



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA, PSICOLOGÍA, MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD

PÚBLICA E INMUNOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA MÉDICA

**IMPLICACIÓN DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS Y
LINFANGIOGÉNICOS EN LA ENFERMEDAD
INFLAMATORIA INTESTINAL**

ALICIA ALGABA GARCÍA

Madrid 2015

**IMPLICACIÓN DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS Y LINFANGIOGÉNICOS
EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.**

Alicia Algaba García

Tesis doctoral

Universidad Rey Juan Carlos

DIRECTOR

Dr. Fernando Bermejo San José

CO-DIRECTOR

Dr. Jesús San Román Montero

UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE FUENLABRADA

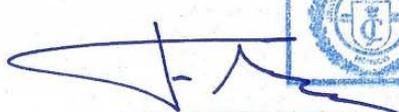


D. FERNANDO BERMEJO SAN JOSÉ Y D. JESÚS MARÍA SAN ROMÁN MONTERO, PROFESORES DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA, PSICOLOGÍA, MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA E INMUNOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA MÉDICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS

CERTIFICA

Que el proyecto de tesis doctoral titulado "*IMPLICACIÓN DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS Y LINFANGIOGÉNICOS EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL*", ha sido realizado bajo nuestra dirección por D^a. Alicia Algaba García, y reúne todos los requisitos científicos y formales para ser presentado y defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a todos los efectos, firmo el presente certificado en Madrid, a quince de diciembre de 2014.


Fdo. Dr. Fernando Bermejo San José


Fdo.: Dr. Jesús María San Román Montero

A Pepe

Agradecimientos

Han pasado ya casi 8 años desde la primera vez que me enfundé la bata blanca y empecé a trabajar en el Hospital de Fuenlabrada en el área de las enfermedades inflamatorias intestinales. Ocho años aprendiendo día a día a poner en práctica los conocimientos estudiados en la facultad y a atender y comprender a los pacientes con estas patologías. Ocho años de alegrías, pero también de momentos difíciles.

Al finalizar un trabajo tan lleno de dificultades como es el desarrollo de una tesis doctoral es inevitable acordarse de todos aquellos que me han facilitado el camino durante todos estos años y es para mí un verdadero placer poder utilizar estas líneas para agradecer a todas aquellas personas que han hecho todo lo posible por ayudarme a mí y a que esta tesis viera la luz.

En especial al Dr. Fernando Bermejo, director de esta tesis, por su tiempo y dedicación y por apoyarme tanto dentro como fuera del hospital. Por ser un trabajador infatigable y el modelo a seguir por todos los que trabajamos con él. Gracias por guiarme en mi carrera de investigación, por tu cercanía, disponibilidad y paciencia y sobre todo gracias por tu confianza en mi persona y mi trabajo.

A mis compañeros del hospital de Fuenlabrada, y especialmente al Dr. Iván Guerra, por completar este magnífico equipo y compartir conmigo trabajo y amistad. Por tu solidez y por tu disposición para ayudarme cada vez que lo he necesitado. También al Servicio de Anatomía Patológica, al Dr. Ángel Castaño y sus compañeros el Dr. Víctor M. Castellano y la Dra. Monserrat López.

A mis compañeros del Hospital de La Princesa, en especial a Pablo M. Linares, por su participación activa en éste y otros trabajos de investigación y también a la Dra. M^a Encarnación Fernández por compartir su conocimiento y aportar su experiencia para el desarrollo de este estudio y a mi codirector el Dr. Jesús San Román.

A mis padres por facilitarme una educación y estudios y apoyarme en todas las decisiones que he tomado tanto en mi vida laboral como en mi vida personal.

Y por supuesto, a Pepe, por ayudarme siempre, por creer en mí de forma incondicional, por estar a mi lado en los buenos y malos momentos y por ser mi apoyo emocional y pilar fundamental durante todos estos años.

Y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis así como a los profesores y compañeros que marcaron cada etapa de mi formación universitaria y profesional.

Indices

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	13
1. LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.....	13
1.1. Concepto	13
1.2. Criterios diagnósticos	14
1.2.1. Criterios clínicos.....	17
1.2.2. Criterios endoscópicos.....	18
1.2.3. Criterios histológicos	19
1.3. Clasificación según la extensión de la enfermedad	21
1.3.1. Clasificación de Montreal de la EC.....	22
1.3.2. Clasificación de Montreal de la CU	25
1.4. Valoración de la gravedad clínica y de la actividad inflamatoria.....	26
1.4.1. Índices clínicos de actividad en la CU	26
1.4.2. Índices endoscópicos en la CU	28
1.4.3. Índices mixtos en la CU.....	29
1.4.4. Índices histológicos en la CU	30

1.4.5.	Índices de actividad clínica en la EC.....	32
1.4.6.	Índices endoscópicos en la EC.....	33
1.4.7.	Índices histológicos en la EC.....	35
1.4.8.	Marcadores serológicos de inflamación.....	35
1.5.	Incidencia y prevalencia de la enfermedad inflamatoria intestinal.....	38
1.6.	Etiología y patogenia de la EII.....	41
1.6.1.	Factores ambientales.....	41
1.6.2.	Factores hereditarios.....	44
1.6.3.	Respuesta inmune.....	44
2.	ANGIOGÉNESIS.....	47
2.1.	Factores angiogénicos.....	49
3.	LINFANGIOGÉNESIS.....	56
3.1.	Factores linfangiogénicos.....	57
4.	ANGIOGÉNESIS, LINFANGIOGÉNESIS Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.....	59
5.	TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL, TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF-α).....	61
HIPÓTESIS.....		65
OBJETIVOS.....		69

PACIENTES Y MÉTODOS	73
1. PACIENTES	73
1.1. Período de estudio	73
1.2. Población de estudio	73
2. MÉTODOS	76
2.1. Metodología en la primera fase del estudio	76
2.1.1. Cultivo de biopsias intestinales para la determinación de factores angiogénicos y linfangiogénicos en sobrenadante de mucosa intestinal	77
2.1.2. Muestras de sangre para la determinación de factores angiogénicos y linfangiogénicos en suero.....	79
2.1.3. Determinación cuantitativa de los niveles de factores angiogénicos y linfangiogénicos en muestras de suero y sobrenadante de tejido	80
2.1.4. Biopsias para el análisis histológico	82
2.1.5. Determinación de la actividad endoscópica de la EII.....	83
2.1.6. Determinación de la actividad histológica de la EII.....	83
2.1.7. Determinación clínica de la EII	85
2.1.8. Determinación de reactantes de fase aguda	85
2.1.9. Análisis estadístico.....	86
2.2. Metodología segunda parte del estudio	88
2.2.1. Determinación de la actividad clínica	89

2.2.2.	Determinación de la respuesta y/o remisión de los pacientes con EII tratados con fármacos anti-TNF- α	90
2.2.3.	Procesamiento de las muestras de sangre	90
2.2.4.	Determinación de los niveles de VEGF-A, PlGF, Ang-1, Ang-2 y Tie-2 en suero	91
2.2.5.	Análisis estadístico segunda parte del estudio.....	92
RESULTADOS (1)	97
1.	DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN EN LA PRIMERA FASE DEL ESTUDIO	97
1.1.	Características basales de los pacientes con EII sometidos a colonoscopia	97
1.1.1	Características basales de los pacientes con EC.....	97
1.1.2	Características basales de los pacientes con CU	100
2.	COMPARACIÓN DE LOS NIVELES EN SUERO DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS SOLUBLES EN PACIENTES CON ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL Y CONTROLES	103
3.	COMPARACIÓN DE LOS NIVELES EN SOBRENADANTE DE TEJIDO DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS SOLUBLES EN PACIENTES CON ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL Y CONTROLES	104
4.	CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES EN SUERO Y SOBRENADANTE DE MUCOSA INTESTINAL DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS Y LINFANGIOGÉNICOS.....	104

5. LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS Y LINFANGIOGÉNICOS Y LA ACTIVIDAD CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	107
6. LOS NIVELES DE FACTORES ANGIOGÉNICOS Y LINFANGIOGÉNICOS Y LA ACTIVIDAD ENDOSCÓPICA DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	110
7. LOS NIVELES DE FACTORES ANGIOGÉNICOS Y LINFANGIOGÉNICOS Y LA ACTIVIDAD HISTOLÓGICA DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL .	114
8. ASOCIACIÓN DE LOS NIVELES DE FACTORES ANGIOGÉNICOS Y LINFANGIOGÉNICOS Y LOS REACTANTES DE FASE AGUDA	116
9. VALOR DE LOS NIVELES DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS Y LINFANGIOGÉNICOS EN SUERO Y SOBRENADANTE DE TEJIDO COMO PREDICTORES DE ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD	117
RESULTADOS (2)	125
1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL Y CONTROLES SANOS, SEGUNDA FASE DEL ESTUDIO	125
2. NIVELES DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS SOLUBLES EN PACIENTES Y CONTROLES.....	127
3. VARIACIÓN DE LOS NIVELES DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS SOLUBLES DURANTE EL TRATAMIENTO CON LOS FÁRMACOS ANTI-TNF- α	128
4. LOS NIVELES EN SUERO DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS COMO PREDICTORES DE EFICACIA DEL TRATAMIENTO ANTI-TNF- α	133
5. LOS NIVELES DE LOS FACTORES PROANGIGÉNICOS Y LA ACTIVIDAD CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	133

DISCUSIÓN.....	137
CONCLUSIONES.....	161
BIBLIOGRAFÍA.....	165
ABREVIATURAS.....	209
ANEXOS	213

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución más común de las lesiones en la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.....	14
Figura 2. Algunos de los métodos utilizados para el diagnóstico de la enfermedad inflamatoria intestinal.....	17
Figura 3. Corte histológico de mucosa de intestino grueso con signos de afectación por enfermedad de Crohn.	20
Figura 4. Corte histológico de mucosa de intestino grueso con signos de afectación por colitis ulcerosa.....	21
Figura 5. Tasa de incidencia y/o prevalencia de la enfermedad de Crohn en los países que han reportado datos, A) Antes de 1960, B) entre 1960-1979, C) después de 1980.....	39
Figura 6. Tasa de incidencia y/o prevalencia de la colitis ulcerosa en los países que han reportado datos, A) Antes de 1960, B) entre 1960-1979, C) después de 1980.	40
Figura 7. Fisiopatología de la enfermedad de Crohn.....	46
Figura 8. Distintas etapas de la angiogénesis.	48
Figura 9. Activación del proceso angiogénico mediado por el factor de crecimiento endotelial A.....	50
Figura 10. Mecanismo de acción de las angiopoyetinas -1 y -2.	55

Figura 11. Unión específica de varios miembros de la familia del factor de crecimiento vascular a sus receptores correspondientes.	59
Figura 12. Placa de 6 pocillos con sus correspondientes <i>inserts</i> . Extracción del <i>insert</i> de la placa tras el cultivo.....	79
Figura 13. Fundamento enzimoimmunoensayo indirecto tipo sándwich.....	82
Figura 14. Concentración en sobrenadante de tejido intestinal de los principales factores angiogénicos y linfangiogénicos en función de la presencia o no de actividad clínica.	108
Figura 15. Concentraciones en sobrenadante de mucosa intestinal de los receptores del factor de crecimiento del endotelio vascular, de las proteínas del sistema angiopoyetinas y los miembros de la familia factor de crecimiento del endotelio vascular en pacientes con actividad clínica y sin ella.	109
Figura 16. Comparación de los niveles de factores angiogénicos y linfangiogénicos en sobrenadante de mucosa intestinal según el grado de actividad endoscópica.	113
Figura 17. Comparación de los niveles de factores angiogénicos y linfangiogénicos en sobrenadante de mucosa intestinal según el grado de actividad histológica. .	115
Figura 18. Niveles en suero de angiopoyetina-1 antes y después del tratamiento anti-TNF- α respecto a niveles basales en pacientes que alcanzaron la remisión antes de la tercera dosis.	129

Figura 19.Factor de crecimiento del endotelio vascular (A.) y angiopoyetina-1 (B.) como predictores de remisión en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal en tratamiento con fármacos anti-TNF- α . Análisis de área bajo la curva ROC. ... 134

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Criterios diagnósticos de Lennard-Jones para la enfermedad de Crohn. .	15
Tabla II. Criterios diagnósticos de Lennard-Jones para la colitis ulcerosa.....	16
Tabla III. Diferentes hallazgos endoscópicos en la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.....	19
Tabla IV. Clasificación de Montreal para enfermedad de Crohn.....	24
Tabla V. Clasificación de Montreal para la colitis ulcerosa	25
Tabla VI. Índice Truelove-Witts clásico.	27
Tabla VII. Índice de Truelove-Witts modificado.....	27
Tabla VIII. Clasificación de Montreal de actividad para la colitis ulcerosa: Gravedad (S).	28
Tabla IX. <i>Ulcerative colitis endoscopic index of severity.</i> Índice UCEIS	29
Tabla X. Índice “Mayo Score”	31
Tabla XI. Índices histológicos en la colitis ulcerosa.	32
Tabla XII. <i>Cronh’s disease activity index.</i> Índice CDAI.	34
Tabla XIII. <i>Simple endoscopic score for Crohn’s disease.</i> Índice SES-CD.....	35
Tabla XIV. Reactantes de fase aguda determinados en la muestras de suero y su correspondiente rango normal.....	86

Tabla XV. Características de los pacientes con enfermedad de Crohn estudiados.	98
Tabla XVI. Características clínicas y demográficas de los pacientes con colitis ulcerosa estudiados.....	101
Tabla XVII. Características clínicas y demográficas de los sujetos controles.	102
Tabla XVIII. Concentraciones séricas de los factores angiogénicos y linfangiogénicos en controles y pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa quiescente.....	105
Tabla XIX. Concentraciones en sobrenadante de tejido intestinal de los factores angiogénicos y linfangiogénicos en controles y pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa activa y quiescente.....	106
Tabla XX. Coeficientes de correlación (r) de la asociación entre los niveles en suero y sobrenadante de tejido de los principales factores angiogénicos y linfangiogénicos y la actividad clínica de la enfermedad inflamatoria intestinal....	110
Tabla XXI. Coeficientes de correlación (r) de la asociación entre los niveles en suero y sobrenadante de tejido de los principales factores angiogénicos y linfangiogénicos y la actividad endoscópica de la enfermedad inflamatoria intestinal.	112
Tabla XXII. Comparación de los niveles de factores angiogénicos y linfangiogénicos en sobrenadante de tejido cólico afecto y no afecto.	114

Tabla XXIII. Coeficientes de correlación (r) para determinar la asociación entre los niveles en suero de los factores angiogénicos y linfangiogénicos y los reactantes de fase aguda.....	117
Tabla XXIV. Análisis de los factores angiogénicos y linfangiogénicos en sobrenadante de mucosa intestinal como predictores de actividad endoscópica.	118
Tabla XXV. Análisis de los factores angiogénicos y linfangiogénicos en sobrenadante de mucosa intestinal como predictores de actividad histológica....	119
Tabla XXVI. Análisis de los factores angiogénicos y linfangiogénicos en sobrenadante de mucosa intestinal como predictores de actividad clínica	120
Tabla XXVII. Características basales de los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal que iniciaron tratamiento biológico con anti-TNF- α	126
Tabla XXVIII. Comparación de los niveles de factores angiogénicos en pacientes con EII y controles.	128
Tabla XXIX. Comparación de los niveles séricos de los factores angiogénicos estudiados en diferentes momentos del tratamiento con anti-TNF- α en pacientes respondedores y no respondedores:	131

Resumen

RESUMEN

“IMPLICACIÓN DE LOS FACTORES ANGIOGENICOS Y LINFANGIOGÉNICOS EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL”

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un trastorno inflamatorio crónico que engloba dos entidades clínicas distintas: Enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU). Aunque la etiología de ambas enfermedades se desconoce, se sabe que están relacionadas con una alteración de la respuesta inmune y que están implicados tanto factores hereditarios como ambientales.

