

Universidad de Huelva

Departamento de Biología Ambiental y Salud Pública



Precisión diagnóstica de la calprotectina fecal y la M2-piruvato quinasa en la detección de actividad endoscópica en la enfermedad de Crohn

**Memoria para optar al grado de doctor
presentada por:**

Juan María Vázquez Morón

Fecha de lectura: 7 de julio de 2017

Bajo la dirección de los doctores:

Carlos Ruiz Frutos

Héctor Pallarés Manrique

Huelva, 2017



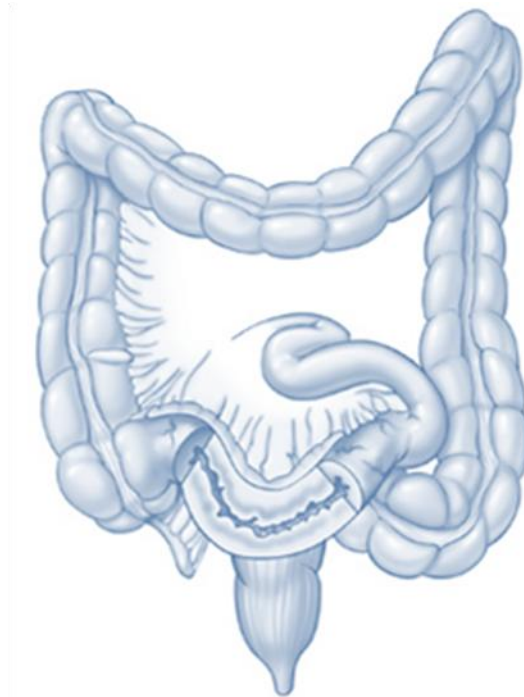


UNIVERSIDAD DE HUELVA

Programa Doctorado Gestión y Salud Ambiental

TESIS DOCTORAL

PRECISIÓN DIAGNÓSTICA DE LA CALPROTECTINA FECAL Y LA M2-PIRUVATO QUINASA EN LA DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ENDOSCÓPICA EN LA ENFERMEDAD DE CROHN



Autor: Juan María Vázquez Morón

**Directores: Dr. Carlos Ruíz Frutos
Dr. Héctor Pallarés Manrique**

Huelva, 2017

TESIS DOCTORAL

PRECISIÓN DIAGNÓSTICA DE CALPROTECTINA FECAL Y M2-PIRUVATO QUINASA EN LA DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ENDOSCÓPICA EN LA ENFERMEDAD DE CROHN

Autor:

Juan María Vázquez Morón

Directores:

Dr. Carlos Ruiz Frutos

Dr. Héctor Pallarés Manrique

UNIVERSIDAD DE HUELVA

Programa de Doctorado de Gestión y Salud Ambiental

Huelva 2017

Agradecimientos

Gracias a mis tutores, Carlos y Héctor, por su dirección, criterio, apoyo y dedicación para poder realizar este proyecto.

Gracias a todos mis compañeros del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Juan Ramón Jiménez por su ayuda en la elaboración y realización de este trabajo.

Gracias a Javier por ayudarme en la idea, metodología e inspiración.

Gracias a Paco por su ayuda y asesoramiento sobre la metodología estadística para poder elaborar este trabajo.

Gracias a José Luís, Luís, Miguel Ángel y José Antonio del Servicio de Análisis clínicos por su ayuda para la realización de las pruebas de laboratorio

Gracias a M^a Carmen, Finita, Simón, Antonio y Simón por su apoyo y aliento continuo para lograr finalizar y poder presentar este proyecto.

Dedicatoria

Dedicado especialmente a Pepa y a Martina por ser las personas más importantes de mi vida y por el tiempo que no he podido estar con ellas al realizar este proyecto y elaborar esta tesis doctoral

INDICE

Glosario-Acrónimos	ii
Resumen	vi
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	3
1.2. ENFERMEDAD DE CROHN.....	5
1.2.1. Definición y generalidades	5
1.2.2. Epidemiología	7
1.2.3. Manifestaciones clínicas	8
1.2.4. Clasificación fenotípica.....	11
1.3 PRUEBAS DIAGNÓSTICAS	17
1.3.1. Pruebas de diagnóstico por la imagen	17
1.3.2. Pruebas endoscópicas en la enfermedad de crohn	20
Colonoscopia e ileoscopia	20
Endoscopia digestiva alta	21
Enteroscopia.....	22
Cápsula endoscópica	22
1.3.3. ANATOMÍA PATOLÓGICA	23
1.4. PRUEBAS DE LABORATORIO	27
1.4.1. Biomarcadores serológicos	27
1.4.1.1. Proteína C Reactiva (PCR).....	28
1.4.1.2. Velocidad de Sedimentación Globular (VSG)	30
1.4.2. Biomarcadores fecales	31
1.4.2.1. Calprotectina fecal (CF)	31
1.4.2.2. M2-Piruvato Quinasa fecal (M2-PK).....	34
1.5 ÍNDICES DE ACTIVIDAD EN LA ENFERMEDAD DE CROHN	37
1.5.1. Índices de actividad clínicos	37
CDAI (Crohn Disease Activity Index).....	37
1.5.2. Índices de actividad endoscópicos	38
SES-CD (Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease).....	39
1.6. CONOCIMIENTO ACTUAL SOBRE LA PRECISIÓN DE LA CALPROTECTINA Y LA M2-PK FECAL PARA DETECTAR ACTIVIDAD INFLAMATORIA EN LA ENFERMEDAD DE CROHN.	41

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
2.1. HIPÓTESIS	49
2.2.1. OBJETIVO GENERAL.....	50
2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA.....	53
3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	55
3.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO	57
3.3. MUESTRA.....	59
3.4. CÁLCULO DE TAMAÑO MUESTRAL.....	61
3.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN	63
3.6. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN DE LOS PACIENTES	65
3.7. TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	69
3.7.1. Determinación de los niveles fecales de calprotectina fecal	69
3.7.2. Determinación de los niveles fecales de M2-piruvato quinasa	70
3.7.3. Determinación de los niveles plasmáticos de la proteína C reactiva.....	71
3.7.4. Determinación de los niveles plasmáticos de la velocidad de sedimentación globular	71
3.8. RECOGIDA DE DATOS	73
3.9. VARIABLES DEL ESTUDIO	75
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	79
3.11. CONSIDERACIONES ÉTICAS	81
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	83
4.1. DESCRIPCIÓN CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS BASALES	85
4.2. TEST DE NORMALIDAD.....	89
4.3. CORRELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES.....	91
4.4. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE LOS BIOMARCADORES Y LA PUNTUACIÓN DEL <i>CROHN'S DISEASE ACTIVITY INDEX</i> SEGÚN LA ACTIVIDAD ENDOSCÓPICA.....	93
4.5. ESTIMACIÓN DEL PUNTO DE CORTE ÓPTIMO DE LOS BIOMARCADORES Y EL <i>CROHN DISEASE ACTIVITY INDEX</i> PARA DETECTAR ACTIVIDAD ENDOSCÓPICA	99
4.6. RANGOS ÓPTIMOS DE LA CALPROTECTINA FECAL PARA ESTABLECER ACTIVIDAD INFLAMATORIA Y CURACIÓN MUCOSA.....	103
4.7. CÁLCULO DE UN MODELO PREDICTIVO PARA DETECTAR ACTIVIDAD ENDOSCÓPICA. .	107
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	111
5.1. CONSIDERACIONES GENERALES: aportaciones de la Tesis	113
5.2. VALORACIÓN DEL ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA	115

5.3. DEFINICIÓN DE ACTIVIDAD ENDOSCÓPICA.....	117
5.4. VALORACIÓN DE LA CORRELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES ESTUDIADAS	119
5.5. VALORACIÓN DE LA COMPARACIÓN DE NIVELES MEDIOS DE LOS BIOMARCADORES Y EL CROHN'S DISEASE ACTIVITY INDEX EN LOS GRUPOS DE ACTIVIDAD Y REMISIÓN ENDOSCÓPICA.....	121
5.6. ANÁLISIS DE LA ESTIMACIÓN DEL PUNTO DE CORTE PARA LOS BIOMARCADORES Y EL CROHN'S DISEASE ACTIVITY INDEX	123
5.7. ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN DE ÁREAS DE ALTA PRECISIÓN PARA DETECTAR ACTIVIDAD ENDOSCÓPICA Y CURACIÓN MUCOSA.....	125
5.8. VALORACIÓN DE LA REGRESIÓN LOGÍSTICA Y GENERACIÓN DE RANGOS DE ALTA PRECISIÓN	129
5.9. DIAGRAMA DE TOMA DE DECISIONES EN BASE A LA ACTIVIDAD CLÍNICA Y A LA CALPROTECTINA FECAL	131
5.10. LIMITACIONES	135
5.11. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN	137
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	139
CONCLUSIONES	141
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA	143
CAPÍTULO VIII: ANEXOS	157
ANEXO 1: SUBVENCIONES, PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES	159
ANEXO 2: HOJA DE RECOGIDA DE DATOS.....	161
ANEXO 3: ÍNDICE CROHN'S DISEASE ACTIVITY INDEX (CDAI).....	162
ANEXO 4: ÍNDICE SIMPLE ENDOSCOPIC SCORE FOR CROHN'S DISEASE (SES-CD)	163
ANEXO 5: CONSENTIMIENTO INFORMADO	164
ANEXO 6: ÍNDICE DE FIGURAS.....	165

Glosario-Acrónimos

ADP: Adenosín difosfato

ATP: Adenosín trifosfato

BOE: Boletín oficial del estado

CDAI: Crohn's disease activity index

CDEIS: Crohn's disease endoscopic index of severity

CF: calprotectina fecal

CI: Colitis indeterminada

CU: colitis ulcerosa

EC: enfermedad de Crohn

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

GETAID: Groupe d'étude thérapeutique des affections inflammatoires du tube digestif

IC: Intervalo de confianza

IY: Índice de Youden

kDa: Kilodalton

K-S: Kolmogorov-Smirnov

LR: Likelihood ratio

M2-PK: M2-piruvato quinasa

OMS: Organización mundial de la salud

PCR: Proteína C reactiva

PG: Precisión global

RIC: Rango intercuartílico

RM: Resonancia magnética

ROC: Receiver operating characteristic

SES-CD: Simple endoscopic scores for Crohn's disease

SII: Síndrome de intestino irritable

SPSS: Statistical package for social science

TAC: Tomografía axial computerizada

TNF α : Tumor necrosis factor

VPN: Valor predictivo negativo

VPP: Valor predictivo positivo

VSG: Velocidad de sedimentación globular

Resumen

RESUMEN

PRECISIÓN DIAGNÓSTICA DE CALPROTECTINA FECAL Y M2-PIRUVATO QUINASA EN LA DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ENDOSCÓPICA EN LA ENFERMEDAD DE CROHN

Antecedentes: La evaluación de los síntomas no ha demostrado ser útil para establecer con precisión la actividad endoscópica en la enfermedad de Crohn. En los últimos años ha habido un gran desarrollo de los biomarcadores confirmándose que son herramientas útiles para establecer la presencia de actividad inflamatoria. Los biomarcadores fecales, sobre todo la calprotectina fecal, han demostrado una mayor precisión que los biomarcadores serológicos, fundamentalmente proteína C reactiva y velocidad de sedimentación globular, para detectar la actividad endoscópica en la enfermedad de Crohn. La M2-Piruvato quinasa es un biomarcador poco estudiado en la enfermedad de Crohn que también podría demostrar su validez como herramienta para esta función. Sin embargo, la aplicabilidad clínica de estos biomarcadores es limitada, ya que no existe consenso sobre el punto de corte óptimo para establecer la presencia de actividad endoscópica.

El objetivo de este estudio es analizar si la calprotectina fecal y la M2-piruvato quinasa fecal son buenas herramientas para detectar actividad endoscópica y para generar rangos altamente precisos para predecir el estado de actividad y de curación mucosa.

Métodos: La puntuación del *simple endoscopic score for Crohn's disease* (SES-CD) y del *Crohn's disease activity index* (CAI) fue calculado en 71 pacientes diagnosticados

con enfermedad de Crohn. Se determinaron los niveles de calprotectina fecal, M2-piruvato quinasa, proteína C reactiva y velocidad de sedimentación globular en todos los pacientes. Se realizó un análisis de precisión mediante la estimación de la curva ROC de los biomarcadores y el CDAI con respecto al SES-CD. Se calculó el punto de corte con mayor precisión para establecer la actividad endoscópica, Se realizó una regresión logística binaria determinándose las variables con mayor precisión para clasificar mejor a los pacientes según la actividad endoscópica. También se analizó si alguna variable presentaba un punto de corte con especificidad $> 90\%$ y $LR + \geq 10$ que presentaría evidencia sólida para apoyar la hipótesis diagnóstica (actividad endoscópica) y un punto de corte con sensibilidad $> 90\%$ y $LR- \leq 0,1$ que ofrecería suficiente fuerza para rechazar esta hipótesis diagnóstica. Finalmente, el nomograma de Fagan fue calculado para determinar la probabilidad de actividad endoscópica o curación de la mucosa después de obtener la puntuación del biomarcador y de acuerdo a la presencia o no de síntomas clínicos.

Resultados: Se incluyeron un total de 71 pacientes diagnosticados de enfermedad de Crohn, de los cuales 49 pacientes presentaban actividad endoscópica (69%) y 22 pacientes curación mucosa (31%). Se observó que existían diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los niveles medios de calprotectina fecal, M2-Piruvato quinasa fecal, proteína C reactiva, velocidad de sedimentación globular y la puntuación del índice CDAI en el grupo de actividad endoscópica con respecto al grupo que presentaba curación mucosa. La curvas ROC de los distintos biomarcadores y el CDAI con respecto al SES-CD mostraron que calprotectina fecal era la variable con mayor área bajo la

curva (0.917) seguido de M2-Piruvato quinasa (0.846). Se estimó un punto de corte óptimo para la calprotectina fecal de 170 $\mu\text{g/g}$ obteniéndose una sensibilidad del 77.5%, una especificidad del 95.5%, un VVP del 97.4%, un VPN del 65.6% para detectar actividad endoscópica. El punto de corte óptimo obtenido para M2-PK fue de 4.5 U/ml, determinándose una sensibilidad de 87.8%, una especificidad de 81.8%, un VPP de 91.5%, un VPN de 75%. La calprotectina fecal fue la única variable que presentó niveles de sensibilidad, especificidad, LR+ y LR- exigidos para poder generar rangos con alta precisión en la detección de curación mucosa y actividad endoscópica. Un punto de corte de calprotectina fecal de 170 $\mu\text{g/g}$ (sensibilidad 77.6%, especificidad 95.5% y LR+ 17.6) predecía una alta probabilidad de actividad endoscópica y un punto de corte de 71 $\mu\text{g/g}$ (sensibilidad 95.9%, especificidad 52.3% y LR- 0.08) predecía alta probabilidad para remisión endoscópica. En nuestro trabajo, la prevalencia de actividad endoscópica fue del 69%, pero si los pacientes tenían una calprotectina fecal ≥ 170 $\mu\text{g/g}$, tenían un 97% de probabilidades de presentar actividad endoscópica; y si tenían una calprotectina fecal ≤ 71 $\mu\text{g/g}$ la probabilidad para presentar curación mucosa sería del 84%. La presencia de síntomas clínicos modifica la probabilidad de predecir actividad endoscópica (100% si presentan actividad clínica y 89% si están en remisión clínica); o curación mucosa (75% si presentan actividad clínica y del 87% si están remisión clínica) en los rangos de alta precisión generados con los puntos de corte de calprotectina fecal. Finalmente se estimó que, de las variables estudiadas, la calprotectina fecal y el CDAI incluidas en un modelo presenta el mayor grado de significación estadística en el contraste de hipótesis que las covaría con la variable dependiente binomial actividad endoscópica. El modelo clasifica correctamente al

85.9% de la muestra y la proporción de variabilidad de SES-CD que es explicada por dicho modelo es aceptable entre un 49% y un 68.9%.

Conclusiones: La calprotectina fecal y la M2-piruvato quinasa fecal han demostrado mayor precisión que el índice clínico CDAI y los biomarcadores serológicos, proteína C reactiva y velocidad de sedimentación globular, para establecer la presencia de actividad inflamatoria observada mediante ileocolonoscopia. La calprotectina fecal es una herramienta útil para generar rangos de alta precisión para predecir el estado de actividad endoscópica o de curación mucosa en pacientes con enfermedad de Crohn. Aunque es importante tener en cuenta el contexto clínico específico, con el fin de interpretar las probabilidades de presentar actividad endoscópica o curación mucosa según el nivel de calprotectina fecal.

SUMMARY

DIAGNOSTIC PRECISION OF FECAL CALPROTECTIN AND M2-PIRUVATO QUINASA IN THE DETECTION OF ENDOSCOPIC ACTIVITY IN CROHN'S DISEASE

Backgrounds: The assessment of symptoms has not proved to be useful in accurately establishing endoscopic activity in Crohn's disease. In recent years there has been a great development of biomarkers confirming that they are useful tools to establish the presence of inflammatory activity. Fecal biomarkers, especially fecal calprotectin, have been shown to be more accurate than serological biomarkers, such as C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate, to detect endoscopic activity in Crohn's disease. M2-Pyruvate kinase is a poorly studied biomarker in Crohn's disease that could also prove its validity as a tool for this function. However, the clinical applicability of these biomarkers is limited, since there is no consensus on the optimal cutoff point to establish the presence of endoscopic activity.

The aim of this study is to analyze whether fecal calprotectin and fecal M2-pyruvate kinase are good tools to detect endoscopic activity and to generate highly accurate ranges to predict the state of endoscopy activity and mucosal healing.

Methods: The simple endoscopic score for Crohn's disease (SES-CD) and the Crohn's disease activity index (CDAI) was calculated for 71 patients diagnosed with Crohn's disease. The levels of fecal calprotectin, M2-pyruvate kinase, C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate were determined in all patients. A precision analysis was performed by estimating the ROC curve of the biomarkers and the CDAI with

respect to the SES-CD. The more precisely cut-off point was calculated to establish endoscopic activity, with better Youden's index, sensitivity and specificity, as well as for predictive scores: positive and negative, overall accuracy and likelihood ratio (LR). A binary logistic regression was performed, determining the variables with greater precision to better classify the patients according to the endoscopic activity. We also analyzed whether a variable had a cut-off with specificity > 90% and LR + \geq 10 that would present strong evidence to support the diagnostic hypothesis (endoscopic activity) and a cut-off with sensitivity > 90% and LR- \leq 0, 1 that would offer sufficient strength to reject this diagnostic hypothesis. Finally, the Fagan nomogram was calculated to determine the probability of endoscopic activity or cure of the mucosa after obtaining the biomarker score and according to the presence or absence of clinical symptoms.

Results: A total of 71 patients diagnosed with Crohn's disease were included, of whom 49 patients had endoscopic activity (69%) and 22 patients had mucosal healing (31%). It was observed that there were significant differences ($p < 0.05$) between the mean levels of fecal calprotectin, fecal M2-pyruvate kinase, C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate and CDAI score in the endoscopic activity group with respect to the group mucosal healing. ROC curves of the different biomarkers and the CDAI with respect to the SES-CD showed that fecal calprotectin was the variable with higher area under the curve (0.917) followed by M2-Pyruvate kinase (0.846). An optimal cutoff point for fecal calprotectin of 170 $\mu\text{g} / \text{g}$ was estimated according to the maximum level of Youden index (0.730), obtaining a sensitivity of 77.5%, a specificity of 95.5%, a PPV of 97.4%, a NPV Of 65.6%, an LR + of 17.06, an LR- of 0.23 and a GP of 83.1% to

detect endoscopic activity. The optimum cut-off point obtained for M2-Pyruvate kinase, according to the highest level of Youden index obtained (0.696), was 4.5 U / ml, with a sensitivity of 87.8%, specificity of 81.8%, PPV of 91.5%, NPV Of 75%, an LR + of 4.82, an LR of 0.15 and a GP of 85.9 to detect endoscopic activity. Fecal calprotectin was the only variable that presented levels of sensitivity, specificity, LR + and LR- required to be able to generate ranges with high precision in the detection of mucosal healing and endoscopic activity. A FC cut-off of 170 $\mu\text{g/g}$ (Sensitivity 77.6%, Specificity 95.5% and LR+ 17.06) predicts a high probability of endoscopic activity, and a FC cut-off of 71 $\mu\text{g/g}$ (Sensitivity 95.9%, Specificity 52.3% and LR- 0.08) predicts a high probability of mucosal healing. In our sample, the prevalence of endoscopic activity was 69%, but if a patient shows $\text{FC} \geq 170 \mu\text{g/g}$ they have a 97% probability of presenting endoscopic activity; and if they have $\text{FC} \leq 71 \mu\text{g/g}$ the probability would be 84% for presenting mucosal healing. Clinical symptoms modified the probabilities of predicting endoscopic activity (100% if clinical activity vs 89% if clinical remission) or mucosal healing (75% if clinical activity vs 87% if clinical remission) In the high precision ranges generated with cutoff fecal calprotectin. Finally, it was estimated that, of the variables studied, fecal calprotectin and CDAI included in a model presented the highest degree of statistical significance in the hypothesis contrast that would covariate them with the dependent variable binomial endoscopic activity. The model correctly classifies 85.9% of the sample and the proportion of SES-CD variability that is explained by this model is acceptable between 49% and 68.9%.

Conclusions: Fecal calprotectin and fecal M2-pyruvate kinase have been shown to be more accurate than the clinical CDAI index and serological biomarkers, C-reactive

protein and erythrocyte sedimentation rate, to establish the presence of inflammatory activity observed by ileocolonoscopy. Fecal calprotectin is a useful tool for generating highly accurate scores for predicting the state of endoscopic activity or mucosal healing in Crohn's disease patients. Although, it is important to take into account the specific clinical context in order to interpret the probabilities of presenting endoscopic activity or mucosal healing according to the fecal calprotectin level.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

El término “Enfermedad Inflamatoria Intestinal” (EII), engloba una amplia variedad de presentaciones y manifestaciones clínicas cuya característica principal es la inflamación crónica del tubo digestivo en diferentes localizaciones. Actualmente el término engloba varias entidades, las principales son la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), también están integrada por la llamada colitis indeterminada (CI) y por las colitis microscópicas (colitis colágena y colitis linfocitaria). Son entidades crónicas cuyo curso clínico consiste en alternar períodos de inactividad o quiescencia, que se identifican con las fases de remisión, con períodos de actividad clínica de diferente intensidad que se denominan brotes o recidivas. La EII ha experimentado un importante desarrollo de su conocimiento en las últimas décadas, ya que el progresivo aumento de la incidencia y prevalencia que presenta a nivel mundial ha generado un enorme interés en la comunidad científica, provocando un gran avance en las técnicas diagnósticas y en el abordaje terapéutico. A pesar de los progresos destacables dirigidos al entendimiento de la causa y los mecanismos de la EII aún no se conoce la verdadera etiología de la enfermedad. La teoría etiopatogénica más aceptada es que la disregulación de la respuesta inmune del huésped frente a la flora bacteriana residente, y a otros antígenos intraluminales en sujetos susceptibles genéticamente, juega un papel clave en la patogenia del daño tisular en la EII^{1,2}.

La EC y la CU son dos entidades que a pesar de ser diferentes entre sí, tienen características comunes que en muchas ocasiones hace difícil diferenciarlas. Para realizar el diagnóstico diferencial entre ambas patologías es necesario apoyarse en las

características clínicas, endoscópicas, radiológicas, histológicas, serológicas y en la evolución de la enfermedad a lo largo del tiempo.

Las diferencias fundamentales entre la CU y la EC son que en la primera se afecta exclusivamente el colon y sólo la capa mucosa de éste. Sin embargo, la EC es un trastorno inflamatorio crónico que puede afectar a 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 a todas las capas del intestino, con la consiguiente aparición de fisuras, fístulas o abscesos.

Los síntomas y la gravedad de cada una de estas entidades dependerán de la extensión, la localización, el comportamiento, el grado de actividad inflamatoria y de las manifestaciones extraintestinales que se asocian a la enfermedad, aspectos que le confieren una importante heterogeneidad clínica y que obligan a subclasificarlas³.

Actualmente, las clasificaciones de la EII que se realizan se basan fundamentalmente en aspectos epidemiológicos y clínicos, pero se está trabajando en la utilización de los marcadores serológicos y fecales y en la creación de una clasificación molecular de la EII mediante la identificación de marcadores genéticos que permitan precisar el diagnóstico, la localización, el comportamiento clínico, y las respuesta terapéutica a los diferentes fármacos utilizados en el control de la EII⁴.

1.2. ENFERMEDAD DE CROHN

1.2.1. Definición y generalidades

La EC es una entidad caracterizada por la presencia de una inflamación crónica y recidivante que puede afectar a cualquier tramo del tubo digestivo. Se caracteriza por una forma de presentación segmentaria, discontinua y con afectación transmural. Su etiología aún hoy es desconocida pero parece desencadenarse por la interacción de factores genéticos y ambientales, predominando su prevalencia en países más desarrollados. La primera referencia de la EC se sitúa en el siglo XVII por el investigador Giovanni Battista Morgagni, aunque el nombre fue otorgado en 1932 por el gastroenterólogo americano Burrill Bernard Crohn que fue quien definió inicialmente la enfermedad describiendo una serie de casos de pacientes con ileitis regional y acuñando el nombre de la enfermedad⁵.

La localización más frecuente en la que aparece la enfermedad son el íleon terminal y el ciego aunque puede manifestarse sólo afectando porciones superiores del intestino delgado o del tracto digestivo superior. Con frecuencia la EC no afecta al recto, aspecto diferenciador con la CU en la que es característica la inflamación de la mucosa a nivel rectal. Sin embargo el 60% de los pacientes con EC que presentan afectación colónica muestran inflamación a nivel del recto fundamentalmente cuando se asocia a enfermedad fistulosa perianal. En esta entidad la inflamación se presenta de forma segmentaria por lo que suelen existir áreas del intestino preservadas de enfermedad entre los segmentos de intestino que están afectados y que tienen una longitud variable. Además esta inflamación es asimétrica a lo largo de la circunferencia

del tracto digestivo y de las diferentes localizaciones de la enfermedad. La EC es una enfermedad transmural, por lo tanto, la inflamación afecta a todo el espesor de la pared intestinal, desde la mucosa hasta la vertiente de la serosa que recubre el intestino. La pared intestinal se encuentra engrosada con afectación de la submucosa, la muscularis propia, la subserosa y la grasa mesentérica. Al estar afectada la grasa mesentérica, esta rodea parcialmente el intestino, al menos el 50%, por sus caras anterior y posterior, a partir de la inserción del mesenterio en el mismo. Este fenómeno se conoce con el nombre de “envoltura grasa”, es específico de la EC; y no se ha descrito en la CU. La afectación transmural puede tener como complicación la aparición de fístulas, abscesos, estenosis e incluso perforación⁶.

