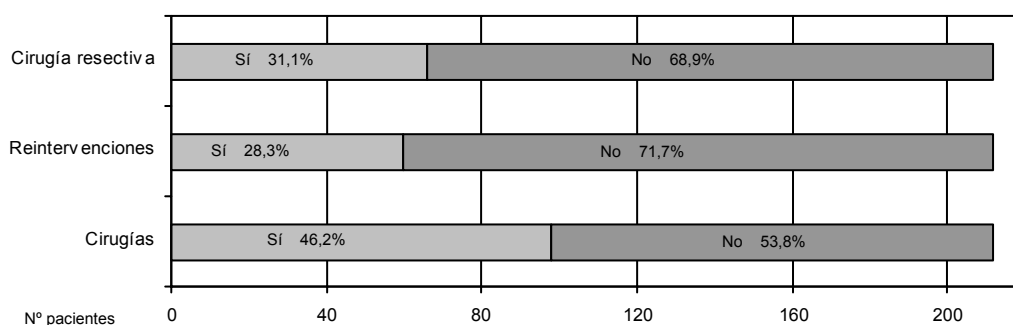
Gráfico 5.- Distribución de las complicaciones intraabdominales en pacientes con EC.



- Requerimientos quirúrgicos (ver gráfico 6):

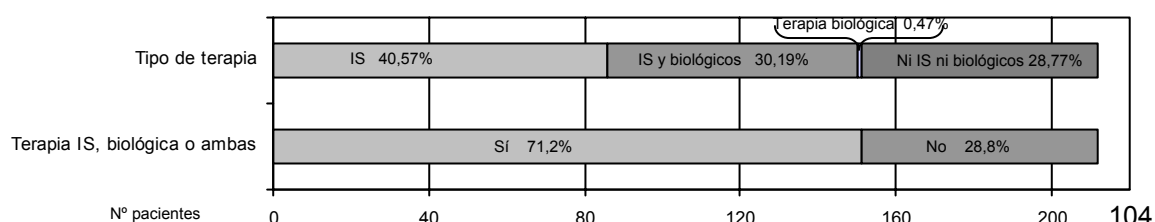
Un total de 98 pacientes (46,23%) han sido sometidos alguna vez a intervención quirúrgica por EC, de ellos 60 pacientes (28,30%) han precisado reintervención con una media de intervenciones de $2,29 \pm 1,57$. Sesenta y seis pacientes (31,1%) han precisado resección intestinal con una media de $1,35 \pm 0,54$.

Gráfico 6.- Requerimientos quirúrgicos en los pacientes con EC.



Por la gravedad clínica de la EC, 151 pacientes (71,23%) han precisado de terapia inmunosupresora o biológica, de ellos 150 pacientes (70,8%) reciben o han recibido tratamiento con IS [86 sujetos sólo terapia IS (57,34%) y 64 sujetos (42,66%) reciben además terapia biológica] y 65 pacientes (30,7%) reciben o han recibido alguna vez terapia biológica, de ellos 64 asociada terapia IS y solo 1 paciente terapia biológica sin IS (ver gráfico 7).

Gráfico 7.- Distribución de los pacientes de EC a recibir terapia inmunosupresora o biológica por la gravedad clínica.



2.- EQUILIBRIO GENÉTICO DE POBLACIONES

Antes de la valoración de la distribución del SNP no sinónimo (refSNP ID: rs1049793) de la DAO entre sujetos con EC y controles sanos es preciso confirmar el PHW en el grupo control. Del total de controles (n=261). Ciento treinta y siete son no portadores, 108 portadores heterocigotos y 16 portadores homocigotos. Teniendo en cuenta la función: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, los resultados obtenidos fueron: $p = 0,7318$, $q = 0,2681$, $n = 261$, con un valor de $p = 0,77$, lo que indica que no hay diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genes en la población control y la distribución esperada según la Ley de Hardy-Weinberg. Según los resultados obtenidos, nuestro grupo control sigue el equilibrio genético de poblaciones.

3.- DIFERENCIAS DEL POLIMORFISMO SNP NO SINÓNIMO (refSNP ID: rs1049793) DE LA DAO ENTRE SUJETOS CON EC Y CONTROLES SANOS

La distribución del SNP del gen de la DAO humano (refSNP ID: rs1049793) que codifica para una proteína alterada con la sustitución de un aminoácido His645Asp en el grupo de EC es de 99 (46,7%) no portadores y 113 (53,3%) portadores, de ellos 100 (47,17%) son heterocigotos y 13 (6,13%) homocigotos. En el grupo de controles sanos 137 (52,49%) son no portadores y 124 (47,51%) portadores, de ellos 108 (41,38%) son heterocigotos y 16 (6,13%) son homocigotos (ver tabla 13).

Tabla 13.- El análisis de frecuencia para SNP del gen de la DAO entre casos y controles

Genotipo	Enfermedad Crohn		Controles sanos		OR (IC 95%)	p
	N	%	N	%		
C/C	99	46,70	137	52,49		
C/G o G/G	113	53,3	124	47,51	1,26 (0,86-1,84)	0,21
C/G (heterocigoto)	100	47,17	108	41,38	1,28 (0,88-1,87)	0,19
G/G (homocigoto)	13	6,13	16	6,13	1,12 (0,52-2,45)	0,76
Total sujetos	212		261			
Alelos C	298	70,28	382	73,18	1,15 (0,86-1,55)	0,32
Alelos G	126	29,72	140	26,82		
Total de alelos	424		522			

La tabla muestra que no existe una distribución distinta de los diferentes genotipos entre los pacientes con EC y controles sanos (OR =1,26; 95 % CI = 0.86-1.84; $P = 0.21$) ni en las frecuencias del alelo mutado (OR = 1,15; 95% CI =0,86-1,55; $p 0,32$).

4.- EVALUACIÓN DE POSIBLES DIFERENCIAS EN LA FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DE UN SOLO NUCLEÓTIDO NO SINÓNIMO (refSNP ID: rs1049793) DE LA DAO SEGÚN EL FENOTIPO DE EC

Con vistas a obtener una mayor información del efecto del SNP (refSNP ID: rs1049793) del gen de la DAO en las características fenotípicas de los pacientes con EC, estos fueron agrupados en portadores y no portadores (heterocigoto u homocigoto) de la correspondiente mutación.

No se hallaron diferencias significativas entre portadores y no portadores de la mutación en relación con las características demográficas (edad, sexo) e historial clínico de los pacientes con EC como edad al diagnóstico, duración media de la enfermedad, historia familiar de EII, habito tabáquico, apendicectomía y amigdalectomía (ver tabla 14 y gráfico 8).

Gráfico 8.- Riesgo relativo (RR) entre portadores y no portadores de la mutación con respecto a las características demográficas e historial médico.

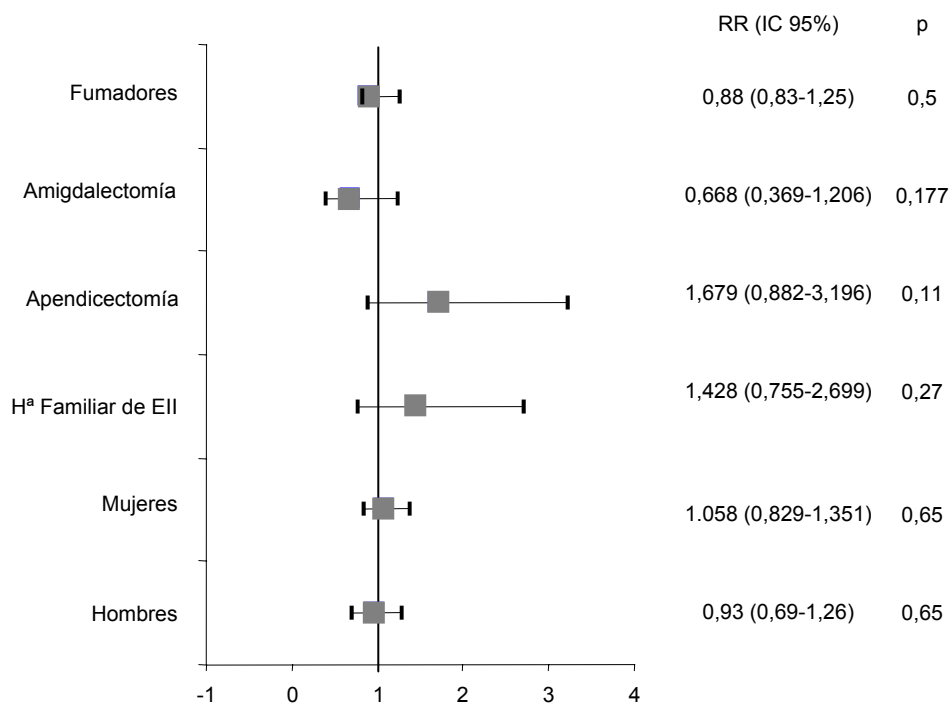


Tabla 14.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación a las características demográficas e historial médico.