En los últimos años se ha intentado profundizar en el conocimiento de las posibles causas de estas enfermedades y de los factores que podrían influir en su evolución. Entre ellos, el estudio del desarrollo vascular y, muy especialmente, de la angiogénesis, ha adquirido gran importancia. Los vasos linfáticos y su relación con la EII no han recibido tanta atención como los sanguíneos y los mecanismos que regulan su desarrollo y crecimiento no se conocen con detalle.

Si una angiogénesis y linfangiogénesis patológica están implicadas en esta enfermedad, los fármacos más potentes utilizados actualmente para el control de la misma, como son los fármacos biológicos, infliximab (IFX) y adalimumab (ADA) también podrían mediar su eficacia mediante un efecto en las concentraciones de los factores angiogénicos y linfangiogénicos (FAL).

Por tanto, la finalidad del presente proyecto de investigación es el estudio conjunto y exhaustivo de los principales mecanismos implicados en los procesos de angiogénesis y linfangiogénesis en la mucosa intestinal y en sangre de pacientes con EII y el posible efecto de los fármacos anti-factor de necrosis tumoral alfa (anti-TNF- α) sobre los FAL en estos pacientes.

Métodos

Estudio prospectivo tipo casos y controles que fue desarrollado en dos fases. En la primera fase del estudio se incluyeron pacientes con EII (72) y controles sanos (28) que acudieron a la realización de una colonoscopia por criterio médico. De cada paciente se obtuvieron tres tipos de muestra: sangre para determinación de FAL y marcadores de inflamación en suero, muestras de tejido para su cultivo y determinación en sobrenadante de los mismos FAL, y biopsias para estudio histológico. En los pacientes con EII, además, se determinó el grado de actividad de la enfermedad mediante el cálculo de los índices clínicos,

endoscópicos e histológicos apropiados y su correlación con los niveles de FAL y se determinó el valor de estas proteínas como predictores de actividad de la EII mediante el análisis de las curvas ROC (receiver operating characteristics).

En una segunda fase del estudio se incluyeron 37 pacientes con EII que iniciaban tratamiento con los fármacos biológicos IFX o ADA y 40 voluntarios sin EII. De cada paciente se obtuvo una muestra de sangre antes de cada una de las tres primeras dosis del tratamiento para la determinación de factores angiogénicos y se determinó la eficacia y repuesta al tratamiento pautado y valor predictivo de estas proteínas como indicadores de eficacia del tratamiento. En el caso de los controles se obtuvo una única muestra sérica para la determinación de los mismos factores angiogénicos.

Las concentraciones de los FAL en suero y sobrenadante de cultivo (SMI) se determinaron mediante la técnica *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

Resultados

Las concentraciones en SMI de todas las proteínas analizadas, excepto VEGFR-3 estuvieron elevadas en pacientes con enfermedad activa respecto a los sujetos controles y variaron de forma significativa en función de la actividad clínica,

endoscópica e histológica de la EII ($p < 0,05$). Los pacientes con enfermedad quiescente por el contrario tuvieron niveles similares a los controles.

Respecto a las determinaciones en suero, sólo VEGF-A, VEGF-C y Ang-1 fueron mayores en pacientes con actividad clínica que en aquellos sin ella (VEGF-A: 592 ± 447 vs. 395 ± 274 pg/ml, $p = 0,02$; VEGF-C: $13,9 \pm 4,8$ vs. $11,8 \pm 3,5$ pg/ml, $p = 0,03$ and Ang1: $58,7 \pm 17,6$ vs. $50,8 \pm 14,5$ ng/ml, $p = 0,04$) y los niveles de VEGF-A y Ang-1 fueron más altos en pacientes con actividad histológica que en pacientes sin ella (577 ± 426 vs. 346 ± 239 pg/ml, $p < 0,01$ y $57,8 \pm 16,4$ vs. $47,2 \pm 14,6$ ng/ml, $p < 0,05$). Los niveles séricos de Ang-1 y VEGF-A también correlacionaron significativamente con los índices endoscópicos de la EII ($r = 0,362$; $p = 0,049$ y $r = 0,397$, $p = 0,01$; respectivamente) y con la proteína C-reactiva, el recuento de leucocitos y el recuento de plaquetas ($p < 0,05$).

Hubo una correlación positiva entre los niveles en suero de VEGF-D ($r = 0,25$), VEGFR-3 ($r = 0,48$) y Tie2 ($r = 0,36$) y sus correspondientes concentraciones en SMI ($p < 0,05$). Esta correlación fue negativa para PIGF ($r = -0,45$; $p < 0,05$). No se encontraron más asociaciones entre suero y SMI para el resto de FAL estudiados.

Los niveles de Ang-2 en SMI fueron los mejores predictores de actividad endoscópica, histológica y clínica de la EII. Respecto a los niveles de FAL en suero, los resultados del área bajo la curva ROC (ABC) para las proteínas estudiadas fueron inferiores respecto a los obtenidos en SMI. Los mejores

6

resultados fueron encontrados para Ang-1 como predictor de actividad histológica (ABC: 0,68; punto de corte: 52,0 ng/ml: 64% sensibilidad y 68% especificidad) y para VEGF-A como predictor de actividad endoscópica (ABC: 72; punto de corte: 341 ng/ml: 85% sensibilidad y 64% especificidad).

Respecto a los resultados obtenidos en la segunda fase del estudio, los niveles de Ang-1 fueron significativamente más bajos antes de la segunda, tercera y cuarta dosis del tratamiento comparado con los niveles iniciales (49,5±18,6 vs. 43,4±21,8; 48,7±18,7 vs. 42,4±18,7; 44,9±19,9 vs. 16,7±38,0; respectivamente) en los pacientes que alcanzaron la remisión tras tres dosis del tratamiento ($p < 0,05$).

Los pacientes en remisión en la tercera dosis tuvieron niveles significativamente más bajos de VEGF-A en el momento basal (453,5±250 vs. 667,5±153,9; $p=0,04$); en la segunda dosis (409,7±217 vs. 681,3±350,6; $p=0,01$) y en al tercera (400,5±222,8 vs. 630,4±243,1; $p=0,03$) respecto a aquellos pacientes que no alcanzaron la remisión con el tratamiento.

Esta misma comparación también se hizo en pacientes que estaban en remisión en la cuarta dosis y pacientes en los que persistía la actividad. Los niveles de Ang-1 basales y antes de la segunda dosis de anti-TNF- α fueron mayores en pacientes en remisión en la semana 14 comparados con aquellos sin remisión (basal: 48,3±20,4 vs. 28,8±11,6 ng/mL, $p=0,04$; semana 14: 46,4±22,4 vs. 30,8±7,3 ng/mL, $p=0,01$). No se hallaron más diferencias a este respecto.

Se encontró que valores elevados basales de VEGF-A fueron predictores de una mala respuesta al tratamiento con fármacos biológicos. El ABC fue de 0,8 con un punto de corte de 658,36 pg/ml (con una sensibilidad de 85,7% y una especificidad de 78,6%). Por el contrario, niveles basales elevados de Ang-1 estuvieron asociados con la remisión de la enfermedad tras el tratamiento de inducción con los fármacos anti-TNF- α (ABC: 0,7; punto de corte: 36,6 ng/ml; 72% sensibilidad y 71,4% especificidad)

Conclusiones

1. Los pacientes con EII activa presentaron un perfil angiogénico caracterizado por unas concentraciones elevadas a nivel local de todas las proteínas estudiadas, a excepción de VEGFR-3, respecto a los pacientes controles y a los pacientes sin actividad, apoyando la implicación de una angiogénesis alterada en la patogenia de la EII.
2. La sobreexpresión de VEGFR-2, VEGF-C y -D y la estabilidad de los niveles de VEGFR-3 sugieren que la función pro-linfangiogénica de VEGF-C y -D podría ser llevada a cabo vía VEGFR-2 en vez de VEGFR-3 en los períodos de actividad de la EII y que la vía de señalización de VEGFR-3 y por tanto, la linfangiogénesis por la vía habitual podría estar bloqueada en estos pacientes.

3. Los niveles de FAL en SMI en los pacientes en remisión clínica y endoscópica fueron iguales que en los sujetos controles lo que sugiere que las alteraciones angio/linfangiogénicas observadas en los pacientes con EII en actividad podrían ser reversibles. Además, las diferencias encontradas en dichos pacientes con actividad fueron similares para los pacientes con EC y CU, sugiriendo un comportamiento similar de ambas entidades respecto a la angiogénesis y linfangiogénesis local.

4. Los niveles locales de FAL correlacionan bien con la actividad clínica, endoscópica e histológica de la EII y tienen buen valor pronóstico de actividad de la enfermedad, especialmente Ang-2 y podrían constituir una nueva diana terapéutica en futuras líneas de investigación.

5. Por el contrario, aunque las concentraciones en suero de VEGF-A y el sistema angiopoyetinas estuvieron alteradas en los pacientes con EII activa respecto a los controles y correlacionaron con distintos marcadores de inflamación como la proteína C-reactiva, el recuento de leucocitos y el recuento de plaquetas, la correlación en general de estas proteínas con los niveles en SMI y la actividad clínica, endoscópica e histológica de la enfermedad es baja y por el momento, podemos afirmar que no poseen utilidad como predictores de actividad.

6. En pacientes que alcanzaron la remisión con el tratamiento anti-TNF- α , los niveles séricos de Ang-1 disminuyeron significativamente con el tratamiento administrado,

mientras que, los niveles de VEGF-A disminuyeron respecto a la determinación basal en pacientes tratados con IFX y fueron marcadamente menores en pacientes que alcanzaron la remisión comparados con los pacientes no respondedores, sugiriendo un papel de estas proteínas en los complejos mecanismos en los que se produce la actuación de los fármacos anti-TNF- α .

7. Los cambios en los niveles de VEGF-A y Ang-1 en pacientes que responden al tratamiento podrían predecir la respuesta a esta terapia, pero por el momento no es posible conocer si tales cambios son un efecto directo de los inhibidores de TNF- α o son una señal secundaria a la remisión de la actividad de la EII.

Palabras clave:

Enfermedad inflamatoria intestinal, factores angiogénicos y linfangiogénicos, fármacos biológicos

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

1.1. Concepto

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un trastorno inflamatorio crónico que engloba dos entidades clínicas distintas: Enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU) (1, 2).

La EC puede afectar a cualquier parte del tracto digestivo desde la boca hasta el ano, aunque se localiza con más frecuencia en íleon terminal y colon. Se caracteriza por una naturaleza focal de la afectación macroscópica. La CU afecta a la mucosa del colon en extensión variable, desde el recto hasta el ciego pero, a diferencia de la EC, se distribuye generalmente de forma continua. Ambas entidades clínicas pueden asociarse a manifestaciones sistémicas y extraintestinales. Tanto la EC como la CU cursan alternando brotes de actividad, caracterizados por un aumento y agudización de la respuesta inflamatoria, con periodos de remisión. El número, la periodicidad y la gravedad de estos brotes son impredecibles.

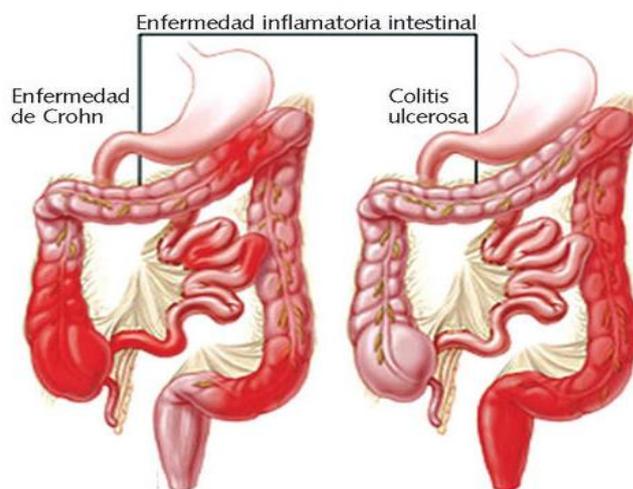


Figura 1. Distribución más común de las lesiones en la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

Imagen tomada de www.taringa.net

1.2. Criterios diagnósticos

El diagnóstico de la EII se realiza por una serie de criterios clínicos, radiológicos, endoscópicos y anatomopatológicos. Estos criterios son los denominados criterios de Lennard-Jones (3), se requiere, al menos la presencia de dos criterios para el diagnóstico, siendo el anatomopatológico el definitivo. Hasta en un 10% de los casos de EII con afectación de colon es imposible hacer un diagnóstico diferencial entre EC y CU, es lo que se conoce como colitis indeterminada o colitis no clasificada.

Tabla I. Criterios diagnósticos de Lennard-Jones para la enfermedad de Crohn.

Tipo criterios	Características de los criterios
Criterios clínicos	<ul style="list-style-type: none"> • Dolor abdominal recurrente • Diarrea • Pérdida de peso • Masa abdominal • Fiebre/febrícula • Enfermedad perianal • Fístulas • Manifestaciones extraintestinales
Criterios radiológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Cambios mucosos: úlceras aftoides, lineales, úlceras longitudinales, pólipos inflamatorios, edemas de válvulas conniventes • Cambios del calibre: estenosis, dilatación, fístulas, asimetría de las lesiones
Criterios endoscópicos	<ul style="list-style-type: none"> • En afectación de colon: presencia de aftas, ulceraciones lineales profundas o serpiginosas, aspecto en empedrado, estenosis, orificios fistulosos, pseudopólipos y pólipos, lesiones características segmentarias, de extensión variable y con recto frecuentemente indemne • En afectación de íleon: aftas, úlceras y/o estenosis
Criterios anatomopatológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Mayores: inflamación transmural, granulomas no caseificantes, agregados linfoides (sin centro germinal) • Menores: inflamación de carácter discontinuo, inflamación de la submucosa con arquitectura epitelial conservada, retención de moco con inflamación mínima, fisuras

Tabla II. Criterios diagnósticos de Lennard-Jones para la colitis ulcerosa.