La característica histológica clave en la EC es el hallazgo de granulomas no caseificantes en el estudio microscópico, aunque es importante recordar que suelen encontrarse en menos del 30% de las biopsias y además no son patognomónicos de la EC pudiendo aparecer en otros procesos como las infecciones por *Campylobacter* o *Yersinia* e incluso en colitis secundarias a fármacos. Un granuloma se define como un conjunto de células epitelioides, macrófagos y linfocitos, habitualmente células T. Las células epiteliales, con un citoplasma pálido y abundante y unos núcleos grandes y ovalados, dispuestos en acúmulos. La necrosis central y la caseificación son raras y su presencia debe alertar sobre la posibilidad de una tuberculosis. Otros hallazgos histológicos, menos específicos de la EC, son la presencia de distorsión de las criptas de forma discontinua, y la presencia de inflamación discontinua siempre y cuando la enfermedad no haya sido tratada previamente con fármacos⁷.

1.2.2. Epidemiología

La incidencia y la prevalencia de la enfermedad inflamatoria intestinal varían notablemente según la localización geográfica. Los datos comunicados traducen la influencia de distintos factores ambientales y genéticos en su etiopatogenia, aunque obviamente, en gran parte ha sido debido a la mejora de las técnicas diagnósticas y metodología de los estudios. Sin embargo, parece que existe un aumento real de la incidencia relacionado con la mejora socio-cultural de las poblaciones, los cambios en el nivel de vida y en los hábitos dietéticos, la industrialización, la mejora del tratamiento de las aguas y la higiene, en lo que se ha denominado “teoría de la higiene”⁸. La EII aparece con mayor frecuencia en países desarrollados, además tradicionalmente ha existido un gradiente norte-sur con las mayores incidencias en países como Suecia, Noruega, Reino Unido, Canadá o Estados Unidos, siendo la incidencia en el centro y sur de Europa inferior. Actualmente se confirma que existe una mayor incidencia de EII en los países del Norte pero la diferencia con respecto al centro y sur de Europa son escasas en la actualidad considerándose que la EII constituye un problema muy frecuente de salud en los países del sur de Europa⁹.

La enfermedad de Crohn, a diferencia de la colitis ulcerosa donde la incidencia parece mantenerse estable durante las últimas décadas, está presentando un aumento progresivo de la incidencia actualmente. Las diferencias geográficas en relación con los porcentajes de incidencia han sido bien establecidas y varios estudios han demostrado que la EC es más común en áreas industrializadas como Norteamérica y Europa, observándose menor incidencia en Asia y África. La incidencia de la EC en los países occidentales se estima entre 10-15 casos por 100000 habitantes/año¹⁰.

1.2.3. Manifestaciones clínicas

Los síntomas clásicos de presentación de la EC son la diarrea, el dolor abdominal y la pérdida de peso. Sin embargo, esta tríada clásica sólo se presenta en el 25% de los casos en el momento del diagnóstico. Diversos estudios de cohortes han constatado que la sintomatología de la EC es intermitente en la mayoría de pacientes y que hasta un 10% de los pacientes diagnosticados presenta posteriormente períodos prolongados de remisión de la enfermedad¹¹.

La diarrea suele ser el síntoma más frecuente en el momento del diagnóstico. Puede ser debida a distintas causas entre las que se incluyen la propia actividad inflamatoria del intestino, la existencia de sobrecrecimiento bacteriano, la esteatorrea o la malabsorción de sales biliares. Frecuentemente suele ser una diarrea de semanas de evolución antes de acudir a la consulta. Es importante evaluar correctamente los cambios del ritmo deposicional, su aparición diurna y nocturna, y la existencia de productos patológicos en forma de sangre y/o moco. La emisión de sangre acompañando a las heces suele ser más frecuente en la afectación colónica. También puede aparecer la presencia de tenesmo, urgencia o incontinencia rectal, ya que aproximadamente el 30% de los pacientes presentan afectación colónica y de estos entre el 25-60% tienen afectación rectal¹².

El dolor abdominal también es uno de los síntomas más frecuentes. Puede tener un origen multifactorial aunque las características del dolor suelen venir determinadas por la localización anatómica de la EC. Se ha observado que puede estar presente incluso en el 72% de los pacientes. En ausencia de complicaciones, el dolor suele corresponder a hiperalgesia secundaria al reclutamiento de mediadores

nociceptivos. En caso de existir estenosis intestinales, estas suelen situarse a nivel del íleon terminal, dando lugar a un dolor cólico, localizado en fosa ílfaca derecha y de características suboclusivas, relacionado con la ingesta de alimento. La aparición de plastrones o abscesos intraabdominales también son causa de dolor en la misma zona, pero a menudo de características continuas, acompañados de fiebre, signos de irritación peritoneal y sensación de ocupación. Cuando existe una afectación colónica el dolor se presenta con mayor frecuencia en el hemiabdomen inferior y si afecta a tramos superiores (estómago o duodeno) se manifiesta a nivel epigástrico pudiéndose acompañar de vómitos y disconfort postpandrial¹³.

La pérdida de peso es otro síntoma habitual en la EC. Suele desarrollarse por múltiples causas como son la propia actividad inflamatoria que incrementa el catabolismo de los nutrientes, malabsorción de los nutrientes cuando existe afectación de tramos del intestino delgado y la propia anorexia que coexiste en una importante proporción de los pacientes.

La enfermedad perianal manifestada como fístulas y abscesos perianales o fisuras anales de localización atípica está presente hasta en un 10% de los pacientes en momento del diagnóstico de la enfermedad. Incluso puede preceder a los síntomas digestivos. La incidencia de la patología perianal es muy variable (20-80%) y depende de si la EC afecta al intestino delgado (22-71%) o al colon (47-92%)¹⁴.

La fiebre es otro síntoma que puede aparecer en la EC, aunque sólo suele estar presente en casos de afección inflamatoria grave o en el contexto de complicaciones como absceso o perforación, de manera que habitualmente va acompañada de otros síntomas.

Las manifestaciones extraintestinales son frecuentes en la EC y afectan hasta un 35% de los pacientes. En la EC pueden preceder incluso en años a la aparición de los síntomas digestivos. Las más frecuentes son las articulares (artritis, espondiloartropatía o sacroileitis), cutáneas (eritema nodoso o pioderma gangrenoso) y oculares (epiescleritis o uveítis). Algunas manifestaciones extraintestinales están relacionadas temporalmente con la actividad de la EC; como son la artritis periférica, el eritema nodoso, las aftas bucales y la epiescleritis, mientras otras tienen habitualmente un curso independiente; como son el pioderma gangrenoso, la uveítis, la artropatía axial y la colangitis esclerosante primaria¹⁵.

Las principales complicaciones de la enfermedad son la presencia de fístulas, abscesos, estenosis o perforaciones intestinales y suelen aparecer cuando la afectación inflamatoria afecta a todas las capas del intestino. Las fístulas se definen como comunicaciones anormales entre la luz del intestino y el mesenterio (fístulas ciegas), entre asas intestinales, con otras vísceras huecas (vejiga, útero, etc), con la pared abdominal y con la piel. Los abscesos intraabdominales se presentan hasta en un 25% de los pacientes con EC, y habitualmente se corresponden con perforaciones encubiertas al adherirse la serosa inflamada a la serosa normal provocando de esta manera una perforación contenida. La estenosis se define como un estrechamiento de la luz del intestino debido al proceso inflamatorio, por engrosamiento circular de la pared intestinal asociado a los cambios cicatriciales debidos a la enfermedad de larga evolución. Es muy difícil diferenciar entre una estenosis fibrosa cicatricial o una estenosis inflamatoria, salvo en los casos en los que se produce una respuesta al tratamiento antiinflamatorio de la EC o tras el análisis de la pieza quirúrgica. La

perforación intestinal consiste en una comunicación abierta entre la luz intestinal y la cavidad abdominal. Esta complicación requiere una intervención quirúrgica urgente ya que puede provocar la aparición de una peritonitis bacteriana con importante riesgo vital para el paciente¹⁶.

1.2.4. Clasificación fenotípica

La EC es clínicamente muy heterogénea y con una importante variedad demográfica, clínica y fenotípica lo que ha obligado a subclasificar a los pacientes en función de la edad al diagnóstico, la localización y el comportamiento de la enfermedad (Figura 1). Cada grupo presenta manifestaciones clínicas y pronósticas diferentes. La clasificación de Viena de la EC considera 24 grupos, agrupando a los pacientes en función de la edad al diagnóstico (A), la localización (L) y el comportamiento de la enfermedad (B)¹⁷.

La edad al diagnóstico (A) se subdividía en dos categorías: A1, edad menor o igual a 40 años, y A2, edad mayor de cuarenta años. La edad de aparición precoz, A1, se relaciona con formas más extensas de la enfermedad, con mayor frecuencia de afectación del intestino delgado y tramos más altos del tubo digestivo (esófago, estómago, y duodeno), mientras que la afectación del colon es más frecuente en mayores de 60 años, aunque se ha observado que en los menores de 8 años la enfermedad se localiza casi de forma constante en el colon, aspecto que no ocurre cuando el diagnóstico se realiza posterior a esta edad. Parece existir una relación entre la enfermedad de aparición precoz, la historia familiar y la predisposición genética; por estos motivos en la clasificación de Montreal¹⁸ se propone a aumentar los grupos a A1:

menores de 16 años, A2: entre 17 y 40 años, A3: mayores de 40 años, debido a que se considera que las formas más precoces tienen cargas genéticas y presentaciones clínicas diferentes.

Respecto a la localización, se considera que un área está afectada cuando aparecen úlceras aftoides. El eritema o edema no es suficiente para determinar que existe afección de esa área.

- L1: Localización ileal (30%). Es cuando se afecta el tercio distal de íleon con o sin afección del ciego. Las manifestaciones fundamentales se deben a la presencia de estenosis a este nivel con náuseas, vómitos, dolor abdominal en fosa iliaca derecha, pérdida de peso y fiebre. La diarrea es menos grave que en las formas que afectan al colon. En ocasiones y fundamentalmente en el debut de la enfermedad se puede confundir con una apendicitis.

- L2: Localización Cólica (20%). Una o varias localizaciones de la enfermedad entre el recto y el ciego, pero exclusivamente en el colon sin afección del intestino delgado. La clínica es más parecida a la de la CU, con diarrea más abundante, hematoquecia, dolor abdominal y pérdida de peso. Se asocia con más frecuencia con enfermedad perianal y manifestaciones extraintestinales.

- L3: Localización ileocólica (40%). Existe afectación del íleon terminal con o sin afectación cecal y con la participación de cualquier otra área del colon desde el recto hasta el colon ascendente, la clínica es una mezcla de las anteriores.

- L4: Localización gastrointestinal alta (5-10%). Se considera esta localización cuando se afecta cualquier localización proximal al íleon distal (íleon proximal, yeyuno, duodeno, estómago, esófago y orofaríngea) independientemente que se afecte el

tercio distal del íleon o el colon. La clínica es mucho más variada y depende de la localización exacta; cuando la afección es esófago-gastro-duodenal existen síntomas de dispepsia alta como son las náuseas, vómitos, dolor abdominal epigástrico e incluso la hemorragia digestiva alta. En ocasiones simulan una enfermedad péptica que no responde al tratamiento con antisecretores gástricos. La afectación yeyunal se relaciona con diarrea, pérdida de peso, síndrome de malabsorción y suele ocurrir en las formas que debutan a edades más precoces. Recientemente, la clasificación de Montreal¹⁸ propone que la categoría L4 se añada a las otras tres categorías y no sea una categoría excluyente porque se considera que esta categoría ha estado infradiagnosticada debido a que no se disponía de las técnicas adecuadas y que actualmente el tránsito intestinal, la enterorresonancia magnética, la cápsula endoscópica y la enteroscopia nos demuestran que no es una localización tan rara.

Finalmente, el comportamiento clínico, que refleja fundamentalmente la afectación transmural, se relaciona de forma fiable con la agresividad de la enfermedad, la necesidad de utilizar terapias más potentes y de recurrir a la cirugía. Un aspecto importante es que los patrones clínicos varían a lo largo del tiempo y pueden pasar de unas categorías a otras durante el seguimiento clínico de la enfermedad. Por este motivo se recomienda un seguimiento mayor de 5 años para poder incluir con fiabilidad a los pacientes en las diferentes categorías¹⁹. La clasificación actual de los distintos patrones de la enfermedad son:

- B1: Patrón inflamatorio, o no-obstructivo no-estenosante. Consiste en la presencia de úlceras superficiales, que se pueden convertir en más profundas, e inflamación; los síntomas típicos son el dolor abdominal y la diarrea.

- B2: Fibroestenósante o estenósante. La enfermedad se caracteriza por la aparición de estenosis con dilatación preestenótica. La clínica característica es la aparición de cuadros obstructivos o pseudooclusivos; acompañados de náuseas, vómitos, dolor y distensión abdominal con dificultad para expulsar los gases por el ano. Se caracterizan por la baja respuesta al tratamiento médico y la necesidad de cirugía.
- B3: Perforante o fistulizante. En esta categoría se incluyen tres tipos de presentaciones clínicas. Perforación libre, perforación con formación de abscesos y masas intraabdominales y la aparición de fistulas internas o externas, incluida la enfermedad perianal. Este patrón evolutivo se caracteriza por recurrencias frecuentes y la necesidad de cirugía. La nueva clasificación propuesta en Montreal recomienda excluir del comportamiento fistuloso (B3) a la enfermedad perianal por considerarla una enfermedad independiente de la EII penetrante²⁰. De esta forma se sugiere que la presencia de afectación perianal se indique con una “p” y acompañen a los diferentes patrones clínicos, resultando en B1p, B2p y B3p¹⁸.

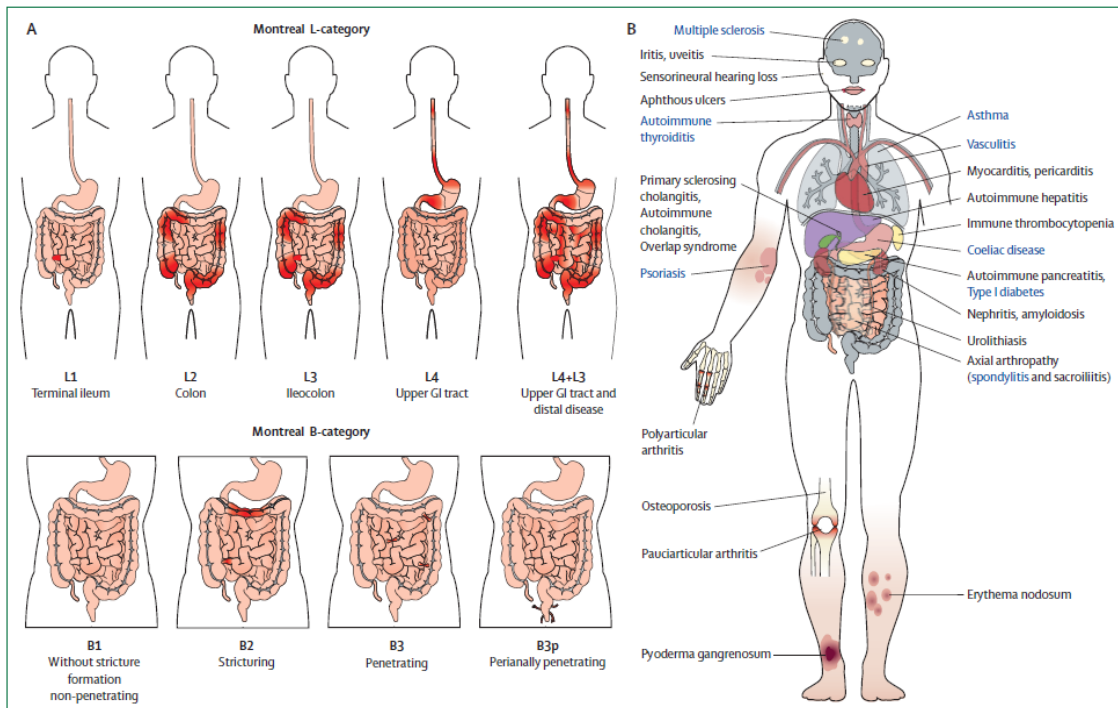


Figura 1. Patrones de la enfermedad de Crohn (Fuente: Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. Lancet 2012)

1.3 PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

A pesar de los avances tanto en el conocimiento clínico, genético y molecular de la EC, como en el desarrollo de nuevas técnicas de imagen aplicables al estudio de los trastornos del tubo digestivo, la base del diagnóstico de la EC no ha cambiado en las últimas décadas. La falta de lesiones histológicas patognomónicas y la inespecificidad de los síntomas facilitan la demora diagnóstica y obligan a establecer el diagnóstico en base a un conjunto de datos histológicos, endoscópicos y radiológicos en un paciente con un cuadro clínico compatible. En caso de sospecha de EC, las pruebas de primera línea para establecer el diagnóstico son la ileocolonoscopia con biopsias del íleon terminal y de cada segmento de colónico afectado. Pero la EC puede afectar a segmentos del intestino delgado donde la ileocolonoscopia no llega, también pueden existir estenosis que no permite valorar endoscópicamente segmentos de intestino más proximales o podría complicarse por lesiones extramurales del intestino o en la zona perianal (como fístulas y abscesos) no accesibles para la visualización endoscópica²¹.

1.3.1. Pruebas de diagnóstico por la imagen

Las técnicas de diagnóstico por la imagen transversal son una importante ayuda para la evaluación endoscópica, para estadificar de manera completa la afectación del intestino delgado y la región perianal. Presentan la importante ventaja de evaluar la enfermedad tanto mural como extramural. Las técnicas de imagen transversales son importantes tanto para el diagnóstico de la enfermedad de Crohn; nos permiten

detectar, estadificar y clasificar el comportamiento de la enfermedad a nivel del intestino delgado, como en el seguimiento; ayuda a valorar y escoger el tratamiento más adecuado en un momento determinado, valorar respuesta y cuantificar lesión tisular^{22, 23}. Existen distintas pruebas de imagen que nos permiten valorar la enfermedad:

- La ecografía abdominal es una técnica de diagnóstico por la imagen sencilla, bien tolerada y sin irradiación que nos permite sobre todo valorar la afectación del íleon terminal, ciego, el colon sigmoide y a menudo el colon ascendente y el descendente. Esta técnica tiene limitaciones como son la presencia de gas intestinal y un hábito corporal grande. La administración de contraste intraluminal por vía oral pueden mejorar la calidad de la imagen y la exactitud diagnóstica²⁴.
- La tomografía axial computerizada (TAC) de abdomen y pelvis para la evaluación del intestino delgado y del colon es una técnica con elevada precisión para establecer presencia de actividad en la EC. Para alcanzar esta elevada precisión esta técnica requiere una adecuada distensión luminal y la administración de contraste intravenoso. La distensión abdominal es un requisito fundamental para cualquier método de diagnóstico por la imagen del intestino delgado, puesto que las asas intestinales colapsadas pueden esconder lesiones o simular engrosamientos patológicos de la pared. Puede alcanzarse con la utilización de agentes de contraste entéricos, tanto positivos como neutros. El empleo de medio de contraste por inyección intravenosa es importante para destacar el patrón de captación de la pared intestinal y de los vasos mesentéricos que se evaluarán²⁵.

- La Resonancia Magnética (RM) permite una evaluación exacta del intestino delgado y del colon. Requieren aplicación de contraste intravenoso y la administración oral de agentes de contraste entéricos (enterografía de RM o enteroRM) o inyectarse por una sonda nasoyeyunal (enterocclisis de RM) para la obtención de imágenes que muestren con gran precisión la presencia de lesiones. Las alteraciones en la RM asociadas a la presencia de inflamación son el engrosamiento de la pared, la hipercaptación de contraste en la pared tras la inyección de medio de contraste intravenoso, la presencia de edema de la pared, y la presencia de úlceras, así como de alteraciones extramurales como el signo del peine, bandas de borrosidad y ganglios linfáticos aumentados de tamaño. Tiene la ventaja de no emitir radiación ionizante, este hecho la convierte en la técnica de imagen más adecuada para los pacientes con EC dada la edad de esta población y la necesidad de repetición de estas técnicas en la evaluación de la enfermedad²⁶.

La TAC y la RM tienen una exactitud similar en la obtención de imágenes en la EC. La TAC tiene mejor disponibilidad y es más rápida que la RM aunque tiene el inconveniente de la exposición a la radiación²⁷.

- El tránsito intestinal baritado y la enterocclisis tienen un buen nivel de precisión para el diagnóstico de la EC con afectación intestinal. Permiten detectar la presencia de la enfermedad, evaluar extensión y gravedad y pueden también identificar algunas complicaciones locales. Para el tránsito intestinal el contraste se administra de forma oral mientras que la enterocclisis requiere canular el duodeno e instilar el contraste desde este nivel. Los hallazgos radiológicos son un engrosamiento y alteración irregular de los pliegues circulares, estenosis de la luz

intestinal con presencia de ulceraciones, adherencias o separación de asas por engrosamiento de la pared e infiltración inflamatoria mesentérica. El gran inconveniente de estas técnicas es que conllevan irradiación por ello, y porque tiene menor precisión, a día de hoy se están sustituyendo por la realización de la enterorM²⁸.

1.3.2. Pruebas endoscópicas en la enfermedad de Crohn

Colonoscopia e ileoscopia

La colonoscopia con ileoscopia es la principal técnica que se realiza inicialmente en todos los pacientes con sospecha clínica de enfermedad inflamatoria intestinal. Este procedimiento permite la observación y toma de biopsias de la mucosa.

Los hallazgos endoscópicos más típicos en la enfermedad de Crohn son la afectación segmentaria con preservación del recto, la afectación ileal, la presencia de lesiones anales, las erosiones aftoides y la mucosa en empedrado²⁹.

La biopsia endoscópica puede ayudar a distinguir entre CU y EC, y también entre otras colitis (isquémica, infecciosa, etc). La presencia de granulomas sugiere fuertemente una EC, aunque su detección es poco frecuente apareciendo sólo en un 1/3 de los casos³⁰. El hallazgo de cronicidad en las muestras obtenidas por biopsia es indicativo de una EII más que de colitis infecciosa.

La endoscopia es indispensable, no sólo para comprobar la extensión de la enfermedad, sino también para valorar la actividad inflamatoria a nivel intestinal en el

seguimiento del paciente. Aunque esta técnica tiene sus limitaciones no pudiendo valorar tramos más proximales al íleon terminal, en ocasiones no se puede valorar el íleon terminal por estenosis de la válvula ileocecal o tramos proximales a estenosis marcadas. Por todo ello los datos de la colonoscopia se deben complementar con otras pruebas endoscópicas y radiológicas que permitan examinar los tramos no explorados.

En los últimos años la ileocolonoscopia está tomando aún mayor relevancia ya que varios grupos proponen que el objetivo actual que debemos perseguir en los pacientes con EII es la denominada curación mucosa. Debemos buscar este objetivo porque se ha correlacionado con menores tasas de recidiva y de complicaciones relacionadas con la enfermedad³¹.

Endoscopia digestiva alta

La endoscopia digestiva alta está indicada en la EC ante la sospecha de afectación del tracto digestivo superior, con especial incidencia en pacientes jóvenes más que en adultos. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son el dolor epigástrico, náuseas y vómitos, disfagia, y más raramente hemorragia digestiva alta. Endoscópicamente las lesiones de la EC consisten en erosiones de tipo aftoso, úlceras, pliegues gástricos engrosados, eritema y estenosis. Permite la toma de biopsias tisulares que pueden ser de gran utilidad para establecer el diagnóstico de la EC, especialmente en aquellos casos de colitis indeterminada³².

Enteroscopia

La enteroscopia es un técnica endoscópica que nos permite evaluar la inflamación de la mucosa a nivel del intestino delgado. Los aspectos más relevantes de la enteroscopia en la EC son la posibilidad de obtener biopsias y la aplicación de medidas terapéuticas como hemostasia, dilataciones de estenosis o colocación de sondas enterales de nutrición³³. Existen dos tipos de enteroscopia: enteroscopia de doble balón que utiliza dos globos inflables en cada extremo distal del endoscopio y el sobretubo, mientras que la enteroscopia de un balón utiliza sólo un globo inflable en el extremo distal del sobretubo. El procedimiento se puede realizar por vía oral y también por vía anal. El rendimiento diagnóstico en pacientes con sospecha de EC está entre el 22-70%³⁴.

Cápsula endoscópica

La cápsula endoscópica permite la visualización directa y no invasiva de la mucosa de todo el intestino delgado. Es útil para el diagnóstico inicial de la EC, establecer su extensión, diagnóstico de recurrencias y evaluación de respuesta terapéutica. En pacientes con sospecha de EC la cápsula endoscópica tiene mayor rendimiento diagnóstico que el tránsito intestinal y que la TAC pero no se observaron diferencias significativas con respecto a la enterorresonancia³⁵. Tiene una elevada sensibilidad (83-100%) y una menor especificidad (53-100%), aunque esta última es más variable dependiendo de las series. Las principales limitaciones de la cápsula endoscópica en la evaluación de la EC con afectación de intestino delgado son la imposibilidad de tomar muestras de tejido y la aplicación de acciones terapéuticas, así

como el riesgo de retención de la cápsula en caso de existir estenosis, aunque este es bajo (1.6%)³³.

1.3.3. ANATOMÍA PATOLÓGICA

Se ha identificado una amplia gama de características microscópicas que son útiles para establecer un diagnóstico de enfermedad de Crohn, y así se ha descrito en la literatura. Las principales características microscópicas utilizadas para el diagnóstico dependen de la localización de la enfermedad^{3,7}.

➤ COLON:

❖ Arquitectura

- Irregularidad en la arquitectura de las criptas: implica anomalías de éstas en > 10% de las criptas cuando hay una inflamación focal o moteada. La irregularidad de las criptas puede corresponder a una distorsión de las criptas, una ramificación de las criptas o un acortamiento de éstas.
- Reducción en el número de criptas
- Superficie irregular

❖ Inflamación crónica

- La inflamación crónica focal o moteada corresponde a un aumento variable de la celularidad de la lámina propia a través de la muestra de biopsia y no limitada a la zona superficial.