	Portador n=113	No portador n=99		
Variables cualitativas	N (%)	N (%)	RR (IC 95%)	p
Hombre	49 (43,4)	46 (46,5)	0,93 (0,69-1,26)	0,65
Mujer	64 (56,6)	53 (53,5)	1,058 (0,829-1,351)	0,65
Historia familiar de EII	21 (18,8)	13(13,1)	1,428 (0,755-2,699)	0,268
Apendicectomía	23 (20,4)	12 (12,1)	1,679 (0,882-3,196)	0,11
Amigdalectomía	16 (14,2)	21 (21,2)	0,668 (0,369-1,206)	0,177
Fumador	41 (36,6)	40 (41,2)	0,88 (0,83-1,25)	0,5
Variables cuantitativas			p	
Edad, media (DE)	31,87 (14,66)	31,64 (13,49)	0,91	
Duración de la enfermedad, mediana (RIQ)	8,34 (3,30-15,03)	8,96 (4,43-14,21)	0,49	

Posteriormente pasamos a comparar si existen diferencias significativas entre portadores y no portadores en cuanto a la clasificación de Montreal (ver tabla 13 y gráfico 9), que tiene en cuenta la edad al diagnóstico, la localización, el comportamiento clínico de la EC y la afectación perianal. Con respecto a la localización se agruparon en afectación de íleon y colon, dándose como perdidos el resto, un total de 77 pacientes, debido a que aquéllos con afectación de íleon y colon pertenecían ambos grupos (n= 75) y por su inferioridad numérica (n=2) aquéllos con sólo afectación del tracto gastrointestinal superior. No se hallaron diferencias significativas entre portadores y no portadores en cada uno de los apartados de la clasificación de Montreal tal como se indica en el gráfico 9 y en la tabla 15, teniendo en cuenta que al realizar comparaciones múltiples, como ocurre en el caso de la edad al diagnóstico y el comportamiento de la enfermedad, el valor de p para ser significativo debe ser $< 0,017$, tal como se explica en el apartado de estadística.

Sólo cabe destacar que en el subgrupo estenosante se evidencia un mayor número de pacientes en el subgrupo no portador (n=20) que en el portador (n=10) (RR 0,474; IC 95% 0,238-0,942; p 0,058), aunque sin diferencias estadísticamente significativas.

Gráfico 9.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación a la clasificación de Montreal.

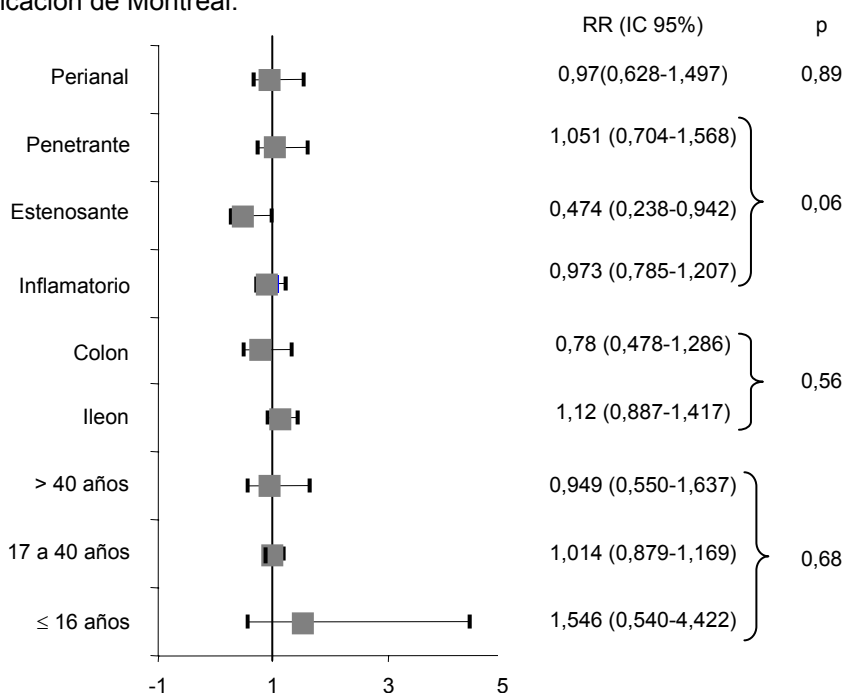


Tabla 15.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación a la clasificación de Montreal.

	Portador n=113	No portador n=99		
Variables cualitativas	N (%)	N (%)	RR (IC 95%)	p
Edad al diagnóstico				
A1	9 (8)	5 (5,1)	1,546 (0,540-4,422)	0,679
A2	83 (73,5)	74 (74,7)	1,014 (0,879-1,169)	
A3	21 (18,6)	20 (20,2)	0,949 (0,550-1,637)	
Localización				
Ileon	51 (71,8)	41 (64,1)	1,12 (0,887-1,417)	0,56
colon	20 (28,2)	23 (35,9)	0,78 (0,478-1,286)	
Comportamiento de la enfermedad				
B1	66 (58,4)	52 (52,5)	0,973 (0,785-1,207)	0,058
B2	10 (8,8)	20 (20,2)	0,474 (0,238-0,942)	
B3	37 (32,7)	27 (27,3)	1,051 (0,704-1,568)	
Afectación perianal	31 (27,4)	82 (72,6)	0,97(0,628-1,497)	0,89

Con respecto a las manifestaciones clínicas extraintestinales no se hallaron diferencias significativas entre el grupo de portadores y no portadores (ver tabla 15 y gráfico 10) aunque, en el caso de las manifestaciones cutáneas el grupo de portadores (N=16; 14,2%) presentaba una menor proporción de éstas que los no portadores (N=24; 24,2%), con diferencias casi significativas (OR 0,584; IC 95%0,330-1,035, p0,061). Por ello se estratificó al grupo de los portadores en homocigotos (N=4) y heterocigotos (N=12), sin obtenerse diferencias significativas (ver tabla 16) puesto que en el análisis multivariante la p debería ser < 0,017.

Gráfico 10.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación a las manifestaciones extraintestinales.

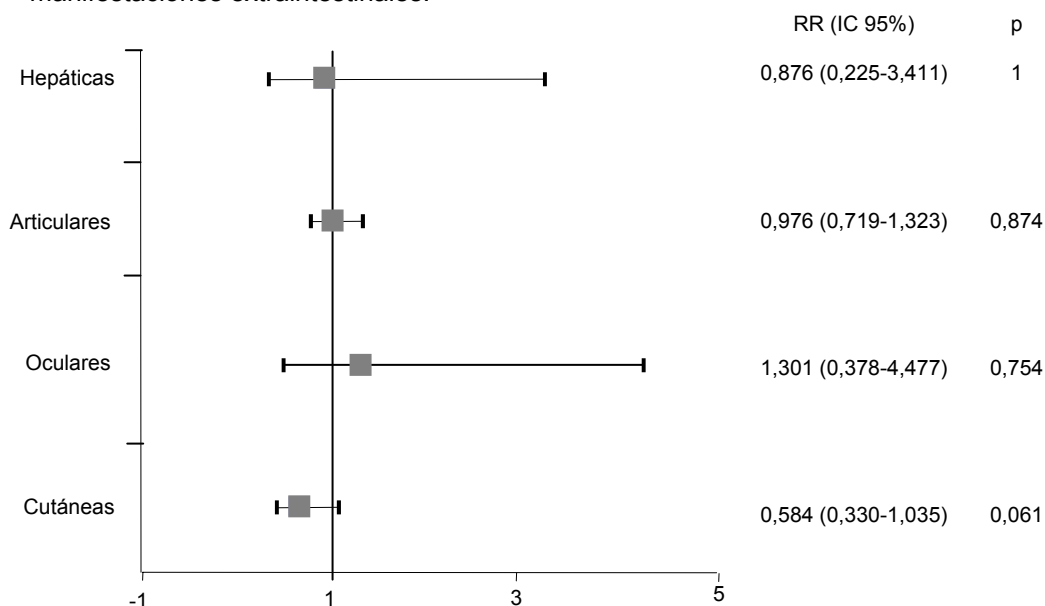


Tabla 16.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación a las manifestaciones extraintestinales.

	Portador n=113	No portador n=99		
Manifestaciones extraintestinales	N (%)	N (%)	RR (IC 95%)	p
Cutáneas	16 (14,2)	24 (24,2)	0,584 (0,330-1,035)	0,061
Oculares	6 (5,3)	4 (4,1)	1,301 (0,378-4,477)	0,754
Articulares	49 (43,4)	44 (44,4)	0,976 (0,719-1,323)	0,874
Hepáticas	4 (3,5)	4 (4,0)	,876 (0,225-3,411)	1,0

Tabla 17.- Riesgo Relativo entre portadores (homocigotos y heterocigotos) y no portadores de la mutación en relación a las manifestaciones cutáneas.

Manifestaciones cutáneas	Si N (%)	No N (%)	Manifestaciones cutáneas	OR (IC 95%)	P
Homocigoto	4 (30,8)	9 (69,2)	Homocigoto-Heterocigoto	2,564 (0,969-6,784)	0,087
Heterocigoto	12 (12)	88 (88)	Homocigoto-No portador	1,269 (0,523-3,080)	0,734
No portador	24 (24,2)	75 (75,8)	Heterocigoto-No portador	0,495 (0,262-0,934)	0,025

Tampoco se hallaron diferencias significativas entre portadores y no portadores en relación con las complicaciones intra-abdominales, como la presencia de fistulas, perforaciones y abscesos (ver tabla 17,18,19,20 y gráfico 11 y 12) salvo en el subgrupo de cirugías, donde resultó que los no portadores (n=53;53,5%) necesitaron más cirugías frente a los portadores (n=45;39,8%) con un RR de 0,744 (IC 95% 0,556-0,996) p 0,046. Al analizar el número de pacientes sometidos a resección intestinal no se hallaron diferencias entre portadores (n= 31; 27,4%) y no portadores (n=35; 35,4%) con un RR de 0,776 (0,520-1,159) p 0,214.