Tipo criterios	Características de los criterios
Criterios clínicos	<ul style="list-style-type: none"> • Rectorragias • Diarrea crónica (aunque en un 10% de los casos puede haber estreñimiento) • Dolor abdominal • Manifestaciones extraintestinales
Criterios radiológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Cambios mucosos: mucosa granular, úlceras espiculares o en botón de camisa, pseudopólipos • Cambios del calibre: estrechamiento de la luz, acortamiento del colon, pérdida de haustración
Criterios endoscópicos	<ul style="list-style-type: none"> • Mucosa eritematosa, granular, edematosa y/o friable • Exudado o ulceraciones • Hemorragia al roce o espontánea • Pseudopólipos y pólipos • Lesiones características continuas y con afectación prácticamente constante de recto
Criterios anatomopatológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Mayores: inflamación exclusiva de la mucosa, úlceras superficiales, distorsión de las criptas, microabscesos, depleción de células caliciformes • Menores: infiltrado inflamatorio crónico difuso, aumento de la vascularización mucosa, metaplasia de las células de Paneth, atrofia mucosa, hiperplasia linfoide

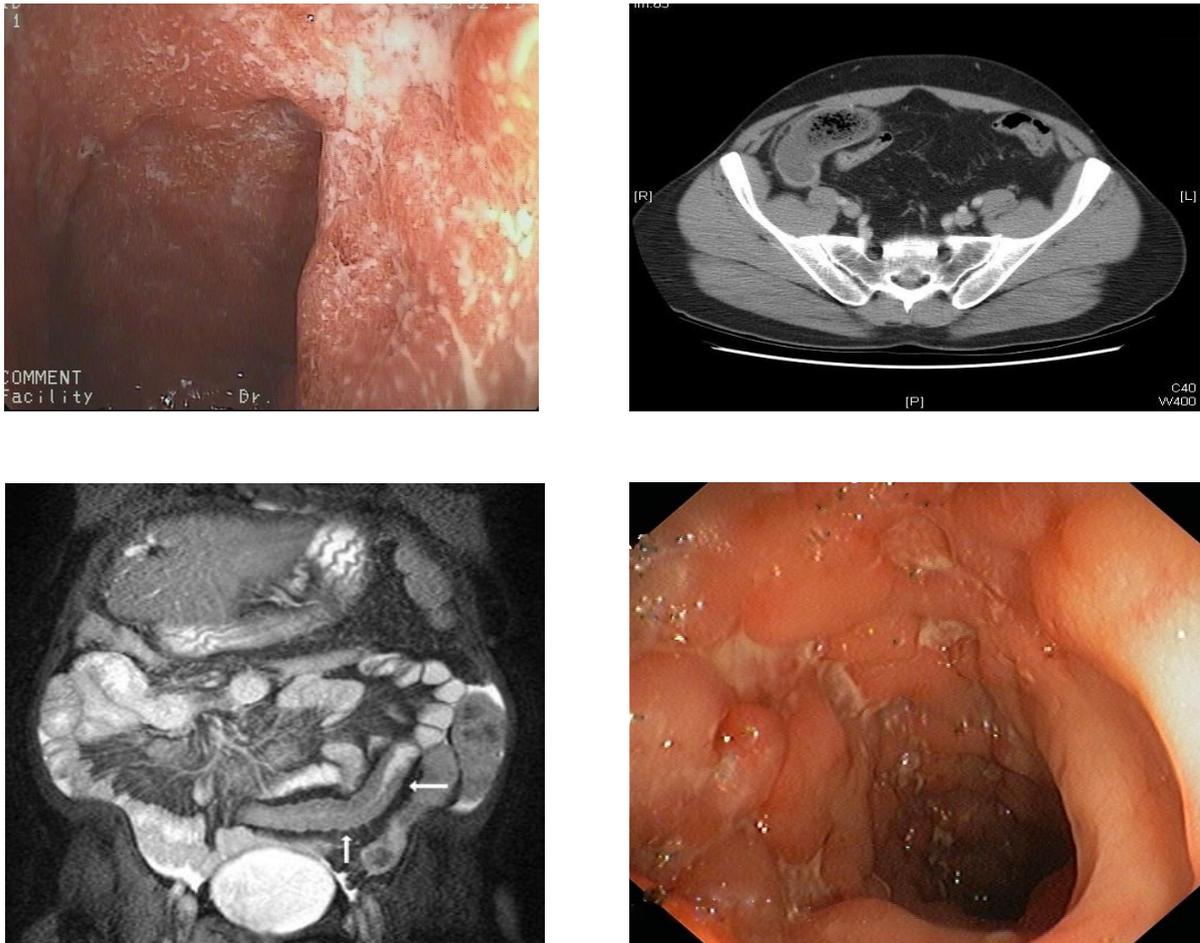


Figura 2. Algunos de los métodos utilizados para el diagnóstico de la enfermedad inflamatoria intestinal.

1.2.1. Criterios clínicos

Los síntomas más frecuentes de presentación de la EC son dolor abdominal y diarrea, aunque también es común la presencia de rectorragia, fiebre o pérdida de peso, entre otros (4). Su carácter transmural y cicatricial explica el desarrollo frecuente de fístulas, abscesos y estenosis (2).

El síntoma más característico de la CU es la diarrea con sangre, aunque no está siempre presente y presenta gran variabilidad tanto en el aspecto como en la cantidad de sangre emitida (5). Pueden añadirse otros síntomas, como fiebre (especialmente en las formas extensas), dolor abdominal, síndrome rectal (tenesmo, urgencia deposicional y esputo rectal de sangre y moco), pérdida de peso o estreñimiento en las formas más distales.

1.2.2. Criterios endoscópicos

La EC se caracteriza por una afectación de predominio submucoso, transmural, granulomatoso y cicatrizante, y una distribución segmentaria a lo largo del intestino (mucosa sana interpuesta entre lesiones). Es frecuente la afectación ileal con aftas, y la presencia de úlceras profundas o serpiginosas produciendo la clásica imagen “en empedrado”; en algunos pacientes se desarrollan estenosis y/o fístulas (6).

Típicamente, la mucosa cólica de la CU en fase de actividad presenta una apariencia granular, con pérdida del patrón vascular, eritema difuso, microulceraciones (o incluso úlceras de gran tamaño en casos graves), exudado y hemorragia espontáneos o al roce con el endoscopio. La afectación macroscópica de la mucosa es, en la mayoría de los casos no tratados, difusa y continua (sin áreas interlesionales aparentemente sanas), y afecta casi siempre desde el recto

en sentido proximal. Es frecuente la presencia de pseudopólipos en las formas crónicas (7, 8).

Tabla III. Diferentes hallazgos endoscópicos en la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

Característica	Enfermedad de Crohn	Colitis ulcerosa
Hiperemia	Parcheada	Difusa
Úlcera profundas	Frecuentes (variadas)	Sólo en casos graves
Recto afectado	50%	95%
Distribución	Discontinua (>80%)	Continua (>90%)
Estenosis en la luz	Frecuente	Rara (casos graves)
Íleon afectado	Frecuente (>60%)	Infrecuente y leve
Pseudopólipos	Infrecuentes	Frecuentes

En ambas entidades clínicas, los hallazgos endoscópicos pueden modificarse en relación con el tratamiento recibido y la gravedad de las lesiones suele correlacionarse con el grado de actividad de la enfermedad.

1.2.3. Criterios histológicos

En la EC la afectación histológica es parcheada y se extiende más allá de la mucosa. Son frecuentes los agregados linfoides (sin centro germinal) y los granulomas no caseificantes. Aparece fibrosis, metaplasia pilórica, neutrofilia de la *lamina propia* y una hipertrofia de los plexos nerviosos (4, 9).

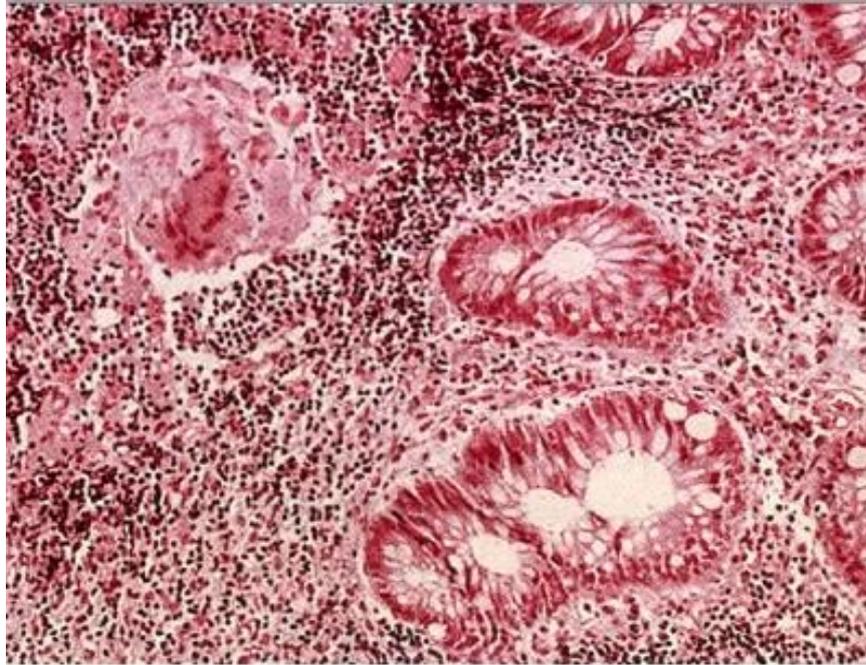


Figura 3. Corte histológico de mucosa de intestino grueso con signos de afectación por enfermedad de Crohn.

Se observa inflamación de la pared consistente en células linfoides, macrófagos y células plasmáticas. También se observan granulomas no caseificantes. Imagen tomada de: www.iqb.es

Durante los brotes agudos de actividad, la mucosa de los pacientes con CU presenta un importante infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos y células plasmáticas, junto a neutrófilos que aparecen predominantemente en las criptas, formando microabscesos crípticos muy característicos, pero no patognomónicos. Así mismo, las criptas presentan distorsión estructural, con disminución de sus ramificaciones y del número de células caliciformes. Durante las fases de remisión, disminuye o desaparece el infiltrado inflamatorio y los abscesos crípticos, y se recupera el número de células caliciformes; sin embargo, las criptas suelen continuar mostrando distorsión arquitectural (9-11).

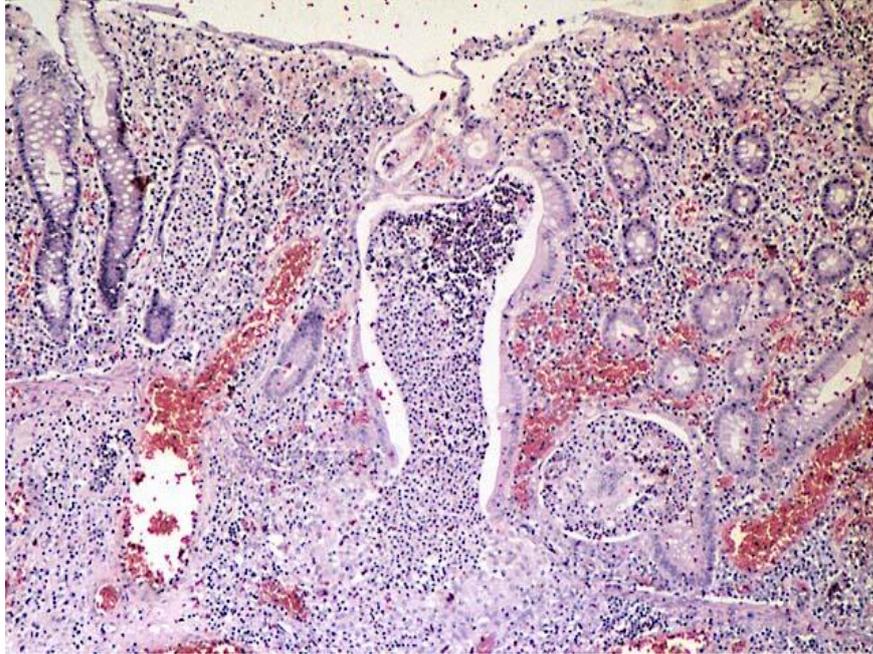


Figura 4. Corte histológico de mucosa de intestino grueso con signos de afectación por colitis ulcerosa.

La *lamina propria* aparece hiperémica y con denso infiltrado linfocitario. Se observan criptas deformadas y dilatadas, con exudado de polinucleares en el lumen y entre células epiteliales. En la porción inferior de la cripta central se observa que los polinucleares infiltran la *lamina propria* subyacente, Imagen tomada de: www.escuela.med.puc.cl

1.3. Clasificación según la extensión de la enfermedad

Debido a la heterogeneidad clínica de estas enfermedades y a la variedad demográfica, clínica y fenotípica de las mismas, existe una clasificación denominada clasificación de Montreal adoptada en el año 2005 que permite diferenciar a los pacientes en función de la extensión de la zona afectada, del

grado de actividad, y en el caso de la EC de la edad al diagnóstico y de su comportamiento (12, 13).

1.3.1. Clasificación de Montreal de la EC

La edad al diagnóstico de la enfermedad (A) se subdivide en tres categorías, A1: menores de 16 años, A2: entre 17 y 40 años, y A3: mayores de 40 años, debido a que se considera que las formas más precoces tienen características genéticas y presentaciones clínicas diferentes.

Respecto a la localización (L), se consideran los siguientes grupos:

-L1: afectación ileal. Aproximadamente un 30% de los casos, es cuando se afecta el íleon con o sin afectación del ciego. Las manifestaciones clínicas se deben a la presencia de estenosis a este nivel con náuseas, vómitos, dolor abdominal en fosa iliaca derecha, pérdida de peso y fiebre.

-L2: localización cólica. 20% de los casos. Una o varias localizaciones de la enfermedad entre el recto y el ciego, sin afectación del intestino delgado. Con clínica parecida a la CU, se asocia con más frecuencia a enfermedad perianal y manifestaciones extraintestinales.

-L3: localización ileocólica. La más común de las localizaciones, presente en un 40% de los casos. Se da afectación en el íleon terminal con o sin afectación cecal y en cualquier otra parte del colon. La clínica es una mezcla de las anteriores.

-L4: localización tracto digestivo alto. Es la localización menos común (5%) y engloba la afectación de 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 afectación exacta presente.

Por último, la clasificación de Montreal tiene en cuenta el comportamiento clínico, que refleja fundamentalmente la agresividad de la enfermedad, relacionada con la necesidad de terapias con mayores efectos secundarios o cirugías. A este respecto, el comportamiento (B) se divide en tres categorías:

-B1: patrón inflamatorio o no-fistulizante no-estenosante. Consiste en la presencia de úlceras superficiales que se pueden convertir en más profundas e inflamación.

-B2: patrón estenosante. Se caracteriza por la presencia de estenosis y dilatación preestenótica. Puede dar lugar a cuadros suboclusivos o pseudooclusivos.

INTRODUCCIÓN

-B3: patrón fistulizante o perforante, Incluye perforaciones libres y perforaciones con formación de fístulas internas, abscesos y masas intraabdominales, Es un patrón que se caracteriza por recurrencias frecuentes y la necesidad de cirugía.

Se recomienda excluir de este último patrón a la enfermedad perianal y considerarla como una categoría independiente. De este modo, los abscesos y fístulas perianales se deben indicar con la letra “p” y puede acompañar a cualquiera de los diferentes patrones clínicos, resultando en B1p, B2p y B3p.

Hay que tener en cuenta que los patrones clínicos pueden variar a lo largo del tiempo y pueden pasar de unas categorías a otras según evolucione la enfermedad.

Tabla IV. Clasificación de Montreal para enfermedad de Crohn.

Edad al diagnóstico	Localización	Patrón evolutivo
A1 16 años o menos	L1 Íleon terminal	B1 No estenosante, no fistulizante(**), o inflamatorio
A2 17-40 años	L2 Colon	B2 Estenosante
A3 >40	L3 Ileocólica	B3 Fistulizante
	L4 Tracto digestivo alto (se añade a cualquiera de las anteriores si está presente)	Añadir “p” a cualquiera de las anteriores si existe participación perianal

1.3.2. Clasificación de Montreal de la CU

En función de la extensión de la enfermedad la CU puede dividirse en las siguientes categorías:

-Proctitis ulcerosa (E1): la afectación se limita al recto, o como máximo a la unión rectosigmoidea.

-CU izquierda (E2): la enfermedad se extiende hasta el ángulo esplénico.

-CU extensa (E3): se observa inflamación más allá del ángulo esplénico.

El tratamiento médico y el pronóstico de la enfermedad pueden variar en función de la extensión de la enfermedad.

Tabla V. Clasificación de Montreal para la colitis ulcerosa

Extensión
E1: Proctitis ulcerosa
E2: Colitis izquierda o colitis distal
E3: Colitis ulcerosa extensa

1.4. Valoración de la gravedad clínica y de la actividad inflamatoria

Para poder cuantificar el grado de actividad inflamatoria en la EC y la CU, se utilizan los denominados índices de actividad. Estos índices están basados en parámetros clínicos, endoscópicos e histológicos, y en ocasiones mixtos.

1.4.1. Índices clínicos de actividad en la CU

El índice clínico clásicamente más utilizado en la CU es el índice de Truelove-Witts (14). Se trata de un índice cualitativo que fue elaborado para evaluar la respuesta a los corticoides. Está constituido por 6 variables y es fácil de calcular. El principal problema que tiene este índice es que no tiene en cuenta la extensión de las lesiones y discrimina mal cambios sutiles de la enfermedad haciendo difícil a veces identificar la mejoría o empeoramiento del paciente. Para intentar solucionar este problema se elaboró el índice de Truelove-Witts modificado, que incluía tres variables analíticas adicionales respecto al clásico y daba como resultado una puntuación cuantitativa (15).