- Focal: implica una celularidad de fondo normal, con un aumento localizado de las células.
- Moteado: significa una celularidad de fondo normal con una intensidad variable.
- Granulomas: se define como una colección de células monocito-macrófago y otras células inflamatorias, con o sin células gigantes. Los macrófagos aparecen como células grandes con abundante citoplasma eosinofílico pálido y un núcleo grande oval. Se encuentran organizadas en grupos. Debido a su semejanza con las células epiteliales se denominan células epitelioides. Los granulomas típicos contienen cinco o más células epitelioides con o sin células gigantes. Se pueden desarrollar en todas las capas del intestino aunque son más frecuente en la submucosa. Pueden aparecer en zonas de tejido sano o inflamado. La frecuencia de hallazgos de granulomas en la enfermedad de Crohn oscila entre el 15 y el 85% aunque raramente es superior al 50-60%. Los granulomas no caseificantes, las colecciones pequeñas, de histiocitos epitelioides y células gigantes o las células gigantes aisladas pueden observarse en las colitis infecciosas y no deben considerarse una evidencia indicativa de enfermedad de Crohn.

❖ Inflamación por polimorfonucleares

- A nivel de la lámina propia

- A nivel del epitelio de las criptas (focales o difusos)
- Abscesos de criptas
- Exudados de polimorfonucleares

❖ Cambios epiteliales

- Erosión/ulceración
- Mucina (depleción o preservación)
- Células de Paneth distales al ángulo hepático

❖ Cambios epiteliales asociados

- Aumento de los linfocitos intraepiteliales > 15

➤ ILEÓN TERMINAL

❖ Arquitectura

- Irregularidad de las vellosidades
- Irregularidad de arquitectura de criptas

❖ Cambios epiteliales

- Metaplasia pseudopilórica de las glándulas

➤ COMPARACIÓN ENTRE DIFERENTES SEGMENTOS

- Distribución de la inflamación a lo largo del colon: gradiente de proximal a distal.
- Cociente del número de biopsias con infiltración celular focal respecto al número de biopsias con infiltración de células mononucleares.

1.4. PRUEBAS DE LABORATORIO

En la EC se produce una estimulación del sistema inmune que pone en marcha una cascada inflamatoria dirigida hacia una diana antigénica que hoy en día sigue sin conocerse. Esta respuesta inflamatoria conlleva la activación de una serie de mecanismos que como consecuencia suponen la liberación de una serie de moléculas al torrente sanguíneo, conocidos como biomarcadores serológicos, que podemos determinar por técnicas de laboratorio. También es liberada una serie de moléculas a nivel intestinal que podemos determinar su concentración en las heces, son los denominados biomarcadores fecales.

En los últimos años se ha generado un gran desarrollo de estos biomarcadores confirmándose que son herramientas útiles para diagnosticar la EC distinguiéndola de otras entidades como SII o cuadros infecciosos, establecer la presencia de actividad inflamatoria y determinar su grado, pronosticar la evolución de la enfermedad, monitorizar la respuesta al tratamiento e incluso predecir la recurrencia postquirúrgica.

En definitiva el amplio abanico de funciones que han demostrado tener los biomarcadores, junto a la sencillez y bajo coste de su determinación, los han convertido en herramientas fundamentales en el manejo de la EC.

1.4.1. Biomarcadores serológicos

La estimulación del sistema inmune en la lámina propia de la mucosa intestinal activa el componente celular de la misma –leucocitos, monocitos, macrófagos y células

endoteliales–, con la consiguiente producción de mediadores de la inflamación, fundamentalmente citocinas. Éstas inducen la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado, por lo que, en teoría, la determinación de estos «reactantes» debería reflejar indirectamente el grado de inflamación³⁶. Los principales biomarcadores serológicos que se utilizan en la EC son la proteína C reactiva (PCR) y la velocidad de sedimentación globular (VSG).

1.4.1.1. Proteína C Reactiva (PCR)

La PCR fue la primera proteína de fase aguda descrita. Esta proteína se sintetiza fundamentalmente en el hígado aunque en la EC también se ha descrito una producción significativa de PCR por parte de la grasa mesentérica³⁷. Cuando acontece un proceso inflamatorio los hepatocitos incrementan rápidamente la síntesis de PCR, proceso que está mediado por citoquinas, entre ellas el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)³⁸.

Los niveles de PCR presentan una buena correlación con la gravedad del proceso inflamatorio mostrando elevaciones discretas en procesos inflamatorios leves o en infecciones virales, niveles superiores en procesos inflamatorios más graves o en infecciones bacterianas, y las concentraciones más elevadas de esta proteína se han descrito en procesos patógenos muy graves o con grandes quemaduras³⁹.

La PCR tiene una vida media corta, en comparación con otros reactantes de fase aguda, de tan sólo 19 h. Por este motivo, es un biomarcador que se eleva precozmente tras el comienzo del proceso inflamatorio y disminuye con celeridad tras su resolución del mismo, aunque puede permanecer elevada en caso de inflamación

crónica. Esta propiedad le confiere precisión para estimar la evolución de la actividad inflamatoria de la enfermedad en el tiempo. Además tiene las ventajas de ser una prueba barata, fácil de realizar, sus concentraciones no varían durante el día y no está influenciada, salvo excepciones, por la toma de fármacos (a no ser que éstos modifiquen el proceso inflamatorio subyacente). Sin embargo, la síntesis de PCR se puede ver afectada por diversos procesos que causen una insuficiencia hepatocelular, y sus cifras tienden a aumentar con la edad, probablemente debido al incremento de procesos patógenos subclínicos^{37,39}.

En la enfermedad de Crohn se ha descrito una notable elevación de esta proteína en presencia de actividad inflamatoria e igualmente normalización de su concentración cuando se induce la remisión de la actividad. A diferencia de la CU donde presenta una menor elevación o incluso esta es inexistente cuando aparece actividad inflamatoria probablemente se explique porque la EC tiene mayor repercusión sistémica ya que su afectación es transmural mientras que la CU se limita sólo a la mucosa del colon³⁸.

En diversos estudios se ha analizado la exactitud de la PCR para el diagnóstico diferencial entre EII, ya sea EC o CU, y otras enfermedades gastrointestinales (funcionales u orgánicas) estimándose, entre los pacientes con clínica compatible, una sensibilidad y especificidad globales del 80 y el 83%, respectivamente. Aunque si consideramos únicamente la exactitud para el diagnóstico de la EC, las cifras de sensibilidad y especificidad se incrementan hasta el 100 y el 91%, respectivamente. Si bien, estos datos se basan en un número muy reducido de estudios con reducido número de pacientes⁴⁰⁻⁴². No obstante, se ha observado que existe un grupo de

pacientes con EC que presentan actividad inflamatoria y tienen niveles de PCR permanentemente normales⁴³.

También se ha estudiado la utilidad de la PCR como posible biomarcador para establecer la presencia de actividad inflamatoria, objetivada mediante colonoscopia, y en consecuencia ser una herramienta útil para monitorizar la evolución de la inflamación en los pacientes con EC. Se ha estimado una sensibilidad del 80% y especificidad del 50% aproximadamente para establecer la presencia inflamación a nivel intestinal^{44, 45}, recientemente se ha publicado un metaanálisis en el que se ha calculado una sensibilidad del 49% y una especificidad del 92%⁴⁶.

1.4.1.2. Velocidad de Sedimentación Globular (VSG)

La VSG cuantifica la velocidad con la que los hematíes sedimentan en un tubo capilar. La presencia de reactantes de fase aguda acelera dicha velocidad, aunque la VSG depende también de otros factores como son la presencia de anemia, la edad o fármacos que pueden aumentan su cifra. Tiene una vida media más prolongada que la PCR por lo que su valor tarda más tiempo en normalizarse tras un proceso inflamatorio⁴⁷. A pesar de sus limitaciones, la VSG dispone también de algunas ventajas, como su sencillez de determinación, su disponibilidad y su reducido coste.

Al igual que la PCR, se trata de un biomarcador de inflamación sistémica no específico para la EII. Diversos estudios dirigidos a evaluar la correlación entre variables clínicas y analíticas demostraron una aceptable correlación entre la VSG y la actividad clínica de los pacientes con EC⁴⁸. Aunque este biomarcador se utiliza de forma rutinaria desde hace años, estudios recientes han observado escasa correlación

con la actividad inflamatoria en la CU⁴⁹, además de demostrarse en un metaanálisis reciente que no es útil para discriminar entre la EII y el SII⁵⁰. También se ha evidenciado que no es un marcador fiable de actividad, ya que la PCR es más precisa para identificar ausencia de actividad inflamatoria en situación de inactividad clínica mantenida⁵¹.

1.4.2. Biomarcadores fecales

El proceso inflamatorio que se genera a nivel intestinal en la EII conlleva la liberación de una serie de moléculas a la luz colónica que podemos determinar mediante un análisis de las heces. Desde hace años se están desarrollando estudios para identificar estas proteínas y determinar su utilidad en la EII y otros procesos con el cáncer de colon. Los principales biomarcadores fecales estudiados son la calprotectina (CF), lactorrefina, M2-piruvato quinasa (M2-PK) y la elastasa de los polimorfonucleares. La CF es el biomarcador que más se ha estudiado en la EII demostrando ser una herramienta con grandes utilidades. La M2-PK es un biomarcador poco estudiado para la EII, aunque se ha evidenciado su utilidad para el diagnóstico de la enfermedad.

1.4.2.1. *Calprotectina fecal (CF)*

La CF es una proteína fijadora de calcio y zinc que pertenece a la familia de las proteínas S-100. Tiene un peso molecular de 36 kDa. Está compuesta por tres cadenas peptídicas (dos de 14 kDa y una de 8 kDa). Es resistente al calor y a la proteólisis, sobre todo en presencia de calcio. Sus subunidades están fuertemente unidas y puede

formar complejos no covalentes (en forma de di, tri y tetrameros) dependiendo de la concentración de calcio. Su secuencia genética está en el cromosoma 1. Esta proteína está presente en los neutrófilos representando el 60% de las proteínas citosólicas solubles y el 5% del total de las proteínas de estas células. También está presente en otras células como son monocitos, macrófagos, queratinocitos, células epiteliales, células pancreáticas e incluso en las células que componen las glándulas traqueales y en tejidos; como la piel, pulmones, tracto gastrointestinal, mucosa oral, mucosa del cérvix uterino y en múltiples fluidos (suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, fluidos orales, heces, orina o líquido sinovial)⁵².

La CF es una molécula con múltiples funciones biológicas como son la traducción de señales intracelulares, formar parte de la estructura del citoesqueleto, marcador de la diferenciación de las células mielomonocíticas, estimulador de la producción de inmunoglobulinas, factor quimiotáctico, regulación de la reacción inflamatoria, actividad antimicrobiana y efecto citotóxico induciendo la apoptosis (actividad antiproliferativa)⁵³. Se le atribuye la denominación de proteína protectora debido a sus funciones reguladoras en el proceso inflamatorio. Por todo ello, la calprotectina parece ser una proteína importante en el interior de las células mieloides y extracelularmente en procesos inflamatorios, lo que ha suscitado la realización de una serie de estudio para determinar su utilidad biológica y clínica.

Los niveles de la CF se elevan en procesos inflamatorios correlacionándose con los niveles de neutrófilos en sangre y otros reactantes de fase aguda serológicos como son la PCR o VSG. Desde el descubrimiento de la extracción y determinación

cuantitativa de la CF en muestras fecales, se ha generado un creciente interés en su uso como marcador de inflamación intestinal⁵⁴.

Su cuantificación se realiza mediante una técnica de ELISA, sencilla y barata, con la que se obtiene la concentración de CF. Se considera que el nivel de CF es normal si es menor de 50 µg/g. Se necesita una única muestra de heces, y de escasa cuantía (5 g son suficientes), para determinar este marcador de modo fiable. Las muestras pueden ser guardadas hasta 5 días a temperatura normal, sin observarse pérdida apreciable de su concentración⁵⁵.

Se ha observado que la presencia de calprotectina en las heces es directamente proporcional a la migración de los neutrófilos hacia el tracto intestinal como se ha descrito en la EII. Por consiguiente, se ha demostrado una estrecha correlación entre la concentración de calprotectina fecal y la excreción leucocitaria cuantificada mediante el marcaje de los leucocitos con el trazador radiactivo indio-111⁵⁶.

Se han estudiado múltiples utilidades de la calprotectina fecal para la EII, tanto en EC como en CU. Es útil para el diagnóstico de la EII pudiéndola diferenciar de otras entidades como el síndrome de intestino irritable. En diversos estudios se ha observado en pacientes con diarrea crónica que calprotectina fecal ha mostrado una elevada correlación con la presencia de inflamación intestinal demostrada mediante colonoscopia presentando niveles significativamente mayores en los pacientes con EII que los pacientes diagnosticados de SII con una elevada precisión diagnóstica⁵⁷⁻⁵⁹. Del mismo modo, se ha observado que es una herramienta precisa para detectar la presencia de actividad inflamatoria en la EC e incluso establecer distintos grados de actividad. También ha demostrado valor pronóstico para establecer pacientes con

mayor probabilidad de presentar una recidiva de la enfermedad. Incluso, se ha demostrado que puede ayudarnos para predecir la respuesta a fármacos o la recurrencia postquirúrgica⁶⁰.

1.4.2.2. M2-Piruvato Quinasa fecal (M2-PK)

La piruvato quinasa es una enzima que cataliza la transformación de fosfoenolpiruvato y ADP en piruvato y ATP. Esta enzima, clave en la ruta central del metabolismo de los hidratos de carbono y en aquellas en que tiene lugar simultáneamente reacciones de la ruta glucolítica y gluconeogénica. Esta enzima está presente en todas las células vivas.

En la especie humana se han identificado dos genes codificantes de la piruvato quinasa, el PK-M y el PK-LR. En el proceso de transcripción, estos dos genes originan cuatro isoenzimas diferentes con actividad piruvato quinasa, denominados M1, M2, L y R, las cuales se expresan de forma diferente en cada tejido u órgano

La isoforma M2-PK es una proteína multifuncional que participa en varias vías no glucolíticas que influyen en la fisiología celular incluyendo las respuestas inmunológicas, el crecimiento celular y la apoptosis⁶¹. M2-PK se expresa en células que están en continua replicación como son las células que componen la mucosa intestinal. Inicialmente la determinación de M2-PK en heces se propuso como nueva herramienta para el diagnóstico del cáncer colorrectal⁶². Los niveles elevados pueden detectarse en suero y heces. La determinación de M2-PK en heces es una prueba barata y sencilla que se realiza mediante una técnica de ELISA similar a la utilizada para determinar CF.

La utilidad de este biomarcador para detectar inflamación intestinal también se ha estudiado en pacientes con EII. La presencia de inflamación activa es acompañada de un aumento de la renovación celular en la mucosa intestinal lo que conlleva un aumento de la división celular y por lo tanto unos niveles mayores de M2-PK en suero y sobre todo en heces.

Se ha evidenciado que M2-PK fecal es útil para diagnosticar la EII distinguiéndola del SII con una sensibilidad 73% y especificidad 74%, además de presentar una elevada correlación con CF. En dicho estudio se realizó un subanálisis que evidenció diferencias importantes en los niveles de ambos marcadores fecales entre EII activa y no activa⁶³. En otro estudio similar, cuya muestra presentaba mayor prevalencia de SII, se observó una sensibilidad del 67% y especificidad del 88% para diagnosticar EII, aunque CF presentó mayor precisión con una sensibilidad del 93% y especificidad 92%⁶⁴. En un estudio en el que comparan la precisión de CF y M2-PK para detectar actividad endoscópica observan que M2-PK presenta una sensibilidad del 87.7% y especificidad del 62.9%, siendo mejor biomarcador para detectar actividad endoscópica en la EC la CF (sensibilidad 93% y especificidad 88.6%). Se concluye que M2-PK no es un biomarcador fiable para monitorizar la actividad inflamatoria al ser inferior que CF⁶⁵. Se ha demostrado que es un biomarcador preciso para detectar actividad inflamatoria en la CU⁶⁶. Del mismo modo, otro estudio mostró que M2-PK fecal refleja la gravedad de la CU en edad pediátrica siendo el mejor biomarcador (comparándolo con CF, lactoferrina fecal, S100A12) para predecir la refractariedad a los corticoides en pacientes pediátricos con CU graves⁶⁷.

1.5 ÍNDICES DE ACTIVIDAD EN LA ENFERMEDAD DE CROHN

1.5.1. Índices de actividad clínicos

CDAI (Crohn Disease Activity Index)

El índice clínico más frecuentemente utilizado es el CDAI (Crohn Disease Activity Index). Es el principal índice validado por las guías de consenso en la práctica clínica¹. Valora de forma cuantitativa ocho parámetros: siete clínicos y uno analítico, por ello es un índice más de gravedad clínica que de actividad inflamatoria. Cada parámetro tiene una puntuación y un peso o factor multiplicador:

- 1) Número de deposiciones blandas o líquidas durante 7 días consecutivos, la cifra obtenida se multiplica por 2.
- 2) Dolor abdominal (no = 0 puntos, leve = 1 punto, moderado = 2 puntos, severo = 3 puntos), suma de 7 puntuaciones diarias que se multiplican por 5.
- 3) Bienestar general (bien = 0 puntos, regular = 1 punto, mal = 2 puntos, muy mal = 3 puntos, fatal = 4 puntos), suma de 7 puntuaciones diarias que se multiplican por 7.
- 4) Número de complicaciones o manifestaciones (artritis o artralgias, iritis o uveítis, eritema nodoso o pioderma gangrenoso, estomatitis aftosa, fisura, fístula o absceso anal, otras fístulas o fiebre > 37.8º C), multiplicado por 20.
- 5) Fármacos para controlar diarrea (no = 0 puntos, sí = 1 punto), multiplicado por 30.

- 6) Presencia de masa abdominal (no = 0 puntos, posible = 0.4 puntos, sí = 1 puntos), multiplicado por 10.
- 7) Cifra de Hematocrito (normal – paciente), multiplicado por 6.
- 8) Pérdida de peso (peso estándar- peso actual/ peso estándar x 100), multiplicado por 1.

Se calcula sumando el resultado de todos los parámetros obteniéndose un resultado numérico final que nos permite definir el grado de actividad de la enfermedad del paciente. El rango de los distintos grados es: Remisión < 150 puntos, actividad leve 150-219 puntos, actividad moderada 220-450 puntos, actividad grave > 450puntos³.

Este índice es útil para evaluar la actividad de la enfermedad, aunque no es válido para todos los subgrupos de pacientes, como son los niños, ni cubre todos los aspectos de la enfermedad, como es el aspecto psicosocial. Es un test laborioso que se utiliza casi exclusivamente en estudios y ensayos clínicos controlados. Se han desarrollado otros índices más sencillos como el índice de Harvey-Bradshaw, el índice de Cape Town y el índice de Present-Koreliz pero estos son menos utilizados^{68,69}.

3.5.2. Índices de actividad endoscópicos

Desde 1989 se han desarrollado índices para definir la actividad o gravedad en la EC a partir de los hallazgos endoscópicos. El más conocido es el CDEIS (Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity) creado por el grupo francés GETAID (Groupe d'Étude Thérapeutique des Affections Inflammatoires du Tube Digestif). Valora 6 items

(úlceras superficiales, úlceras profundas, superficie afectada por inflamación, superficie afectada por úlceras, presencia de estenosis no ulcerado y presencia de estenosis ulcerada) cada parámetro una puntuación y peso específico. Se analizan estos 6 parámetros en cada uno de los segmentos colónicos y en íleon⁷⁰. Es un índice que presenta gran complejidad ya que todas las lesiones deben medirse en centímetros y posteriormente aplicar los distintos factores multiplicadores. Es utilizado sólo en ensayos clínicos y es realizado por endoscopistas expertos en EII.

SES-CD (Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease)

En el año 2004, un grupo italiano desarrolló un índice más sencillo denominado SES-CD (Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease). Es la simplificación validada de un índice más complejo como es el CDEIS. El SES-CD clasifica la actividad endoscópica en función de las características de las lesiones presentes a nivel de colon e íleon⁷¹. Los parámetros que valora son:

- 1) Presencia de úlceras y tamaño: Ausencia = 0 puntos, aftas 0.1-0.5 cm = 1 punto, úlceras 0.5-2 cm = 2 puntos, úlceras > 2 cm = 3 puntos.
- 2) Superficie ulcerada: Ausencia = 0 punto, < 10% = 1 punto, 10%-30% = 2 puntos, > 30% = 3 puntos.
- 3) Superficie afectada por inflamación: Ausencia = 0 puntos, < 50% = 1 punto, 50%-75% = 2 puntos, > 75% = 3 puntos.
- 4) Presencia de estenosis: Ninguna = 0 puntos, una estenosis franqueable = 1 punto, más de una estenosis franqueable = 2 puntos, una estenosis infranqueable = 3 puntos.

Se valoran estos 4 parámetros con las puntuaciones expuestas en 5 tramos: Recto, colon izquierdo, colon transverso, colon derecho e íleon. La suma total nos permite clasificar al paciente en función del grado de actividad endoscópica según el valor obtenido: Remisión < 3 puntos, actividad leve 3-7 puntos, actividad moderada 8-15 puntos, actividad severa ≥ 16 puntos^{72, 73}.

En un estudio llevado a cabo por Sipponen y colaboradores han comparado ambos índices endoscópicos observándose una estrecha correlación entre ellos⁷².

Ambos índices presentan una elevada correlación pero el SES-CD es un índice más sencillo y aplicable en la práctica diaria, aunque la principal limitación de ambos es que sobreestiman la enfermedad cólica e infravaloran la localización ileal exclusiva, además de no valorar las lesiones en las localizaciones gastrointestinales superiores. Por otro lado, aún no están bien definidos los puntos de corte del SES-CD para establecer remisión endoscópica, aunque estudios más recientes establecen dicho punto de corte en SES-CD ≤ 2 ⁷³⁻⁷⁵. Con todo ello, actualmente la ileocolonoscopía está adquiriendo aún mayor relevancia ya que estudios recientes sugieren que alcanzar la curación mucosa debería ser el principal objetivo en el tratamiento de la EC⁷⁵⁻⁷⁷.

1.6. CONOCIMIENTO ACTUAL SOBRE LA PRECISIÓN DE LA CALPROTECTINA Y LA M2-PK FECAL PARA DETECTAR ACTIVIDAD INFLAMATORIA EN LA ENFERMEDAD DE CROHN.

En la EC, la ileocolonoscopy con toma de biopsias se considera la prueba “gold standar” para valorar la presencia de inflamación intestinal, aunque tiene los inconvenientes de ser una prueba invasiva, con alto coste, disponibilidad limitada y riesgo de complicaciones. Si bien se han desarrollado una serie de índices endoscópicos específicos, como son CDEIS y SES-CD, estos índices son difíciles de calcular e interpretar en la práctica diaria. Es evidente que la realización de colonoscopias para monitorizar la actividad inflamatoria comprobando la evolución de la misma y la respuesta a las distintas terapias puede resultar complicado⁷⁴.

La evaluación de la actividad clínica no ha demostrado ser una herramienta útil para establecer de forma precisa la actividad endoscópica a pesar de la existencia de instrumentos como el Crohn’s Disease Activity Index (CDAI), se ha observado que hasta en el 70% de los pacientes que alcanzan una remisión clínica pueden presentar algún grado de actividad endoscópica⁷⁸. La persistencia de actividad inflamatoria, aún sin sintomatología evidente, se asocia a mal pronóstico. Dado que el principal objetivo del tratamiento es alcanzar la curación mucosa, se hace necesario basar el criterio clínico en pruebas que nos aporten datos objetivos y precisos para demostrar la resolución o persistencia de la actividad inflamatoria en la EC⁷⁷.

En este sentido, se han desarrollado pruebas de laboratorio para ayudarnos a detectar, de forma indirecta, la presencia de actividad inflamatoria en la EC. Los biomarcadores serológicos son reactantes de fase aguda inespecíficos para esta

patología ya que sus niveles pueden aumentar en cualquier proceso inflamatorio sistémico, por lo que se ha observado que su precisión para detectar actividad inflamatoria en la EC es limitada⁷⁹.

En los últimos años se han desarrollado biomarcadores fecales que han demostrado ser más precisos para detectar la presencia o ausencia de inflamación intestinal siendo más específicos para la EC. Dentro de los biomarcadores fecales, calprotectina fecal ha sido el más estudiado. Varios estudios han confirmado una elevada correlación directa entre los valores de la calprotectina fecal y la actividad de la EC evaluada por índices clínicos, endoscópicos e incluso histológicos. Se ha observado una mayor correlación con los índices endoscópicos e histológicos que con los clínicos^{80, 81}. Se ha observado que los pacientes con afectación exclusivamente ileal presentan valores inferiores con respecto a la localización colónica e ileocólica, además de existir mejor correlación con los índices endoscópicos en ambas localizaciones con respecto a la ileal^{79, 80}. Igualmente existe mayor correlación entre los niveles de calprotectina y la actividad endoscópica en el fenotipo inflamatorio con respecto a los fenotipos estenosante o penetrante^{60, 79, 80}.

En 2007, D'Inca et al⁸² analiza la utilidad de la CF para detectar actividad inflamatoria en un grupo de pacientes con EC y CU. Para un punto de corte de 80 µg/g obtienen una sensibilidad del 79% y especificidad del 74% para establecer la presencia de actividad endoscópica en la EC y CU. La correlación entre CF y la actividad endoscópica fue de $r = 0.48$ para EC y $r = 0.51$ para CU.

Jones et al⁸³ estudia la correlación entre el índice SES-CD, CDAI y biomarcadores como PCR, CF y lactoferrina fecal en 164 pacientes con EC. Definen como actividad

endoscópica un SES-CD > 7 puntos. Observan una correlación positiva ($r = 0.45$) entre CF y SES-CD, además el área bajo la curva ROC (Receiver Operating Characteristic) de CF para detectar actividad endoscópica fue de 0.72.

Langhorst et al⁴⁵ analizó la precisión de calprotectina, PCR y CDAI para detectar actividad inflamatoria en la EC. Obtuvieron un punto de corte óptimo para CF de 48 $\mu\text{g/g}$ mostrando una sensibilidad del 81.8% y especificidad del 80% para detectar actividad en la EC. La correlación entre CF y la actividad endoscópica fue significativamente positiva ($r = 0.35$), en este estudio no se utilizó un índice endoscópico validado.

En otro estudio, Sipponen et al⁸¹ determinó en 77 pacientes con EC el índice endoscópico CDEIS, el índice CDAI y el valor de CF. Observaron una elevada correlación entre CF y CDEIS ($r = 0,729$), se obtuvo una sensibilidad del 70% y una especificidad del 92% para predecir actividad endoscópica ($\text{CDEIS} \geq 3$), mientras que para $\text{CDAI} \geq 150$ fue sólo 27%, pero con una especificidad algo mayor (94%).

Shoepfer et al⁷⁹ observó una elevada correlación entre CF y el índice endoscópico SES-CD ($r = 0.75$). Obtuvieron una sensibilidad del 89% y especificidad del 72% para un punto de corte de CF de 70 $\mu\text{g/g}$ con el objetivo de establecer la presencia de actividad endoscópica, definida en este estudio como $\text{SES-CD} \geq 4$.