Gráfico 11.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación a las fístulas.

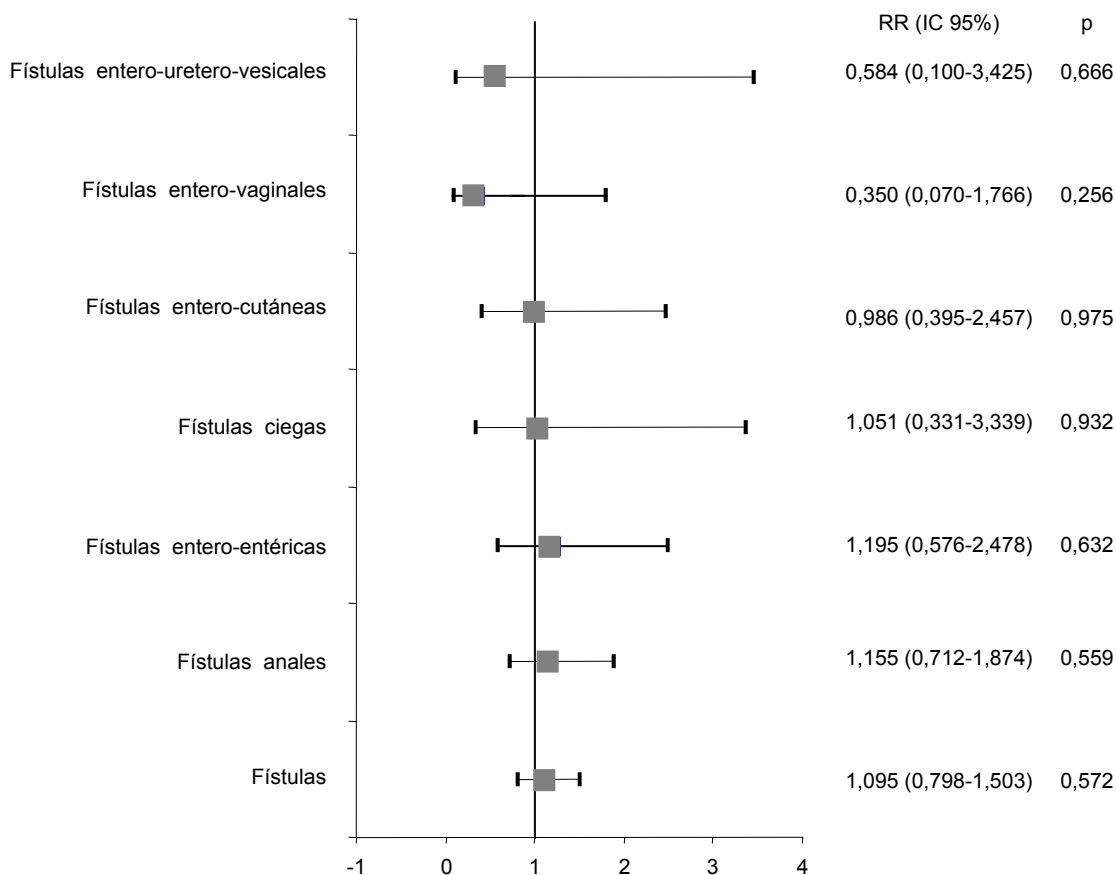


Tabla 18.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación a las fístulas.

	Portador n=113	No portador n=99		
Fistulas	N (%)	N (%)	RR (IC 95%)	p
Fistulas	50 (44,2)	40 (40,4)	1,095 (0,798-1,503)	0,572
Fistulas ciegas	6 (5,3)	5 (5,1)	1,051 (0,331-3,339)	0,932
Fistulas entero-entéricas	15 (13,3)	11 (11,1)	1,195 (0,576-2,478)	0,632
Fistulas entero-cutáneas	9 (8,0)	8 (8,1)	0,986 (0,395-2,457)	0,975
Fistulas entero-vaginales	2 (1,8)	5 (5,1)	0,350 (0,070-1,766)	0,256
Fistulas entero-uretero-vesicales	2 (1,8)	3 (3,0)	0,584 (0,100-3,425)	0,666
Fistulas anales	29 (25,7)	22 (22,2)	1,155 (0,712-1,874)	0,559

Tabla 19.- Evaluación de las variables cuantitativas de las fístulas entre portadores y no portadores de la mutación.

	Portador n=133	No portador n =99	
	Mediana (RIQ)	Mediana (RIQ)	p
Nº fístulas	1 (1-2)	1 (1-2)	0,740
Nº fístulas anales	1 (1-2)	1 (1-2)	0,840

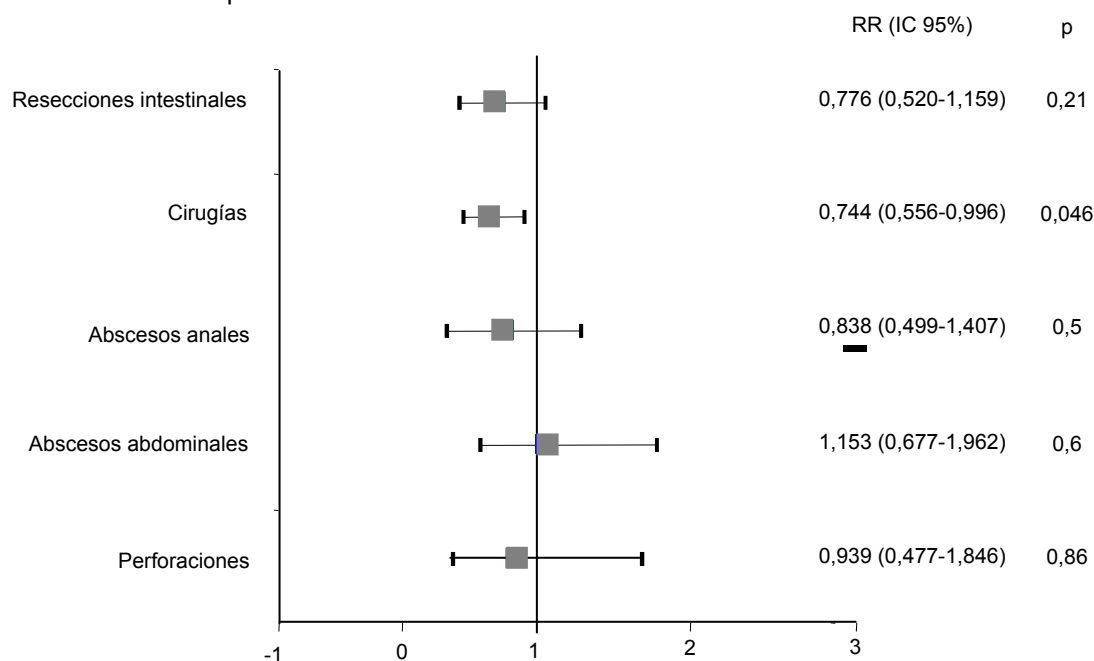
Tabla 20.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación al resto de complicaciones intraabdominales.

	Portador n=113	No portador n=99		
Complicaciones abdominales	N (%)	N (%)	RR (IC 95%)	p
Perforaciones	15 (13,3)	14 (14,1)	0,939 (0,477-1,846)	0,855
Abscesos abdominales	25 (22,1)	19 (19,2)	1,153 (0,677-1,962)	0,599
Abscesos en ano	22 (19,5)	23 (23,2)	0,838 (0,499-1,407)	0,504
Cirugías	45 (39,8)	53 (53,5)	0,744 (0,556-0,996)	0,046
Resección intestinal	31 (27,4)	35 (35,4)	0,776 (0,520-1,159)	0,214

Tabla 21.- Evaluación de las variables cuantitativas del resto de las complicaciones intraabdominales entre portadores y no portadores de la mutación.

Complicaciones intraabdominales	Portador n=133 Mediana (RIQ)	No portador n =99 Mediana (RIQ)	p
Nº cirugías	2 (1-3)	2 (1-2,25)	0,243
Nº Abscesos abdominales	1 (1-2)	1 (1-2)	0,954
Nº perforaciones	1 (1-2)	1 (1-1)	0,330
Nº abscesos anales	1 (1-2,25)	1 (1-3)	0,894

Gráfico 12.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación al resto de complicaciones intraabdominales.



En relación con la severidad de la enfermedad como es la utilización de inmunosupresores y terapia biológica no se hallaron diferencias significativas (ver tabla 22 y gráfico13).

Gráfico 13.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación al tratamiento requerido por la gravedad de la enfermedad.

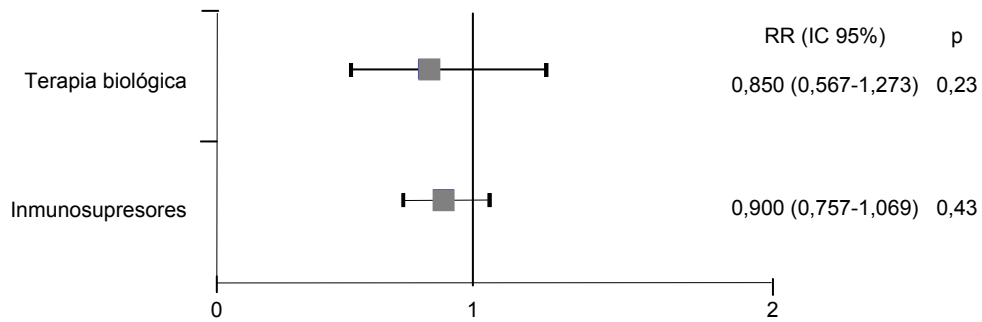


Tabla 22.- Riesgo Relativo entre portadores y no portadores de la mutación en relación al tratamiento requerido por la gravedad de la enfermedad.