La Clasificación de Montreal de la CU aborda también la actividad de la enfermedad y su validez ha sido refrendada por un grupo de expertos (13).

Otros índices clínicos menos utilizados son el índice de Seo (16), el índice de Rachmilewitz (17) o el índice de Lichtiger (18) entre otros.

Tabla VI. Índice Truelove-Witts clásico.

Variable	Grave	Leve
Deposiciones/día	>6	<4
Sangre deposiciones	Frecuente	Intermitente
Hb (mg/dl)	<75% valor normal	Normal
Temperatura	> 37,5	Normal*
Pulso	>90	Normal
VSG	>30	≤30

*En el momento de la exploración o en los 2 de los 4 últimos días. Brote moderado: valores intermedios entre brote leve y grave

Tabla VII. Índice de Truelove-Witts modificado.

Puntuación	3 puntos	2 puntos	1 punto
Deposiciones/día	> 6	4-6	<4
Sangre deposiciones	+ /+++	+	-
Hb (g/l) -Hombres	<10	10-14	>14
-Mujeres	<10	10-12	>12
Albúmina (g/l)	<30	30-32	>33
Fiebre (°C)	> 38	37-38	<37
Taquicardia	>100	80-100	<80
VSG	>30	15-30	<15
Leucocitos (x1000)	>13	10-13	<10
Potasio	<3	3-3,8	>3,8

Puntuación total <11: Brote leve; 16-21: Brote moderado; 20-27: brote grave.

Tabla VIII. Clasificación de Montreal de actividad para la colitis ulcerosa: Gravedad (S).

Gravedad
S0: Colitis en remisión (colitis silente): no hay síntomas de la enfermedad
S1: Colitis leve: 4 o menos deposiciones al día con sangre, sin fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia sin aumento de la VSG
S2: Colitis moderada: criterios intermedios entre leve y grave, siempre con signos de afección sistémica leves
S3: Colitis grave: 6 o más deposiciones diarias con sangre, fiebre (>37,5 °C) o taquicardia (>90lat./min) o anemia (Hb<10,5 g/dl) o aumento de VSG (> 30 mm/h), a menudo con signos de afección (toxicidad) sistémica grave

1.4.2. Índices endoscópicos en la CU

Aunque son sencillos de aplicar y resultan útiles para unificar criterios de interpretación, a diferencia de lo que sucede con la EC, en la CU ninguno está validado. Los índices endoscópicos “puros” más utilizados son los índices de Powell-Tuck (19), Sutherland (20), Sninsky (21) y más recientemente el índice *ulcerative colitis endoscopic index of severity* (22), UCEIS que ha demostrado ser un índice con buen factor pronóstico.

Tabla IX. *Ulcerative colitis endoscopic index of severity.* Índice UCEIS

Descripción	Puntuación	Definición
Patrón vascular	-Normal (1)	Patrón vascular normal con capilares claramente definidos o pérdida leve de los márgenes capilares
	-Pérdida parcial (2)	Pérdida parcial del patrón vascular
	-Perdido (3)	Pérdida completa del patrón vascular
Sangrado	-Ninguno (1)	Sin sangrado visible
	-En mucosa(2)	Restos de sangre coagulada en la superficie de la mucosa que pueden ser fácilmente lavados
	-Luminal leve (3)	Restos de sangre líquida en el lumen
	-Luminal moderado a grave (4)	Sangre evidente en el lumen por delante del endoscopio o sangrado desde la mucosa tras lavar la sangre intraluminal o sangrado claro desde la mucosa hemorrágica
Erosiones y úlceras	-Ninguna (1)	Mucosa normal, sin erosiones ni úlceras visibles
	-Erosiones (2)	Defectos diminutos (<5 mm) en la mucosa, de un color blanco o amarillo y borde plano
	-Úlcera superficial (3)	Lesiones en la mucosa mayores (> 5 mm), consistentes en úlceras cubiertas de fibrina pero siendo superficiales
	-Úlcera profunda (4)	Lesiones profundas excavadas en la mucosa con borde elevado

1.4.3. Índices mixtos en la CU

Se necesitan índices para evaluar la curación o mejoría de la mucosa y aunque no existe un índice validado como se comentó con anterioridad, los índices

más utilizados actualmente son los índices mixtos que combinan parámetros clínicos con parámetros endoscópicos. Entre ellos destacan el Mayo score (23) y el *ulcerative colitis disease activity index*, UCDAI (20). Cada uno de ellos está compuesto de cuatro categorías (sangrado, frecuencia de las deposiciones, evaluación del médico, y apariencia endoscópica) con una calificación de 0 a 3 que se suman para dar una puntuación total que va desde 0 hasta 12.

Los estudios que analizan la concordancia inter-observador de diferentes índices, concluyen que el índice más reproducible con mayor correlación entre endoscopistas es el índice de Mayo (24). Además también se ha estudiado la correlación entre ambos índices siendo ésta excelente (25). También existe la posibilidad de utilidad una puntuación Mayo parcial en la que no se tiene en cuenta la apariencia de la mucosa. Este índice se utiliza cuando no es posible la realización de una colonoscopia.

1.4.4. Índices histológicos en la CU

Aunque en general existe buena correlación entre los índices endoscópicos e histológicos, es frecuente que exista actividad microscópica con enfermedad macroscópica inactiva. Estos índices se basan en la presencia de infiltrado inflamatorio, distorsión arquitectural o presencia de abscesos o úlceras en la muestra estudiada. Los índices más utilizados a este respecto son: índices de Gomes (26), Riley (27) o Hanauer (28).

Tabla X. Índice “Mayo Score”.

Variable	Puntuación
Frecuencia defecatoria	
- Normal	0
-1-2 deposiciones/día más de lo habitual	1
- 3-4 deposiciones/día más de lo habitual	2
- >4 deposiciones/día más de lo habitual	3
Sangrado rectal	
- Ninguno	0
- Hilos hemáticos en heces en menos de la mitad de las deposiciones	1
- Sangrado visible mezclado con las heces en la mayoría de las deposiciones	2
- Rectorragia sin heces	3
Apariencia endoscópica de la mucosa	
- Normal o enfermedad inactiva	0
- Enfermedad leve (eritema, disminución del patrón vascular, friabilidad leve)	1
-Enfermedad moderada (eritema marcado, desaparición patrón vascular, friabilidad, erosiones)	2
-Enfermedad grave (sangrado espontáneo, ulceración)	3
Valoración médica	
- Normal	0
- Leve	1
- Moderado	2
- Grave	3

Tabla XI. Índices histológicos en la colitis ulcerosa.

Gomes	Riley	Hanauer
0= Normal	0= Normal	0= Normal
1= Leve edema e infiltrado en <i>lamina propria</i>	1= Infiltrado inflamatorio leve sin destrucción epitelial	1= Distorsión de las criptas, depleción de moco, aumento de la mitosis epitelial, aumento de la celularidad en la <i>lamina propria</i>
2= Formación de abscesos en las criptas e infiltrado en <i>lamina propria</i>	2 = Infiltrado inflamatorio moderado sin destrucción epitelial	2= Hallazgos de enfermedad inflamatoria intestinal inactiva con úlceras superficiales con o sin criptitas focal
3= Abscesos en las criptas con destrucción de epitelio (ulceración)	3= Marcado infiltrado inflamatorio con leve destrucción epitelial	3= Hallazgos de enfermedad inflamatoria intestinal activa con úlceras más profundas, criptitis y necrosis
	4= Marcado infiltrado inflamatorio con evidente destrucción epitelial	

1.4.5. Índices de actividad clínica en la EC

Dentro de esta modalidad los índices más utilizados son los índices *Crohn's disease activity index* (CDAI) (29) y de Harvey-Bradshaw (30). El primero de ellos se utiliza de forma habitual en los ensayos clínicos, es más complejo y está validado, Incluye 7 variables clínicas y una analítica. La puntuación global obtenida permite discriminar entre distintos estados de gravedad clínica, aunque presenta una elevada subjetividad. Parte de las variables analizadas, requieren lo acontecido en los 7 días previos a la evaluación.

El índice de Harvey-Bradshaw por el contrario, es más sencillo ya que sólo consta de 5 variables. Es debido a esta sencillez que se utiliza de forma frecuente

en la práctica clínica habitual. Tiene en cuenta el estado general, el dolor abdominal, el número de deposiciones líquidas diarias, la presencia de masa abdominal y las posibles complicaciones relacionadas con la enfermedad (artralgias, uveitis, eritema nodoso, aftas orales, pioderma gangrenoso, presencia de fístulas y abscesos perianales y/o abdominales).

El cálculo del índice CDAI está indicado principalmente en pacientes con afectación luminal, es por ello que para pacientes con presencia de enfermedad perianal, se utilicen otros índices distintos. Es el caso del índice *perianal disease activity index* (31), PDAI o *fistula drainage assesment* (32), FDA, ambos no validados.

1.4.6. Índices endoscópicos en la EC

La valoración endoscópica de la EC es más complicada que la CU. Para los casos de afectación cólica existen dos índices principalmente, el índice CDEIS (33) (*Crohn's disease endoscopic index of severity*) y el índice SES-CD (*simplified endoscopic activity score for Crohn's disease*) (34). El CDEIS está validado y consta de 4 variables (úlceras profundas, úlceras superficiales, longitud afecta y superficie ulcerada) en los distintos segmentos explorados. El cálculo de este índice es complejo, por lo que recientemente se ha desarrollado el índice SES-CD, más fácil de aplicar y con buena correlación con el índice CDEIS.

Tabla XII. Cronh's disease activity index. Índice CDAI.

Variables	1 2 3 4 5 6 7	Suma x factor	Subtotal
1. Número de heces líquidas	-----	x 2	=
o muy blandas			
2. Dolor abdominal	-----	x 5	=
(no = 0, leve = 1, moderado = 2, grave = 3)			
3. Estado general	-----	x 7	=
(bueno = 0, regular = 1, malo = 2, muy malo = 3, terrible = 4)			
4. Número de las siguientes 6 manifestaciones clínicas			
<ul style="list-style-type: none"> • Artritis/artralgia/iritis/uveítis • Eritema nudoso/pioderma/aftas • Fisura anal/fístula/absceso • Otras fístulas • Fiebre > 38,5 °C 			
		x 20	=
5. Toma de antidiarreicos		x 30	=
(no = 0, sí = 1)			
6. Masa abdominal		x 10	=
(no = 0, dudosa = 1, sí = 2)			
7. Hematocrito		x 6	=
Hombres (47%) Mujer (42%)			
8. Peso corporal (1-peso/peso estándar)x100		x 1	=
Los apartados 1, 2 y 3 hacen referencia a lo ocurrido al paciente durante los 7 días previos a la consulta			

Tabla XIII. Simple endoscopic score for Crohn's disease. Índice SES-CD.

Variable	Recto	C. izdo	Transverso	C. derecho	Íleon	Total
Presencia y tamaño de las úlceras (de 0 a 3)						
Extensión de superficie ulcerada (de 0 a 3)						
Extensión de superficie afecta (de 0 a 3)						
Presencia y tipo de estenosis (de 0 a 3)						
Total						

Para valorar la recurrencia postquirúrgica se utiliza el índice de Rutgeerts (35).

1.4.7. Índices histológicos en la EC

Pocos son los índices histológicos desarrollados para la EC y ninguno de los existentes está validado. El índice más utilizado es el creado por D'Haens y colaboradores (36).

1.4.8. Marcadores serológicos de inflamación

Además del cálculo de puntuaciones basado en los índices clínicos, endoscópicos e histológicos también es posible determinar la actividad inflamatoria

mediante el análisis de parámetros bioquímicos. La estimulación del sistema inmune en la *lamina propia* presente en los pacientes con estas patologías desencadena una activación de distintos tipos celulares (leucocitos, monocitos, macrófagos,...) que tiene como consecuencia última la producción de moléculas inflamatorias tipo citoquinas. Estas moléculas inducen la síntesis de proteínas y reactantes de fase aguda, cuya determinación reflejan de forma indirecta el grado de inflamación existente (37). Los marcadores biológicos y pronósticos más importantes son:

-Proteína C-reactiva (PCR): una de las proteínas más utilizadas cuya determinación se realiza en suero (38, 39). Esta proteína se sintetiza en condiciones normales en pequeñas cantidades en el hígado, pero tras el estímulo inflamatorio, aumenta su síntesis rápidamente. Debido a que presenta una vida media muy corta, disminuye con celeridad tras la resolución del proceso inflamatorio. Otras proteínas sintetizadas en el hígado dentro de la categoría de reactantes de fase aguda son el orosomucoide (α 1 glucoproteína ácida) y el fibrinógeno que también aparecen elevados en los períodos de actividad de la EII (40).

-Velocidad de sedimentación globular (VSG): la velocidad de sedimentación globular cuantifica la velocidad con la que los hematíes sedimentan en un tubo capilar. La presencia de reactantes de fase aguda aumenta dicha velocidad, aunque la VSG depende también de otros factores como el número y el tamaño de

los hematíes (41). Por este motivo, esta determinación también se ve afectada por la presencia de anemia, hecho que limita a veces su interpretación. Por el contrario, se trata de una determinación cuya realización es sencilla y de coste reducido.

-Calprotectina y lactoferrina: También existen otras proteínas fecales como la calprotectina y la lactoferrina que han demostrado tener una buena correlación con la afectación mucosa (42). La calprotectina está presente en grandes cantidades en el citoplasma de los neutrófilos, su presencia en las heces, por tanto, dará idea de la migración de los neutrófilos al tracto intestinal. Esta proteína es estable en las heces durante largos períodos de tiempo y su determinación tiene una alta especificidad (43). Respecto a la lactoferrina, es una proteína transportadora de hierro que está presente en los neutrófilos activados, es de esta forma también una proteína útil para diagnosticar la EII y determinar el grado de actividad. Al igual que la calprotectina también es estable en heces (43).

Así mismo, la determinación de otros parámetros de laboratorio como son la hemoglobina (HB), el recuento de leucocitos (RL) y el recuento de plaquetas (RP) o los niveles de albúmina pueden dar idea de la intensidad y extensión de la inflamación (37).

1.5. Incidencia y prevalencia de la enfermedad inflamatoria intestinal

Los datos epidemiológicos publicados hasta hace pocos años reflejaban un gradiente norte-sur, con una incidencia de tres a cinco veces más alta en los países del norte de Europa, seguidos de Reino Unido y Norteamérica, respecto al centro y sur de Europa, incluyendo España (44). Sin embargo, estudios más recientes han encontrado que estas diferencias se han igualado hoy en día. La incidencia anual de EC es más alta en Norteamérica, mientras que la incidencia anual de CU es más alta en Europa. Actualmente, se estima que la tasa de incidencia de la CU es de 24,3 por 100,000 personas-año en Europa, 19,2 por 100,000 personas-año en Norteamérica y 6,3 por 100,000 personas-año en Asia (45). Por otro lado, la incidencia de la EC, es de 12,7 por 100,000 personas-año en Europa, 20,2 por 100,000 personas-año en Norteamérica y 5,0 por 100,000 personas-año en Asia (45).

En cuanto a la prevalencia, se ha reportado que las prevalencias más altas de igual forma se encuentran en Europa (CU, 505 por 100,000 personas; EC, 322 por 100,000 personas) y Norteamérica (CU, 249 por 100,000 personas; EC, 319 por 100,000 personas). En otras áreas del mundo las cifras de prevalencia son mucho más bajas. Sin embargo, parece que la EII está emergiendo en países como China, Corea del Sur, India o el Norte de África entre otros, de acuerdo con la industrialización y occidentalización de estos lugares. Este hecho apoya la hipótesis de que el estilo de vida y los factores ambientales son unos factores fundamentales en la etiología de la EII (46).