D'Haens et al⁸⁴ observa en pacientes con EC una correlación positiva y significativa entre los niveles de CF y los índice endoscópicos CDEIS ($r = 0.419$) y SES-CD ($r = 0.490$). La correlación entre CF y CDAI no fue significativa ($r = 0.145$, $p = 0.192$). En dicho estudio se estimó un punto de corte de CF de 250 $\mu\text{g/g}$ para detectar la presencia de úlceras de gran tamaño con una sensibilidad del 60.4% y especificidad del

79.5%. También se obtuvo como punto de corte óptimo para detectar remisión endoscópica ($CDEIS \leq 3$) en $250 \mu\text{g/g}$ con una sensibilidad del 94.1% y especificidad del 62.2%.

Lobatón et al⁸⁵ observa una elevada correlación entre los niveles de CF y el CDEIS ($r = 0.784$). También obtuvieron una sensibilidad del 76.4 y especificidad del 97.2% con un punto de corte de CF de $274 \mu\text{g/g}$ para detectar remisión endoscópica ($CDEIS < 3$).

En 2014, Lin et al⁸⁶ publican una meta-análisis en el que incluyen 13 estudios (744 pacientes con CU y 727 pacientes con EC). Obteniendo para un punto de corte de $50 \mu\text{g/g}$ una sensibilidad del 92% y especificidad del 60% y para un punto de corte de $250 \mu\text{g/g}$ una sensibilidad del 80% y especificidad del 82%. Concluyen que la calprotectina fecal es un marcador fiable para evaluar la actividad en la EII observándose mayor precisión en la CU que en la EC.

Otro meta-análisis publicado en 2015 por Mosli et al⁴⁶ analiza 19 estudios (total de 2499 pacientes) analizando la precisión de la PCR, la CF y la lactoferrina fecal para detectar actividad endoscópica en pacientes con EII. Se estima para CF una sensibilidad del 88% y especificidad del 73% para detectar actividad en la EII. Observa que CF es más precisa que la PCR y es más sensible en la CU que en la EC. Concluye que PCR, Calprotectina y lactoferrina fecal son biomarcadores útiles para detectar actividad inflamatoria en la EII pero que para el manejo individual de cada paciente debemos tener en cuenta el contexto clínico específico.

En ambos meta-análisis se observa una gran heterogeneidad entre los diferentes ensayos debido a la falta de estandarización de la metodología diagnóstica.

Como conclusión de estos trabajos se proponen distintos puntos de corte de calprotectina fecal: 50 $\mu\text{g/g}$ ^{79, 87}, 100 $\mu\text{g/g}$ ⁸⁸⁻⁹⁰, 250 $\mu\text{g/g}$ ^{84, 91} o 274 $\mu\text{g/g}$ ⁸⁵, no existiendo acuerdo en el punto de corte óptimo.

Por tanto, la aplicabilidad clínica de la calprotectina fecal está limitada al no existir consenso en el punto de corte óptimo para establecer actividad endoscópica. Tratar de encontrar evidencia estadística sobre los diferentes rangos de valores para clasificar estado de “actividad endoscópica” o “curación mucosa” con elevada precisión supondría un avance en la toma de decisiones sin necesidad de realizar otras pruebas. De este modo, alcanzaríamos un aumento en la eficiencia de la práctica clínica diaria, pudiendo realizar una mejor clasificación de los pacientes y por consiguiente una individualización del manejo terapéutico.

M2-PK es otro biomarcador fecal que se ha demostrado que es útil para diagnosticar la EII, también para detectar actividad inflamatoria en la CU e incluso ha demostrado ser un importante marcador predictivo para la CU grave en edad pediátrica⁹². Pero no existen estudios en los que se haya demostrado la precisión de M2-PK para detectar actividad inflamatoria en la EC en base a los datos objetivados por la colonoscopia.

Consideramos que, dada la limitada precisión que presenta la clínica y los biomarcadores serológicos para detectar actividad inflamatoria, demostrar una elevada precisión de los biomarcadores fecales en nuestro medio nos permitiría una práctica clínica con un manejo más preciso y eficiente de los pacientes con EC evitando la realización de colonoscopias innecesarias en la monitorización de la actividad inflamatoria.

En este sentido nuestro objetivo principal es analizar la precisión diagnóstica de CF y M2-PK fecal para detectar actividad inflamatoria en la EC.

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

Existe interés en la determinación de biomarcadores precisos para el diagnóstico y manejo de los pacientes con enfermedad de Crohn. Se hipotetiza que los valores de calprotectina fecal, M2-Piruvato quinasa fecal, PCR, VSG, SES-CD y CDAI se encontrarán significativamente correlacionados en esta cohorte de pacientes. También se hipotetiza que los niveles de calprotectina fecal, M2-Piruvato quinasa fecal, PCR, VSG y la puntuación de CDAI serán significativamente más elevados en el grupo de pacientes con actividad endoscópica que en el grupo de curación mucosa. Así mismo, para evaluar de forma más precisa estas diferencias, se hipotetiza que existirán diferencias significativas en los niveles de los biomarcadores y la puntuación de CDAI entre los diferentes grupos de actividad endoscópica (remisión, leve, moderada y grave), siendo mayores en los niveles de actividad endoscópica más graves.

También, indicar que tal y como se ha señalado, actualmente desconocemos la verdadera precisión diagnóstica de calprotectina fecal y de M2-Piruvato quinasa fecal para establecer la presencia de actividad endoscópica en la enfermedad de Crohn, por lo que en este trabajo se hipotetiza que estos biomarcadores fecales tiene una precisión diagnóstica mayor que PCR y VSG.

2.2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

2.2.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la precisión diagnóstica de la calprotectina fecal y M2-piruvato quinasa fecal en la detección de actividad endoscópica en la enfermedad de Crohn.

2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir las características basales demográficas y clínicas de una cohorte de pacientes con enfermedad de Crohn a los cuales se les realiza una colonoscopia.

2. Analizar las correlaciones entre los niveles de calprotectina fecal, M2-Piruvato quinasa fecal, PCR, VSG, índice SES-CD e índice CDAI en la cohorte de pacientes con enfermedad de Crohn seleccionada.

3. Comprobar si los niveles de calprotectina fecal, M2-Piruvato quinasa fecal, PCR, VSG y la puntuación del CDAI son significativamente más elevados en el grupo de pacientes con actividad endoscópica que en el grupo con curación mucosa.

4. Analizar si existen diferencias significativas entre los niveles de los distintos biomarcadores analizados y la puntuación del CDAI entre los grupos de actividad endoscópica (remisión, leve, moderado y grave).

5. Estimar un punto de corte óptimo, respecto a sensibilidad y especificidad, de los biomarcadores y del CDAI para detectar actividad endoscópica en la enfermedad de Crohn.

6. Analizar si existe una agrupación de variables que conjuntamente determinen una mayor precisión para detectar la presencia de actividad endoscópica en los pacientes de nuestra cohorte.

7. Determinar los puntos de cortes óptimos de los distintos biomarcadores para generar rangos con elevada probabilidad para detectar estado de actividad inflamatoria y estado de curación mucosa.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio analítico, observacional y de validación de prueba diagnóstica, en una cohorte prospectiva de pacientes diagnosticados de enfermedad de Crohn, con formato prospectivo.

3.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se ha estudiado una muestra de la población de pacientes adultos, diagnosticados de enfermedad de Crohn, y pertenecientes al área hospitalaria Juan Ramón Jiménez de Huelva

3.3. MUESTRA

Pacientes adultos pertenecientes al área hospitalaria Juan Ramón Jiménez de Huelva y diagnosticados de enfermedad de Crohn, a los que se les solicitó ileocolonoscopia dentro de la práctica clínica habitual y durante el seguimiento de la enfermedad para valoración de actividad inflamatoria.

Se seleccionaron de forma sucesiva, pacientes con enfermedad de Crohn a los que se les evaluó la actividad inflamatoria mediante ileocolonoscopia por indicación facultativa, bien desde la consulta monográfica de enfermedad inflamatoria intestinal o bien desde la planta de hospitalización. En la exploración endoscópica se recogieron los datos necesarios para calcular el índice SES-CD en todos los pacientes.

3.4. CÁLCULO DE TAMAÑO MUESTRAL

Se establece el cálculo del tamaño muestral para el estudio de la actividad endoscópica en la enfermedad de Crohn, tomando la proporción de sujetos clasificados a partir de la calprotectina fecal como con actividad y sin actividad endoscópica. Por ello, se lleva a cabo el cálculo del tamaño muestral a partir de dos proporciones independientes con la calculadora de tamaño muestral GRANMO v 7.12.

Aceptando un riesgo alfa de 0.05 y un riesgo beta de 0.2 en un contraste bilateral, se precisan 66 sujetos para detectar como estadísticamente significativa la diferencia entre dos proporciones que, teniendo en cuenta los registros clínicos del año 2010 en el Hospital Juan Ramón Jiménez, para el grupo 1 se espera sea de 0.68 y el grupo 2 de 0.32. Se ha estimado una tasa de pérdidas de seguimiento del 10%. Se ha utilizado la aproximación del arcoseno.

3.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN

Los criterios de inclusión fueron:

- Edad comprendida entre 18 y 70 años de edad
- Diagnóstico de enfermedad de Crohn en base a criterios clínicos, endoscópicos e histológicos.
- Realización de ileocolonoscopia con valoración de actividad inflamatoria
- Firma de consentimiento informado para el estudio

Los criterios de exclusión fueron aquellas situaciones que podrían modificar los niveles de los biomarcadores:

- Padecer enfermedad inflamatoria distinta de enfermedad de Crohn
- Presentar neoplasias digestivas o a otro nivel
- Presentar actualmente cuadro infeccioso agudo
- Antecedentes de resecciones intestinales amplias (colectomía total o subtotal)
- Ser consumidor crónico de anti-inflamatorios no esteroideos o ácido acetil salicílico.
- Presentar afectación extensa de intestino delgado o gastrointestinal superior (Montreal L4)
- Realización de ileocolonoscopia incompleta

3.6. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN DE LOS PACIENTES

Como se ha indicado, se incluyeron de forma sucesiva todos los pacientes con el diagnóstico de EC en base a datos clínicos, endoscópicos e histológicos que se realizaron una colonoscopia reciente de seguimiento y para valoración de actividad o remisión endoscópica. Todos los pacientes incluidos tenían pruebas radiológicas para evaluar la afectación de intestino delgado (tránsito intestinal, enteroRM o TAC abdomen), no incluyéndose en el estudio pacientes con localización gastrointestinal superior o extensa de intestino delgado. A todos los pacientes se les practicó una ileocolonoscopia valorándose el aspecto de la mucosa a nivel del colon; observando el recto, colon izquierdo, transverso y colon derecho; y del íleon terminal valorando la presencia o no de datos de inflamación en cada tramo explorado.

Previo a iniciar el estudio se realizaron reuniones de consenso con los endoscopistas del centro para aunar criterios de valoración del índice con el fin de poder disminuir la variabilidad interobservador a la hora de puntuar los distintos criterios. Respecto a la valoración de la actividad clínica estudiamos aspectos clínicos como deposiciones blandas o líquidas, dolor abdominal, bienestar general, complicaciones de la enfermedad, necesidad de fármacos para controlar deposiciones, presencia de masa abdominal y pérdida de peso; además de la cifra de hematocrito. Todas estas variables fueron recogidas para calcular el índice CDAI.

Dentro de los siete días posteriores a la ileocolonoscopia, donde se recogieron los datos necesarios para el cálculo del índice de actividad SES-CD, se citaron a los pacientes para plantear la entrada en el estudio, así como la firma de consentimiento

informado en caso de aceptación. En esta visita se le explicó al paciente en qué consistía el estudio y cuáles eran los objetivos que se pretendían alcanzar. Aquellos pacientes que aceptaron participar firmaron por escrito la hoja de consentimiento informado específica para dicho estudio. Además, se realizó una entrevista clínica para obtener la información necesaria en el cálculo del índice CDAI. Por último, se le entregó al paciente la hoja de petición analítica para determinación de hemograma, PCR y VSG; hoja de petición de microbiología con un bote para recogida de heces para descartar posible infección intestinal; y hoja de consulta al laboratorio y dos botes para recogida de heces con el fin de determinar los niveles de la Calprotectina fecal y la M2-PK fecal. Se les explicó a los pacientes que la recogida de heces de los tres botes debía ser de la misma deposición, realizada el mismo día que se entregue la muestra en el laboratorio. Aquellos pacientes que pudieran presentar infección intestinal, detectada en coprocultivo, quedarían excluidos del estudio. También se explicó que tanto la muestra de sangre como la muestra de heces debería de realizarse en los próximos tres días tras la visita.

El período de tiempo entre la realización de la colonoscopia y la visita no fue superior a los siete días. Desde que se realizó la colonoscopia hasta que el paciente recogió las muestras de heces y se realizó la determinación de hemograma y biomarcadores serológicos no se modificó el tratamiento que realizaban los pacientes para la enfermedad. Si el paciente no realizaba ningún tratamiento, se les indicó que no comenzasen ninguna terapia hasta no entregar las muestras.

Las muestras de heces, recogidas para la determinación de CF y M2-PK fecal, fueron congeladas a -20°C en un congelador localizado en el laboratorio de Análisis

Clínico del Hospital Juan Ramón Jiménez. Posteriormente, fueron enviadas, con una cadencia semestral, a los laboratorios REFERENCE en Barcelona. El transporte se realizó con nieve carbónica asegurándose la correcta conservación de las muestras. En el centro de análisis clínicos de REFERENCE en Barcelona se procedió al procesamiento de las muestras y a la determinación de los niveles de CF y M2-PK fecal.

Con todos estos datos recogidos, se pudo clasificar a los pacientes según presentasen actividad o remisión, tanto desde el punto de vista endoscópico como clínico. Todos los pacientes del estudio fueron reclutados en un periodo de tiempo total de 24 meses.

3.7. TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.7.1. Determinación de los niveles fecales de calprotectina fecal

En el laboratorio de análisis clínicos de REFERENCE en Barcelona se realizó la determinación de la CF utilizando la técnica de Calprest[®] Eurospital, Trieste (Italia). Se trata de un ensayo inmunoenzimático, mediante método colimétrico para la determinación de los niveles de la CF. Dicha técnica consiste en un inmunoensayo en el cual dos anticuerpos seleccionados se unen a epítopes distintos de la CF. Los calibradores, controles del ensayo y muestras de los pacientes se cargan directamente en los pocillos de una placa de microvaloración que están recubiertos con un anticuerpo contra la CF. Tras un corto período de incubación, la placa se lava y a cada pocillo se le agrega un anticuerpo monoclonal específico a la calprotectina humana. Después de un segundo período de incubación, se forma un “sándwich” de anticuerpo en fase sólida – calprotectina humana – anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos monoclonales libres y la matriz del tampón se eliminan en el siguiente paso de lavado. Para detectar este complejo inmune, se incuba el pocillo con una solución de sustrato en una reacción cronometrada y luego se mide en un espectrofotómetro lector de placas. La actividad enzimática del complejo inmune unido a la pared de cada pocillo de la placa de microvaloración es directamente proporcional a la concentración de calprotectina humana en la muestra del paciente. Se genera una curva de calibración y se traza la absorbancia versus la concentración de calprotectina humana respectiva para cada calibrador ajustando la curva punto a punto o con 4 parámetros. La concentración de la CF humana en las muestras se determina directamente a partir de

esta curva estándar. Las unidades son $\mu\text{g/g}$. Calprest[®] proporciona resultados en el rango entre $15.6 \mu\text{g/g}$ y $500 \mu\text{g/g}$, pero en aquellos pacientes con niveles $> 500 \mu\text{g/g}$ se realizó dilución apropiada de las muestras extraídas ampliándose el valor superior a $1000 \mu\text{g/g}$. Las muestras con una concentración superior a $50 \mu\text{g/g}$ se consideran positivas al ensayo. En los adultos sanos, el promedio es de $25 \mu\text{g/g}$ aproximadamente.

3.7.2. Determinación de los niveles fecales de M2-piruvato quinasa

En el laboratorio de análisis clínicos de REFERENCE en Barcelona se realizó la determinación de la M2-PK fecal utilizando la técnica de Schebo[®] • Tumor M2-PK[™] ELISA Stool, Giessen (Germany). Se trata de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas altamente sensible. La prueba se basa en la utilización de dos anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con epítopes específicos de M2-PK y no reaccionan de forma cruzada con otras isoformas de la enzima piruvato quinasa. Inicialmente la placa de microvaloración se recubre con un anticuerpo monoclonal específico para M2-PK. Posteriormente, se vierte en los pocillos las muestras fecales y estándares produciéndose la unión de M2-PK al anticuerpo y quedando este complejo inmovilizado sobre la placa. Luego, se añade el segundo anticuerpo, que contiene biotina, que igualmente se une a la M2-PK. Finalmente se añade un conjugado de peroxidasa y estreptavidina que se une a la biotina por la gran afinidad que tiene la estreptavidina a esta molécula. Se produce una reacción de oxidación por parte de la peroxidasa generándose en el pocillo un color amarillo. La determinación de la concentración se realiza fotométricamente. Las unidades se obtienen en U/ml. Schebo[®] • Tumor M2-PK[™] ELISA estima resultados entre 1.0 U/ml y 20 U/ml , a

aquellos pacientes con niveles > 20 U/ml se realizó dilución apropiada, igual que para Calprest[®], ampliándose su valor superior a 40 U/ml. Los niveles normales de M2-PK en adultos son inferiores a 4 U/ml.

3.7.3. Determinación de los niveles plasmáticos de la proteína C reactiva

La determinación de PCR se realizó en el laboratorio del Hospital Juan Ramón Jiménez mediante la prueba Tina-Quant de PCR (Test inmunológico de aglutinación intensificado por partículas de látex) de Roche Diagnostics, Mannheim (Alemania). Consiste en una prueba de inmunturbidimetría que determina in vitro el nivel de la PCR en suero y plasma humano utilizando analizadores automáticos. Los anticuerpos contra la PCR unidos a macropartículas de látex reaccionan con el antígeno de la muestra para formar un complejo cuya aglutinación se mide por turbidimetría. Las unidades se obtienen en mg/dl. Los niveles de normalidad de PCR en adultos son inferiores a 0.5 mg/dl.

3.7.4. Determinación de los niveles plasmáticos de la velocidad de sedimentación globular

La determinación de la VSG se realizó en el laboratorio de análisis clínicos del Hospital Juan Ramón Jiménez mediante se realizó en el analizador automático Ves-Matic Cube 80 de A. Menarini Diagnostics (España). La técnica consiste en medir la velocidad de caída (sedimento) de los hematíes en un tubo de ensayo. Los resultados se expresan como milímetros de plasma transparente que quedan en la parte superior del tubo después de que haya transcurrido una hora. Las unidades se obtienen en

mm/h. Los valores normales de VSG en mujeres son inferiores a 20 m/h y en hombre inferiores a 15 mm/h.

3.8. RECOGIDA DE DATOS

Tras la primera visita y la posterior entrega de muestras, los resultados fueron recogidos en el cuaderno de recogida de datos y los pacientes fueron seguidos en la consulta de digestivo, continuando con la práctica clínica habitual. Se realizó un protocolo de estudio que incluyó variables epidemiológicas, clínicas, endoscópicas y analíticas. Todos los datos se recogieron en distintas plantillas específicas para el estudio, realizando el cálculo del SES-CD, del CDAI, la recogida de datos epidemiológicos y la concentración de los marcadores fecales y serológicos. Toda la información fue recogida en una base de datos “ad hoc” en el programa SPSS versión 21.

3.9. VARIABLES DEL ESTUDIO

A continuación describimos las variables estudiadas, y a su vez las clasificamos como variables dependientes y variables independientes.

La variable **dependiente** fue la siguiente:

- **Actividad endoscópica:** Se define por la presencia de datos inflamatorios, objetivados en la ileocolonoscopía, que generan un valor del índice SES-CD > 2 puntos.
 - El SES-CD (Índice endoscópico simplificado de la EC) valora cuatro parámetros:
 1. Presencia de úlceras y tamaño: Ausencia = 0 puntos, aftas 0.1-0.5 cm = 1 punto, úlceras 0.5-2 cm = 2 puntos, úlceras > 2 cm = 3 puntos.
 2. Superficie ulcerada: Ausencia = 0 punto, < 10% = 1 punto, 10%-30% = 2 puntos, > 30% = 3 puntos.
 3. Superficie afectada por inflamación: Ausencia = 0 puntos, < 50% = 1 punto, 50%-75% = 2 puntos, > 75% = 3 puntos.
 4. Presencia de estenosis: Ninguna = 0 puntos, una estenosis franqueable = 1 punto, más de una estenosis franqueable = 2 puntos, una estenosis infranqueable = 3 puntos.

Cada parámetro es valorado en 5 segmentos: Recto, colon izquierdo, colon transversal, colon derecho e íleon. Obtenemos una puntuación final que clasifica al paciente según su actividad desde el punto de vista endoscópico en: Remisión < 3

puntos, actividad leve 3-7 puntos, actividad moderada 8-15 puntos, actividad severa \geq 16 puntos^{71, 72}.

Las variables **independientes** fueron las siguientes:

- **Edad:** medida en años. Variable cuantitativa continua
- **Género:** Variable dicotómica (Hombre/Mujer)
- **Años de evolución de la enfermedad:** se definen por los años transcurridos desde el diagnóstico de EC en cada paciente. Variable cuantitativa continua.
- **Localización:** Se define como la zona afectada por la inflamación. Se distinguen tres grupos siguiendo la clasificación de Montreal: Ileal (L1), Colónica (L2) e Ileocólica (L3). Variable categórica-nominal.
- **Tratamiento:** Se distinguieron varios grupos según el tratamiento que realizase el paciente en el momento de realizarse las pruebas: sin tratamiento/con tratamiento. Variable dicotómica. Dada la posibilidad de existencia de diferentes tratamientos, compatibles entre ellos, se desarrolla otra variable de respuesta múltiple en la que se registran los siguientes tratamientos:
 - Sin tratamiento, en tratamiento con mesalazina, en tratamiento con corticoides, en tratamiento con inmunosupresores o en tratamiento con anti-factor de necrosis tumoral α (anti-TNF α). Variables dicotómicas (Si/No).
- **Calprotectina fecal ($\mu\text{g/g}$):** Define los niveles fecales de CF determinados varios días después de realizar la colonoscopia. Variable cuantitativa continua.

- **M2-Piruvato Quinasa fecal (U/ml):** Define los niveles fecales de M2-Piruvato quinasa posterior a la realización de la colonoscopia. Variable cuantitativa continua.
- **Proteína C reactiva (mg/dl):** Define los niveles serológicos de Proteína C reactiva obtenidos en la analítica posterior a la colonoscopia. Variable cuantitativa continua.
- **Velocidad de sedimentación globular (mm/h):** Define los niveles serológicos de velocidad de sedimentación globular determinados en analítica realizada tras la colonoscopia. Variable cuantitativa continua.
- **Actividad Clínica:** definida por presencia de datos clínicos que generan un valor del índice CDAI > 150 puntos. Variable cuantitativa continua.
 - El CDAI valora de forma cuantitativa ocho parámetros: siete clínicos y uno analítico. Cada parámetro tiene una puntuación y un peso o factor multiplicador:
 1. Número de deposiciones blandas o líquidas durante 7 días → x 2.
 2. Dolor abdominal (no = 0 puntos, leve = 1 punto, moderado = 2 puntos, severo = 3 puntos), suma durante 7 días → x 5.
 3. Bienestar general (bien = 0 puntos, regular = 1 punto, mal = 2 puntos, muy mal = 3 puntos, fatal = 4 puntos), suma de 7 días consecutivos → x 7.
 4. Número de complicaciones o manifestaciones (artritis o artralgias, iritis o uveítis, eritema nodoso o pioderma gangrenoso, estomatitis aftosa, fisura, fístula o absceso anal, otras fístulas o fiebre > 37.8º C) → x 20.

5. Fármacos para controlar diarrea (no = 0 puntos, sí = 1 punto) → x 30.
6. Presencia de masa abdominal (no = 0 puntos, posible = 0.4 puntos, sí = 1 puntos) → x 10.
7. Cifra de Hematocrito (normal – paciente) → x 6.
8. Pérdida de peso (peso estándar- peso actual/ peso estándar x 100) → x 1.

Se calcula sumando el resultado de todos los parámetros, obteniéndose un resultado numérico final que nos permite definir el grado de actividad desde el punto de vista clínico en: Remisión < 150 puntos, actividad leve 150-219 puntos, actividad moderada 220-450 puntos, actividad grave > 450 puntos³.

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se ha realizado inicialmente un estudio descriptivo de los datos, definiendo la edad media de la muestra, distribución de género, años de evolución de la enfermedad, localización, distribución por grados de actividad y tratamiento, así como la normalidad de las diferentes variables cuantitativas a partir del test de Kolmogorov-Smirnov (K-S) dado que el tamaño muestral es mayor a 30. Se observó que únicamente el CDAI cumplía normalidad, siendo el resto de variables no normales.

Tras este resultado, se utilizaron los test no paramétricos de U-Mann Whitney y H de Kruskal-Wallis para comparar los niveles de las distintas variables en los grupos de actividad y remisión endoscópica. Igualmente, se utilizó el test no paramétrico de rho de Spearman para analizar la correlación entre las variables estudiadas. Se realizó un análisis de precisión estimando las curvas ROC de la calprotectina y M2-PK respecto al SES-CD. Mediante el índice de Youden (IY) se calculó el punto de corte con mayor precisión de ambos biomarcadores para establecer actividad endoscópica, así como valores de sensibilidad, especificidad, y valores predictivos: positivo y negativo, precisión global y likelihood ratios (LR). Se ha realizado un cálculo de rangos de alta precisión identificando un umbral de confirmación de actividad endoscópica aquel valor con especificidad $> 90\%$ y $LR+ \geq 10$ y un umbral para exclusión de actividad endoscópica el valor con sensibilidad $> 90\%$ y $LR- \leq 0.1$ ^{93, 94}. Finalmente se ha calculado el nomograma de Fagan para determinar la probabilidad de presentar actividad endoscópica o curación mucosa tras obtener el valor del biomarcador. Se utilizó la escala aplicada de Hinkle DE, Wiersma W & Jurs SG (2003)⁹⁵ para clasificar la magnitud

de correlación entre las variables analizadas (0-0.30: pequeña; 0.30 – 0.50: baja; 0.50 – 0.70: moderada; 0.70 – 0.90: fuerte; 0.90 – 1.0: muy fuerte).