	Portador n=113	No portador n=99		
Tratamientos que indican gravedad en EC	N (%)	N (%)	RR (IC 95%)	p
Inmunosupresores	76 (67,3)	74 (74,7)	0,900 (0,757-1,069)	0,232
Terapia biológica	32 (28,3)	33 (33,3)	0,850 (0,567-1,273)	0,429

DISCUSIÓN

Los mastocitos y sus mediadores desempeñan un papel importante en la activación de los mecanismos proinflamatorios en la pared del tubo digestivo. Se ha objetivado que los mastocitos y también sus diferentes mediadores están incrementados en la mucosa del íleon y del colon de pacientes con EC [170, 171]. Las diferentes acciones de los mediadores mastocitarios sugieren que debe de existir un equilibrio entre mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios y su alteración puede desencadenar la EII.

La histamina está involucrada en la patogenia de la EC. La secreción de histamina está incrementada en los pacientes con EC comparado con controles sanos y dicha secreción se relaciona con la actividad de la enfermedad [191]. Una de las hipótesis propuestas para explicar el aumento de la histamina en la EII es la menor actividad de la enzima degradadora de la histamina, la DAO. Los estudios al respecto demuestran una disminución del 50% de su actividad en los pacientes con EII, comparado con los controles. La razón por la que existe un descenso de la actividad enzimática de la DAO es desconocida, pero parece que podría explicarse en parte por el polimorfismo genético de la misma.

Son pocos los estudios sobre el polimorfismo de la DAO en relación con la EII, la mayoría de ellos realizados sobre muestras pequeñas y muy heterogéneas, incluyendo controles, pacientes con alergia a alimentos, con EII y con neoplasias de colon. Por esta razón, aunque los estudios tienden a implicar a los diferentes polimorfismos en la EII, los resultados no llegan a ser concluyentes. El estudio que valora la muestra más amplia (229 pacientes con CU y 261 controles) demostró que en pacientes con CU la gravedad de la enfermedad estaba relacionada con el SNP no sinónimo (refSNP ID: rs1049793) de la DAO. Este trabajo, realizado por nuestro grupo, incluyó una casuística amplia, homogénea y bien tipificada, y ha sido la base y la justificación para llevar a cabo el estudio que constituye esta tesis doctoral [191].

El presente trabajo estudia el mismo polimorfismo pero en pacientes con EC, y evalúa si se relaciona con una mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad, y si su presencia induce cambios en el fenotipo de esta.

En el estudio se han incluido 212 pacientes con EC y 261 controles (946 alelos) y se objetiva una frecuencia del alelo mutado de 29,72% en EC frente al 26,82% en el control siendo las diferencias no significativas. El estudio previo de nuestro grupo usa el mismo grupo control, con frecuencia del alelo mutado 26,8% frente a 30,8% en los pacientes con CU [201]. Nuestros

resultados muestran una incidencia ligeramente inferior del alelo mutado a la observada en los estudios preliminares realizados, con frecuencias en todos ellos superiores al 30% (ver tabla 23). La muestra de estos estudios (59, 60 y 44 personas, respectivamente) es sensiblemente inferior a la del presente trabajo.

Tabla 23.- Frecuencias del alelo mutado del SNP no sinónimo de la enzima DAO (refSNP ID:rs1049793)

Población	Nº individuos	Alelo G	Alelo C
HapMap-CEU	59	0,305	0,695
HapMap-CEU	60	0,300	0,700
EGP CEPH-PANEL	22	0,318	0,682
Tesis	261	0,268	0,732

Términos: Hap-Map, mapa de haplotipos del genoma humano; CEPH, Centro de Estudios del Polimorfismo Humano.

En el análisis interno del grupo de pacientes con EC no se hallaron diferencias en el polimorfismo genético de SNP de la DAO en ninguna de las características evaluadas, salvo en el subgrupo de pacientes con comportamiento estenosante en el que hay un exceso de pacientes no portadores de la mutación (n=20) en relación con los portadores (n=10) (RR 2,11; IC 95% 4,2-1,06; p 0,058), próxima al límite de la significación. La formación de fibrosis y estenosis en el intestino es una complicación común de EC que conduce a una obstrucción parcial o completa de la luz intestinal, y que a menudo requiere resección quirúrgica. Los depósitos de colágeno y la proliferación de las células de músculo liso son la respuesta a una inflamación crónica y al daño de la submucosa, y pueden producir fibrosis y engrosamiento de la submucosa y la capa de músculo liso de la pared intestinal. Estudios realizados al respecto demuestran una relación entre los mastocitos y una mayor tendencia a la fibrosis. Gelbmann y colaboradores demostraron una mayor densidad de mastocitos en la submucosa y particularmente en la muscularis propia, que se encontraba engrosada, en las estenosis fibróticas en pacientes con EC comparado con un colon normal [171]. Sellge y colaboradores evidenciaron que los fibroblastos humanos promueven la supervivencia de los mastocitos. Tal interacción entre los mastocitos y los fibroblastos puede explicar por qué los mastocitos se acumulan en la submucosa y la capa muscular en la EC y por qué pueden producir fibrosis intestinal [216]. En muestras de biopsias de pacientes con EC se aprecia que mastocitos y

eosinófilos podrían estar involucrados en la modulación de la fibrosis por influencia directa sobre las propiedades del fibroblasto intestinal [182]. La quimasa, una serinoproteasa secretada por los mastocitos, puede actuar como un estímulo para el proceso de fibrosis tisular y remodelación del tejido en la EC. Dicha serinoproteasa se encuentra en submucosa, muscularis propia y grasa subcutánea en pacientes con EC activa y en menor proporción en pacientes con CU y controles [217]. A pesar de los datos reseñados en relación con los mastocitos y su capacidad de fibrosis en la EC estenosante, no hay datos relativos a la histamina y la fibrosis en la EC. El hecho de objetivar en nuestro estudio un menor número de portadores del polimorfismo genético en los pacientes con estenosis va en contra de la existencia de una relación entre la histamina y la formación de fibrosis intestinal. De todos modos hay que señalar que esta diferencia está en el límite de la significación estadística y se ha obtenido en un análisis de subgrupos no previsto inicialmente de forma expresa, por lo que un significado real, si es que tiene alguno, es muy difícil de precisar.

Con respecto a las manifestaciones extraintestinales, el grupo portador del polimorfismo de la DAO (N=16; 14,2%) presentaba una menor frecuencia de manifestaciones dermatológicas que los no portadores (N=24; 24,2%), sin alcanzar diferencia significativa (OR 0,584; IC 95%0,330-1,035; p 0,061), al estratificar entre homocigotos (N=4) y heterocigotos (N=12), tampoco se obtuvieron diferencias significativas. Las manifestaciones cutáneas presentadas en nuestros pacientes con EC fueron: eritema nodoso (n= 22), estomatitis aftosa (n=15) y pioderma gangrenoso (n=2). No hay datos que relacionen estas manifestaciones clínicas con los mastocitos ni la histamina, salvo un estudio publicado por Snyder que encuentra en 1 de 6 pacientes con pioderma gangrenoso mastocitos en la biopsia de la lesión [218].

Al estratificar a los pacientes que habían sido sometidos a cirugía debido a su EC se obtuvo que los no portadores de la mutación (n=53; 53,5%) necesitaron más cirugías frente a los portadores (n=45; 39,8%) con un RR de 1,34 (IC 95%1,0-1,8) p 0,046. Esto va en contra de lo esperado de acuerdo con nuestra hipótesis, pero hay que considerar que se incluyen tanto cirugías asociadas a fibrosis y estenosis (resecciones y estricturoplastias) como otras cirugías por enfermedad perianal, con base fisiopatológica diferenciada. Cuando se estratificaron en relación con pacientes sometidos a resección intestinal no se hallaron diferencias entre

portadores (n= 31; 27,4%) y no portadores (n=35; 35,4%) con un RR de 0,776 (IC 95% 0,520-1,159) p 0,214.

En nuestros datos a diferencia de los obtenidos para la CU tampoco se objetivan diferencias entre los portadores en cuanto gravedad de la enfermedad, considerada como necesidad de cirugía, terapia inmunosupresora o biológica.

Una posible explicación de la escasa implicación del SNP no sinónimo His645Asp del gen de la DAO en la EC puede deberse a la interacción de otros genes ligados al mismo. Sólo hay un trabajo publicado al respecto y estudia tres diferentes SNP no sinónimos del gen de la DAO (Thr16Met, con ref SNP ID: rs10156191; Ser332Phe, con ref SNP ID: rs1049742; y His645Asp, con ref SNP ID: rs 1049793) en 134 pacientes sanos [183]. Los resultados obtenidos demuestran que parece haber un desequilibrio de ligamiento parcial debido a que las frecuencias de portadores asociados a mutación eran mayores que las esperadas calculadas de frecuencias de genotipos aislados. Sólo el SNP His645Asp con ref SNP ID: rs 1049793 causa cambios importantes en la cinética enzimática con un descenso en la V_{max}/K_m , mientras los otros dos polimorfismos, Thr16Met y Ser332Phe, inducen o cambios mínimos o ningún efecto, respectivamente. Si tenemos en cuenta que los tres SNP analizados son comunes en los humanos con un rango de frecuencia de 6-30%, la variabilidad interindividual en la actividad de la enzima DAO puede relacionarse con la expresión de las enfermedades relacionadas con ella.