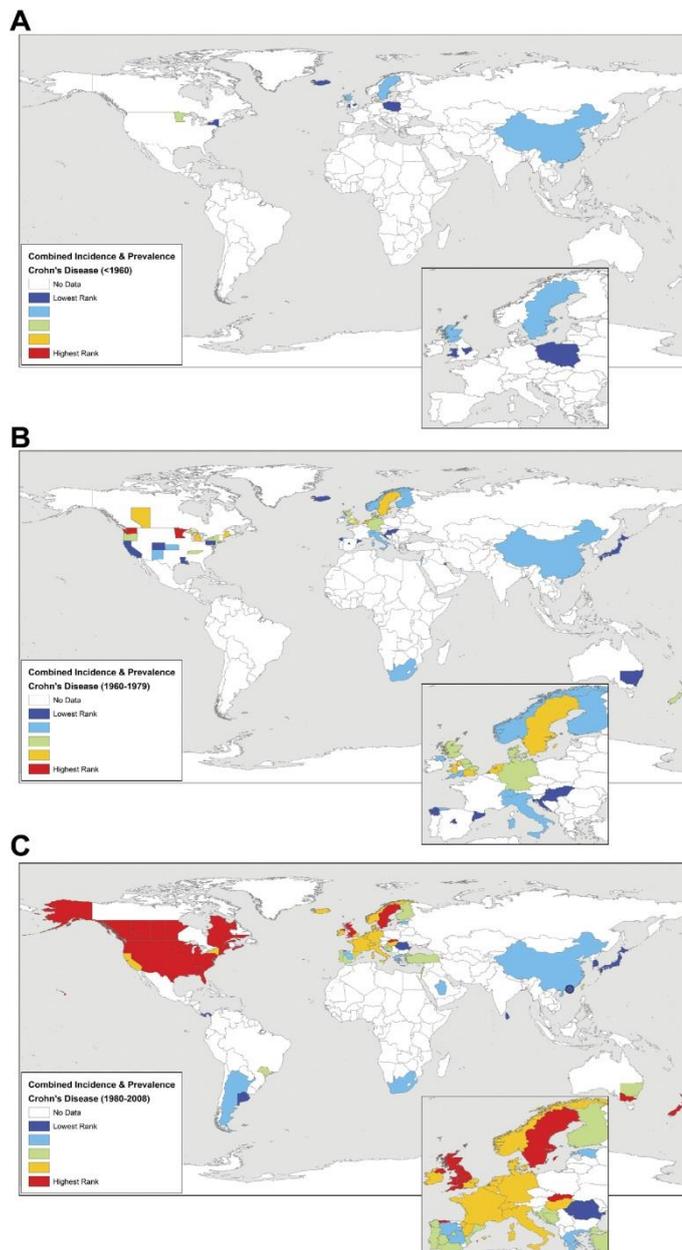


Figura 5. Tasa de incidencia y/o prevalencia de la enfermedad de Crohn en los países que han reportado datos, A) Antes de 1960, B) entre 1960-1979, C) después de 1980.

Fuente: Gastroenterology 2012; 142:46-54.e42 (DOI:10.1053/j.gastro.2011.10.001)

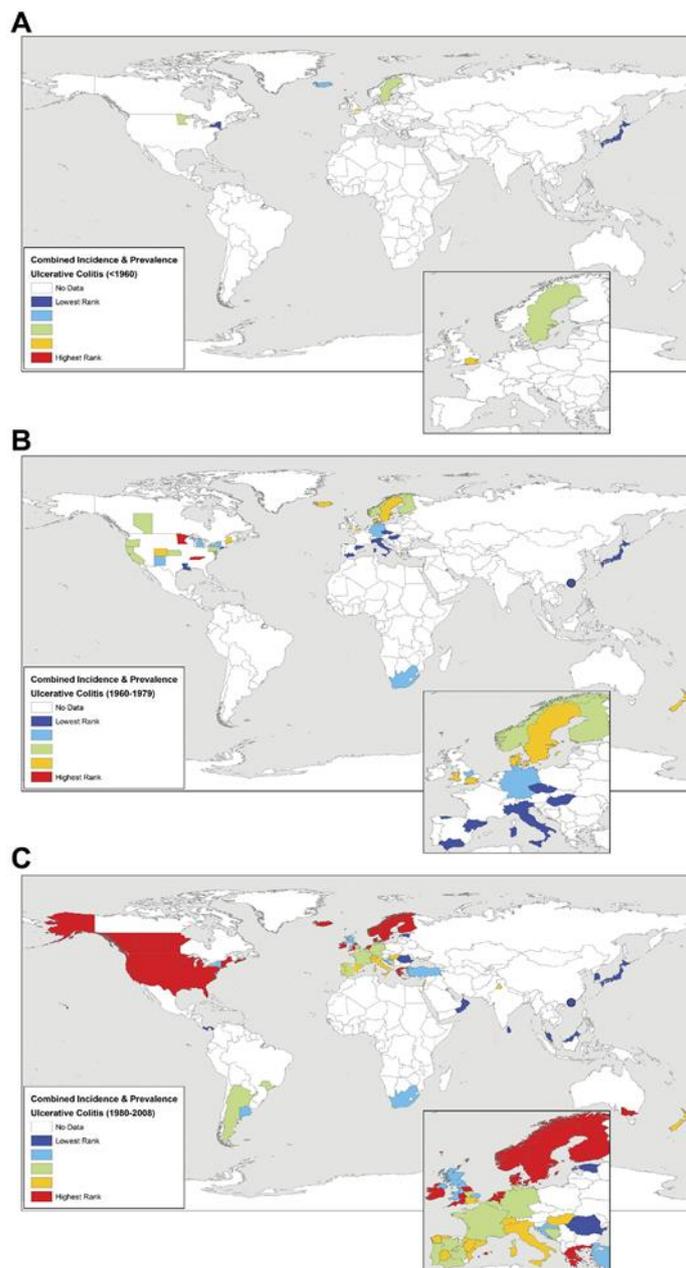


Figura 6. Tasa de incidencia y/o prevalencia de la colitis ulcerosa en los países que han reportado datos, A) Antes de 1960, B) entre 1960-1979, C) después de 1980.

Fuente: Gastroenterology 2012; 142:46-54.e42 (DOI:10.1053/j.gastro.2011.10.001)

Si bien los resultados no son siempre fácilmente comparables por las diferencias metodológicas utilizadas en los diferentes estudios, parece que las incidencias y prevalencias de la EII en los últimos años están aumentando a la vez y en diferentes regiones del mundo, indicando su emergencia como una enfermedad global.

1.6. Etiología y patogenia de la EII

Aunque la etiología de la EII se desconoce, se sabe que ambas enfermedades están relacionadas con una alteración de la respuesta inmune y que están implicados tanto factores hereditarios como ambientales (47, 48).

1.6.1. Factores ambientales

Entre los factores externos posiblemente implicados, se ha estudiado con especial interés los siguientes:

-Tabaco: este factor se comporta de manera totalmente distinta en la CU y la EC, reforzando la hipótesis de que ambas enfermedades son heterogéneas (49). En la CU el tabaco tiene un cierto efecto protector, mientras por el contrario, los pacientes fumadores con EC tienen una peor evolución clínica favoreciendo la aparición de brotes (50).

-Apendicectomía: se ha demostrado que la apendicectomía se comporta como un factor protector para el debut de la CU (51). Sin embargo, los datos no son concluyentes respecto a la EC (52, 53),

-Dieta: cualquier enfermedad del tracto digestivo sugiere una posible relación con los alimentos que se ingieren. Existen estudios que determinan que los pacientes con EII consumen más azúcares e hidrocarburos refinados que la población control pero tampoco existen datos definitivos al respecto (54-56).

-Infecciones: se han estudiado distintas bacterias que podrían tener implicación en el desarrollo de la EII (57). Entre los gérmenes más estudiados destacan: *Escherichia coli*, *Fusobacterium varium*, *Yersinia enterocolítica*, *Clostridium* (58), *Campylobacter*, *Wolinella*, *Mycoplasma*, *Chlamidia*. También destacan las bacterias del género micobacterias como son *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium avium* (59), o *Kansaii* y algunos virus, como herpes virus (60) o citomegalovirus. Hasta la fecha tampoco se ha podido confirmar el papel que tienen estos gérmenes en la EII.

-Anticonceptivos orales: algunos estudios demostraron una asociación entre el uso de anticonceptivos orales y un riesgo de EC superior (61, 62). Por el contrario, en otros estudios llevados a cabo con mujeres en tratamiento postmenopausia con terapia hormonal sustitutiva, éstas tuvieron un riesgo mayor de desarrollar CU (63). Con los datos existentes hasta la fecha, no existe suficiente

evidencia para suspender su uso. La dosis hormonal que contienen los nuevos anticonceptivos es significativamente inferior y no parecen influir en el curso de la EII.

-Antiinflamatorios no esteroideos: se sabe el efecto negativo que los antiinflamatorios no esteroideos tienen en el tracto gastrointestinal provocando lesiones como erosiones, sin embargo, el papel que estos fármacos tiene en la EII permanece en discusión (64, 65). Se ha descrito que el uso de estos antiinflamatorios puede ocasionar brotes de EII.

-Contaminación ambiental: el aumento de partículas en suspensión en la atmósfera está asociado a mayores niveles de leucocitos polimorfonucleares y citoquinas plasmáticas que podrían estar asociados a un mayor riesgo de EII (66, 67). Por el momento son necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis.

-Vitamina D: la deficiencia de vitamina D es bastante común en los pacientes que son diagnosticados de EII, este hecho ha contribuido al diseño de recientes estudios encaminados a esclarecer el papel que su déficit puede tener en el incremento del riesgo de EII (68).

1.6.2. Factores hereditarios

Diversos estudios realizados en gemelos (69, 70) y familias (71, 72) han sugerido la existencia de un componente genético en la EII. En los estudios poblacionales se ha obtenido que aproximadamente entre un 5 y un 10% de los pacientes con EII presentan antecedentes familiares, siendo el riesgo relativo mayor cuando los familiares son de primer grado (73). La agregación es mayor entre los pacientes con EC que entre los pacientes con CU (74).

Analizando el genoma humano se han encontrado multitud de regiones genéticas de interés, hasta la fecha se han identificado más de 100 genes implicados en el desarrollo de la EII. Entre ellos destaca el gen NOD2, actualmente denominado CARD15, el gen ATLG16 o el gen IRGM entre otros (75-77),

1.6.3. Respuesta inmune

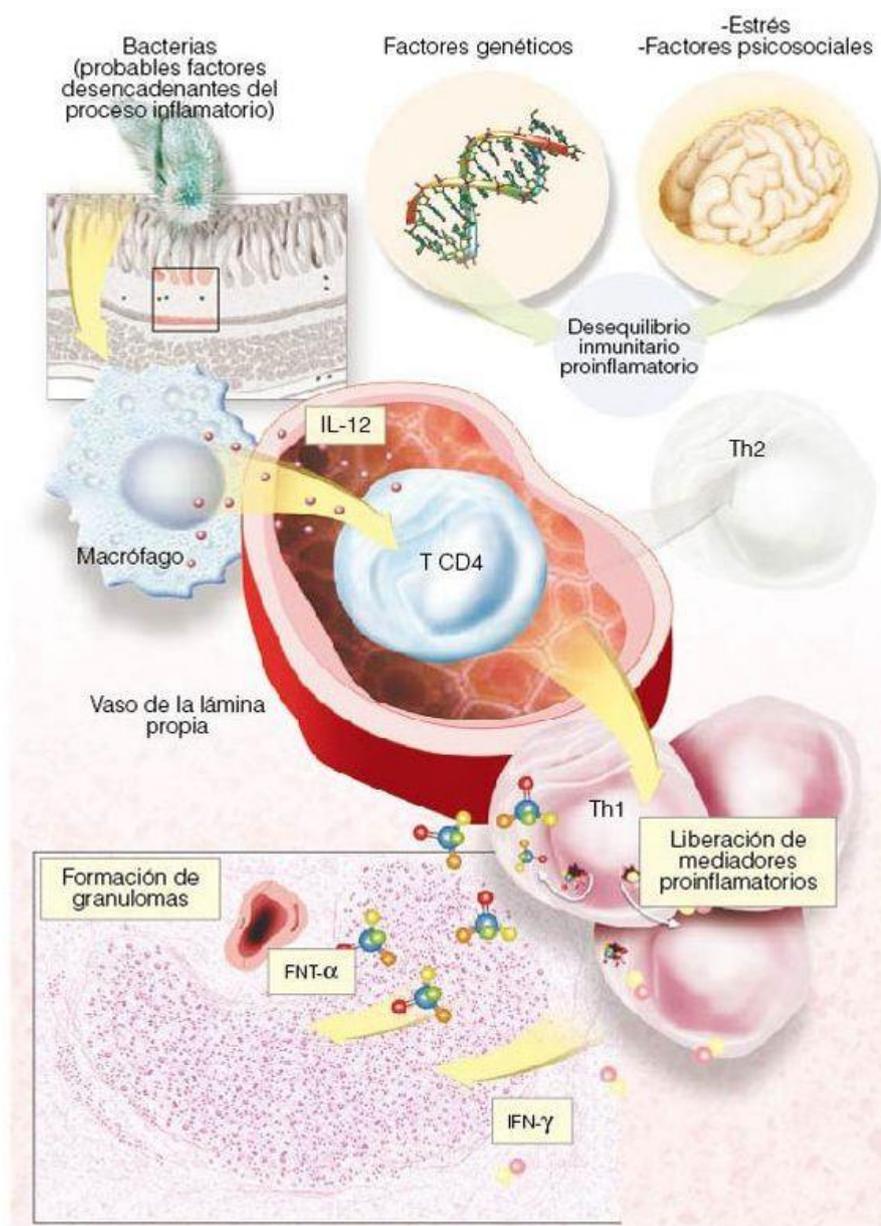
El epitelio del intestino está compuesto de una capa simple de células especializadas encargadas de la absorción de los nutrientes mediante el paso selectivo de moléculas, iones y microorganismos. Es lo que se conoce como barrera epitelial. Dicha barrera además está compuesta por moco superficial producido por células intercaladas entre las células epiteliales, el flujo fecal mantenido por un peristaltismo activo y la secreción de factores protectores del huésped. De este modo, la mucosa intestinal está en contacto permanente con

antígenos derivados tanto de la flora microbiana intestinal como de la dieta ingerida. Es una estimulación continua y masiva que da lugar a un proceso de inflamación fisiológica que tiene como resultado una respuesta inmunológica encaminada a discriminar entre antígenos patógenos que son eliminados y antígenos inofensivos que son tolerados (76, 78). En la EII, la compleja cascada de eventos que dan lugar a esta tolerancia está dañada y acaba generando una respuesta inmune anormal hacia antígenos normalmente tolerados (79). Se produce, por tanto, una compleja respuesta inmunitaria contra antígenos lumbinales, exagerada e incontrolada que está mediada fundamentalmente por linfocitos T que son diferenciados mediante la liberación de factores proinflamatorios que acaban activando a su vez a macrófagos que provocan el daño tisular (80-82). Adicionalmente, también se ha descrito que en estas patologías existe una pérdida de la integridad de la barrera epitelial que tiene consecuencias directas sobre la permeabilidad de dicha estructura (83, 84). Esta alteración de la barrera mucosa-epitelial daría lugar a un flujo no controlado de antígenos que finalmente desencadenaría de forma potencial el inicio o mantenimiento del proceso inflamatorio (85). Estos dos mecanismos responsables de la patogenia de la EII son difíciles, si no imposibles de separar y podrían contribuir de forma conjunta al desarrollo de la enfermedad.

En los últimos años se ha intentado profundizar en el conocimiento no sólo de estos mecanismos, sino también de otros factores distintos a los anteriores que pudieran tener influencia en este proceso inflamatorio anómalo. Entre ellos, el

INTRODUCCIÓN

estudio del desarrollo vascular y, muy especialmente, de la angiogénesis, ha adquirido gran importancia (86, 87).