Por último, se utilizaron modelos de regresión logística binaria para generar un modelo predictivo utilizando como variable dependiente la actividad endoscópica y como independientes todas aquellas variables recogidas que sean significativas y aporten algo al modelo que se pueda establecer. La regresión logística binaria nos permite conocer como una serie de factores influyen en una variable dicotómica, como en este caso sería la presencia o no de actividad endoscópica. También se realizó la prueba de Hosmer y Lemeshow para comprobar que los resultados obtenidos con el modelo son aceptables.

En todos los casos se exigió una significación estadística del 5% ($p < 0.05$). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa estadístico SPSS 21.0, MedCalc 13.3.3 y Excel 2013.

3.11. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los pacientes fueron informados de las características y el propósito del estudio. Aunque no se trata de un ensayo clínico, la necesidad de mantener muestras biológicas congeladas nos obligó a solicitar consentimiento informado por escrito, sobre todo, por la custodia del material genético de los enfermos contenido en las muestras de heces que fueron congeladas y que fueron remitidas a un laboratorio externo para la determinación de las proteínas a estudio. Para tal efecto se confeccionó un documento de consentimiento informado (ANEXO 5). Los datos personales fueron recogidos únicamente por el investigador y en todo momento se ha preservado la confidencialidad de los mismos. El Proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética e Investigación Sanitaria del Hospital Juan Ramón Jiménez y Centros adscritos de la provincia de Huelva.

Se aplicaron los principios éticos de la investigación en humanos que se recogen en la declaración de Helsinki (OMS: Seul, Octubre 2008). Se respetó la confidencialidad y secreto de la información de carácter personal siguiendo la ley de protección de datos 15/1999 (BOE 1999, nº 298).

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1. DESCRIPCIÓN CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS BASALES

Se incluyeron un total de 80 pacientes de los cuales 5 fueron excluidos por no poder realizarse ileoscopia y 4 pacientes no entregaron las muestras de heces para realizar tras la primera visita. En ningún paciente se identificó ningún microorganismo en el coprocultivo. Así pues se alcanzó un tamaño muestral total de 71 pacientes. Las características basales de los pacientes se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Características basales de los pacientes

Características de los pacientes	Número (%)
Número de pacientes	71
Edad (años); mediana (rango)	41.5 años (16-69)
Género femenino	38 (53.52%)
Duración de la EC (años); mediana (rango)	5.6 años (0-41)
Localización	
Ileal (L1)	23 (32.4%)
Colónica (L2)	17 (23.9%)
Ileocólica (L3)	31 (43.7%)
Fenotipo	
Inflamatorio (B1)	63 (88.7%)
Estenosante (B2)	6 (8.5%)
Penetrante (B3)	2 (2.8%)
Tratamiento	
Mesalazina	30 (42.2%)
Corticoides	11 (15.5%)
Tiopurinas	20 (28.1%)
Metrotexate	2 (2.8%)
Anti-TNF α	10 (14.0%)
Sin tratamiento	10 (14.0%)
SES-CD; (mediana, RIC)	
Curación mucosa (≤ 2)	22 (31%)
Actividad leve (3-6)	15 (21.1%)
Actividad moderada (7-15)	26 (36.6%)
Actividad severa (≥ 16)	8 (11.3%)
CDAI; (median, RIC)	
Remisión (< 150)	31 (43.7%)
Actividad leve (150 - 220)	20 (28.2%)
Actividad moderada (221 - 450)	19 (26.7%)
Actividad severa (> 450)	1 (1.4%)
Calprotectina ($\mu\text{g/g}$); mediana (RIC)	196 (96-419)
M2-PK (U/l); mediana (RIC)	9.4 (2.5-21.8)
PCR (mg/dl); mediana (RIC)	0.5 (0.2-1.4)
VSG (mm/h); mediana (RIC)	24 (12-44)

TNF α : Tumor necrosis factor α ; RIC: rango intercuartílico; SES-CD: Simple endoscopic scores for Crohn's disease; CDAI: Crohn's disease activity index; M2-PK: M2-piruvato quinasa; PCR: Proteína C reactiva; VSG: Velocidad de sedimentación globular.

Nuestra cohorte tenía una edad media de 41.58 años (Sd = 12.77), con predominio de mujeres (53.52%) con respecto a los hombres (46.48%). El tiempo de evolución media de la enfermedad de la cohorte era de 5.62 años (Sd = 8.12). Respecto a la localización de la enfermedad de Crohn, la más frecuente fue la localización ileocólica (Figura 1). La distribución fenotípica fue de un 88.7% de los paciente patrón inflamatorio, el 8.5% patrón estenosante y el 2.8% patrón penetrante. Con respecto a la medicación que estaba tomando el paciente en el momento de realizar la colonoscopia, el 42.2% tomaba mesalazina, el 15.5% corticoides, el 28.1% tiopurinas, el 2.8% metrotexate, el 14% anti-TNF y el 14% no tomaba ninguna medicación para la enfermedad. Se detectó actividad endoscópica en el 69% de los pacientes; de estos el 48.9% presentaban actividad leve, el 38.7% actividad moderada y el 10.2% actividad severa. El 31% no presentaban actividad inflamatoria siendo clasificados en estado de curación mucosa (Figura 2). El 43.7% presentaban remisión clínica y el 56.3% actividad clínica, siendo lo más frecuente, dentro de la actividad, presentar actividad leve (Figura 3).

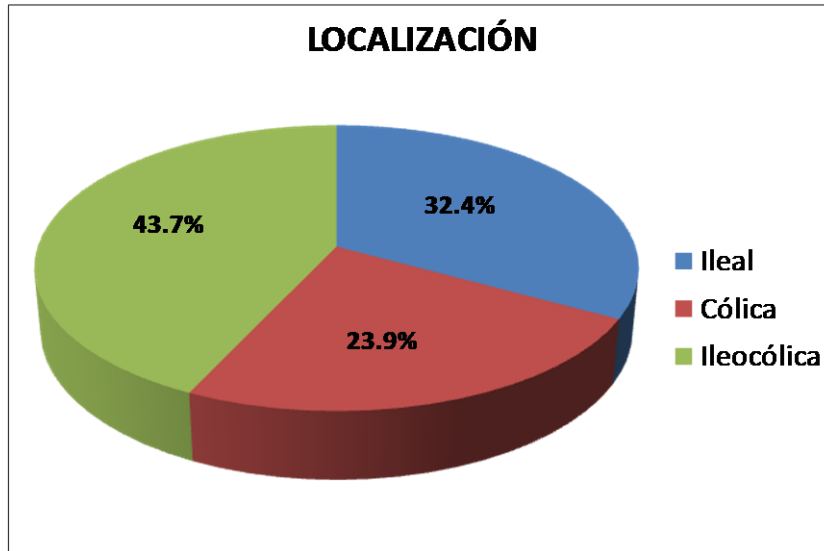


Figura 2. Distribución de la localización de la enfermedad de Crohn

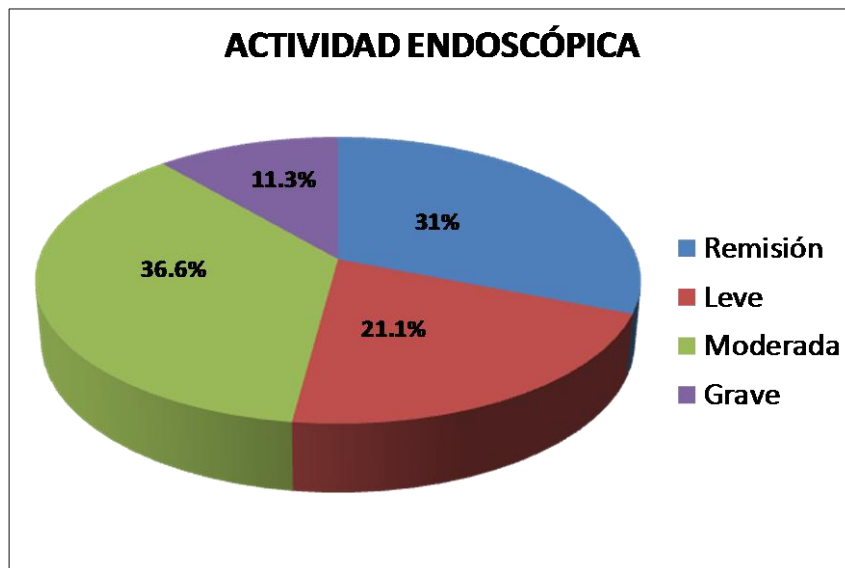


Figura 3. Distribución según la actividad endoscópica

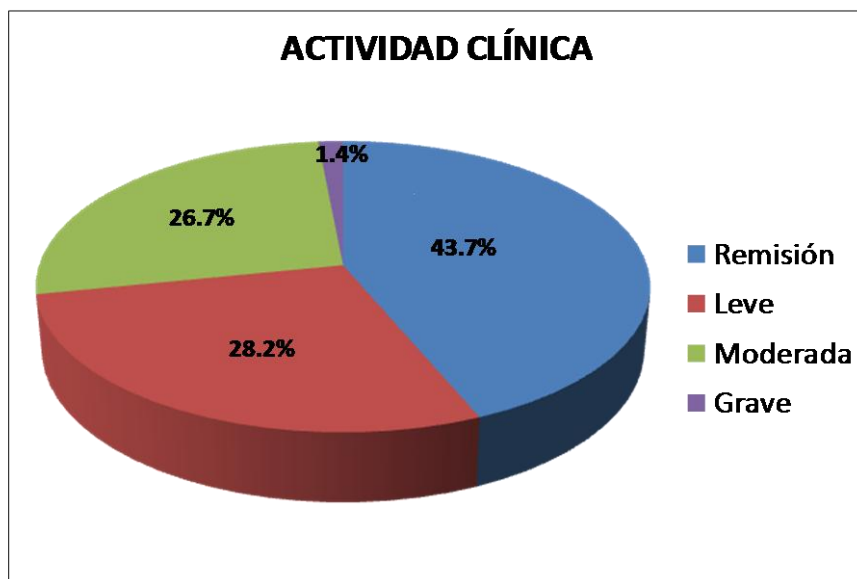


Figura 4. Distribución según la actividad clínica

4.2. TEST DE NORMALIDAD

Tras realizar el test de Kolmogorov-Smirnov se observó que únicamente el CDAI cumplía normalidad (Tabla 2). Tras estos resultados se utilizaron test no paramétricos para realizar la correlación y comparación de niveles de las variables en función del grupo de actividad.

Tabla 2: Tests de normalidad Kolmogorov-Smirnov con Corrección de Lilliefors

	estadístico	df	Significación
SES-CD	,125	71	,008
CDAI	,104	71	,056
Calprotectina	,151	71	,000
M2-PK	,164	71	,000
PCR	,338	71	,000
VSG	,163	71	,000

SES-CD: Simple endoscopic scores for Crohn's disease; CDAI: Crohn's disease activity index; M2-PK: M2-piruvato quinasa; PCR: Proteína C reactiva; VSG: Velocidad de sedimentación globular.

4.3. CORRELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES

Al no cumplir la normalidad la mayoría de las variables estudiadas se utilizó el test de rho de Spearman para determinar la correlación entre SES-CD, CDAI, CF, M2-PK fecal, PCR y VSG conformándose un cuadro de correlaciones (Tabla 3).

Tabla 3: Correlaciones entre las variables (rho Spearman)

	SES-CD	CF	M2-PK	CDAI	PCR	VSG
SES-CD	1,000	,738**	,575**	,669**	,534**	,516**
CF		1,000	,765**	,560**	,579**	,544**
M2-PK			1,000	,302*	,424**	,468**
CDAI				1,000	,597**	,481**
PCR					1,000	,599**
VSG						1,000

SES-CD: Simple endoscopic scores for Crohn's disease; CF: Calprotectina fecal; M2-PK: M2-piruvato quinasa; CDAI: Crohn's disease activity index; PCR: Proteína C reactiva; VSG: Velocidad de sedimentación globular.

*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

Todas las correlaciones fueron positivas y estadísticamente significativas, siendo la correlación entre ambos biomarcadores fecales la que presentó mayor magnitud de correlación ($r = 0.765$). CF presentó una fuerte correlación positiva tanto con M2-PK como con SES-CD (Figura 4); también presentó moderada correlación positiva con PCR, CDAI y VSG. M2-PK mostró una fuerte correlación positiva con CF, moderada correlación positiva con SES-CD y baja con VSG, PCR y CDAI. Además, se observó una moderada correlación positiva entre SES-CD y CDAI (Tabla 3).

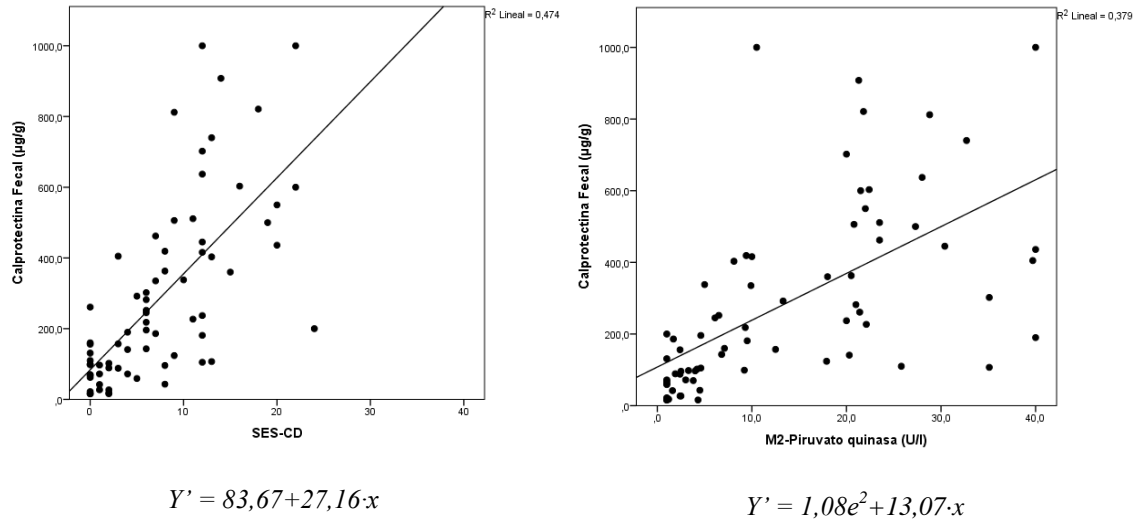


Figura 5. Correlación entre la calprotectina fecal con respecto al índice SES-CD y a la M2-Piruvato quinasa fecal.

4.4. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE LOS BIOMARCADORES Y LA PUNTUACIÓN DEL CROHN'S DISEASE ACTIVITY INDEX SEGÚN LA ACTIVIDAD ENDOSCÓPICA

Antes de determinar un punto de corte óptimo para estimar la utilidad de los biomarcadores y el CDAI como detectores de actividad inflamatoria intestinal, tenemos que comprobar que los niveles medios de estas variables en el grupo de actividad endoscópica son mayores que en el grupo de remisión o curación mucosa. Se utilizó el test no paramétrico de U de Mann-Whitney, dado que la mayoría de las variables no cumple la normalidad, para el contraste de hipótesis de igualdad. Todas las variables alcanzan significación estadística por lo que se rechaza la hipótesis de igualdad de los biomarcadores y de CDAI (Tabla 4).

Tabla 4: Resultados prueba U de Mann-Whitney

Variable	Actividad endoscópica	Mediana (RIQ)	Significación
M2-PK	Actividad	20 U/ml (RIC 6.6 - 23.5)	$p < 0.001$
	Remisión	2.5 U/ml (RIC 1.0 - 4.2)	
Calprotectina	Actividad	335 µg/g (RIC 183 - 508)	$p < 0.001$
	Remisión	71 µg/g (RIC 25 - 104)	
PCR	Actividad	0.8 mg/dl (RIC 0.2 - 1.8)	$p = 0.001$
	Remisión	0.2 mg/dl (RIC 0.1 - 0.4)	
VSG	Actividad	32 mm/h (RIC 17 - 50)	$p = 0.003$
	Remisión	15 mm/h (RIC 9 - 29)	
CDAI	Actividad	190 puntos (RIC 127 - 303)	$p < 0.001$
	Remisión	82 puntos (RIC 30 - 152)	

M2-PK: M2-piruvato quinasa; PCR: Proteína C reactiva; VSG: Velocidad de sedimentación globular; CDAI: Crohn's disease activity index

La representación gráfica de los niveles de los biomarcadores y CDAI según los dos grupos de status endoscópico (remisión endoscópica o actividad inflamatoria) se

observa en los diagramas de cajas y bigotes. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en todas las variables estudiadas. (Figura 5).

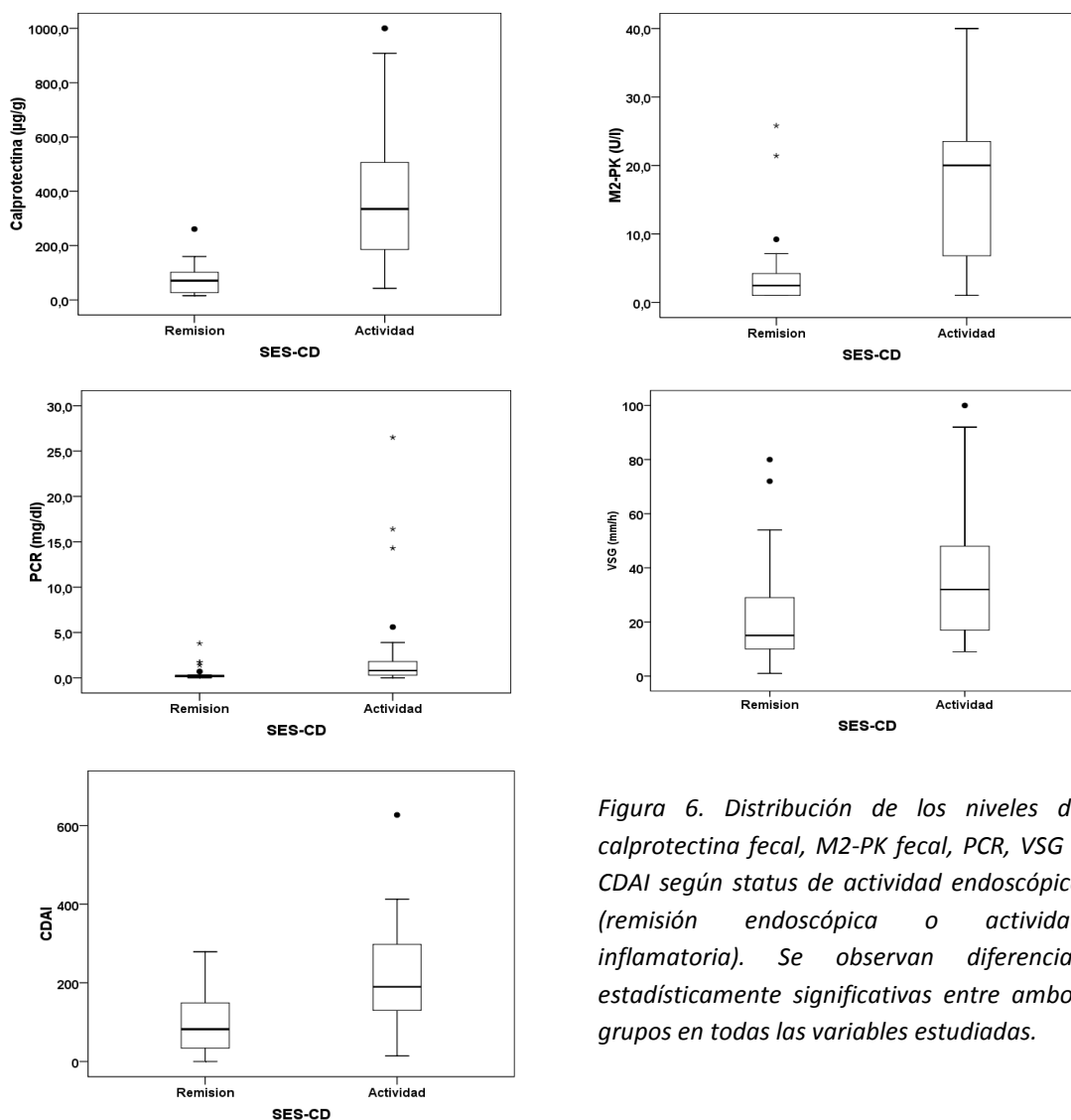


Figura 6. Distribución de los niveles de calprotectina fecal, M2-PK fecal, PCR, VSG y CDAI según status de actividad endoscópica (remisión endoscópica o actividad inflamatoria). Se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en todas las variables estudiadas.

También se analizó si existen diferencias entre los niveles de biomarcadores y puntuación de CDAI entre los cuatro grupos de actividad (remisión, leve, moderada y grave) según la puntuación obtenida por el índice SES-CD. Para este análisis se utilizó la

prueba H de Kruskal Wallis, observándose que en todas las variables existe al menos un par de grupos entre los que hay diferencias significativas (Tabla 5).

Tabla 5. Prueba H de Kruskal Wallis ^a

	Chi-cuadrado	gl	Sig. asintótica
M2-Piruvato quinasa	24,709	3	,000
Calprotectina	39,817	3	,000
Proteína C Reactiva	21,172	3	,000
Velocidad de Sedimentación Globular	22,096	3	,000
Índice CDAI	27,545	3	,000

CDAI: Crohn's disease activity index

a. Variable de agrupación: Índice endoscópico por grupos

Además, se estudia las diferencias de los niveles medios de las variables entre los cuatro grupos de actividad utilizando nuevamente el test de la U de Mann-Whitney. La CF presentó diferencias estadísticamente significativas en la comparación de los niveles entre los distintos grupos excepto entre actividad moderada y grave. Los niveles de la M2-PK fecal presentaban diferencias significativas para distinguir entre remisión y los otros tres grupos de actividad pero no hubo diferencias significativas entre los grupos de actividad leve con respecto a moderada y grave; y moderado con respecto a grave. Se observaron diferencias significativas entre los niveles de la PCR para remisión con respecto a moderado, remisión con grave, leve con grave y moderado con grave. Los niveles de VSG presentaron diferencias significativas entre todas las comparaciones de grupos excepto en remisión con respecto a leve. La puntuación de CDAI igualmente presentó diferencias significativas entre todas las comparaciones de grupos excepto entre remisión con respecto a leve y leve con respecto a moderado (Tabla 6).

La representación gráfica de los niveles de los biomarcadores y CDAI según los grupos de actividad endoscópica (remisión endoscópica, actividad leve, actividad moderada y actividad grave) se observa en los diagramas de cajas y bigotes. Se observan diferencias estadísticamente significativas al menos entre dos grupos en todas las variables estudiadas (Figura 6).

Tabla 6. Comparación de niveles entre grupos de actividad

		Calprotectina	M2-PK	PCR	VSG	CDAI
Remisión vs Leve	U de Mann-Whitney	47,500	76,000	132,000	136,500	102,500
	Z	-3,635	-2,768	-1,040	-,883	-1,935
	Sig. (bilateral)	,000*	,006*	,298	,377	,053
Remisión vs Moderada	U de Mann-Whitney	41,000	66,500	135,000	146,000	95,500
	Z	-5,070	-4,547	-3,158	-2,899	-3,943
	Sig. (bilateral)	,000*	,000*	,002*	,004*	,000*
Remisión vs Severa	U de Mann-Whitney	1,000	23,000	11,500	14,000	2,000
	Z	-4,081	-3,068	-3,652	-3,474	-4,036
	Sig. (bilateral)	,000*	,002*	,000*	,001*	,000*
Leve vs Moderada	U de Mann-Whitney	98,000	157,000	130,000	109,500	140,000
	Z	-2,625	-1,029	-1,765	-2,316	-1,489
	Sig. (bilateral)	,009*	,304	,078	,021*	,137
Leve vs Severa	U de Mann-Whitney	7,000	30,000	9,500	4,500	10,500
	Z	-3,421	-1,940	-3,265	-3,585	-3,196
	Sig. (bilateral)	,001*	,052	,001*	,000*	,001*
Moderada vs Severa	U de Mann-Whitney	57,500	62,000	42,000	34,500	36,000
	Z	-1,888	-1,706	-2,521	-2,823	-2,761
	Sig. (bilateral)	,059	,088	,012*	,005*	,006*

M2-PK: M2-piruvato quinasa; PCR: Proteína C reactiva; VSG: Velocidad de sedimentación globular; CDAI: Crohn's disease activity index

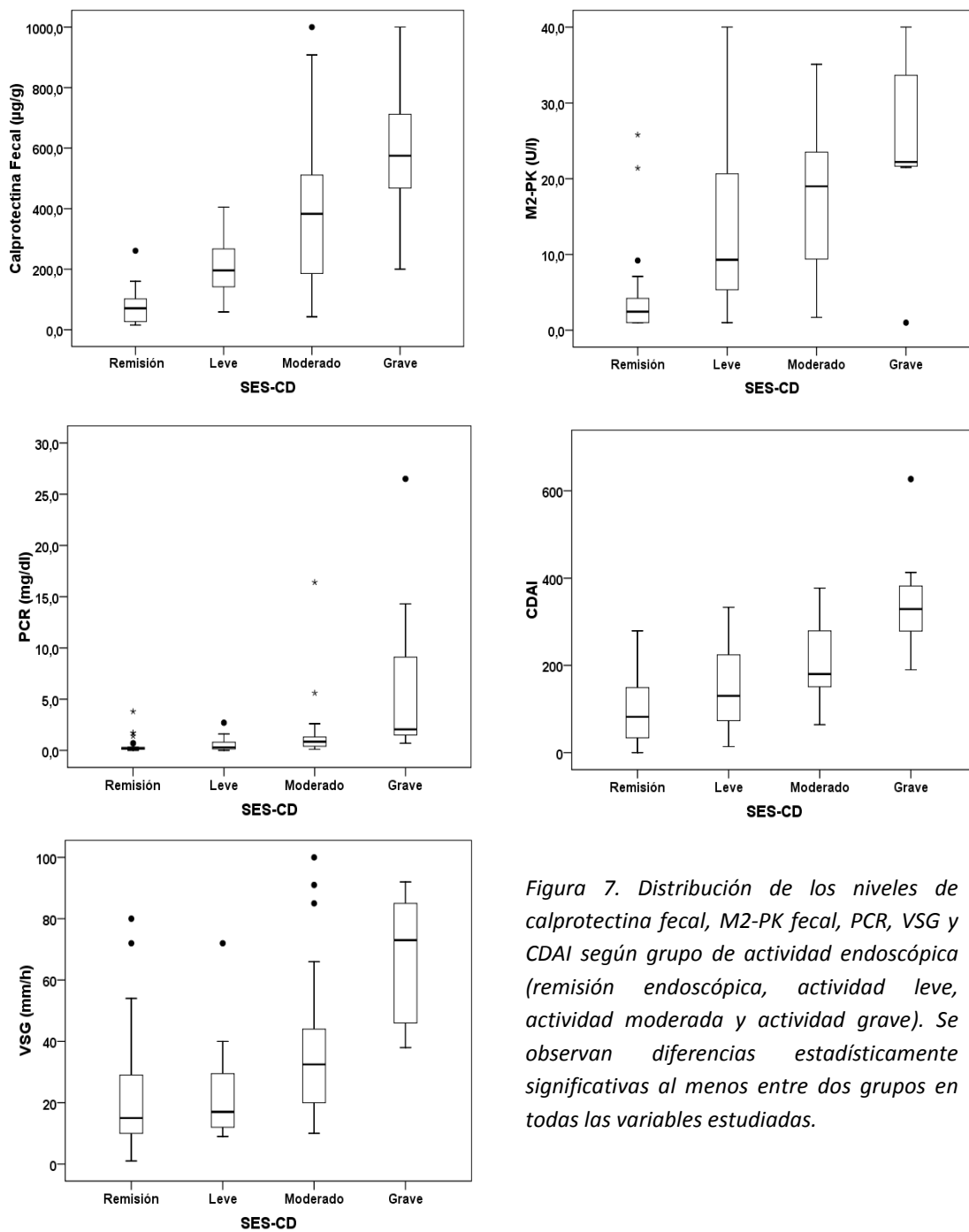


Figura 7. Distribución de los niveles de calprotectina fecal, M2-PK fecal, PCR, VSG y CDAI según grupo de actividad endoscópica (remisión endoscópica, actividad leve, actividad moderada y actividad grave). Se observan diferencias estadísticamente significativas al menos entre dos grupos en todas las variables estudiadas.