Presentamos pues un estudio basado en una hipótesis coherente y fundamentada, con una casuística extensa y homogénea, adecuadamente controlada y seguida, cuyos resultados son negativos y no confirman la hipótesis de partida. Es significativo que un estudio previo de nuestro grupo realizado en CU sí confirmara parcialmente lo previsto en la hipótesis, lo que apoya la existencia de diferencias en los mecanismos patogénicos entre ambas enfermedades. Resulta muy difícil para la mayoría de los grupos reunir casuísticas del tamaño de la aquí presentada. Por lo tanto, el resultado negativo de este estudio tiene la utilidad de dejar prácticamente zanjada la interrogante de una posible relación de la EC con el polimorfismo estudiado, evitando con ello que se invierta más tiempo, medios y esfuerzo en una línea de investigación que tras este estudio parece ofrecer poco atractivo suplementario.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1.- No hallamos diferencias en la frecuencia de portadores del polimorfismo de un solo nucleótido no sinónimo (refSNP ID: rs1049793) de la diamino oxidasa en pacientes con EC con respecto al grupo control.

2.- No se objetivan diferencias entre los portadores y no portadores del polimorfismo de un solo nucleótido no sinónimo (refSNP ID: rs1049793) de la diamino oxidasa con respecto a las características demográficas, fenotípicas, complicaciones intestinales o extraintestinales y tratamiento de la EC.

3.- El estudio del polimorfismo de un solo nucleótido no sinónimo (refSNP ID: rs1049793) de la diamino oxidasa no es útil para valorar la susceptibilidad a padecer la EC, ni como marcador de actividad o comportamiento clínico en los pacientes afectados de EC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *JAMA* 1932;99:1323.
2. Mate Jimenez J, Pajares Garcia JM, Perez-Miranda M. Epidemiology of inflammatory bowel disease: geographic distribution and environmental factors. *Rev Esp Enferm Dig* 1994;86(1):533-9.
3. Binder V. Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18(3):463-79.
4. Cella Lanau J, López Zaborras J, Gomollón F, Sáinz R. Inflammatory bowel disease in Aragon: a more and more frequent diagnosis. *Rev Esp Enferm Dig* 1995;87(5):363-7.
5. Hinojosa J, Primo J, Lledó S, López A, Roig JV, Fernández J. Incidence of inflammatory bowel disease in Sagunto. *Rev Esp Enferm Dig* 1990;78(5):283-7.
6. Mate-Jimenez J, Muñoz S, Vicent D, Pajares JM. Incidence and prevalence of ulcerative colitis and Crohn's disease in urban and rural areas of Spain from 1981 to 1988. *J Clin Gastroenterol.* 1994; 18(1): 27-31.
7. Solá Lamoglia R, García-Pugés AM, Monés J, Badosa C, Badosa J, Casellas F, et al. Chronic inflammatory intestinal disease in Catalonia (Barcelona and Gerona). *Rev Esp Enferm Dig* 1992;81(1):7-14.
8. Saro C, Argüelles G, Álvarez D. Estudio multicéntrico retrospectivo de la Enfermedad de Crohn en Asturias (1975-85). *Boletín de la Sociedad Asturiana de Pat Dig.* 1986; 1: 50-56.
9. Ruiz Ochoa V. Estudio epidemiológico de la Enfermedad de Crohn en Galicia en el periodo de 1976 a 1983. *Rev Esp Enferm Dig* 1984;68:273-279.
10. Brullet E, Bonfill X, Urrutia G, Ruiz Ochoa V, Cueto M, Clofent J, et al. Epidemiological study on the incidence of inflammatory bowel disease in 4 Spanish areas. Spanish Group on the Epidemiological Study of Inflammatory Bowel Disease. *Med Clin (Barc)* 1998;110(17):651-6.
11. Saro C, Riestra S, Milla A, Sánchez Fernández R, Lacort M, Argüelles G, et al. Incidencia y prevalencia en enfermedad inflamatoria intestinal crónica. Estudio asturiano en cinco áreas (EIICEA). *An. Med. Interna* 2003;20(1):3-9.
12. Garza E, Thomson C, Lucas M. Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal crónica en el área de salud de Teruel. *Rev Esp Enferm Dig* 1994;85:39-40.
13. Arin Letamendía A, Burusco MJ, Borda F, Pueyo A, Martínez A, Jiménez FJ. Epidemiological aspects of inflammatory bowel disease in the Pamplona area. *Rev Esp Enferm Dig* 1999;11:769-772.
14. Gomollón F, López J, Saíz R. High incidence of inflammatory bowel disease in Aragón (Spain): a prospective population based study. *Gastroenterology* 1995;108:A865.
15. Monferrer R, Martín JA, Pedraza RG, Moreno I, Soler E, Hinojosa J. Incidencia de la Enfermedad inflamatoria intestinal en el Área de Salud 02 de Castellón (1992-1996). *Rev Esp Enferm Dig* 1999;91:33-39.
16. Saro C, Lacort M, Argüelles G, Anton J, Navascues CA, García López R, et al. Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Gijón, Asturias, Spain. *Gastroenterol Hepatol* 2000;23(7):322-7.

17. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39(5):690-7.
18. Moum B, Ekobom A. Epidemiology of inflammatory bowel disease--methodological considerations. *Dig Liver Dis* 2002;34(5):364-9.
19. Lakatos L, Mester G, Erdalyi Z, Balogh M, Szipocs I, Kamaras G, et al. Striking elevation in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary between 1977-2001. *World J Gastroenterol* 2004;10(3):404-9.
20. Sincic BM, Vucelic B, Persic M, Brncic N, Erzen DJ, Radakovic B et al. Incidence of inflammatory bowel disease in Primorsko-goranska County, Croatia, 2000-2004: A prospective population-based study. *Scand J Gastroenterol* 2006;41(4):437-44.
21. Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002;8(1):158-61.
22. Appleyard CB, Hernandez G, Rios-Bedoya CF. Basic epidemiology of inflammatory bowel disease in Puerto Rico. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10(2):106-11.
23. López Miguel C, Sicilia B, Sierra E, López Zaborras J, Arribas F, Gomollón F. Incidence of inflammatory bowel disease in Aragon: outcome of a prospective population-based study. *Gastroenterol Hepatol* 1999;22(7):323-8.
24. Russel MG, Stockbrugger RW. Epidemiology of inflammatory bowel disease: an update. *Scand J Gastroenterol* 1996;31(5):417-27.
25. Mayberry JF, Rhodes J. Epidemiological aspects of Crohn's disease: a review of the literature. *Gut* 1984;25(8):886-99.
26. Kurata JH, Kantor-Fish S, Frankl H, Godby P, Vadheim CM. Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization. *Gastroenterology* 1992;102(6):1940-8.
27. Roth, MP Petersen GM, McElree C, Feldman E, Rotter JI. Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1989;97(4):900-4.
28. Roth MP, Petersen GM, McElree C, Feldman E, Rotter JI. Familial empiric risk estimates of inflammatory bowel disease in Ashkenazi Jews. *Gastroenterology* 1989;96(4):1016-20.
29. Yang H, McElree C, Roth MP, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut* 1993;34(4):517-24.
30. Gilat T, Grossman A, Fireman Z, Rozen P. Inflammatory Bowel disease in jews. *Gastrointest Res* 1986;11:135-140.
31. Satsangi J. Genetics of inflammatory bowel disease: from bench to bedside?. *Acta Odontol Scand* 2001;59(3):187-92.
32. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003;124(2):521-36.
33. Colombel JF, Grandbastien B, Gower-Rousseau C, Plegat S, Evarard JP, Dupas JL, et al. Clinical characteristics of Crohn's disease in 72 families. *Gastroenterology*. 1996; 111(3): 604-7.

34. Peeters M, Nevens H, Baert F, Hiele M, de Meyer AM, Vlietinck R, et al. Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology* 1996;111(3):597-603.
35. Monsen U, Bernell O, Johansson C, Hellers G. Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1991;26(3):302-6.
36. Probert CS, Jayanthi V, Hughes AO, Thompson JR, Wicks AC, Mayberry JF. Prevalence and family risk of ulcerative colitis and Crohn's disease: an epidemiological study among Europeans and south Asians in Leicestershire. *Gut* 1993;34(11):1547-51.
37. Polito JM 2nd, Childs B, Mellits ED, Tokayer AZ, Harris ML, Bayless TM. Crohn's disease: influence of age at diagnosis on site and clinical type of disease. *Gastroenterology* 1996;111(3):580-6.
38. Satsangi J, Grootcholten C, Holt H, Jewell DP. Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease. *Gut* 1996;38(5):738-41.
39. Picco MF, Goodman S, Reed J, Bayless TM. Metodologic pitfalls in the determination of genetic anticipation: the case of Crohn disease. *Ann Intern Med* 2001;134(12):1124-9.
40. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* 1996;312(7023):95-6.
41. Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Flodérus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988;29(7):990-6.
42. Schreiber S, Hampe J. Genomics and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2000;16(4):297-305.
43. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411(6837): 599-603.
44. Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, et al. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 1996;14(2):199-202.
45. Cho J, Nicolae DL, Gold LH, Fields CT, LaBuda MC, Rohal PM, et al. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(13):7502-7.
46. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001;357(9272):1925-8.
47. Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Pfutzer R and Weeks DE. High-density genome scan in Crohn disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12. *Am J Hum Genet* 2000; 66(6):1857-62.
48. Vermeire S, Rutgeerts P, Van Steen K, Joossens S, Claessens G, Pierik M, et al. Genome wide scan in a Flemish inflammatory bowel disease population: support for the IBD4 locus, population heterogeneity, and epistasis. *Gut* 2004;53(7):980-6.
49. Barmada MM, Brant SR, Nicolae DL, Achkar JP, Panhuysen CI, Bayless TM, et al. A genome scan in 260 inflammatory bowel disease-affected relative pairs. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10(1):15-22.

50. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411(6837):599-603.
51. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411(6837):603-6.
52. McGovern DP, van Heel DA, Ahmad T, Jewell DP. NOD2 (CARD15), the first susceptibility gene for Crohn's disease. *Gut* 2001;49(6):752-4.
53. Girardin SE, Boneca JG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. NOD2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003;278(11):8869-72.
54. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001;357(9272):1925-8.
55. Vermeire, S. NOD2/CARD15: relevance in clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18(3):569-75.
56. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol* 2004;99(12):2393-404.
57. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, et al. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;123(3):679-88.
58. Ahmad T, Marshall S, Jewell D. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;122(4):854-66.
59. Büning C, Genschel J, Bühner S, Krüger S, Kling K, Dignass A, et al. Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19(10):1073-8.
60. Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M, Tassies D, Plaza S, Delgado S, et al. Crohn's disease patients carrying Nod2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence. *Ann Surg* 2005;242(5):693-700.
61. Rioux JD, Daly MJ, Silverberg MS, Lindblad K, Steinhart H, Cohen Z, et al. Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet* 2001;29(2):223-8.
62. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, et al. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 2004;36(5):471-5.
63. Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, et al. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2004;36(5):476-80.
64. McGovern DP, Hysi P, Ahmad T, van Heel DA, Moffatt MF, Carey A, et al. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Hum Mol Genet* 2005;14(10):1245-50.
65. Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, et al. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 2004;53(7):987-92.

66. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;314(5804):1461-3.
67. Forbes A. Diet in the aetiology and patogénesis of inflammatory bowel disease. In: Gasull, Cabré E, Doménech E. *Inflammatory bowel disease. Proceedings of the XII Monographic course on the physiopathology and treatment of digestive diseases*. 1ª ed. Madrid: Adalia farma; 2005. p.19-23.
68. Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1989; 34(12): 1841-54.
69. Regueiro M, Kip KE, Cheung O, Hegazi RA, Plevy S. Cigarette smoking and age at diagnosis of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11(1):42-7.
70. Cosnes J, Carbonnel F, Carrat F, Beaugerie L, Cattan S, Gendre J. Effects of current and former cigarette smoking on the clinical course of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13(11):1403-11.
71. Picco MF and Bayless TM. Tobacco consumption and disease duration are associated with fistulizing and stricturing behaviors in the first 8 years of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2003;98(2):363-8.
72. Ryan WR, Allan RN, Yamamoto T, Keighley MR. Crohn's disease patients who quit smoking have a reduced risk of reoperation for recurrence. *Am J Surg* 2004;187(2):219-25.
73. Breuer-Katschinski BD, Hollander N, Goebell H. Effect of cigarette smoking on the course of Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8(3):225-8.
74. Bridger S, Lee JC, Bjarnason I, Jones JE, Macpherson AJ. In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis. *Gut* 2002;51(1):21-5.
75. Abraham N, Selby W, Lazarus R, Solomon M. Is smoking an indirect risk factor for the development of ulcerative colitis? An age- and sex-matched case-control study. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18(2):139-46.
76. Beaugerie L, Massot N, Carbonnel F, Cattan S, Gendre JP, Cosnes J. Impact of cessation of smoking on the course of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2001;96(7):2113-6.
77. Fraga XF, Vergara M, Medina C, Casellas F, Bermejo B, Malagelada JR. Effects of smoking on the presentation and clinical course of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9(7):683-7.
78. Godet PG, May GR, Sutherland LR. Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. *Gut* 1995;37(5):668-73.
79. Davies NM. Toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the large intestine. *Dis Colon Rectum*. 1995; 38(12): 1311-21.
80. Fang WF, Broughton A, Jacobson ED. Indomethacin-induced intestinal inflammation. *Am J Dig Dis* 1977;22(9):749-60.
81. Bjarnason I, Zanelli G, Smith T, Prouse P, Williams P, Smethurst P, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drug-induced intestinal inflammation in humans. *Gastroenterology* 1987;93(3):480-9.

82. Thayer WR Jr, Chitnavis V. Inflammatory bowel disease. The case for an infectious etiology. *Med Clin North Am* 1994;78(6):1233-47.
83. Pounder RE. The pathogenesis of Crohn's disease. *J Gastroenterol* 1994;29 Suppl 7:11-5.
84. Chen W, Li D, Paulus B, Wilson I, Chadwick VS. Detection of *Listeria monocytogenes* by polymerase chain reaction in intestinal mucosal biopsies from patients with inflammatory bowel disease and controls. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(10):1145-50.
85. Schwartz D, Shafran I, Romero C, Piromalli C, Biggerstaff J, Naser N, Chamberlin W, Naser SA. Use of short-term culture for identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue from Crohn's disease patients. *Clin Microbiol Infect* 2000;6(6):303-7.
86. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;127(2):412-21.
87. Uzoigwe JC, Khaitisa ML, and Gibbs PS. Epidemiological evidence for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as a cause of Crohn's disease. *Epidemiol Infect* 2007;135(7):1057-68.
88. Chamberlin W, Graham DY, Hulten K, El-Zimaity HM, Schwartz MR, Naser S, et al. Review article: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as one cause of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15(3):337-46.
89. Wurzelmann JI, Lyles CM, Sandler RS. Childhood infections and the risk of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1994; 39(3):555-60.
90. Klement E, Cohen RV, Boxman J, Joseph A, Reif S. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2004;80(5):1342-52.
91. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003;124(1):40-6.
92. Radford Smith GL, Edwards JE, Purdie DM, Pandeya N, Watson M, Martin NG et al. Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2002;51:808-13.
93. Wills JS, Lobis IF, Denstman FJ. Crohn disease: state of the art. *Radiology* 1997;202(3):597-610.
94. Ogorek CP, Fisher RS. Differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Med Clin North Am* 1994;78(6):1249-58.
95. Hughes LE. Clinical classification of perianal Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 1992;35(10):928-32.
96. Parks AG, Gordon PH, and Hardcastle JD. A classification of fistula-in-ano. *Br J Surg* 1976;63(1):1-12.
97. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, et al. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 2000;6(1):8-15.
98. Silverberg MS, Satsagi J, Ahmad T, Arnott ID, Nernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005;19 Suppl A:5-36.

99. Quinn PG, Binion DG, Connors PJ. The role of endoscopy in inflammatory bowel disease. *Med Clin North Am* 1994;78(6):1331-52.
100. Leighton JA, Legnani P, Seidman EG. Role of capsule endoscopy in inflammatory bowel disease: where we are and where we are going. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13(3):331-7.
101. Dağlı U, Over H, Tezel A, Ulker A, Temuçin G. Transrectal ultrasound in the diagnosis and management of inflammatory bowel disease. *Endoscopy* 1999;31(2):152-7.
102. Schwartz DA, Wiersema MJ, Dudiak KM, Fletcher JG, Clain JE, Tremaine WJ, et al. A comparison of endoscopic ultrasound, magnetic resonance imaging, and exam under anesthesia for evaluation of Crohn's perianal fistulas. *Gastroenterology* 2001;121(5):1064-72.
103. Bartram CI. Barium radiology. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1994;203:20-3.
104. Ros LH, Crespo AM, Gimenez F, Marcuello T, Galbe R. Diagnostic imaging of inflammatory bowel disease. *Radiologia* 2006;48(4):205-15.
105. Schreyer AG, Seitz J, Feuerbach S, Rogler G, Herfarth H. Modern imaging using computer tomography and magnetic resonance imaging for inflammatory bowel disease (IBD) AU1. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10(1):45-54.
106. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976;70(3):439-44.
107. Travis SP, Stange EF, Lemann M, Oresland T, Chowers Y, Forbes A, et al., European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* 2006;55 Suppl 1:i16-35.
108. Azad Khan AK, Piris J, Truelove SC. An experiment to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine. *Lancet* 1977;2:892-5.
109. Tanigawara Y, Kita T, Aoyama N, Gobara M, Komada F, Sakai T et al. N-acetyltransferase 2 genotype-related sulfapyridine acetylation and its adverse events. *Biol Pharm Bull* 2002;25(8):1058-62.
110. Pullar T, Hunter JA, Capell HA. Effect of acetylator phenotype on efficacy and toxicity of sulphasalazine in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1985;44(12):831-7.
111. Singleton JW, Hanauer SB, Gitnick GL, Peppercorn MA, Robinson MG, Wruble LD, Krawitt EL. Mesalamine capsules for the treatment of active Crohn's disease: results of a 16-week trial. Pentasa Crohn's Disease Study Group. *Gastroenterology* 1993;104(5):1293-301.
112. Hanauer SB, Stromberg U. Oral Pentasa in the treatment of active Crohn's disease: A meta-analysis of double-blind, placebo-controlled trials. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2(5):379-88.
113. Otley A, Steinhart AH. Budesonide for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;4:CD000296.
114. Malchow H, Ewe K, Brandes JW, Goebell H, Ehms H, Sommer H, Jesdinsky H. European Cooperative Crohn's Disease Study (ECCDS): results of drug treatment. *Gastroenterology* 1984;86(2):249-66.

115. Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut* 2002;50(4):485-9.
116. Bebb JR, Scott BB. How effective are the usual treatments for Crohn's disease? *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20(2):151-9.
117. Alfadhli AA, McDonald JW, Feagan BG. Methotrexate for induction of remission in refractory Crohn's Disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;1:CD003459.
118. Mekhjian HS, Switz DM, Watts HD, Deren JJ, Katon RM, Beman FM. National Cooperative Crohn's Disease Study: factors determining recurrence of Crohn's disease after surgery. *Gastroenterology* 1979;77(4 Pt 2):907-13.
119. Farmer RG, Whelan G, Fazio VW. Long-term follow-up of patients with Crohn's disease. Relationship between the clinical pattern and prognosis. *Gastroenterology* 1985; 88(6):1818-25.
120. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000;406(6797):782-7.
121. Elewaut D, DiDonato JA, Kim JM, Truong F, Eckmann L, Kagnoff MF. NF-kappa B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. *J Immunol* 1999;163(3):1457-66.
122. Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 2001;292(5519):1115-8.
123. Salzman NH, Chou MM, de Jong H, Liu L, Porter EM, Paterson Y. Enteric salmonella infection inhibits Paneth cell antimicrobial peptide expression. *Infect Immun* 2003;71(3):1109-15.
124. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003;3(4):331-41.
125. Cheroutre H, Madakamutil L. Acquired and natural memory T cells join forces at the mucosal front line. *Nat Rev Immunol* 2004;4(4):290-300.
126. Hershberg RM, Mayer LF. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol Today* 2000;21(3):123-8.
127. Fagarasan S, Honjo T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol* 2003;3(1):63-72.
128. Modlin RL, Brightbill HD, Godowski PJ. The toll of innate immunity on microbial pathogens. *N Engl J Med* 1999;340(23):1834-5.
129. Kopp EB, Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1999;11(1):13-8.
130. Oostenbrug LE, Drenth JP, de Jong DJ, Nolte IM, Oosterom E, van Dullemen HM et al. Association between Toll-like receptor 4 and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11(6):567-75.
131. Pierik M, Joossens S, Van Steen K, Van Schuerbeek N, Vlietinck R, Rutgeerts P et al. Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(1):1-8.

132. Frolova L, Drastich P, Rossmann P, Klimesova K, Tlaskalova-Hogenova H et al. Expression of Toll-like Receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in Biopsy Samples of Patients With Inflammatory Bowel Diseases: Upregulated Expression of TLR2 in Terminal Ileum of Patients With Ulcerative Colitis. *J Histochem Cytochem* 2007;Nov 26 [Epub ahead of print]
133. Inohara N, Nuñez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(5):371-82.
134. Netea MG, Kullberg BJ, de Jong DJ, Franke B, Sprong T, Naber TH et al. NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. *Eur J Immunol* 2004;34(7):2052-9.
135. Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2007;117(3):514-21.
136. Seksik P, Lepage P, Sokol H, Mangin I, Suau A. Intestinal Bacteria: their role in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. In: Gasull, Cabré E, Doménech E. *Inflammatory bowel disease. Proceeding of the XII monographic course on the physiopathology and treatment of digestive diseases*. 1ª ed. MADRID: Adalia farma; 2005. p. 31-39.
137. Olson TS, Reuter BK, Scott KG, Morris MA, Wang XM, Hancock LN, et al. The primary defect in experimental ileitis originates from a nonhematopoietic source. *J Exp Med* 2006;203(3):541-52.
138. Hermiston ML, Gordon JI. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* 1995;270(5239):1203-7.
139. Bjarnason I. Intestinal permeability. *Gut* 1994;35(1 Suppl):S18-22.
140. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2005;129(1): 50-65.
141. Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spottl T, Andus T, et al. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2002;122(7):1987-2000.
142. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K, et al. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9(4):215-23.
143. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004;53(11):1658-64.
144. Martinez-Montiel MP, Muñoz-Yague MT. Biologic therapies for chronic inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2006;98(4):265-91.
145. Galli SJ. New insights into "the riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest* 1990;62(1):5-33.
146. Kitamura Y, Oboki K, Ito A. Molecular mechanisms of mast cell development. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2006;26(3):387-405.
147. Caulfield JP, Lewis RA, Hein A, Austen KF. Secretion in dissociated human pulmonary mast cells. Evidence for solubilization of granule contents before discharge. *J Cell Biol* 1980;85(2):299-312.

148. Imamura T, Dubin A, Moore W, Tanaka R, Travis J. Induction of vascular permeability enhancement by human tryptase: dependence on activation of prekallikrein and direct release of bradykinin from kininogens. *Lab Invest.* 1996;74(5):861-70.
149. Lohi J, Harvima I, Keski-Oja J. Pericellular substrates of human mast cell tryptase: 72,000 dalton gelatinase and fibronectin. *J Cell Biochem* 1992;50(4):337-49.
150. He S, Walls AF. Human mast cell chymase induces the accumulation of neutrophils, eosinophils and other inflammatory cells in vivo. *Br J Pharmacol* 1998;125(7):1491-500.
151. Tchougounova E, Pejler G. Regulation of extravascular coagulation and fibrinolysis by heparin-dependent mast cell chymase. *Faseb J* 2001;15(14):2763-5.
152. Tchougounova E, Lundequist A, Fajardo I, Winberg JO, Abrink M, Pejler G. A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloprotease-9 and pro-matrix metalloprotease-2. *J Biol Chem* 2005;280(10):9291-6.
153. Robinson C, Benyon C, Holgate ST, Church MK, Robinson. The IgE -and calcium-dependent release of eicosanoids and histamine from human purified cutaneous mast cells. *J Invest Dermatol* 1989;93(3):397-404.
154. Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(12):4464-8.
155. Weidner N, Austen KF. Evidence for morphologic diversity of human mast cells. An ultrastructural study of mast cells from multiple body sites. *Lab Invest* 1990;63(1):63-72.
156. Santos J, Saperas E, Nogueiras C, Mourelle M, Antolín M, Cadahia A, Malagelada JR. Release of mast cell mediators into the jejunum by cold pain stress in humans. *Gastroenterology* 1998;114(4):640-8.
157. He SH. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2004;10(3):309-18.
158. Qu Z, Huang X, Ahmadi P, Stenberg P, Liebler JM, Le AC, Planck SR, Rosenbaum JT. Synthesis of basic fibroblast growth factor by murine mast cells. Regulation by transforming growth factor beta, tumor necrosis factor alpha, and stem cell factor. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;115(1):47-54.
159. Bern MJ, Sturbaum CW, Karayalcin SS, Berschneider HM, Wachsmann JT, Powell DW. Immune system control of rat and rabbit colonic electrolyte transport. Role of prostaglandins and enteric nervous system. *J Clin Invest* 1989; 83(6):1810-20.
160. Crowe SE, Perdue MH. Anti-immunoglobulin E-stimulated ion transport in human large and small intestine. *Gastroenterology* 1993;105(3):764-72.
161. Crowe SE, Sestini P, Perdue MH. Allergic reactions of rat jejunal mucosa. Ion transport responses to luminal antigen and inflammatory mediators. *Gastroenterology* 1990;99(1):74-82.
162. Perdue MH, Marshall J, Masson S. Ion transport abnormalities in inflamed rat jejunum. Involvement of mast cells and nerves. *Gastroenterology* 1990;98(3):561-7.
163. Stack WA, Keely SJ, O'Donoghue DP, Baird AW. Oimmune regulation of human colonic electrolyte transport in vitro. *Gut* 1995;36(3):395-400.

164. Crowe SE, Perdue MH. Gastrointestinal food hypersensitivity: basic mechanisms of pathophysiology. *Gastroenterology* 1992;103(3):1075-95.
165. Befus D, Goodacre R, Dyck N, Bienenstock J. Mast cell heterogeneity in man. I. Histologic studies of the intestine. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985;76(3):232-6.
166. Perdue MH, Marshall J, Masson S. Ion transport abnormalities in inflamed rat jejunum. Involvement of mast cells and nerves. *Gastroenterology* 1990;98(3):561-7.
167. Lloyd G, Green FH, Fox H, Mani V, Turnberg LA. Mast cells and immunoglobulin E in inflammatory bowel disease. *Gut* 1975;16(11):861-5.
168. Araki Y, Andoh A, Fujiyama Y, Bamba T. Development of dextran sulphate sodium-induced experimental colitis is suppressed in genetically mast cell-deficient Ws/Ws rats. *Clin Exp Immunol* 2000;119(2):264-9.
169. Farhadi A, Fields JZ, Keshavarzian A. Mucosal mast cells are pivotal elements in inflammatory bowel disease that connect the dots: stress, intestinal hyperpermeability and inflammation. *World J Gastroenterol* 2007;13(22):3027-30.
170. Dvorak AM, Monahan RA, Osage JE, Dickersin GR. Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. II. Immunologic inflammatory response. Alterations of mast cells, basophils, eosinophils, and the microvasculature. *Hum Pathol* 1980;11(6):606-19.
171. Gelbmann CM, Mestermann S, Gross V, Köllinger M, Schölmerich J, Falk W. Strictures in Crohn's disease are characterised by an accumulation of mast cells colocalised with laminin but not with fibronectin or vitronectin. *Gut* 1999;45(2):210-7.
172. Dvorak AM, Schleimer RP, Lichtenstein LM. Human mast cells synthesize new granules during recovery from degranulation. In vitro studies with mast cells purified from human lungs. *Blood* 1988;71(1):76-85.
173. Tsuneyama K, Saito K, Ruebner BH, Konishi I, Nakanuma Y, Gershwin ME. Immunological similarities between primary sclerosing cholangitis and chronic sclerosing sialadenitis: report of the overlapping of these two autoimmune diseases. *Dig Dis Sci* 2000;45(2):366-72.
174. Lilja I, Gustafson-Svard C, Franzen L, Sjobahl R. Tumor necrosis factor-alpha in ileal mast cells in patients with Crohn's disease. *Digestion* 2000;61(1):68-76.
175. Middel P, Reich K, Polzien F, Blaschke V, Hemmerlein B, Herms J, et al. Interleukin 16 expression and phenotype of interleukin 16 producing cells in Crohn's disease. *Gut* 2001;49(6):795-803.
176. Fox CC, Lichtenstein LM, Roche JK. Intestinal mast cell responses in idiopathic inflammatory bowel disease. Histamine release from human intestinal mast cells in response to gut epithelial proteins. *Dig Dis Sci* 1993;38(6):1105-12.
177. Bischoff SC, Schwengberg S, Wordelmann K, Weimann A, Raab R, Manns MP. Effect of c-kit ligand, stem cell factor, on mediator release by human intestinal mast cells isolated from patients with inflammatory bowel disease and controls. *Gut* 1996;38(1):104-14.
178. Raithel M, Schneider HT, Hahn EG. Effect of substance P on histamine secretion from gut mucosa in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 1999; 34(5):496-503.