© 2013 – Licitelco España S.L.

Figura 7. Fisiopatología de la enfermedad de Crohn.

2. ANGIOGÉNESIS

Se denomina angiogénesis al proceso biológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de otros preexistentes.

La vasculatura es el primer órgano que surge durante el desarrollo y asegura la homeostasis metabólica suministrando los nutrientes necesarios a los distintos órganos y recogiendo los productos de desecho derivados del metabolismo celular (88). El desarrollo vascular comienza en la etapa embrionaria con la formación de vasos sanguíneos a partir de células pluripotenciales (vasculogénesis) (89, 90) . De forma paralela a la formación de estos vasos se produce su engrosamiento mediante el proceso de arteriogénesis. La formación de vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes en condiciones fisiológicas, tiene lugar durante el ciclo menstrual, el desarrollo embrionario, la reparación de tejidos y en el desarrollo y crecimiento de huesos (91, 92).

Actualmente se considera que la angiogénesis es un proceso que consta de varias etapas (93-95):

1º) Activación del proceso angiogénico, mayoritariamente por hipoxia.

2º) Degradación de la membrana basal mediada por metaloproteasas.

3º) Proliferación y degradación de las células endoteliales, mediada por integrinas y moléculas de adhesión.

4º) Estabilización de los vasos por reclutamiento de pericitos.

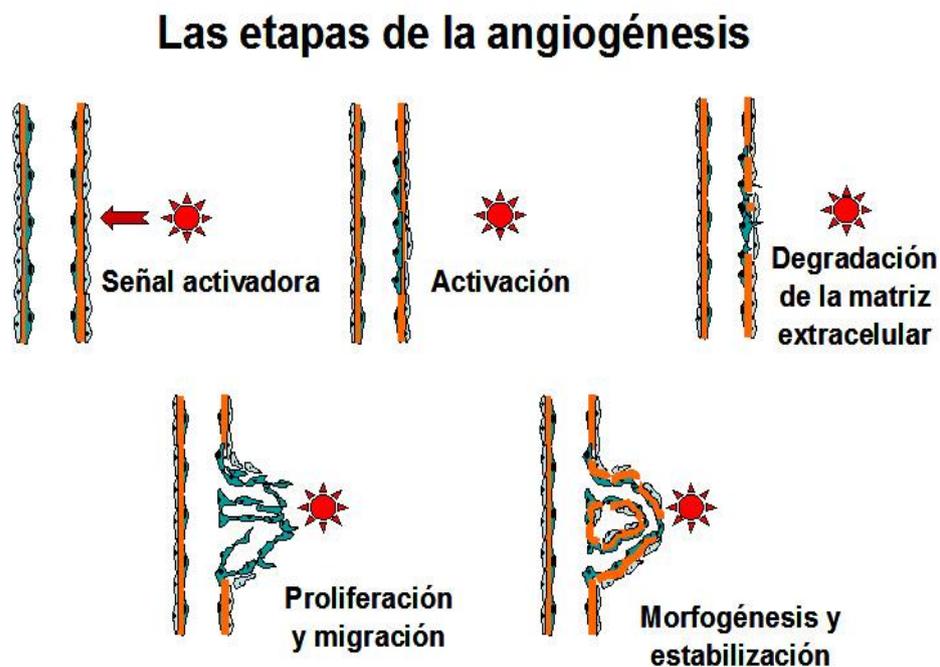


Figura 8. Distintas etapas de la angiogénesis.

Imagen tomada de www.drugdiscovery.es

Tras la estabilización y estructuración de la nueva red de capilares, el equilibrio entre los factores pro y antiangiogénicos volvería a los valores iniciales y

finalizaría la angiogénesis fisiológica (96). Sin embargo, en la angiogénesis patológica el nivel de los mediadores proangiogénicos seguiría elevado y persistiría la formación de nuevos vasos (96, 97). Se ha comprobado que en enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide o el asma se produce una alteración de la angiogénesis, posiblemente relacionada con este desequilibrio (98, 99). El proceso de angiogénesis, también está implicado en el crecimiento tumoral y la diseminación de metástasis o en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares, psoriasis o degeneración macular (87, 100-103).

2.1. Factores angiogénicos

Entre los mediadores implicados en este proceso destacan los miembros de la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (104, 105). Intervienen en todos los procesos del desarrollo vascular (vasculogénesis, angiogénesis y linfangiogénesis) y se han identificado diversos miembros con propiedades relacionadas con la angiogénesis (106):

1, *Vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A). Conocido genéricamente como VEGF, es el principal mediador angiogénico. Su expresión está regulada por hipoxia y se secreta como homodímero. El procesamiento (*splicing*) alternativo de su ARN mensajero da lugar a distintas isoformas que se diferencian en su afinidad por la heparina. Se une a los receptores *vascular endothelial growth factor receptor*

INTRODUCCIÓN

1 (VEGFR-1) y *vascular endothelial growth factor receptor 2* (VEGFR-2) y desencadena respuestas relacionadas con la supervivencia, anti-apoptosis, proliferación, migración, regulación génica, expresión de proteínas, permeabilidad y vasodilatación. El sistema VEGF-A/VEGFR-2 tiene un importante papel en el proceso de señalización linfangiogénico (107). Varios estudios han demostrado que juega un papel esencial en varios órganos adultos como el intestino delgado, páncreas, tiroides, riñón e hígado. Además promueve la formación de médula ósea, la reparación tisular o la maduración del ovario (108).

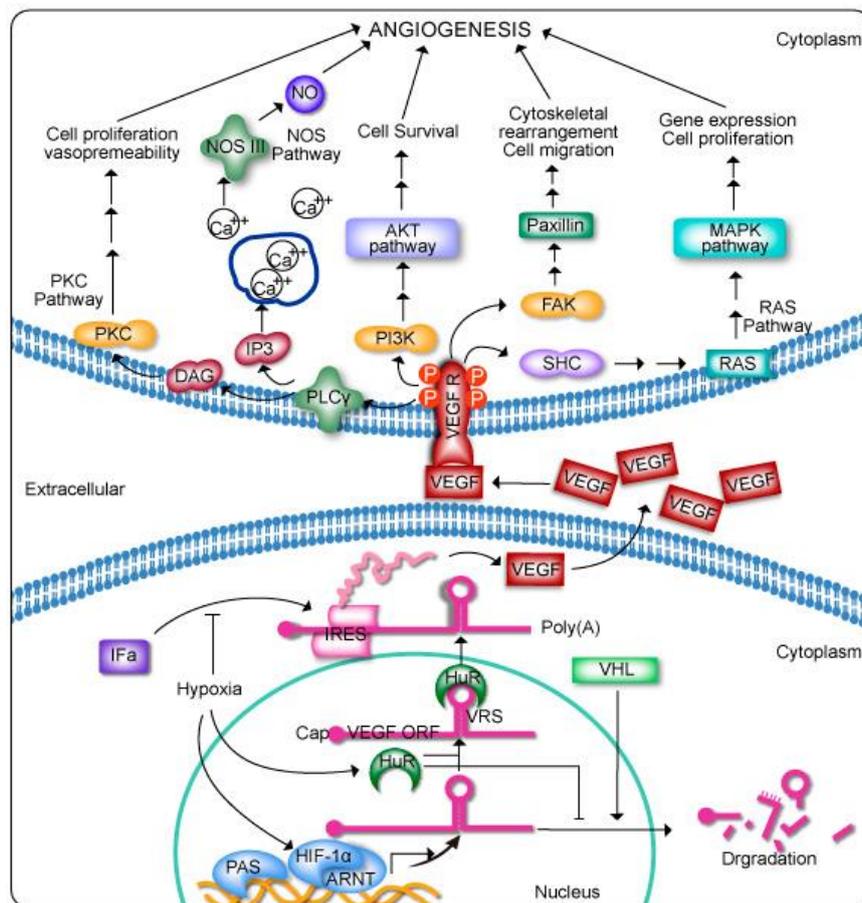


Figura 9. Activación del proceso angiogénico mediado por el factor de crecimiento endotelial A.

Imagen tomada de www.genecopoeia.com

2. *Vascular endothelial growth factor* (VEGF-B). Su expresión no está regulada por hipoxia. Se une a VEGFR-1 y al correceptor neuropilina1 (109). Activa al plasminógeno (110). Este factor ha sido presentado tradicionalmente como un factor con funciones proangiogénicas, aunque estudios recientes han desvelado que en determinadas circunstancias puede actuar como inhibidor del crecimiento tumoral o la angiogénesis (111, 112). Es más, modelos animales han demostrado que se trata más bien de un factor de supervivencia de múltiples células (113), incluyendo las células del endotelio vascular, los pericitos, células del músculo liso (114), múltiples tipos de neuronas (115) y micocitos cardiacos (116) que de un factor angiogénico clásico.

3. *Placenta growth factor* (PlGF). Se expresa predominantemente en placenta, corazón y pulmón, se sintetiza en forma de homodímeros que se unen al receptor VEGFR-1 y a neuropilina-1 y llevan a cabo funciones relacionadas con angiogénesis, extravasación plasmática e inflamación mediante la diferenciación, proliferación y migración de las células endoteliales (117). Además, tiene un efecto quimiotáctico sobre los monocitos, induciendo la acumulación de macrófagos. Por su parte, esta infiltración de macrófagos podría contribuir a la sobreexpresión de VEGF-A (117). También se ha descrito que participa activamente en diversas patologías neoplásicas y en el proceso de arteriogénesis (118, 119). Existen 4 isoformas identificadas, que se diferencian en su afinidad a la heparina.

4. VEGFR-1. Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular 1, También conocido como Flt-1, es un receptor tipo tirosin quinasa. Fue el primer receptor de VEGF-A identificado y tiene un papel crítico en las etapas tardías del desarrollo embrionario en la diferenciación y mantenimiento de los vasos sanguíneos (120). Aunque se expresa mayormente en células endoteliales, también aparece en osteoblastos, monocitos/macrófagos, pericitos, trofoblastos de la placenta, células renales e incluso en algunas células precursoras hematopoyéticas (121). Normalmente tiene una regulación negativa sobre el receptor VEGFR-2 aunque puede formar heterodímeros con él, dando lugar a un complejo con mayores efectos sobre la angiogénesis y regula la migración de monocitos durante el proceso inflamatorio. VEGF-A, VEGF-B y PlGF son sus ligandos. Existe una forma soluble del receptor que consiste en la parte extracelular menos el séptimo dominio tipo inmunoglobulina que ha sido relacionada con el mantenimiento de la avascularidad corneal o la preeclampsia (122-124). Existen fármacos utilizados para el tratamiento del cáncer cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de este y otros receptores angiogénicos, es el caso de los medicamentos sunitinib o sorafenib que han sido desarrollados para su uso clínico.

5. VEGFR-2. Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular 2. Es el receptor mayoritario de VEGF-A en las células endoteliales. Este receptor tipo tirosin quinasa, se une a VEGF-A con una afinidad 10 veces menor que VEGFR-1. También se une al *vascular endothelial growth factor C* (VEGF-C) y *vascular endothelial growth factor D* (VEGF-D), inhibiendo el proceso linfangiogénico de éstos al impedir su unión al receptor *vascular endothelial growth factor receptor 3*

(VEGFR-3) (125). De igual forma que sucede con VEGFR-1, existe una forma soluble que es el resultado de un *splicing* alternativo que está presente en piel, corazón, ovario, riñón y plasma. La estimulación de este receptor da lugar a la activación de diversas vías (RAS/RAF/ERK/MAPK) (126, 127) que tienen como resultado la regulación de la angiogénesis y un aumento de la permeabilidad vascular y supervivencia de las células endoteliales (128, 129). La actividad de VEGFR-2 se ve modificada con la interacción con ciertas integrinas. Es el caso de la integrina $\alpha\beta3$ imprescindible para el reclutamiento de actina y vinculina necesario para la migración de las células endoteliales, o las integrinas $\alpha5\beta1$ o $\alpha9\beta1$ entre otras (130) .

6. Receptores de neuropilinas. Proteínas transmembrana que actúan como correceptores de VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3. El receptor de neuropilina 1 actúa como correceptor para VEGFR-1 y VEGFR -2, mientras del receptor de neuropilina 2 lo hace para el VEGFR-3. La expresión del receptor de neuropilina 1 se correlaciona con el crecimiento, la angiogénesis y el grado de invasión tumoral (131).

Otros mediadores muy importantes en el desarrollo vascular, no pertenecientes a la familia de VEGF-A son las angiopoyetinas -1 y -2 (Ang-1 y Ang-2), ligandos para el *endothelium specific-receptor tyrosine kinase* (receptor Tie-2). Estos son mediadores de gran importancia en vasculogénesis y angiogénesis.

7. Ang-1. Se expresa de forma constitutiva por varios tipos celulares, como son los pericitos, fibroblastos y algunas células tumorales. Actúa como regulador de la maduración de los vasos sanguíneos aumentando el tamaño del lumen y reclutando células periendotheliales (132). También tiene propiedades antiinflamatorias y juega un papel crucial al mediar las interacciones recíprocas entre el endotelio y la matriz extracelular (133). Su estimulación en células endoteliales linfáticas o LEC (lymphatic endothelial cells) conduce a la regulación al alza de VEGFR-3, lo que indica que también interviene indirectamente de la vía VEGF-C/VEGFR-3 (134).

8. Ang-2. Proteína producida mayoritariamente por las células endoteliales y los pericitos. Es especialmente responsable de la iniciación de la angiogénesis y es necesaria para la formación normal de la vasculatura linfática. Dependiendo de la interacción con otros factores angiogénicos, esta glucoproteína puede ejercer una acción pro- o antiangiogénica (135). Por ejemplo en ausencia de VEGF-A contribuye a la regresión vascular, mientras en su presencia estimula la angiogénesis (136). En líneas generales se acepta que su sobreexpresión desestabiliza la vasculatura, Ang-2 actúa como inhibidor competitivo de Ang-1, debido a que ambas proteínas se une al receptor, pero sólo la unión de Ang-1 llega a activarlo.

9. Receptor Tie-2. Receptor tipo tirosin quinasa expresado principalmente en células endoteliales y células precursoras hematopoyéticas (137). Se ha sugerido

que este receptor tiene un papel fundamental en la maduración y el mantenimiento de la estructura vascular tras la unión de las angiopoyetinas (138). El bloqueo de esta vía en modelos animales reduce la vascularización y crecimiento del tumor (139).

Otros factores angiogénicos: También se han identificado otros factores angiogénicos como el receptor del crecimiento fibroblástico 3 (FGFR-3), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento hepatocitario (HGF) o las integrinas $\alpha 9\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$ (140).

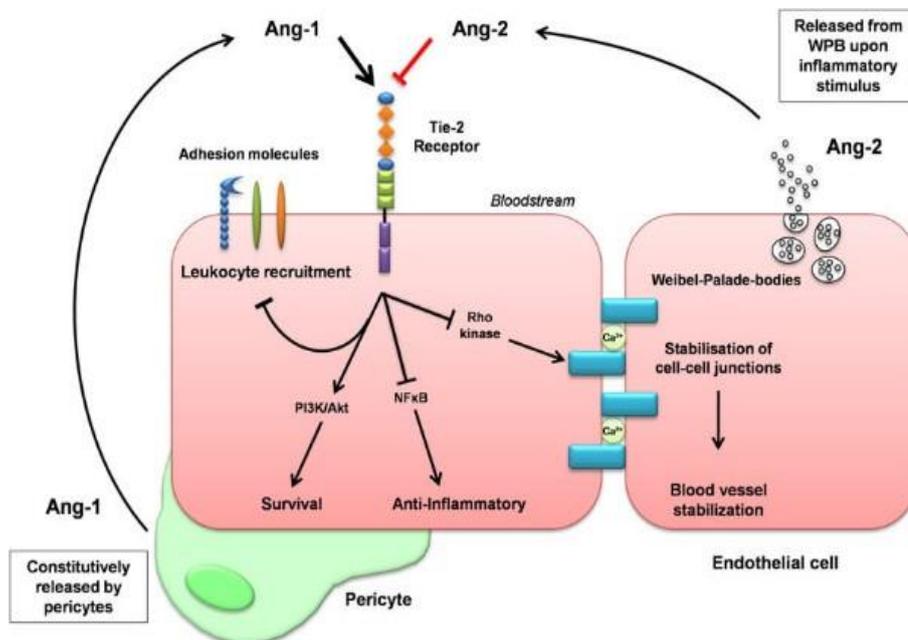


Figura 10. Mecanismo de acción de las angiopoyetinas -1 y -2.