4.5. ESTIMACIÓN DEL PUNTO DE CORTE ÓPTIMO DE LOS BIOMARCADORES Y EL CROHN DISEASE ACTIVITY INDEX PARA DETECTAR ACTIVIDAD ENDOSCÓPICA

Tras demostrar que los niveles de los cuatro biomarcadores y la puntuación de CDAI es significativamente mayor en el grupo de actividad endoscópica con respecto al grupo de remisión o curación mucosa se procede a construir una curva ROC (Receiver Operating Characteristic). Se formula la hipótesis nula: área verdadera = 0.5. El área bajo la curva obtenida para CF fue de 0.917 (IC_{95%}: 0.854-0.980), para M2-PK fue de 0.846 (IC_{95%}: 0.745-0.948), para CDAI fue de 0.814 (IC_{95%}: 0.713-0.916), para PCR fue de 0.742 (IC_{95%}: 0.611-0.872) y para VSG fue de 0.725 (IC_{95%}: 0.590-0.860). La significación estadística alcanzó una $p < 0.001$ para CF, M2-PK y CDAI, una $p = 0.001$ para PCR y $p = 0.003$ para VSG. (Tabla 7). En la figura 4 se observa la representación gráfica de las curvas ROC y las áreas bajo da curva de los biomarcadores y el CDAI.

Tabla 7. Área bajo la curva y significación estadística

Variables	Área	Error estándar ^a	Sig. Asintótica. ^b	IC 95%	
				Límite inferior	Límite superior
CF	,917	,032	,000	,854	,980
M2-PK	,846	,052	,000	,745	,948
CDAI	,814	,052	,000	,713	,916
PCR	,742	,066	,001	,611	,872
VSG	,725	,069	,003	,590	,860

CF: calprotectina fecal; M2-PK: M2-piruvato quinasa; CDAI: Crohn's disease activity index; PCR: Proteína C reactiva; VSG: Velocidad de sedimentación globular. a. Bajo el supuesto no paramétrico. b. Hipótesis nula: área verdadera = 0.5.

Se utilizó el índice de Youden para obtener la mejor relación especificidad-sensibilidad. De este modo se estimó un punto de corte óptimo para la calprotectina

fecal de 170 µg/g según el máximo nivel del índice de Youden (0.730) alcanzado por esta variable. Este punto de corte determinó para la calprotectina fecal una sensibilidad del 77.5%, una especificidad del 95.5%, un VVP del 97.4%, un VPN del 65.6%, un LR+ del 17.06, un LR- del 0.23 y una PG del 83.1% para detectar actividad endoscópica. El punto de corte óptimo obtenido para M2-PK, según el máximo nivel de IY obtenido (0.696), fue de 4.5 U/ml. Este punto de corte determinó para M2-PK una sensibilidad de 87.8%, una especificidad de 81.8%, un VPP de 91.5%, un VPN de 75%, un LR+ de 4.82, un LR- de 0.15 y una PG de 85.9 para detectar actividad endoscópica (Tabla 8).

Tabla 8. Precisión diagnóstica de Calprotectina, M2-PK, PCR, VSG CDAI para predecir actividad endoscópica (SES-CD > 2)

	Calprotectina	M2-PK	CDAI	PCR	VSG
Punto de corte	170 µg/g	4.5 U/ml	150 puntos	0.4 mg/dl	19.5 mm/h
Índice de Youden	0.730	0.696	0.487	0.487	0.376
Sensibilidad (%)	77.6	87.8	71.4	71.4	69.4
Especificidad (%)	95.5	81.8	77.3	77.3	68.2
Valor Predictivo Positivo (%)	97.4	91.5	87.1	87.1	83.0
Valor Predictivo Negativo (%)	65.6	75.0	53.1	53.1	50.0
Precisión (%)	84.5	85.9	73.2	69.0	54.7
Razón de Verosimilitud (LR) +	17.06	4.82	3.05	3.05	2.16
Razón de Verosimilitud (LR) -	0.23	0.15	0.40	0.40	0.46
<i>p</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.001	0.003

M2-PK: M2-piruvato quinasa; CDAI: Crohn's disease activity index; PCR: Proteína C reactiva; VSG: Velocidad de sedimentación globular. LR: Likelihood ratio.

Si tenemos en cuenta la clasificación SES-CD, observamos que la calprotectina fecal presenta una probabilidad mayor de clasificar correctamente un par de individuos sano y enfermo (positivo o negativo) seleccionados al azar que la M2PK,

presentando ambos biomarcadores una adecuada precisión para predecir la actividad endoscópica, y no existiendo diferencias significativas entre las curvas ROC ($Z = 1.751$, $p = .079$).

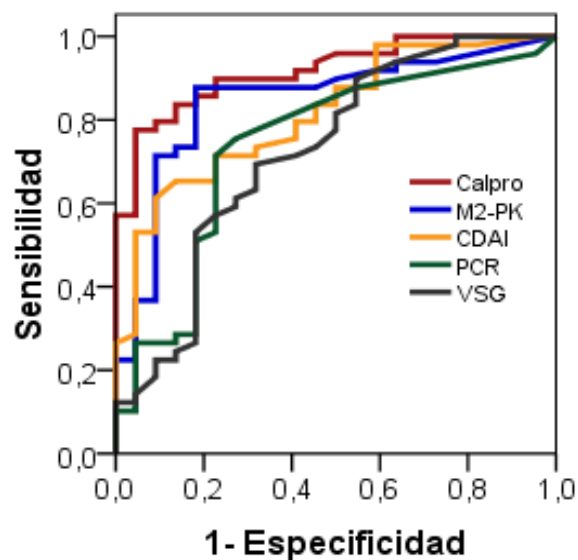


Figura 8. Curva ROC de los niveles de CF, M2-PK fecal, PCR, VSG y CDAI para detectar actividad endoscópica

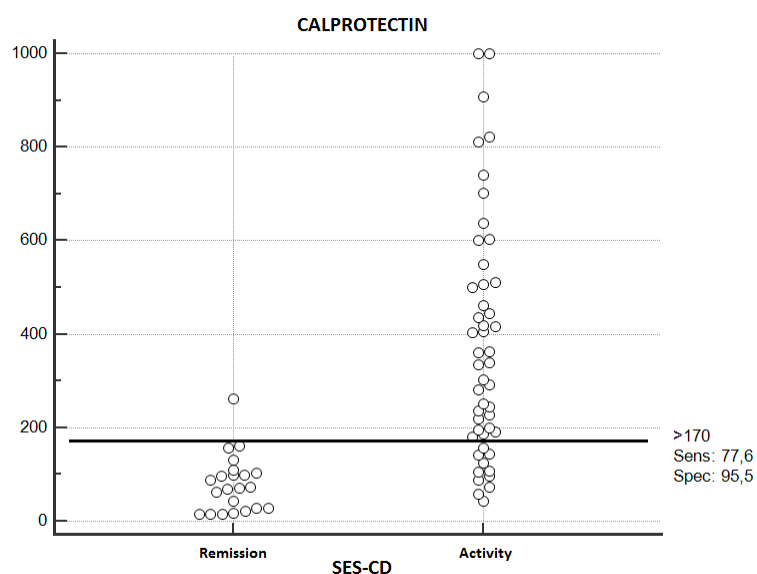


Figura 9. Distribución de los pacientes en los grupos de status de actividad endoscópica según el punto de corte de CF de 170 µg/g

4.6. RANGOS ÓPTIMOS DE LA CALPROTECTINA FECAL PARA ESTABLECER ACTIVIDAD INFLAMATORIA Y CURACIÓN MUCOSA.

La calprotectina fecal fue la única variable que presentó niveles de sensibilidad, especificidad, LR+ y LR- exigidos para poder generar rangos con alta precisión en la detección de curación mucosa y actividad endoscópica. Se estimó un punto de corte de calprotectina fecal en 170 $\mu\text{g/g}$ para detectar, con alta probabilidad, actividad endoscópica (Sensibilidad 77.6%, Especificidad 95.5%, LR+ 17,06, LR- 0.24 y precisión global 83%). Con el fin de establecer un segundo grupo, para detectar curación mucosa con alta probabilidad, se obtuvo un nuevo punto de corte de CF en 71 $\mu\text{g/g}$ (Sensibilidad 95.9%, Especificidad 52.3%, LR+ 1.99, LR- 0.08 y precisión global 80%). Así pues, se generan dos rangos de status endoscópico con una zona intermedia de baja precisión: Actividad endoscópica (Calprotectina ≥ 170), curación mucosa (Calprotectina ≤ 71) e Incertidumbre ($71 > \text{Calprotectina} < 170$), observando que existen diferencias significativas en los valores endoscópicos ($F = 26.407$, $p < .01$). Así mismo, se observa una concordancia adecuada con el índice CDAI ($\tau_b = .420$, $p < .01$).

La prevalencia de actividad endoscópica en nuestra muestra fue del 69% (Probabilidad pre-test). Se calculó el nomograma de Fagan, obteniéndose una probabilidad post-test del 97% (IC_{95%}: 85%-100%) de presentar actividad endoscópica para un nivel de CF $\geq 170 \mu\text{g/g}$ y sólo una probabilidad de 34% (IC_{95%}: 24%-47%) para un nivel de CF $< 170 \mu\text{g/g}$. La prevalencia de curación mucosa en nuestra muestra fue del 31%. La probabilidad post-test de presentar curación mucosa para un sujeto con un nivel de CF $\leq 71 \mu\text{g/g}$ fue del 84% (IC_{95%}: 57%-96%) y si presenta un valor de calprotectina $> 71 \mu\text{g/g}$ fue sólo del 19% (IC_{95%}: 13%-26%) (Figura 9).

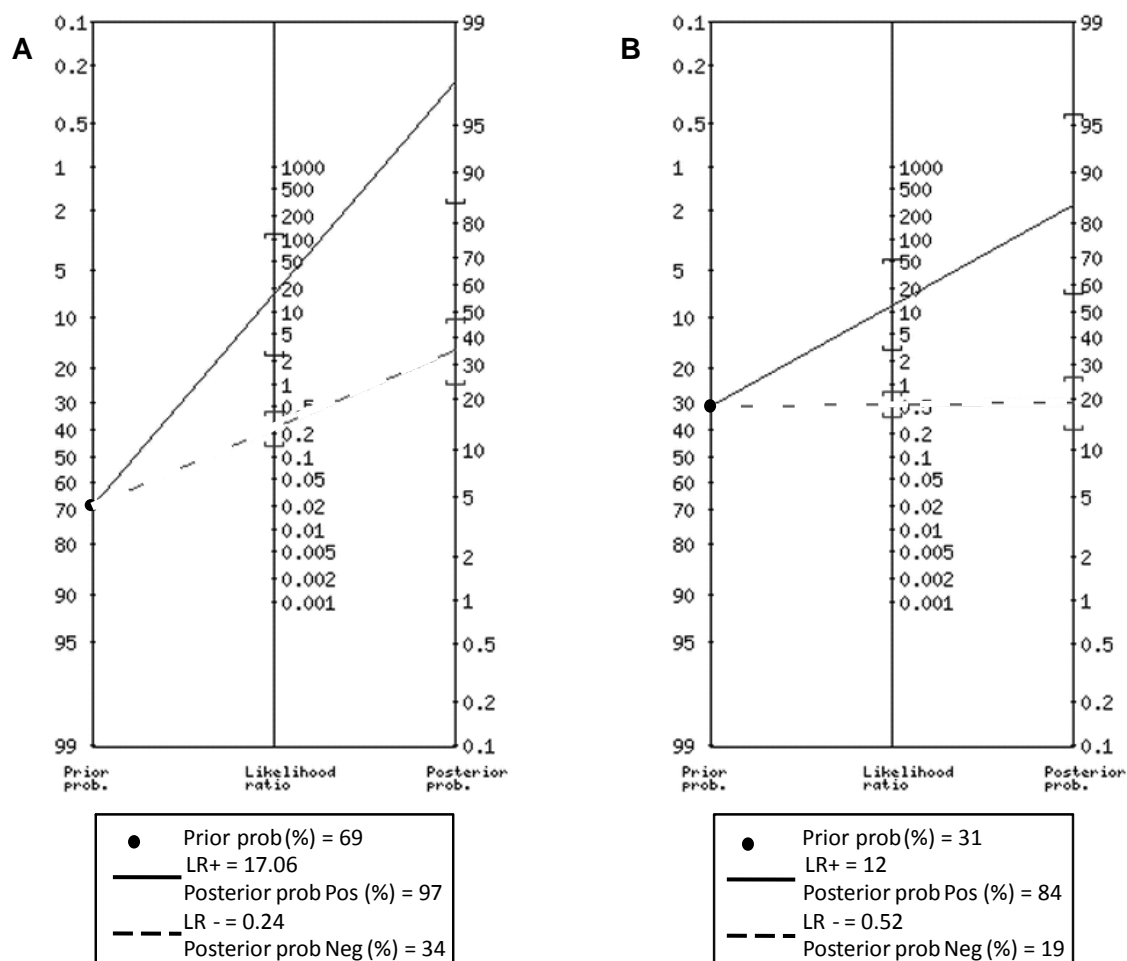


Figura 1. Nomograma de Fagan. (A) Probabilidad de presentar actividad endoscópica para el punto de corte de CF $\geq 170 \mu\text{g/g}$, (B) Probabilidad de presentar curación mucosa para el punto de corte de CF $\leq 70 \mu\text{g/g}$.

Analizamos la probabilidad de presentar actividad endoscópica o curación mucosa en función del status de actividad clínica y del valor de CF. En el grupo de actividad clínica la prevalencia de actividad endoscópica fue del 85% y en el grupo de remisión clínica fue del 48%. Para aquellos pacientes con nivel de CF $\geq 170 \mu\text{g/g}$ y actividad clínica la probabilidad de tener actividad endoscópica fue del 100%. Sin embargo, si presentaban CF $\geq 170 \mu\text{g/g}$ y remisión clínica las probabilidades descienden al 89%. Del mismo modo, la probabilidad de presentar curación mucosa en

un sujeto con un nivel de CF $\leq 71 \mu\text{g/g}$ es del 87% si presenta remisión clínica y esta probabilidad bajaría al 75% si está en actividad clínica (Figura 7).

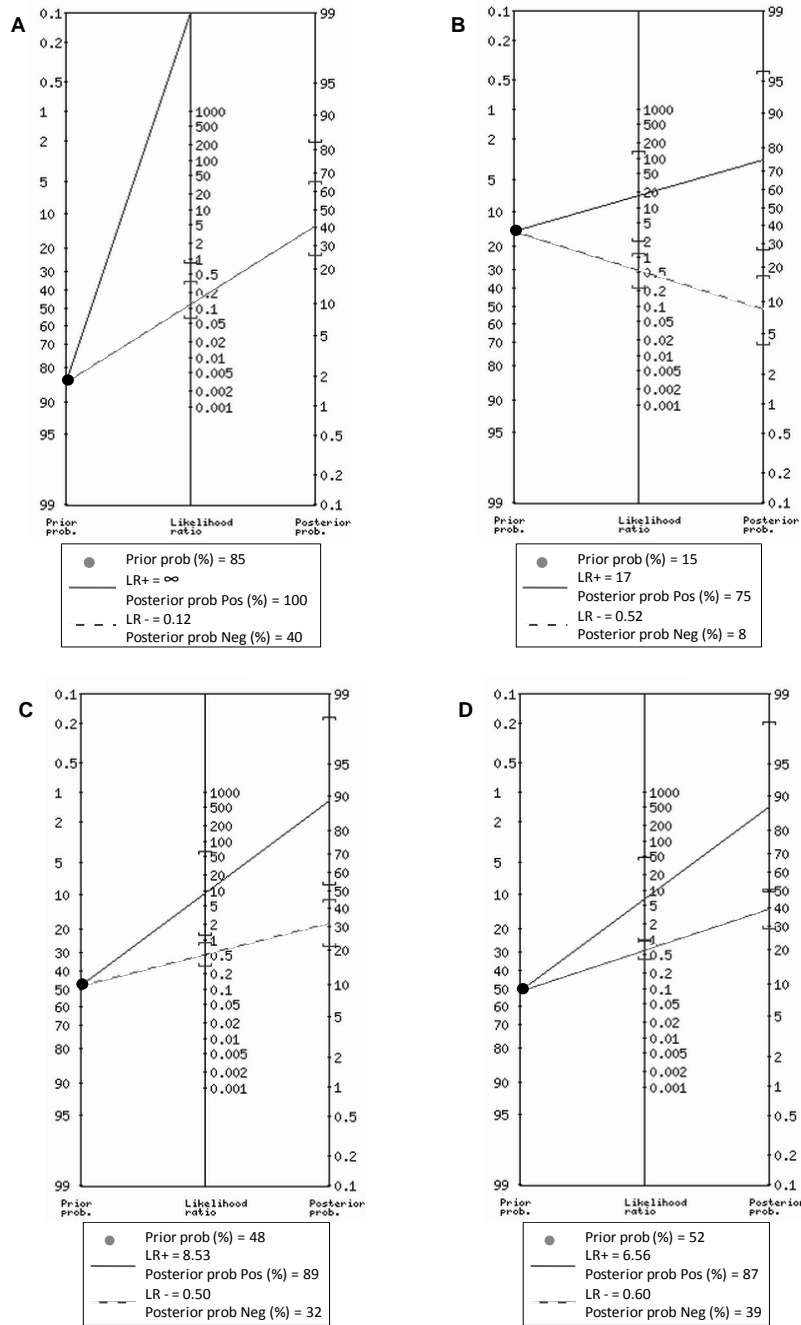


Figura 2. Nomograma de Fagan. (A) Probabilidad de presentar actividad endoscópica para nivel de CF $\geq 170 \mu\text{g/g}$ en pacientes con actividad clínica. (B) Probabilidad de presentar curación mucosa para nivel de CF $\leq 70 \mu\text{g/g}$ en pacientes con actividad clínica. (C) Probabilidad de actividad endoscópica para nivel de CF $\geq 170 \mu\text{g/g}$ en pacientes con remisión clínica. (D) Probabilidad de presentar curación mucosa para nivel de CF $\leq 70 \mu\text{g/g}$ en pacientes con remisión clínica.

4.7. CÁLCULO DE UN MODELO PREDICTIVO PARA DETECTAR ACTIVIDAD ENDOSCÓPICA.

Se realizó un análisis de regresión logística binaria para comprobar si las variables independientes analizadas como la edad, localización, años de evolución de la enfermedad, nivel de calprotectina fecal (CF), nivel de M2-Piruvato quinasa (M2-PK) fecal, nivel de proteína C reactiva (PCR), nivel de la velocidad de sedimentación globular (VSG) y la puntuación del *Crohn's Disease Activity Index* (CDAI); pueden predecir la probabilidad de detectar actividad endoscópica. De las variables estudiadas, se observó que la calprotectina fecal y el CDAI incluidas en un modelo presentan el mayor grado de significación estadística en el contraste de hipótesis que las covaría con la variable dependiente binomial actividad endoscópica (SES-CD > 2: actividad, SES-CD ≤ 2: remisión) (Tabla 9 y 10).

Tabla 9. Variables componente obtenidas en la regresión logística binaria

	B	Error estándar	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95% C.I. para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Paso 1 ^a CDAI	,012	,006	4,894	1	,027	1,012	1,001	1,023
CF	,021	,007	10,881	1	,001	1,022	1,009	1,035
Constante	-4,038	1,241	10,592	1	,001	,018		

CDAI: Crohn's disease activity index; CALP: calprotectina fecal.

a. Variables especificadas en el paso 1: CDAI, CF.

Tabla 10. Tabla de clasificación^a

Observado		Pronosticado			
		Índice endoscópico remisión-actividad		Porcentaje correcto	
		Remisión	Actividad		
Paso 1	Índice endoscópico Remisión	17	5	77,3	
	remisión-actividad Actividad	5	44	89,8	
Porcentaje global				85,9	

a. El valor de corte es ,500

El modelo obtenido clasifica correctamente al 85.9% de la muestra estudiada. Clasifica correctamente a 44 de 49 de los sujetos con actividad, por lo que su sensibilidad sería del 89.8%; y clasificaría correctamente a 17 de 22 de los pacientes en remisión, por lo que su especificidad sería del 77.3%.

La proporción de variabilidad de SES-CD que es explicada por el modelo es aceptable/adecuada, entre un 49% y un 68.9% como se observa en la tabla 11.

Tabla 11. Resumen del modelo

Paso	Logaritmo de la verosimilitud -2	R cuadrado de Cox y Snell	R cuadrado de Nagelkerke
1	40,157 ^a	,490	,689

Con los valores obtenidos en las tablas anteriores obtenemos la siguiente ecuación del modelo predictivo:

$$P(SES\text{CD}_{roc} = 1) = \frac{1}{1 + e^{-(-4.038 + .012 \cdot CDAI + .021 \cdot CALP)}}$$

Donde SESCDroc es la probabilidad de tener actividad endoscópica, CDAI es la puntuación del *Crohn's disease activity index* y CALP el nivel de calprotectina fecal.

Para evaluar el ajuste del modelo se empleó la prueba de Hosmer-Lemeshow y una validación de prueba diagnóstica analizando el área bajo la curva ROC.

La prueba de Hosmer y Lemeshow nos indica que no hay significación estadística ($p=0.993$), por lo que no existen diferencias entre los valores observados y los predichos por la ecuación (Tabla 12). Los resultados predichos del modelo son aceptables, ya que las posibles diferencias observadas no serían explicables por el azar o por errores de muestreo.

Tabla 12. Prueba de Hosmer y Lemeshow

Paso	Chi-cuadrado	gl	Sig.
1	1,507	8	,993

Se construyó una curva ROC para valorar la capacidad de la nueva variable para predecir la presencia de actividad endoscópica. La variable obtenida tras la combinación de la calprotectina fecal y el CDAI presentó un área bajo de la curva ROC del 0.937 (IC_{95%}: 0.88.3-0.990), siendo éste estadísticamente significativo, lo que nos indica un muy buen ajuste del modelo ya que es superior a 0.9 (Figura 8). El modelo presenta un valor óptimo del índice de Youden de 0.807 alcanzando una sensibilidad del 89.8% y especificidad del 90.9% para un punto de corte óptimo obtenido en la fórmula del modelo de 0.510.

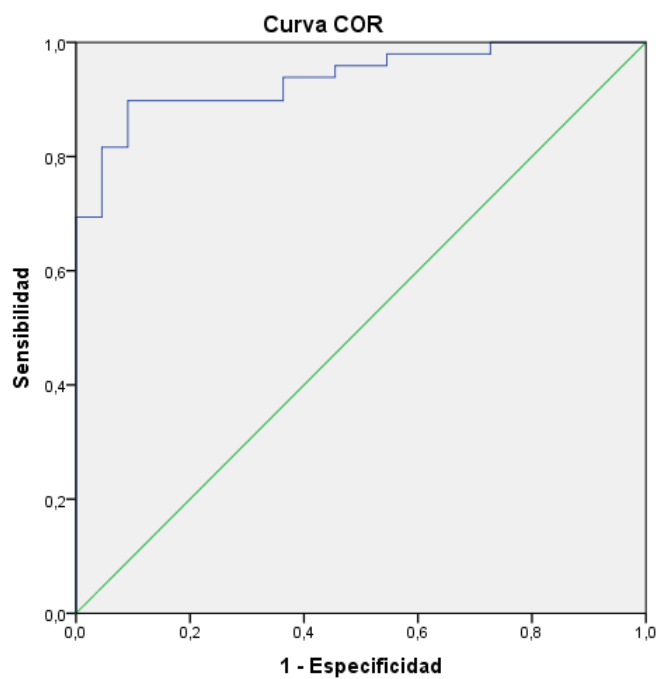


Figura 3. Curva ROC de la variable predictiva que combina calprotectina fecal y CDAI para detectar actividad endoscópica.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

5.1. CONSIDERACIONES GENERALES: aportaciones de la Tesis

En este estudio, describimos la precisión diagnóstica de la calprotectina fecal, la M2-Piruvato quinasa fecal, la proteína C reactiva, la velocidad de sedimentación globular y el índice CDAI para detectar actividad endoscópica en pacientes con enfermedad de Crohn. Además, se estiman por primera vez rangos de alta precisión, según los niveles de la CF, para detectar actividad endoscópica y curación mucosa.

De los resultados obtenidos en esta investigación, podemos deducir que la calprotectina y M2-PK fecal son biomarcadores útiles para detectar actividad endoscópica en pacientes con EC. De hecho, hemos observado que ambos biomarcadores fecales son más precisos que el índice clínico CDAI y los biomarcadores serológicos, PCR y VSG, para establecer la presencia de actividad inflamatoria intestinal. Aunque, sólo la CF se ha mostrado como una herramienta útil en la generación de rangos de alta precisión para detectar estado de actividad endoscópica y de curación mucosa en pacientes con EC. Se ha observado que el contexto clínico específico debe tenerse en cuenta para tener una mejor interpretación de las probabilidades del estado endoscópico según el nivel de CF. Finalmente hemos determinado un modelo que combina el nivel de CF y la puntuación de CDAI como una herramienta con elevada precisión para detectar actividad endoscópica en los pacientes con EC, siendo de gran utilidad en la toma de decisiones en un importante número de pacientes sin necesidad de realizar una colonoscopia o una técnica radiológica. Los resultados de este trabajo pueden permitirnos llevar a cabo una práctica clínica más eficiente en el manejo de los pacientes con EC.