179. Nolte H, S Spjeldnaes N, Kruse A, Windelborg B. Histamine release from gut mast cells from patients with inflammatory bowel diseases. *Gut* 1990;31(7):791-4.
180. Bischoff SC, Wedemeyer J, Herrmann A, Meier PN, Trautwein C, Cetin Y, et al Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. *Histopathology* 1996;28(1):1-13.
181. Ruh J, Schmidt E, Gebhard MM, Klar E, Glaser F, Herfarth C. Effect of mast cell activation on microcirculation of intestinal mucosa in inflamed small intestine of the rat. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1998;115(Suppl I):109-12.
182. Xu X, Rivkind A, Pikarsky A, Pappo O, Bischoff SC, Levi-Schaffer F. Mast cells and eosinophils have a potential profibrogenic role in Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2004;39(5):440-7.
183. Crowe SE, Perdue MH. Functional abnormalities in the intestine associated with mucosal mast cell activation. *Reg Immunol* 1992;4(2):113-7.
184. Crowe SE, Luthra GK, Perdue MH. Mast cell mediated ion transport in intestine from patients with and without inflammatory bowel disease. *Gut* 1997;41(6):785-92
185. Dale HH, Laidlaw PP. The physiological action of beta-aminazolyethylamine. *J Physiol* 1910;41(5):318-44.
186. Dale HH, Laidlaw PP. Further observations on the action of beta-aminazolyethylamine. *J Physiol* 1911;43(2):182-95.
187. Thorpe WV. Vasodilator constituents of tissue extracts: Isolation of histamine from muscle. *Biochem J* 1928;22(1):94-101.
188. Lewis T, Zotterman Y. Vascular reactions of the skin to injury: Part VIII. The resistance of the human skin to constant currents, in relation to injury and vascular response. *J Physiol* 1927;62(3):280-8.
189. Riley JF, West GB. Mast cells and histamine in normal and pathological tissues. *J Physiol* 1953;119(4):44P.
190. Schayer RW, Karjala SA. Ring N methylation; a major route of histamine metabolism. *J Biol Chem* 1956;221(1):307-13.
191. Knutson L, Ahrenstedt O, Odland B, Hällgren R. The jejunal secretion of histamine is increased in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 1990;98(4):849-54.
192. Weidenhiller M, Raithel M, Winterkamp S, Otte P, Stolper J, Hahn EG. Methylhistamine in Crohn's disease (CD): increased production and elevated urine excretion correlates with disease activity. *Inflamm Res* 2000;49 Suppl 1:S35-6.
193. Winterkamp S, Weidenhiller M, Otte P, Stolper J, Schwab D, Hahn EG, Raithel M. Urinary excretion of N-methylhistamine as a marker of disease activity in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2002;97(12):3071-7.
194. Bischoff SC, Grabowsky J, Manns MP. Quantification of inflammatory mediators in stool samples of patients with inflammatory bowel disorders and controls. *Dig Dis Sci* 1997;42(2):394-403.
195. Homaidan FR, Tripodi J, Zhao L, Burakoff R. Regulation of ion transport by histamine in mouse cecum. *Eur J Pharmacol* 1997;331(2-3):199-204.

196. Moriarty D, Goldhill J, Selve N, O'Donoghue DP, Baird AW. Human colonic anti-secretory activity of the potent NK(1) antagonist, SR140333: assessment of potential anti-diarrhoeal activity in food allergy and inflammatory bowel disease. *Br J Pharmacol* 2001;133(8):1346-54.
197. Mennigen R, Kusche J, Streffer C, Krakamp B. Diamine oxidase activities in the large bowel mucosa of ulcerative colitis patients. *Agents Actions* 1990;30(1-2):264-6.
198. Pacifici GM, Donatelli P, Giuliani L. Histamine N-methyl transferase: inhibition by drugs. *Br J Clin Pharmacol* 1992;34(4):322-7.
199. Garcia-Martin E, Garcia-Menaya J, Sanchez B, Martinez C, Rosendo R, Agundez JA. Polymorphisms of histamine-metabolizing enzymes and clinical manifestations of asthma and allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2007;37(8):1175-82.
200. Raithel M, Kűfner M, Ulrich P, Hahn EG. The involvement of the histamine degradation pathway by diamine oxidase in manifest gastrointestinal allergies. *Inflamm Res* 1999;48 Suppl 1:S75-6.
201. Garcia-Martin E, Mendoza JL, Martinez C, Taxonera C, Urcelay E, Ladero JM. Severity of ulcerative colitis is associated with a polymorphism at diamine oxidase gene but not at histamine N-methyltransferase gene. *World J Gastroenterol* 2006;12(4):615-20.
202. Ayuso P, Garcia-Martin E, Martinez C, Agundez JA. Genetic variability of human diamine oxidase: occurrence of three nonsynonymous polymorphisms and study of their effect on serum enzyme activity. *Pharmacogenet Genomics* 2007;17(9):687-93.
203. Wolvekamp MC, de Bruin RW. Diamine oxidase: an overview of historical, biochemical and functional aspects. *Dig Dis Sci* 1994;12(1):2-14.
204. Thompson JS, Burnett DA, Markin RS, Vaughan WP. Intestinal mucosa diamine oxidase activity reflects intestinal involvement in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1988;83(7):756-60.
205. Schmidt WU, Sattler J, Hesterberg R, Roher HD, Zoedler T, Sitter H et al. Human intestinal diamine oxidase (DAO) activity in Crohn's disease: a new marker for disease assessment? *Agents Actions* 1990;30(1-2):267-70.
206. Barbry P, Champe M, Chassande O, Munemitsu S, Champigny G, Lingueglia E, et al. et al. Human kidney amiloride-binding protein: cDNA structure and functional expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(19):7347-51.
207. Lingueglia E, Renard S, Voilley N, Waldmann R, Chassande O, Lazdunski M, et al. Molecular cloning and functional expression of different molecular forms of rat amiloride-binding proteins. *Eur J Biochem* 1993;216(2):679-87.
208. Barbry P, Simon-Bouy B, Mattéi MG, Le Guern E, Jaume-Roig B, Chassande O, et al. Localization of the gene for amiloride binding protein on chromosome 7 and RFLP analysis in cystic fibrosis families. *Hum Genet* 1990;85(6):587-9.
209. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>, N.S.n.p.d.
210. Garcia-Martin E, Ayuso P, Martinez C, Agundez JA. Improved analytical sensitivity reveals the occurrence of gender-related variability in diamine oxidase enzyme activity in healthy individuals. *Clin Biochem* 2007;40(16-7):1339-41.

211. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs1049793.
212. Petersen J, Raithel M, Schwelberger HG. Analysis of diamine oxidase gene polymorphisms in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Res* 2001;50 Suppl 2:S68-9.
213. Petersen J, Raithel M, Schwelberger HG. Histamine N-methyltransferase and diamine oxidase gene polymorphisms in patients with inflammatory and neoplastic intestinal diseases. *Inflamm Res* 2002;51 Suppl 1:S91-2.
214. Petersen J, Drasche A, Raithel M, Schwelberger HG. Analysis of genetic polymorphisms of enzymes involved in histamine metabolism. *Inflamm Res* 2003;52 Suppl 1:S69-70.
215. Neitzel H. A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum Genet* 1986;73(4):320-6.
216. Sellge G, Lorentz A, Gebhardt T, Levi-Schaffer F, Bektas H, Manns MP, et al., Human intestinal fibroblasts prevent apoptosis in human intestinal mast cells by a mechanism independent of stem cell factor, IL-3, IL-4, and nerve growth factor. *J Immunol* 2004;172(1):260-7.
217. Andoh A, Deguchi Y, Inatomi O, Yagi Y, Bamba S, Tsujikawa T, et al. Immunohistochemical study of chymase-positive mast cells in inflammatory bowel disease. *Oncol Rep* 2006;16(1):103-7.
218. Snyder, RA. Pyoderma gangrenosum involving the head and neck. *Arch Dermatol* 1986;122(3):295-302.