Imagen tomada de www.lookfordiagnosis.com

3. LINFANGIOGÉNESIS

Se denomina linfangiogénesis a la formación de nuevos vasos linfáticos. El sistema linfático está compuesto por una compleja red que contiene capilares linfáticos, vasos colectores y órganos inmunes secundarios especializados. La linfangiogénesis se puede producir, bien a partir de vasos sanguíneos, o bien a partir de vasos linfáticos preexistentes y es un proceso muy dinámico durante la embriogénesis (141). En el adulto, está normalmente ausente en condiciones fisiológicas y sólo tiene lugar en condiciones patológicas como la inflamación (en respuesta a la liberación de mediadores inflamatorios), la reparación tisular, el crecimiento tumoral o el linfedema (142-144). Aunque normalmente la angiogénesis y la linfangiogénesis juegan un papel concomitante en la inflamación crónica a través de múltiples tipos celulares y mediadores, los vasos linfáticos y su relación con la EII no han recibido tanta atención como los sanguíneos y los mecanismos que regulan su desarrollo y crecimiento no se conocen con detalle.

El sistema linfático gastrointestinal, que abarca una red de vasos capilares, es esencial para la regulación del volumen del líquido tisular, la función inmune, y el transporte de nutrientes grasos (145). Al contrario de lo que sucede con los vasos sanguíneos que están presentes en todos los niveles de la mucosa, los vasos linfáticos del colon, en condiciones normales, están limitados a la capa submucosa e inmediatamente adyacente a la *muscularis mucosa* con algunas ramificaciones a través de ella, y raramente llegan hasta la parte basal de las

criptas cólicas (146). En estados patológicos pueden llegar a identificarse vasos linfáticos dentro de la *lamina propria* y algunos estudios incluso han asociado la densidad de estos vasos en dicha capa con el grado de actividad de la CU (147).

El descubrimiento de marcadores endoteliales linfáticos ha facilitado el análisis detallado, tanto de la naturaleza y organización estructural de los vasos linfáticos, como de la linfangiogénesis. Es el caso del factor de transcripción Prox-1, considerado como el marcador más específico para el endotelio linfático (148) o la podoplanina, el receptor-1 hialurónico endotelial de vasos linfáticos (LYVE-1) o el marcador D 2-40 (149-151).

3.1. Factores linfangiogénicos

Los factores linfangiogénicos más importantes identificados hasta este momento son el receptor-3 de VEGF (VEGFR-3), VEGF-C y VEGF-D (152, 153).

1. VEGF-C. Se une con gran afinidad al receptor VEGFR-3 y neuropilina 2 (relacionado con la linfangiogénesis) y, con menor afinidad, a VEGFR-2 (función angiogénica). VEGF-C estimula la migración de células endoteliales e incrementa la permeabilidad vascular (154). La concentración de esta proteína aparece elevada en varios tipos de tumores y es un factor de mal pronóstico (155, 156).

2. VEGF-D. Al igual que VEGF-C, está relacionado con la linfangiogénesis mediante la unión al receptor VEGFR-3 aunque también puede llevar a cabo funciones angiogénicas a través del receptor VEGFR-2. También al igual que VEGF-C, tiene funciones muy relevantes durante el crecimiento del tumor y es considerado una diana terapéutica para controlar la metástasis (157, 158). La función de esta proteína está mediada por el factor de transcripción SOX-18 (159).

3. VEGFR-3. Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular 3. También llamado Flt4. Receptor tirosin quinasa al que se unen las formas VEGF-C y VEGF-D. Este receptor forma tanto homodímeros como heterodímeros con VEGFR-2. Tiene un papel crítico en la función linfoendotelial aunque es también expresado en células endoteliales vasculares, osteoblastos, progenitores neuronales y macrófagos (160-162). Su papel en las células tumorales está todavía siendo debatido (163). Este receptor también puede interactuar con integrinas (164).

4. Receptor de neuropilinas 2: actúa como co-receptor para VEGFR-3. Ratones deficientes en esta proteína muestran un desarrollo vascular deficiente con un patrón anómalo y una marcada reducción de vasos linfáticos pequeños y capilares (165).

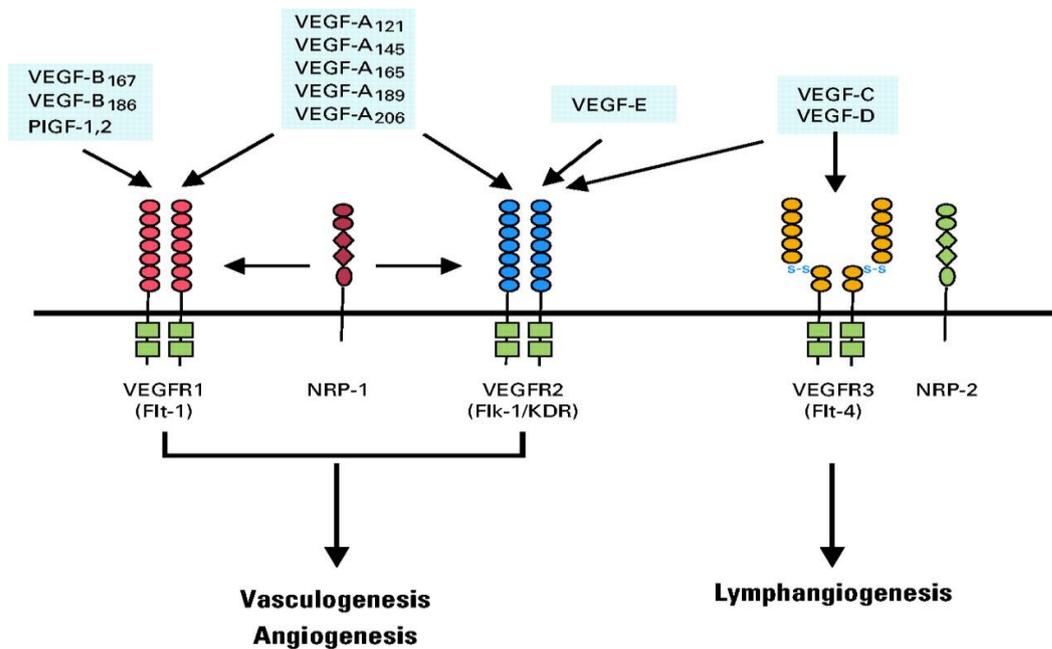


Figura 11. Unión específica de varios miembros de la familia del factor de crecimiento vascular a sus receptores correspondientes.

Imagen tomada de: jco.ascopubs.org.

4. ANGIOGÉNESIS, LINFANGIOGÉNESIS Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Existen pocos estudios que hayan investigado la distribución y densidad de los vasos linfáticos y sanguíneos en relación con la enfermedad. Según algunos estudios, en la CU los vasos linfáticos se extienden incluso a la *lamina propria* (147, 166) y la submucosa. Al comparar entre EC y CU, algunos autores han observado que el número medio de vasos linfáticos en la EC es considerablemente más alto que en la CU y otros procesos inflamatorios (167), mientras que otros no encuentran diferencias significativas (168). Por el contrario, estudios recientes

describen que los pacientes con CU tienen una densidad linfática mayor que los pacientes con EC y que éstos a su vez poseen una densidad mayor que los controles sanos (169). Además, los mismos autores han observado que una disminución de la densidad linfática está asociada con un riesgo mayor de recurrencia postquirúrgica en pacientes con EC (170-172).

La densidad de capilares sanguíneos y linfáticos se ha correlacionado con la expresión de factores de crecimiento angiogénico y linfangiogénico. En cáncer de esófago se ha observado una asociación entre la expresión en tejido afecto de VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, Ang-1 y Ang-2 y la densidad capilar (173). Estudios en otro tipo de tumores sobre correlación entre expresión génica y proteica de VEGF-A y C y angiogénesis y linfangiogénesis han mostrado datos variables (174).

A la vista de los datos anteriores y de los resultados observados en otras patologías inflamatorias (175-177) es probable que las alteraciones de los procesos de angiogénesis o linfangiogénesis tengan una influencia decisiva en la patogenia de la EC y de la CU. Los estudios realizados hasta ahora se han centrado en la expresión individual de algunos factores de crecimiento en mucosa afectada de pacientes con EII activa y la correlación con sus niveles en sangre. La distinción entre el proceso angiogénico y linfangiogénico ha comenzado a estudiarse a nivel local, sin la necesaria correlación con los niveles de los factores de crecimiento, y principalmente en cáncer.

5. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL, TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF- α)

A diferencia de lo que ocurre en algunos procesos tumorales, actualmente no existe ningún fármaco aprobado para modular específicamente los fenómenos de angiogénesis / linfangiogénesis en la EII. Sin embargo, existen varias terapias biológicas que han demostrado su eficacia, tanto en la inducción como en el mantenimiento de la EII. Entre ellas destacan los anticuerpos monoclonales humanos adalimumab (ADA) e infliximab (IFX), que ejercen su acción sobre el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

Los mecanismos inmunológicos propuestos para ambos agentes inmunoterapéuticos *in vivo* incluyen la rápida formación de complejos estables con el TNF- α humano. Además, regulan a la baja a las citoquinas de la mucosa Th1 y reducen la expresión de IFN- γ y de otras moléculas proinflamatorias, tales como las moléculas de adhesión responsables de la migración leucocitaria (ELAM-1, VCAM-1, e ICAM-1) y la interleuquina 6 (IL-6) sérica y PCR (178-181).

Disponemos de escasos estudios previos en los que se ha evaluado el efecto de IFX en la expresión de los niveles de VEGF-A en tejido de pacientes con psoriasis (182), artritis psoriásica (183) y en suero de pacientes con artritis reumatoide (184). Sólo dos estudios previos han analizado los niveles en suero de

VEGF-A en pacientes con EC tratados con IFX (185, 186). No se ha encontrado ningún estudio similar realizado con ADA en pacientes con EII.

En CU existe un estudio donde se ha observado una disminución de la expresión de VEGF-A y un aumento del crecimiento microvascular, en pacientes con baja sensibilidad a la terapia con esteroides (187). En EC se ha publicado un estudio donde el IFX parece mediar en la inhibición de la inflamación intestinal (188). Salvo estos estudios, exclusivos de VEGF-A, no existe ningún otro que haya determinado los niveles de factores angiogénicos en sangre con el objetivo de estudiar el grado de modulación que dichos fármacos puedan tener en estos factores circulantes.

Hipótesis

HIPÓTESIS

La hipótesis principal de este estudio es que los pacientes con EII tienen una regulación anómala de los procesos angiogénicos y linfangiogénicos. Una formación de vasos sanguíneos alterada permitiría una continua migración leucocitaria a la mucosa afecta perpetuando y manteniendo la respuesta inflamatoria que es una parte integral de la patogenia de la EII. Los niveles séricos de algunos de estos factores además podrían tener valor pronóstico de actividad y tener relación con el grado de afectación de la mucosa ayudando a conocer la actividad real del paciente sin la necesidad de pruebas invasivas como una colonoscopia.

Si una angiogénesis y una linfangiogénesis patológicas están implicadas en esta enfermedad, los fármacos más potentes utilizados actualmente para el control de la misma, como son los fármacos biológicos, IFX y ADA, también podrían mediar su eficacia mediante un efecto en las concentraciones de estos FAL.

Objetivos

OBJETIVOS

La finalidad del presente proyecto de investigación es el estudio conjunto y exhaustivo de los principales mecanismos implicados en los procesos de angiogénesis y linfangiogénesis en la mucosa intestinal y en sangre de pacientes con EII, mediante la determinación de los principales factores angiogénicos y linfangigénicos (FAL) en suero y sobrenadante de mucosa intestinal (SMI). Además, se pretende investigar en una segunda fase del estudio, el efecto de los fármacos anti-TNF- α sobre los FAL.

Los objetivos de este estudio son los siguientes:

1. Comparar los niveles de VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PIGF, Ang-1, Ang-2 y Tie-2 en pacientes con EII y sujetos controles.
2. Evaluar y comparar los niveles de los principales FAL (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PIGF, Ang-1, Ang-2 y Tie2) en muestras de suero y SMI de pacientes con EII activa y quiescente.

OBJETIVOS

3. Correlacionar los niveles de VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PIGF, Ang-1, Ang-2 y Tie-2 en suero y SMI con la actividad clínica, endoscópica e histológica de la EII.

4. Correlacionar los niveles de VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PIGF, Ang-1, Ang-2 y Tie-2 en suero y SMI con los siguientes reactantes de fase aguda: RL, HB, PCR, RP y VSG.

5. Evaluar los niveles circulantes de VEGF-A, PIGF, Ang-1, Ang-2 y Tie-2 en pacientes con EII que son tratados con anti-TNF- α , determinar sus potenciales cambios durante el tratamiento con IFX y ADA y la influencia que éstos tienen en la efectividad del tratamiento.

Pacientes y Métodos

PACIENTES Y MÉTODOS

1. PACIENTES

1.1. Período de estudio

Este trabajo se realizó en el seno de un equipo multidisciplinario dedicado a la atención de pacientes diagnosticados de EII del Servicio de Digestivo del Hospital Universitario de Fuenlabrada con la colaboración de los servicios de Digestivo del Hospital Universitario de La Princesa de Madrid y el Hospital de Sabadell (Institut Parc Taulí) de Barcelona. Los pacientes que forman parte del estudio fueron incluidos durante el período comprendido entre 2008 y 2011. El seguimiento de los pacientes en los que se determinó el efecto de los tratamientos IFX y ADA sobre los FAL se realizó hasta 2012.

1.2. Población de estudio

Se trata de un estudio prospectivo tipo casos y controles. La población de estudio se dividió en dos grupos diferenciados según se detalla a continuación:

- En la primera fase del estudio se incluyeron los pacientes que acudían a la realización de una colonoscopia por criterio médico al Servicio de Digestivo del Hospital Universitario de Fuenlabrada. Esta primera población objeto de nuestro estudio se compuso de un total de 100 pacientes, 28 sujetos controles sin EII que acudían a la realización de la prueba por antecedentes de cáncer de colon pero que no presentaban síntomas digestivos de interés y 72 pacientes con EII (37 pacientes con CU y 35 pacientes con EC).

- En una segunda fase del estudio se incluyeron 37 pacientes con EII distintos a los pacientes de la fase anterior, que iniciaban tratamiento con los fármacos biológicos IFX o ADA procedentes de tres hospitales españoles [Hospital Universitario de La Princesa de Madrid, el Hospital de Sabadell (Institut Parc Taulí) de Barcelona y el Hospital Universitario de Fuenlabrada]. Dentro de este sub-estudio también se incluyó un grupo control de 40 voluntarios sin EII.

En ambos estudios la EII fue diagnosticada por los criterios clínicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos habituales (3) y la localización de la misma fue establecida de acuerdo a la Clasificación de Montreal (13). La forma de inclusión en el estudio fue consecutiva.

Se obtuvo el consentimiento informado debidamente firmado y fechado por todos los participantes, que tras leer la hoja de información, accedieron a participar. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de ética e investigación

del Hospital Universitario de Fuenlabrada y por los comités de ética de los otros dos centros colaboradores.