5.2. VALORACIÓN DEL ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA

A pesar de realizar una selección consecutiva de los pacientes las características basales en cuanto a edad, género y localización de la enfermedad son similares a estudios como los de Schoepfer et al⁷⁹ o Lobatón et al⁸⁵. En cuanto a los años de evolución de la enfermedad, nuestra muestra presenta una media similar al estudio de Sipponen et al⁸⁷ y ligeramente inferior al de trabajos publicados por otros autores^{79,85}. Hay un claro predominio de pacientes con patrón inflamatorio, hecho que igualmente sucede en la gran mayoría de estudio publicados^{79,83-85,87,89,90}, aunque en nuestro trabajo el porcentaje de pacientes es mayor (88.7%). La distribución según el tratamiento que toman los pacientes es similar a otros estudios publicados^{83,85}. Aproximadamente la mitad de los pacientes (44.9%) recibía tratamiento con algún inmunosupresor (azatioprina, metrotexate o anti-TNF).

Aproximadamente la mitad de los pacientes (43.7%) presentaba remisión clínica, menos frecuente fue presentar actividad leve o moderada y sólo un paciente presentó actividad clínica severa. Casi un tercio de los pacientes (31%) presentaba remisión endoscópica. De los pacientes con actividad endoscópica, lo más frecuente fue presentar actividad moderada, seguido de actividad leve y menos frecuente actividad severa.

5.3. DEFINICIÓN DE ACTIVIDAD ENDOSCÓPICA

Actualmente no existe consenso sobre la determinación de un punto de corte claramente definido en los índices endoscópicos para clasificar a los pacientes según presenten actividad o remisión endoscópica. En nuestro estudio se definió la presencia de actividad endoscópica obtener un SES-CD > 2 , elegimos este punto de corte porque es el punto de corte que se estaba utilizando en estudios publicados en los últimos años^{72, 73,96}. De esta manera, se consigue clasificar mejor a los pacientes con curación mucosa considerando este status si se detecta una mucosa completamente normal (SES-CD 0) o con mínima actividad inflamatoria en algún área (SES-CD 1-2). Es verdad que siempre puede existir cierta variabilidad entre los observadores, pero para ello se estableció un consenso para disminuir lo máximo posible este hecho.

5.4. VALORACIÓN DE LA CORRELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES ESTUDIADAS

En este estudio se evidenció que la variable que presentó mayor correlación con el SES-CD, según el test de rho de Spearman, fue la CF ($r = 0.738$), seguido del CDAI ($r = 0.669$) y posteriormente de la M2-PK (0.575). La correlación con PCR y VSG fue inferior aunque estadísticamente significativa. En el estudio de Langhorst et al⁴⁵, se observa una correlación baja entre CF y el índice endoscópico utilizado ($r = 0.35$) aunque significativa. Igualmente la correlación observada en el estudio de Nancey et al⁹⁰ entre el SES-CD y la CF es inferior ($r = 0.53$) a la de este estudio, del mismo modo la correlación observa, por estos autores, entre SES-CD y PCR ($r = 0.37$) también fue inferior a la de este trabajo. Sin embargo en el estudio de Sipponen et al⁸⁷ la correlación de la CF con el índice CDEIS es superior a la que se observó en este trabajo ($r = 0.831$), mientras que en el estudio de Lobatón et al⁸⁵ esta correlación fue sólo mínimamente superior ($r = 0.784$). En este trabajo, la correlación entre ambos biomarcadores fecales, CF y M2-PK, fue la que presentó mayor fuerza ($r = 0.765$). Esto también se ha observado en otros estudios como en el trabajo de publicado por Chung-Faye et al⁶³ donde la correlación entre ambos biomarcadores fecales fue ligeramente inferior ($r = 0.62$) a la observada en este estudio de tesis. En el estudio de Sipponen et al⁸² la correlación entre CF y otro biomarcador fecal como la lactoferrina fue superior ($r = 0.925$). La estrecha correlación que existe entre los biomarcadores fecales puede ser explicada por el origen común de estas moléculas, calprotectina y lactoferrina proceden de los polimorfonucleares que actúan en el proceso inflamatorio intestinal, aunque M2-PK pueda tener un origen distinto como son los enterocitos, es

un biomarcador fecal que igualmente se libera en el proceso inflamatorio presentando una moderada correlación con la actividad endoscópica. En el estudio de Sipponen et al⁸⁷, al igual que en este trabajo, se observa una correlación moderada entre el índice endoscópico, en este caso CDEIS, y el CDAI ($r = 0.592$). Aunque en el estudio de Lobatón et al⁸⁵ la correlación entre CDEI y CDAI fue muy baja ($r = 0.129$). En este estudio de tesis, se observó una moderada correlación entre CF y el CDAI ($r = 0.560$), igualmente en otros estudios también se han evidenciado una buena correlación entre los índices clínicos y los niveles de CF^{83,97}

5.5. VALORACIÓN DE LA COMPARACIÓN DE NIVELES MEDIOS DE LOS BIOMARCADORES Y EL CROHN'S DISEASE ACTIVITY INDEX EN LOS GRUPOS DE ACTIVIDAD Y REMISIÓN ENDOSCÓPICA

Se observó que los niveles medios de los biomarcadores y el CDAI eran significativamente superiores en el grupo de actividad inflamatoria con respecto al grupo de remisión clínica. El mayor grado de significación lo alcanzaron los biomarcadores fecales y el CDAI. Los niveles medios de CF en el grupo de actividad fue de 335 $\mu\text{g/g}$ (RIC 183-508) y en el grupo en remisión fue de 71 $\mu\text{g/g}$ (RIC 25-104). En el estudio de Langhorst et al⁴⁵ se estimaron niveles medios de CF inferiores en ambos grupos (105 $\mu\text{g/g}$ en el grupo de actividad y 11.2 $\mu\text{g/g}$ en el grupo de remisión). En el trabajo publicado por Lobatón et al⁸⁵, el nivel medio de CF, por método ELISA, en el grupo de actividad endoscópica fue de 1211 $\mu\text{g/g}$ (RIC 122-1800), casi cuatro veces superior al nivel medio observado en este estudio, y en el grupo en remisión fue de 101.8 $\mu\text{g/g}$ (RIC 30-1620), ligeramente superior al nivel calculado en este estudio de tesis. Llama la atención en este último estudio que observan pacientes que presentan remisión endoscópica, definida en este estudio como CDEIS < 3, que presentan niveles de CF superiores a 1620 $\mu\text{g/g}$.

5.6. ANÁLISIS DE LA ESTIMACIÓN DEL PUNTO DE CORTE PARA LOS BIOMARCADORES Y EL *CROHN'S DISEASE ACTIVITY INDEX*

Se decidió construir las curvas ROC de los biomarcadores y CDAI para estimar el punto de corte óptimo según la sensibilidad y especificidad ya que son conceptos fáciles de entender en la práctica clínica. La CF obtuvo el mayor área bajo la curva, seguido de M2-PK, de CDAI y por último las áreas de los biomarcadores serológicos PCR y VSG. La significación estadística alcanzó una $p < 0.001$ para CF, M2-PK y CDAI, una $p = 0.001$ para PCR y $p = 0.003$ para VSG.

Se utilizó el estadístico IY (sensibilidad + especificidad -1) para estimar la mejor relación especificidad-sensibilidad y así obtener el punto de corte óptimo de cada biomarcador para establecer actividad endoscópica. La CF fue el biomarcador estudiado que obtuvo mayor precisión diagnóstica para establecer actividad endoscópica, siendo esta similar a la publicada por otros autores⁴⁶. En este trabajo, el punto de corte óptimo calculado para la CF fue de 170 $\mu\text{g/g}$ obteniendo una elevada especificidad (95.5%) y una buena sensibilidad (77.6%) similares a las obtenidas por Lobatón et al⁸⁵. El IY obtenido para CF (0.730) fue superior al obtenido por Sipponen et al⁸⁷ y af Bjorkesten et al⁸⁸, pero similar al publicado por Schoepfer et al⁷⁹ y Shastri et al⁶⁵. M2-PK presentó un IY máximo de 0.696 estimándose punto de corte de 4.5 U/ml obteniéndose una elevada sensibilidad (87.8%) y también una buena especificidad (81.8%) para detectar actividad endoscópica. Estos valores son superiores a los obtenidos por Shastri et al⁶⁵. Además, estos valores son similares a los obtenidos para CF por Schoepfer et al⁷⁹ y Shastri et al⁶⁵, y para lactoferrina fecal obtenidos por

Langhorst et al⁴⁵. La precisión global de ambos biomarcadores fecales fue elevada, siendo ligeramente superior para M2-PK fecal (85.9%) con respecto a CF (83.1%) y siendo similar a la precisión global estimada por Lobatón et al⁸⁵ para nivel de CF de 274 $\mu\text{g/g}$ (85.2%).

5.7. ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN DE ÁREAS DE ALTA PRECISIÓN PARA DETECTAR ACTIVIDAD ENDOSCÓPICA Y CURACIÓN MUCOSA.

Los estudios publicados en los últimos años en los que se compara la precisión de los distintos biomarcadores para detectar actividad endoscópica muestran que los biomarcadores fecales, sobre todo CF y lactoferrina, son más precisos que los biomarcadores serológicos como PCR o VSG. También se ha observado estas diferencias para CDAI siendo superiores los biomarcadores fecales⁷⁹⁻⁸³. Igualmente en este estudio hemos demostrado que un biomarcador fecal como la M2-PK, poco estudiado en la EII, tiene una elevada precisión para detectar actividad endoscópica.

Pero el gran problema que plantean actualmente los biomarcadores fecales es la falta de consenso sobre el punto de corte óptimo para establecer la presencia de actividad endoscópica o curación mucosa en la EC, variando los diferentes puntos de corte propuestos entre 50 µg/g y 272 µg/g⁷⁹⁻⁹⁰. Establecer un único punto de corte tiene una limitada aplicabilidad clínica ya que no existe acuerdo. Si bajamos el umbral para establecer actividad aumentaremos la sensibilidad del test pero disminuirá la especificidad por lo que tendremos pocos falsos negativos pero se elevará el número de falsos positivos; sin embargo si elevamos el punto de corte tendremos un número más reducido de falsos positivos pero mayor número de falsos negativos, es decir tendremos menos probabilidades de clasificar bien a todos los pacientes con actividad endoscópica. Este hecho limita la gran utilidad que podrían tener los biomarcadores para manejar a los pacientes sin necesidad de realizar otras pruebas más caras e invasivas.

Por ello, en este estudio hemos calculado, por primera vez, dos puntos de corte que nos permitirán generar rangos de elevada precisión para poder detectar pacientes con curación mucosa o actividad inflamatoria con altas probabilidades, generándose una zona central de baja precisión o zona de incertidumbre para establecer la presencia de actividad endoscópica. Se estima que un punto de corte con una especificidad $> 90\%$ y $LR+ \geq 10$ tendría una fuerte evidencia para apoyar la hipótesis diagnóstica (actividad endoscópica) y un punto de corte con una sensibilidad $> 90\%$ y $LR- \leq 0.1$ tendría fuerte evidencia para rechazar esta hipótesis diagnóstica^{93,94}. De los biomarcadores estudiados, sólo CF ha cumplido estos criterios estadísticos, por lo que se han generado estos rangos en base a los niveles determinados por estos dos puntos de corte.

La utilidad clínica real estará determinada por la medida en que la CF nos permita abandonar el área comprendida entre ambos umbrales (“zona de incertidumbre”), esto dependerá del valor de LR y de la probabilidad pre-test inicial (prevalencia). De este modo, se podrían utilizar los niveles de CF en la consulta para tomar decisiones diagnósticas y terapéuticas, en pacientes con EC, de forma eficiente y rápida sin necesidad de acudir a pruebas endoscópicas o radiológicas más caras y con mayor riesgo.

Como hemos comentado, la CF fue el único biomarcador que presentó los niveles de precisión diagnóstica necesarios para generar rangos de alta precisión, mientras que M2-PK no alcanzó los niveles necesarios de $LR+$ y $LR-$. Se estimó como punto de corte con óptima precisión para establecer actividad endoscópica un nivel de $CF \geq 170 \mu\text{g/g}$ (Especificidad = 95.5% y $LR+ = 17.24$) y $CF \leq 71 \mu\text{g/g}$ (Sensibilidad = 95.9%

y LR - = 0.08) como punto de corte con óptima precisión para establecer curación mucosa. En nuestra muestra se estableció como “zona de incertidumbre” los niveles de CF comprendidos entre 72 $\mu\text{g/g}$ y 169 $\mu\text{g/g}$. Con estos intervalos, cuando se obtiene un valor de CF $\geq 170 \mu\text{g/g}$, la probabilidad de encontrar sujetos con actividad inflamatoria sería 17 veces mayor que los sujetos con un valor de CF inferior; mientras que obteniendo un valor de CF $\leq 71 \mu\text{g/g}$ la probabilidad de encontrar sujetos sin actividad endoscópica, y por tanto en curación mucosa, sería 12 veces mayor.

El nomograma de Fagan nos ayudó a clasificar las probabilidades de los pacientes en porcentajes, aportándose aún una mejor aplicabilidad clínica. En la muestra de este estudio la prevalencia de actividad endoscópica fue de un 69%, pero en aquellos paciente con un nivel de CF $\geq 170 \mu\text{g/g}$ tendrían una probabilidad del 97% de presentar actividad endoscópica y si tienen un nivel de CF $\leq 71 \mu\text{g/g}$ tendría una probabilidad del 84% de presentar curación mucosa. En ambos casos tendríamos una precisión suficiente para establecer actividad endoscópica, en el primer caso, y curación mucosa, en el segundo, permitiéndonos tomar decisiones en los pacientes que presenten estos niveles de CF sin necesidad de realizar una ileocolonoscopia.

5.8. VALORACIÓN DE LA REGRESIÓN LOGÍSTICA Y GENERACIÓN DE RANGOS DE ALTA PRECISIÓN

De las variables estudiadas, se observó que la CF y el CDAI, incluidas en un modelo, presentan el mayor grado de significación estadística para detectar actividad endoscópica en nuestro estudio. El modelo generado con ambas variables tendría una precisión del 85.9% para clasificar correctamente a los pacientes, presentando una sensibilidad del 89.8% y especificidad del 77.3%. El área bajo la curva ROC, o poder de discriminación del modelo, sería del 93.7%, siendo estadísticamente significativo, lo que nos indica un muy buen ajuste del modelo. af Björkesten et al⁸⁹, observó en su estudio que un índice que combinaba el nivel de CF y la puntuación del índice Harvey-Bradshaw presentaba mayor precisión para identificar remisión endoscópica que CF, PCR, CDAI e índice Harvey-Bradshaw por sí solos. El modelo presentó un área bajo la curva ROC de 0.90 con una sensibilidad del 85% y especificidad del 82% para establecer la presencia de remisión endoscópica.

De este modo, la generación de este modelo que combina CF y CDAI refuerza uno de los mensajes que expresa Mosli⁴⁶ en un metanálisis publicado recientemente. Una de las conclusiones de este metanálisis es que la CF es un biomarcador útil para establecer la presencia de actividad endoscópica, pero su valor debe de interpretarse de forma individualizada en función del contexto clínico específico. Hay mayor prevalencia de actividad endoscópica en pacientes con presencia de síntomas clínicos que en aquellos pacientes que están en remisión clínica y este es un hecho que debemos de tener en cuenta para interpretar las probabilidades de presentar actividad

endoscópica tras obtener el resultado de la concentración de CF. En este estudio, la prevalencia de actividad endoscópica era mayor en los pacientes con actividad clínica (85%) que en los pacientes con remisión clínica (48%). Esto implica diferencias en cuanto a las probabilidades de presentar actividad al obtener un nivel de CF $\geq 170 \mu\text{g/g}$ (100% para el grupo de actividad clínica vs 89% para el grupo remisión clínica). Del mismo modo, cambian las probabilidades de presentar estado de curación mucosa si se obtiene un nivel de CF $\leq 71 \mu\text{g/g}$, siendo del 87% si presenta remisión clínica y del 75% si presenta actividad clínica.

Aquellos pacientes con actividad inflamatoria subclínica son pacientes que van a tener una peor evolución con elevadas probabilidades de presentar nueva recidiva^{98,99} o incluso presentar complicaciones que requieran intervención quirúrgica¹⁰⁰. La CF sería la prueba idónea para identificar la presencia de actividad inflamatoria en pacientes asintomáticos permitiendo monitorizar la evolución de esta actividad y la respuesta a los tratamientos.

5.9. DIAGRAMA DE TOMA DE DECISIONES EN BASE A LA ACTIVIDAD CLÍNICA Y A LA CALPROTECTINA FECAL

Consideramos interesantes los resultados obtenidos en este estudio y creemos que pueden ser útiles para el manejo de los pacientes con EC en la práctica clínica diaria. Por ello hemos elaborado un diagrama de toma de decisiones (figura 9) en el que incorporamos las variables que conforman la fórmula obtenida en la regresión logística, como son el CDAI y la CF. Según este diagrama debemos de interpretar las probabilidades de que el paciente presente actividad inflamatoria o curación mucosa según el nivel de CF y el valor del CDAI (CDAI > 150 actividad clínica y CDAI ≤ 150 remisión clínica). Aquellos pacientes con actividad clínica que presentan niveles de CF ≥ 170 µg/g tendrían una probabilidad muy alta de tener actividad endoscópica, en este estudio fue el 100%, por lo que sería un paciente candidato a intensificar o cambiar su tratamiento para lograr alcanzar no sólo una remisión de los síntomas sino también el objetivo de la curación mucosa. Si el paciente presenta síntomas como diarrea y dolor abdominal sugestivos de actividad clínica pero con nivel de CF ≤ 71 µg/g, deberíamos de investigar otras causas de los síntomas (intolerancia o alergia alimentaria, origen infeccioso, enfermedad celiaca o SII asociado) ya que tendría bajas posibilidades de presentar realmente actividad endoscópica, en este estudio el 75% de los pacientes con estas características presentaban curación mucosa. Si el paciente no presenta síntomas y tiene un nivel de CF ≤ 71 µg/g tiene elevadas probabilidades de presentar estado de curación mucosa, en este trabajo fue el 87%, por lo que sería un paciente que ha logrado el objetivo y debemos de mantener tratamiento. Si el paciente está

asintomático pero presenta nivel de CF $\geq 170 \mu\text{g/g}$, tiene elevadas probabilidades de presentar actividad endoscópica subclínica, en este estudio el 89% de los pacientes sin síntomas pero con CF $\geq 170 \mu\text{g/g}$ presentaban actividad endoscópica. Estos pacientes son candidatos a intensificar su tratamiento y monitorizar la respuesta al mismo con CF en los siguientes meses. Con estos puntos de corte, se han podido clasificar correctamente a 51 pacientes, lo que supone el 72% de la muestra. Los 20 pacientes que están en la zona de incertidumbre (72-169 $\mu\text{g/g}$) ha supuesto el 28% de la muestra, son pacientes que a pesar de conocer su actividad clínica y su nivel de CF presentan una baja precisión para establecer la presencia de actividad inflamatoria o curación mucosa. Si estos pacientes en zona de incertidumbre presentan síntomas deberíamos realizar pruebas complementarias (colonoscopia y/o enteroRM) para poder detectar la presencia o no de actividad inflamatoria. Si el paciente está asintomático y en zona de incertidumbre según nivel de CF, podría ser candidato a monitorizar la concentración de la CF en los próximos meses y si sube su nivel por encima de 170 $\mu\text{g/g}$ se debería intensificar o escalar en el régimen terapéutico.

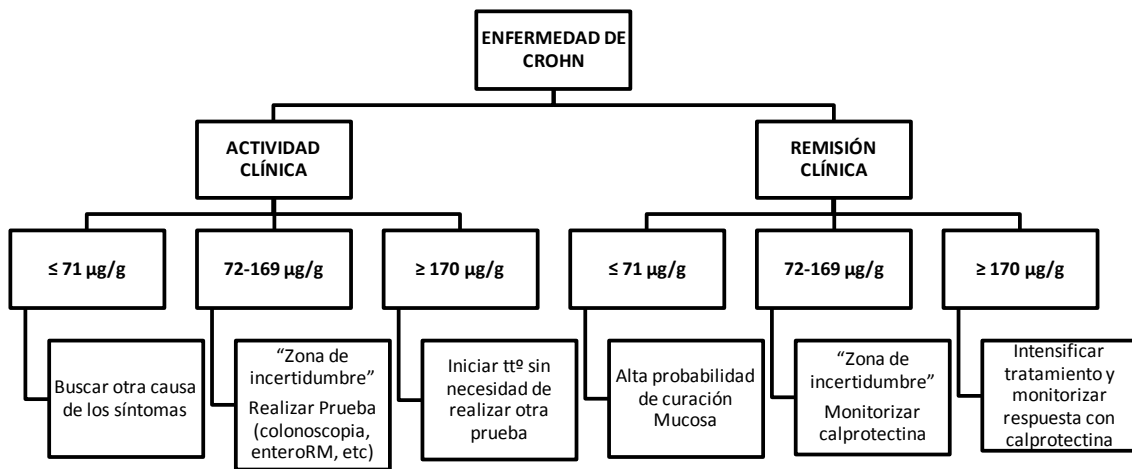


Figura 4. Diagrama de toma de decisiones según actividad clínica y nivel de CF.

5.10. LIMITACIONES

Nuestro estudio tiene varias limitaciones. En primer lugar, la muestra utilizada ha sido una muestra muy localizada por lo que el estudio mejoraría sustancialmente incluyendo un mayor número de sujetos. En segundo lugar, se ha evaluado la actividad inflamatoria sólo mediante ileocolonoscopía, por lo que no se han podido obtener datos de la actividad de otros segmentos de intestino delgado distintos al íleon ni del tracto gastrointestinal superior. Por último, no hay seguimiento de los niveles de calprotectina, hecho que sería útil para evaluar la evolución de los pacientes según su actividad y valorar la respuesta a los cambios de tratamiento en un estudio longitudinal.

5.11. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

Los resultados obtenidos en esta tesis son muy interesantes y útiles para realizar un manejo más eficiente de los pacientes con enfermedad de Crohn, por ello queremos contar con otros centros para poder obtener una validación externa del modelo y poder aplicar el diagrama de toma de decisiones. Igualmente sería interesante realizar un estudio prospectivo y multicéntrico donde se evalúe la evolución clínica, endoscópica y de los niveles de calprotectina fecal para conocer la verdadera precisión diagnóstica y valor pronóstico de este biomarcador.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La calprotectina y la M2-PK fecal son biomarcadores útiles para detectar la actividad endoscópica en pacientes con enfermedad de Crohn.

Ambos biomarcadores fecales son más precisos que el índice clínico CDAI y los biomarcadores serológicos, PCR y VSG, para establecer la presencia de actividad inflamatoria intestinal.

La calprotectina fecal es una herramienta útil en la generación de rangos de alta precisión para predecir el estado de la actividad endoscópica y de curación mucosa en pacientes con enfermedad de Crohn.

El contexto clínico específico debe tenerse en cuenta para tener una mejor interpretación de las probabilidades del estado endoscópico según el nivel de calprotectina fecal.

Un modelo que combine el nivel de calprotectina fecal y la puntuación de CDAI se ha mostrado como una herramienta con elevada precisión (85.9%) para detectar actividad endoscópica en los pacientes con enfermedad de Crohn, siendo de gran utilidad en la toma de decisiones sin necesidad de realizar una colonoscopia.

CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA

1. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347(6): 417-429.
2. Luissint AC, Parkos CA, Nusrat A. Inflammation and the intestinal barrier: Leukocyte-Epithelial Cell Interactions, Cell Junction Remodeling and Mucosal Repair. *Gastroenterology* 2016; Oct; 151 (4): 616-32.
3. Gomollón F, Dignass A, Annese V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, et al. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis* 2017 Jan; 11 (1): 3-25.
4. Crohn's Disease and Ulcerative Colitis—From Epidemiology and Immunobiology to a Rational Diagnostic and Therapeutic Approach. Baumgart DC, ed. Springer, New York, 2012.
5. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. *JAMA* 1984; 251(1): 73-79.
6. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet* 2012; 380 (9853): 1590-1605.
7. Gassull MA, Gomollón F, Hinojosa J, Obrador A. Enfermedad inflamatoria intestinal, 3^a edición. Aran. Madrid, 2007.
8. Kaplan GG, Jess T. The Changing Landscape of Inflammatory Bowel Disease: East Meets West. *Gastroenterology* 2016; 150: 24-6.
9. Burisch J, Munkholm P. Inflammatory Bowel disease epidemiology. *Curr Opin Gastroenterol* 2013 Jul; 29 (4): 357-62.
10. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of de inflammatory bowel disease with time, base on systematic review. *Gastroenterology* 2012; 142 (1): 46-54.
11. Loftus EV, Schoenfeld P, Sandborn WJ. The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America: A systematic review. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 51-60.
12. Sand BE. From symptoms to diagnosis: Clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2004; 126: 1518-32.

13. Fakhoury M, Negrulj R, Mooranian A, Al-Salami H. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *J Inflamm Res* 2014 jun 23; 7: 113-20.
14. Singh B, McC Mortensen NJ, Jewell DP, George B. Perianal Crohn's disease. *Br J Surg.* 2004; 91: 801-14.
15. Trikudanathan G, Venkatesh PG, Navaneethan U. Diagnosis and therapeutic management of extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Drugs.* 2012 Dec 24; 72 (18) 2333-49.
16. Steinhart AH, Girgrah N, Mcleod RS. Reliability of a Crohn's disease clinical classification scheme based on disease behavior. *Inflamm Bowel Dis* 1998; 4: 228-234.
17. 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.
18. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005; 19 (Supl. A): 5-36.
19. Louis E, Collard A, Oger AF, Degroote E, Aboul Nasr El Yafi FA, Belaiche J. Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut* 2001; 49: 777-782.
20. Sachar DB, Bodian CA, Goldstein ES, Present DH, Bayless TM, Picco M, et al. Is perianal Crohn's disease associated with intestinal fistulization? *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1547-1549.
21. Lakatos PL, Szalay F, Tulassay Z, Molnar T, Kovacs A, Gasztonyi B, et al. Clinical presentation of Crohn's disease. Association between familial disease, smoking, disease phenotype, extraintestinal manifestations and need for surgery. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 817-822.

22. Fletcher JG, Fidler JL, Bruining DH, Huprich JE. New concepts in intestinal imaging for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011; 140: 1795-1806.
23. Parience B, Cosnes J, Danese S, Sandborn WJ, Lewin M, Fletcher JG, et al. Development of the Crohn's disease digestive damage score, the Leman score. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 1415-1422
24. Strobel D, Goertz RS, Bernatik T. Diagnostics in inflammatory bowel disease: ultrasound, *World J Gastroenterol* 2011; 17: 3192-3197.
25. Morris MS, Chu Di. Imaging for Inflammatory Bowel Disease. *Surg Clin North Am.* 2015 Dec; 95 (6): 1143-58.
26. Yoon K, Chang KT, Lee HJ. MRI for Crohn's Disease: Present and Future. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 786802.
27. Horsthuis K, Bipat S, Beninck RJ, Stoker J. Inflammatory bowel disease diagnosed with US, MR, scintigraphy, and CT: metaanalysis of prospective studies. *Radiology* 2008; 247: 64-79.
28. Panes J, Bouhnik Y, Reinisch W, Stoker J, Taylor SA, Baumgart DC et al. Imaging techniques for assessment of inflammatory bowel disease: Joint ECCO and ESGAR evidence-based consensus guidelines. *J Crohns Colitis.* 2013. 7 (7): 556-585.
29. Annese V, Daperno M, Rutter MD, Amiot A, Bossuyt P, East J, et al. European evidence based consensus for endoscopy in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2013 Dec; 7 (12): 982-1018.
30. Heresbach D, Alexandre JL, Branger B, Bretagne JF, Cruchant E, Dabadie A, et al. Frequency and significance of granulomas in a cohort of incident cases of Crohn's disease. *Gut* 2005; 54: 215-222.
31. Shah SC, Colombel JF, Sands BE, Narula N. Systematic review with meta-analysis: mucosal healing is associated with improved long-term outcomes in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016 Feb; 43 (3): 317-33.
32. Annunziata ML, Caviglia R, Papparella LG, Cicala M. Upper gastrointestinal involvement of Crohn's disease: a prospective study on the role of upper endoscopy in the diagnostic work-up. *Dig Dis Sci* 2012 Jun; 57 (6): 1618-23.

33. Kim M, Jang HJ. The role of small bowel endoscopy in small bowel Crohn's disease: when and how?. *Intest Res.* 2016 Jul; 14 (3): 211-7.
34. Jang HJ, Choi MH, Eun CS, Choi H, Choi KY, Park DI, et al. Clinical usefulness of double balloon enteroscopy in suspected Crohn's disease. The KASID multicenter trial. *Hepatogastroenterology.* 2014 Jul-Aug; 61 (133): 1292-6.
35. Dionisio PM, Gurudu SR, Leighton JA, Leontiadis GI, Fleischer DE, Hara AK, et al. Capsule endoscopy has a significantly higher diagnostic yield in patients with suspected and established small-bowel Crohn's disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2010 Jun; 105 (6): 1240-8.
36. Gisbert JP, González-Lama Y, Maté J. Role of biological markers in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol.* 2007 Mar; 30 (3): 117-29.
37. Peyrin-Biroulet L, Gonzalez F, Dubuquoy L, et al. Mesenteric fat as a source of C reactive protein and as a target for bacterial translocation in Crohn's disease. *Gut* 2012; 61:78–85.
38. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut.* 2006; 55: 426-31.
39. Fengming Y, Jianbing W. Biomarkers of inflammatory bowel disease. *Dis Markers* 2014; 2014: 710915.
40. Beattie RM, Walker-Smith JA, Murch SH. Indications for investigation of chronic gastrointestinal symptoms. *Arch Dis Child.* 1995; 73: 354-5.
41. Shine B, Berghouse L, Jones JE, Landon J. C-reactive protein as an aid in the differentiation of functional and inflammatory bowel disorders. *Clin Chim Acta.* 1985;148:105-9.
42. Poullis AP, Zar S, Sundaram KK, Moodie SJ, Risley P, Theodossi A, et al. A new, highly sensitive assay for C-reactive protein can aid the differentiation of inflammatory bowel disorders from constipation- and diarrhoea-predominant functional bowel disorders. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2002; 14:409-12.
43. Benítez JM, Mauwis MA, Reenaers C, Van Kemseke C, Meunier P, Louis E. Role of endoscopy, cross-sectional imaging and biomarkers in Crohn's disease monitoring. *Gut* 2013 Dec; 62 (12): 1806-16.

44. Chang S, Malter L, Hudesman D. Disease Monitoring in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2015 Oct; 21 (40): 11246-59.
45. Langhorst J , Elsenbruch S , Koelzer J et al. Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices . *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 162–9.
46. Mosli MH, Zou G, Garg SK, Feagan SG, MacDonald JK, Chande N, et al. C-Reactive Protein, Fecal Calprotectin, and Stool Lactoferrin for Detection of Endoscopic Activity in Symptomatic Inflammatory Bowel Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol* 2015 Jun; 110(6): 802–19.
47. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999; 340: 448-54.
48. Tromm A, Tromm CD, Hüppe D, Schwegler U, Krieg M, May B. Evaluation of different laboratory tests and activity indices reflecting the inflammatory activity of Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*. 1992; 27:774-8.
49. Yoon JY, Park SJ, Hong SP, Kim TI, Kim WH, Cheon JH. Correlations of C-reactive protein levels and erythrocyte sedimentation rates with endoscopic activity indices in patients with ulcerative colitis. *Dig Dis Sci*. 2014; 59:829–837.
50. Menees SB, Powell C, Kurlander J, Goel A, Chey WD. A meta-analysis of the utility of C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, fecal calprotectin, and fecal lactoferrin to exclude inflammatory bowel disease in adults with IBS. *Am J Gastroenterol*. 2015; 110:444–454.
51. Barnes BH, Borowitz SM, Saulsbury FT, Hellems M, Sutphen JL. Discordant erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in children with inflammatory bowel disease taking azathioprine or 6-mercaptopurine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004; 38: 509-12.
52. Fagerhol MK, Anderson KB, Naess-Andresen CF, Brandtzaeg P, Dale I. Calprotectin (the L1 leukocyte protein). In: Smith VL, Dedman JR, eds. *Stimulus Response Coupling: the Role of Intracellular Calcium-Binding Proteins*. CRC Press Inc, 1990: 187-210.

53. Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T, et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocytic protein calprotectin. *J Clin Pathol* 1997; 50: 113-23.
54. Roseth AG, Fagerhol MK, Aadland E, Schjonsby H. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27(9): 793-8.
55. Lundberg JO, Hellstrom PM, Fagerhol MK, et al. Technology insight: calprotectin, lactoferrin and nitric oxide as novel markers of inflammatory bowel disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2005; 2: 96-102.
56. Roseth AG, Schmidt PN, Fagerhol MK. Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34(1): 50-4.
57. von Roon AC, Karamountzos L, Purkayastha S, Reese GE, Darzi AW, Teare JP. Diagnostic precision of fecal calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy. *Am J Gastroenterol*. 2007 Apr; 102 (4): 803-13.
58. Van Rheenen PF, Van de Vijver E, Fidler V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ* 2010; 342: c3369.
59. Burri E, Beglinger C. Fecal calprotectin – a useful tool in the management of inflammatory bowel disease. *Swiss Med Wkly* 2012; 142: w13557.
60. Smith LA, Gaya Dr. Utility of faecal calprotectin analysis in adult inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2012; 18 (46): 6782-9.
61. Gupta V, Bamezai RN. Human pyruvate kinase M2: a multifunctional protein. *Protein Sci*. 2010; 19:2031–2044.
62. Hardt PD, Mazurek S, Toepler M, Schlierbach P, Bretzel RG, Eigenbrodt E, Kloer HU. Faecal tumour M2 pyruvate kinase: a new, sensitive screening tool for colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2004; 91:980–984.
63. Chung-Faye G, Hayee B, Maestranzi S, Donaldson N, Forgacs I, Sherwood R. Fecal M2-pyruvate kinase (M2-PK): a novel marker of intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis*. 2007; 13:1374–1378.

64. Jeffery J, Lewis SJ, Ayling RM. Fecal dimeric M2-pyruvate kinase (tumor M2-PK) in the differential diagnosis of functional and organic bowel disorders. *Inflamm Bowel Dis*. 2009; 15:1630–1634.
65. Shastri YM, Povse N, Schröder O, Stein J. Comparison of a novel fecal marker-fecal tumor pyruvate kinase type M2 (M2-PK) with fecal calprotectina in patients with inflammatory bowel disease: a prospective study. *Clin Lab*. 2008; 54: 389-90.
66. Czub E, Herzig KH, Szaflarska-Popawska A, Kiehne K, Socha P, Woś H, Kamińska B, Błaszczyński M, Cichy W, Bała G, et al. Fecal pyruvate kinase: a potential new marker for intestinal inflammation in children with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2007; 42:1147–1150.
67. Turner D, Leach ST, Mack D, Uusoue K, McLernon R, Hyams J, Leleiko N, Walters TD, Crandall W, Markowitz J, et al. Faecal calprotectin, lactoferrin, M2-pyruvate kinase and S100A12 in severe ulcerative colitis: a prospective multicentre comparison of predicting outcomes and monitoring response. *Gut*. 2010; 59: 1207–1212.
68. Best WR, et al. Development of a Crohn's disease activity index. *Gastroenterology* 1976; 70: 439-444.
69. Sostegni R, Daperno M, Scaglione, et al. Review article: Crohn's disease: monitoring disease activity. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 11-17.
70. Mary JY, Modigliani R. Development and validation of an the endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study. *Gut* 1989; 30: 983-989.
71. Daperno M, D'haens G, Van Assche G, et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 505-512
72. Sipponen T, Nuutinen H, Turunen U, et al. Endoscopic evaluation of Crohn's disease activity: comparison of the CDEIS and the SES-CD. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 2131-2136

73. Moskovitz DN, Daperno M, Van Assche G. Defining and validating cut-offs for the Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease. *Gastroenterology* 2007; 132: S1097.
74. Molander P, Sipponen T, Kempainen H, Jussila A, Blomster T, Koskela R, et al. Achievement of deep remission during scheduled maintenance therapy with TNF α -blocking agents in IBD. *J Crohns Colitis* 2013; 7 (9): 730-735.
75. Yu L, Yang X, Xia L, Zhong J, Ge W, Wu J, et al. Infliximab preferentially induces clinical remission and mucosal healing in short course Crohn's disease with luminal lesions through balancing abnormal immune response in gut mucosa. *Mediators Inflamm* 2015; 2015: 793-764.
76. Froslic KF, Jahnsen J, Moum BA, Vatn MH. Mucosal healing in inflammatory bowel disease: results from a Norwegian population-based cohort. *Gastroenterology* 2007; 133: 412-422.
77. De Cruz P, Kamm MA, Prideaux L, Allen PB, Moore G. Mucosal healing in Crohn's disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19: 429-444.
78. Modigliani R, Mary JY, Simo JF, Cortot A, Soule JC, Gendre JP, Rene E. Clinical, biological and endoscopic picture of attacks of Crohn's disease. Evolution on prednisolone. Groupe d'Etude Thérapeutique des Affections Inflammatoires Digestives. *Gastroenterology* 1990; 98: 811-818.
79. Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A, Trummler M, Vavricka SR, Bruegger LE, et al. Fecal calprotectin correlates more closely with the Simple Endoscopic Score for Crohn's disease (SES-CD) than CRP, blood leukocytes, and the CDAI. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 162-169.
80. Sipponen T, Kärkkäinen P, Savilahti E, Kolho KL, Nuutinen H, Turunen U, et al. Correlation of faecal calprotectin and lactoferrin with an endoscopic score for Crohn's disease and histological findings. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008; 28: 1221-9.
81. Sipponen T, Savilahti E, Kolho KL, Nuutinen H, Turunen U, Färkkilä M. Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 40-46.

82. D'Incà R, Dal Pont E, Di Leo V, Ferronato A, Fries W, Vettorato MG, et al. Calprotectin and lactoferrin in the assessment of intestinal inflammation and organic disease. *Int J Colorectal Dis.* 2007; 22(4):429–37.
83. Jones J, Loftus EV Jr, Panaccione R, Chen LS, Peterson S, McConnell J, et al. Relationships between disease activity and serum and fecal biomarkers in patients with Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6 (11): 1218-24.
84. D'Haens G, Ferrante MD, Vermeire S, Baert F, Noman M, Moortgar L, et al. Fecal calprotectina is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012; 18: 2218-24.
85. Lobatón T, López-García A, Rodríguez-Morante F, Ruiz A, Rodríguez L, Guardiola J. A new rapid test for fecal calprotectin predicts endoscopic remission and postoperative recurrence in Crohn's disease. *J. Crohns Colitis* 2013; 7: e641-51.
86. Lin JF, Cen JM, Zuo JH, Yu A, Xiao ZJ, Deng FH, et al. Meta-analysis: fecal calprotectina for assessment of inflammatory bowel disease activity. *Inflamm Bowel Dis.* 2014; 20: 1407-15.
87. Sipponen T, Savilahti E, Karkkainen P, Kolho KL, Nuutinen H, Turunen U, et al. Fecal calprotectin, lactoferrin and endoscopic disease activity in monitoring anti-TNF-alpha therapy for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2008; 14: 1392-8.
88. Sipponen T, Björkesten CG, Färkkilä M, Nuutinen H, Savilahti E, Kolho KL. Fecal calprotectina and lactoferrin are reliable surrogate markers of endoscopic response during Crohn's disease treatment. *Scand J Gastroenterol* 2010; 45: 325-331.
89. af Björkesten CG, Nieminen U, Turunen U, Arkkila P, Sipponen T, Färkkilä M. Surrogate markers and clinical indices, alone or combined, as indicators for endoscopic remission in anti-TNF-treated luminal Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol.* 2012; 47: 528-537.
90. Nancey S, Boschetti G, Moussata D, Cotte E, Peyras J, Cuerq C, et al. Neopterin is a novel reliable fecal marker as accurate as calprotectina for predicting

- endoscopic disease activity in patients with inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2013; 19: 1043-52.
91. Louis E, Mary JY, Vernier-Massouille G, Grimaud JC, Bouhnik Y, Laharie D, et al. Groupe D'études Thérapeutiques Des Affections Inflammatoires Digestives. Maintenance of remission among patients with Crohn's disease on antimetabolite therapy after infliximab therapy is stopped. *Gastroenterology*. 2012; 142: 63-70.
92. Däbritz J, Musci J, Foell D. Diagnostic utility of faecal biomarkers in patients with irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2014 Jan 14; 20 (2): 363-375.
93. Lijmer JG, Mol BW, Heisterkamp S, Bossel GJ, Prins MH, van der Meulen JH, et al. Empirical evidence of design-related bias in studies of diagnostic tests. *JAMA* 1999; 282: 1061-6.
94. Black ER, Panzer RJ, Mayewski RJ, et al. Characteristics of diagnostic tests and principles for their use in quantitative decision making in diagnostic strategies for common medical problems. In: Black ER, Bordley DR, Tape TG, Panzer RJ, eds. *Diagnostic Strategies of Common Medical Problems*. Philadelphia: American College of Physicians, 1999; 1-7.
95. Hinkle DE, Wiersma W, & Jurs SG (2003). *Applied statistics for the behavioral sciences*. Boston, Mass: Houghton Mifflin.
96. Algaba A, Linares PM, Fernández-Contreras ME, Ordoñez A, Trápaga J, Guerra I, et al. Relationship between levels of angiogenic and lymphangiogenic factors and the endoscopic, histological and clinical activity, and acute-phase reactants in patients with inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2013 Dec; 7 (11): e569-79.
97. Gaya DR, Lyon TDB, Duncan A, Neilly JB, Han S, Howell J, Liddell C, Stanley AJ, Morris AJ, Mackenzie JF. Faecal calprotectin in the assessment of Crohn's disease activity. *Q J Med* 2005; 98: 435-441.

98. Gisbert JP, Bermejo F, Pérez-Calle JL, Taxonera C, Vera I, McNicholl AG, et al. Fecal calprotectin and lactoferrin for the prediction of inflammatory bowel disease relapse. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 1190-1198.
99. García-Sánchez V, Iglesias-Flores E, González R, Gisbert JP, Gallardo-Valverde JM, González-Galilea A, Naranjo-Rodríguez A, et al. Does fecal calprotectin predict relapse in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis?. *J Crohns Colitis* 2010; 4: 144-152.
100. Neurath MF, Travis SP. Mucosal healing in inflammatory bowel diseases. A systematic review. *Gut* 2012; 61: 1619-35.

CAPÍTULO VIII: ANEXOS

ANEXO 1: SUBVENCIONES, PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES

1) SUBVENCIONES

El proyecto de tesis recibió el premio “Beca Gonzalo Miño Fungarolas” otorgado por la Sociedad Andaluza de Patología Digestiva en Octubre de 2010 como subvención para la realización del trabajo presentado en esta tesis doctoral. Dotación: 6000 €

2) PUBLICACIONES

Vázquez-Morón JM, Pallarés-Manrique H, Machancoses FH, Ramos-Lora M, Ruíz-Frutos C. Accurate cut-offs for predicting endoscopic activity and mucosal healing in Crohn’s disease with fecal calprotectina. Rev Esp Enferm Dig. 2017 Feb; 109 (2): 130-136.

Vázquez-Morón JM, Benítez-Rodríguez B, Pallarés-Manrique H, Cabanillas-Casafranca M, Jiménez Macías FM, Osuna-Molina O, González-Gutiérrez R, Ramos lora M. M2-Piruvato quinasa fecal (M2-PK) es un nuevo biomarcador útil para diagnosticar la enfermedad inflamatoria intestinal. Revista Andaluza de Patología Digestiva. 2013; 36 (1):10-16

3) COMUNICACIONES A CONGRESOS

Vázquez-Morón JM, Benítez-Rodríguez B, Pallarés-Manrique H, Herrero-Machancoses F, Robles-Rodríguez J, Ramos-Lora M, Ruíz-Frutos C. Accurate cut-offs for predicting endoscopic activity and mucosal healing in Crohn’s disease with fecal calprotectina. J Crohns Colitis 2017; 11 (Suppl_1): P319. 12th Congress of ECCO, February 15-18, 2017, Barcelona/Spain.

Vázquez Morón JM, Benítez Rodríguez B, Pallarés Manrique H, Jiménez Macías FM, Osuna Molina R, Cabanillas Casafranca M, González Gutiérrez R, Robles Rodríguez JL, Carrasco Sánchez FJ, Ramos Lora M. “Precisión diagnóstica de calprotectina y M2-Piruvato quinasa fecal en la predicción de actividad endoscópica y clínica en la enfermedad de Crohn”. Vázquez Morón JM, Benítez Rodríguez B, Pallarés Manrique H, Jiménez Macías FM, Osuna Molina R, Cabanillas Casafranca M, González Gutiérrez R, Robles Rodríguez JL, Carrasco Sánchez FJ, Ramos Lora M. Rev Esp Enferm Dig 2013; 105 (Supl. I): 32. LXXII Congreso de la Sociedad Española de Patología Digestiva. Semana de las Enfermedades Digestivas. Murcia, 1-4 Junio 2013

Vázquez Morón JM, Cabanillas Casafranca M, Osuna Molina R, Benítez Rodríguez B, Pallarés Manrique H, Jiménez Macías FM, Ramos Lora M. “Precisión diagnóstica de calprotectina y M2-Piruvato quinasa fecal para clasificar la gravedad de la actividad endoscópica en la enfermedad de Crohn”. Rev Esp Enferm Dig 2013; 105 (Supl. I): 66-67. LXXII Congreso de la Sociedad Española de Patología Digestiva. Semana de las Enfermedades Digestivas. Murcia, 1-4 Junio 2013.

Vázquez Morón JM, Benítez Rodríguez B, Casado Monge PG, Pallarés Manrique H, Jiménez Macías FM, Ramos Lora M. “¿La localización en la enfermedad de Crohn puede influir en la correlación entre calprotectina fecal y los índices de actividad SES-CD y CDAI?”. Rev Esp Enferm Dig 2013; 105 (Supl. I): 57-58. LXXII Congreso de la Sociedad Española de Patología Digestiva. Semana de las Enfermedades Digestivas. Murcia, 1-4 Junio 2013.

ANEXO 2: HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

NOMBRE Y APELLIDOS:

EDAD:

SEXO:

Nº HISTORIA:

TELEFONO:

AÑOS DE ENFERMEDAD:

LOCALIZACIÓN: L1 L2 L3

FENOTIPO: B1 B2 B3

TRATAMIENTO: NOVO SFZ CTC IMM ANTI-TNF

SES-CD	
CDAI	
CALPROTECTINA	
M2-PK	
PCR	
VSG	

ANEXO 3: ÍNDICE CROHN'S DISEASE ACTIVITY INDEX (CDAI)

1)	Nº deposiciones líquidas o muy blandas/semana	X 2	
2)	Dolor abdominal, suma de 7 puntuaciones diarias (0: no, 1: leve, 2: moderado, 3 severo)	X 5	
3)	Bienestar general, suma de 7 puntuaciones diarias (0: bien, 1: regular, 2: mal, 3 muy mal, 4: fatal)	X 7	
4)	Nº de complicaciones o manifestaciones (artritis o artralgias, iritis o uveítis, eritema nodoso o pioderma gangrenoso, estomatitis aftosa, fisura, fístula o absceso anal, otras fístulas o fiebre > 37.8º C)	X 20	
5)	Fármacos para controlar diarrea (0: no, 1: si)	X 30	
6)	Masa abdominal (0: no, cuestionable: 0.4, 1: si)	X 10	
7)	Hematocrito (normal – paciente) (♀ 42, ♂ 47)	X 6	
8)	Pérdida de peso (peso estándar- peso actual/ peso estándar x 100)	X 1	
		Total	

Rangos de valores (0 – 600 puntos):

Remisión (inactiva): < 150

Leve: 150 - 219

Moderada: 220 - 450

Severa: > 450

Van Assche G, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. J Crohns Colitis. 2010 Feb; 4(1): 7-27.

ANEXO 4: ÍNDICE SIMPLE ENDOSCOPIC SCORE FOR CROHN'S DISEASE (SES-CD)

VARIABLES	0	1	2	3
<u>ÚLCERAS</u>	NINGUNA	AFTAS (0.1-0.5 cm)	ÚLCERAS (0.5-2 cm)	ÚLCERAS (> 2 cm)
<u>SUPERFICIE ULCERADA</u>	NINGUNA	<10%	10%-30%	>30%
<u>SUPERFICIE AFECTADA</u>	NINGUNA	<50%	50%-75%	>75%
<u>ESTENOSIS</u>	NINGUNA	<u>Una</u> que se puede pasar	<u>Más de una</u> que se puede pasar	Estenosis que <u>no</u> puede pasar

VARIABLES		RECTO	COLON IZQUIERDO	COLON TRANSVERSO	COLON DERECHO	ÍLEON	TOTAL
<u>ÚLCERAS</u>	0						
	1						
	2						
	3						
<u>SUPERFICIE ULCERADA</u>	0						
	1						
	2						
	3						
<u>SUPERFICIE AFECTADA</u>	0						
	1						
	2						
	3						
<u>ESTENOSIS</u>	0						
	1						
	2						
	3						

Grados de actividad:

Remisión (inactiva): 0 – 2

Leve: 3 – 7

Moderada: 8 – 15

Severa: ≥ 16

Daperno M, D'haens G, Van Assche G, et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 505-512

Sipponen T, Nuutinen H, Turunen U, et al. Endoscopic evaluation of Crohn's disease activity: comparison of the CDEIS and the SES-CD. *Inflammm Bowel Dis* 2010; 16: 2131-2136

ANEXO 5: CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, (Nombre y apellidos):.....

- He sido informado por el profesional sanitario sobre el estudio en que voy a participar.
- He podido hacer preguntas sobre el mismo.
- Comprendo que mi participación en el estudio es voluntaria y que puedo retirarme del estudio cuando lo desee.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- Deseo ser informado/a de los datos y resultados de carácter personal obtenidos durante el estudio:

Sí

No

En caso afirmativo la información será enviada por correo electrónico.

Correo electrónico:.....

Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto: “Precisión diagnóstica de la calprotectina y M2-Piruvato quinasa fecal en la detección de actividad endoscópica en la enfermedad de Crohn”

Nombre y apellidos del paciente

Nombre y apellido del profesional

.....

.....

Firma del paciente(o representante)

Firma del profesional informador

Fecha:

ANEXO 6: ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Patrones de la enfermedad de Crohn.....	15
Figura 2. Distribución de la localización de la enfermedad de Crohn	878
Figura 3. Distribución según la actividad endoscópica.....	878
Figura 4. Distribución según la actividad clínica	889
Figura 5. Correlación entre la calprotectina fecal con respecto al índice SES-CD y a la M2-Piruvato quinasa fecal.	924
Figura 6. Distribución de los niveles de CF, M2-PK fecal, PCR, VSG y CDAI según status de actividad endoscópica (remisión endoscópica o actividad inflamatoria). Se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en todas las variables estudiadas.....	946
Figura 7. Distribución de los niveles de CF, M2-PK fecal, PCR, VSG y CDAI según grupo de actividad endoscópica (remisión endoscópica, actividad leve, actividad moderada y actividad grave). Se observan diferencias estadísticamente significativas al menos entre dos grupos en todas las variables estudiadas.	979
Figura 8. Curva ROC de los niveles de CF, M2-PK fecal, PCR, VSG y CDAI para detectar actividad endoscópica.....	1013
Figura 8. Distribución de los pacientes en los grupos de status de actividad endoscópica según el punto de corte de CF de 170 µg/g.....	1013
Figura 9. Nomograma de Fagan. (A) Probabilidad de presentar actividad endoscópica para el punto de corte de CF ≥ 170 µg/g, (B) Probabilidad de presentar curación mucosa para el punto de corte de CF ≤ 70 µg/g.....	1046
Figura 10. Nomograma de Fagan. (A) Probabilidad de presentar actividad endoscópica para nivel de CF ≥ 170 µg/g en pacientes con actividad clínica. (B) Probabilidad de presentar curación mucosa para nivel de CF ≤ 70 µg/g en pacientes con actividad clínica. (C) Probabilidad de actividad endoscópica para nivel de CF ≥ 170 µg/g en pacientes con remisión clínica. (D) Probabilidad de presentar curación mucosa para nivel de CF ≤ 70 µg/g en pacientes con remisión clínica.....	1057
Figura 11. Curva ROC de la variable predictiva que combina calprotectina fecal y CDAI para detectar actividad endoscópica.	11012
Figura 12. Diagrama de toma de decisiones según actividad clínica y nivel de CF.	1336