Fueron excluidos de este estudio pacientes sin diagnóstico bien definido de CU o EC (en el caso del grupo de pacientes con EII), pacientes con cáncer, trastornos coronarios relevantes, mujeres embarazadas o en período de lactancia, pacientes menores de edad o pacientes que a juicio del investigador presentasen alguna patología o condición que impidiese el correcto seguimiento del paciente en el estudio. También se excluyeron pacientes con cirugías importantes en los meses previos a la inclusión en el estudio.

En la segunda fase del estudio sólo se incluyeron pacientes con actividad clínica en el momento del comienzo del tratamiento anti-TNF- α y se consideró criterio de exclusión el uso previo de alguno de estos fármacos biológicos.

2. MÉTODOS

2.1. Metodología en la primera fase del estudio

Todos aquellos pacientes con EC o CU o pacientes sanos que acudieron al Servicio de Digestivo del Hospital de Fuenlabrada para la realización de una colonoscopia durante el período especificado y cumplían los criterios de inclusión fueron informados del estudio antes de la realización de la prueba. De todos aquellos que aceptaron participar y firmaron el consentimiento se obtuvieron las siguientes muestras:

-Muestras de tejido de la mucosa intestinal para la determinación de FAL en SMI.

-Una muestra de sangre para la determinación de FAL en suero.

-Biopsias de mucosa intestinal para un análisis histológico de la muestra.

Los pacientes con EII fueron clasificados en EC o CU activa o quiescente por criterios clínicos, endoscópicos e histológicos que se detallarán más adelante en el texto.

2.1.1. Cultivo de biopsias intestinales para la determinación de factores angiogénicos y linfangiogénicos en sobrenadante de mucosa intestinal

La obtención de las biopsias de la mucosa intestinal de los pacientes incluidos en alguno de los grupos muestrales fue distinta en función del tipo y la localización de la EII y se realizó como se detalla a continuación:

1. Pacientes con CU activa sometidos a rectoscopia: se tomaron 3 muestras de zona afectada y 3 muestras de zona no afectada si la localización de la enfermedad así lo permitió. Si no fue así, se tomaron 4-5 muestras de la zona afectada.

2. Pacientes con CU activa sometidos a colonoscopia completa: 3 muestras de zona no inflamada y 3 muestras de zona inflamada, alcanzándose la zona más lejana de afectación.

3. Pacientes con CU quiescentes o EC cólica inactiva o pacientes sanos: se tomaron 4-5 muestras del colon pasada la unión rectosigmoidea (sobre 25 cm).

4. Pacientes con EC cólica activa sometidos a rectoscopia/colonoscopia: debido a la distribución discontinua de la enfermedad, se tomaron 4-5 muestras de

zona con inflamación. La toma de muestras se realizó de la misma forma que para la CU activa en el caso de haber encontrado alguna zona sana.

Una vez obtenidas las biopsias, éstas fueron introducidas inmediatamente en tubos falcon de 15 ml que contenían el medio de cultivo: Complete Media (*Roswell Park Memorial Institute medium*, RPMI suplementado con suero fetal bovino (10%), ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazineetanesulfónico, mezcla de antibióticos y antifúngicos). Dichos tubos fueron almacenados seguidamente a 4°C, durante 3- 4 horas, en agitación renovando el medio cada 45 min-1 h para reducir el contenido bacteriano de la muestra.

Una vez finalizada esta incubación las biopsias pasaron a sembrarse sobre *inserts* con un tamaño de poro de 0,4 µm que fueron introducidos en placas de 6 pocillos que contenían 2,4 ml del medio mencionado anteriormente. Se dejó incubar durante 24 horas a 37°C y 5 % de CO₂. Pasado este tiempo se procedía a separar el *insert* de la placa, las biopsias eran extraídas del mismo y pesadas y el SMI era recogido y separado en alícuotas de 200 µl y congelado a – 70 ° C hasta su posterior análisis por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).



Figura 12. Placa de 6 pocillos con sus correspondientes *inserts*. Extracción del *insert* de la placa tras el cultivo

Imágenes tomadas de: spanish.alibaba.com y www.nature.com

La finalidad del *insert* es permitir el paso de nutrientes del medio de cultivo a las biopsias y el paso de productos producidos por las biopsias (citoquinas, factores de crecimiento, etc,,,) hacia el medio, sin permitir el paso de bacterias ,células o detritus a través del mismo.

2.1.2. Muestras de sangre para la determinación de factores angiogénicos y linfangiogénicos en suero

Se obtuvieron 10 ml de sangre venosa periférica en 2 tubos de suero con gel separador de 5 ml cada uno de ellos de los pacientes participantes. La muestra se consiguió aprovechando la vía puesta para la administración de sedación si la prueba requería sedación. Una vez obtenida la muestra, ésta se dejó coagular durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente y después se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos. El suero resultante tras la centrifugación fue

almacenado en alícuotas a -70°C hasta su posterior procesamiento por la técnica ELISA.

2.1.3. Determinación cuantitativa de los niveles de factores angiogénicos y linfangiogénicos en muestras de suero y sobrenadante de tejido

Los niveles de VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PlGF, Ang-1, Ang-2 y Tie-2 fueron determinados en suero y SMI mediante la técnica cuantitativa de enzimoimmunoensayo en sándwich, que se basa en la reacción antígeno-conjugado. El principio del ensayo consiste en la generación de un producto con color que permite medir indirectamente la unión del antígeno y el anticuerpo.

El ensayo consta de las siguientes fases esenciales:

- Los estándares y las muestras son pipeteados e incubados dentro de pocillos que contienen un anticuerpo monoclonal (anticuerpo primario) específico para la proteína que se está analizando prefijado a la microplaca. En esta fase del ensayo cada molécula de la sustancia a estudio presente en el medio se une de forma específica al anticuerpo inmovilizado.

- Lavado de la placa, de forma que las moléculas que no se han unido de forma específica al anticuerpo son eliminadas.

- Posteriormente se añade al pocillo un anticuerpo policlonal (anticuerpo secundario) unido a una enzima también específico para la proteína que se está estudiando. Se realiza la segunda incubación.

- Nuevo lavado de la placa para eliminar las moléculas no unidas.

- Adición de una solución substrato cromogénica capaz de desarrollar color tras su unión a la enzima asociada al anticuerpo secundario. La generación del color es proporcional a la cantidad de proteína unida en el paso inicial.

- Por último, la reacción colorimétrica se para con la adición de una solución stop (ácido sulfúrico) y la intensidad del color es medida mediante espectrofotometría.

Para la realización de esta técnica se contó con los Kits de ELISA apropiados para cada mediador de los laboratorios R & D Systems (Human Quantikine) y se utilizaron los anticuerpos suministrados junto al mismo kit comercial.

ELISA

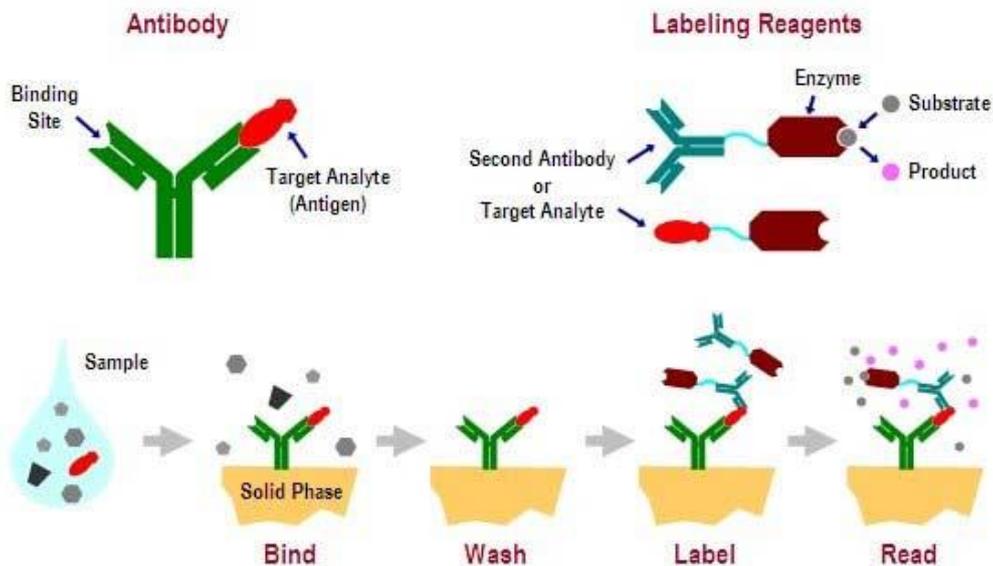


Figura 13. Fundamento enzimoimmunoensayo indirecto tipo sándwich.

Imagen tomada de: thefutureofthings.com

2.1.4. Biopsias para el análisis histológico

Las biopsias obtenidas para el análisis histológico fueron obtenidas de las mismas áreas que las biopsias para la determinación de FAL en SMI (consultar apartado 2,1,1). Una vez obtenida la muestra, ésta fue fijada inmediatamente en paraformaldehído y enviada al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Fuenlabrada para su examen histológico.

2.1.5. Determinación de la actividad endoscópica de la EII

Gastroenterólogos experimentados fueron los encargados de la realización de las endoscopias en el Servicio de Digestivo del Hospital de Fuenlabrada. Durante el desarrollo de la prueba el facultativo valoró los hallazgos endoscópicos de acuerdo al índice Mayo *subscore* endoscópico para la CU (ver apartado 1.4.3. “Índices mixtos en la CU”) (23) y el índice SES-CD para la EC, ver apartado 1.4.6. “Índices endoscópicos en la EC”) (34).

Una puntuación de 0 en el índice Mayo *subscore* endoscópico se consideró como enfermedad inactiva, 1 como actividad leve, 2 como actividad moderada y 3 como grave.

Respecto a la actividad endoscópica de la EC, una puntuación SES-CD entre 0 y 2 sugirió enfermedad inactiva en el colon y el íleon terminal, sin embargo una puntuación entre 3 y 6 fue considerada actividad leve, entre 7 y 15 actividad moderada y una puntuación mayor a 16 se consideró actividad endoscópica grave.

2.1.6. Determinación de la actividad histológica de la EII

Todas las muestras fueron sometidas a un examen histológico por parte de facultativos especializados del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Fuenlabrada.

Los hallazgos histológicos en los pacientes con CU fueron evaluados mediante el índice de Riley (27). Se tuvieron en cuenta 6 características de la CU: infiltrado celular inflamatorio agudo (células polimorfonucleares en la *lamina propria*), abscesos crípticos, depleción de mucina, integridad de la superficie epitelial, infiltrado celular inflamatorio crónico (células inflamatorias en la lámina propia) e irregularidades arquitecturales de las criptas, Cada variable fue puntuada en una escala que iba desde la puntuación 0 a la 3.

En los pacientes con EC, la actividad histológica fue determinada de acuerdo a la escala de alteraciones de la mucosa desarrollada por D'Haens et al (36). La puntuación histológica total fue la suma de las siguientes variables: daño epitelial [sin daño (puntuación=0), daño local (puntuación=1) o daño extenso (puntuación=2)], cambios arquitecturales [sin cambios (puntuación=0), alteraciones moderadas (puntuación=1) o alteraciones graves (puntuación=2)], infiltración de células polimorfonucleares en lámina propia [normal (puntuación=0), incremento moderado (puntuación=1), incremento grave (puntuación=2), células polimorfonucleares en el epitelio [en la superficie del epitelio (puntuación=1), criptitis (puntuación=2) y abscesos crípticos (puntuación=3), presencia de erosiones y/o úlceras y presencia de granulomas [ambas puntuadas como sí (puntuación=1) o no (puntuación=0) y el número de biopsias afectadas [ninguna (puntuación=0), <33% (puntuación=1) y entre 33-66% (puntuación=2)].

2.1.7. Determinación clínica de la EII

La actividad clínica de la CU y la EC fue establecida mediante el índice Mayo y el índice CDAI respectivamente (ver apartados 1.4.3. y 1.4.5. “Índices mixtos de la CU” e “Índices clínicos de la EC”, respectivamente) (23, 29).

Se consideró CU inactiva una puntuación en el índice Mayo \leq a 2, actividad leve de 3 a 5, actividad moderada de 6 a 10 y una puntuación entre 10 y 12 se consideró actividad grave.

Una puntuación inferior a 150 puntos en el índice CDAI indicó enfermedad quiescente, 150-250 actividad leve, 251-350 actividad moderada, y una puntuación $>$ a 350, actividad clínica grave.

2.1.8. Determinación de reactantes de fase aguda

Los siguientes reactantes de fase aguda fueron determinados de forma rutinaria antes de la colonoscopia: RL, HB, PCR, RP y VSG.

Tabla XIV. Reactantes de fase aguda determinados en la muestras de suero y su correspondiente rango normal.

Variable	Rango normal
Leucocitos	4,0-11,0 10 ⁹ /l
Hemoglobina	13,0-17,3 g/dl
Proteína C reactiva	< 5 mg/l
Plaquetas	140-450 10 ⁹ /l
VSG	< 15 mm/h

2.1.9. Análisis estadístico

Para las variables categóricas se calcularon frecuencias y porcentajes, Respecto a las variables cuantitativas, los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar.

El test de Kolmogorov-Smirnov fue utilizado para evaluar la normalidad de las variables continuas.

La comparación entre variables cuantitativas y variables categóricas de dos grupos fue realizada mediante el test de Student o el test U-Mann-Whitney cuando la variable no siguió una distribución normal.

Las comparaciones entre variables cuantitativas y cualitativas con tres o más categorías fueron efectuadas a través del test del análisis de la varianza (*analysis of variance*, ANOVA) o mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Para analizar la relación entre dos variables cuantitativas se utilizó el cálculo de coeficiente de correlación de Pearson cuando las variables siguieron distribución gaussiana o el coeficiente de correlación de Spearman cuando no lo hicieron.

Los análisis de concordancia se realizan mediante el coeficiente Kappa (κ).

Para evaluar la precisión con la que cada factor angiogénico o linfangiogénico puede predecir la presencia de actividad clínica, endoscópica e histológica se utilizó el análisis de las curvas ROC.

En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error tipo I o error α menor a 0,05.

El paquete informático utilizado para el análisis fue el programa SPSS para Windows versión 15,0.

2.2. Metodología segunda parte del estudio

En esta fase del estudio se incluyeron de forma consecutiva a pacientes con EII que iniciaban tratamiento con IFX o ADA en los hospitales de Fuenlabrada, La Princesa y ParcTaulí. De cada paciente se obtuvo una muestra de sangre antes de cada una de las tres primeras dosis del tratamiento. Así mismo, también se incluyó un grupo de 40 pacientes controles sanos de los que se obtuvo una única muestra de sangre. En dichas muestras se determinaron los niveles de las proteínas VEGF-A, PlGF, Ang-1, Ang-2 y Tie-2.

El tratamiento biológico se administró de acuerdo a la dosis estándar en el grupo de pacientes con EII. Tres dosis de inducción de IFX a 5 mg/kg intravenoso en las semanas 0, 2 y 6, seguido de un tratamiento de mantenimiento con la misma dosis anterior (5 mg/kg intravenoso) cada 8 semanas.

En el caso de ADA la inducción se hizo en la semana 0 y 2 con dosis de 160/80 mg subcutáneo, seguido de una terapia de mantenimiento que consistió en 40 mg subcutáneos cada dos semanas.

Aquellos pacientes que habían sido tratados previamente con un fármaco biológico no fueron considerados para el presente estudio.

2.2.1. Determinación de la actividad clínica

Sólo pacientes con EII con actividad clínica confirmada en el momento del inicio del tratamiento con fármacos biológicos fueron incluidos en este estudio, Dicha actividad se determinó mediante el cálculo CDAI para los pacientes con EC y el índice Truelove-Witts modificado para aquellos con CU (15, 29). Estas determinaciones se realizaron en varios momentos durante el estudio, semana 0 (visita basal), 2, 4 (en el caso de ADA) ó 6 (en el caso de IFX) y una última determinación en la semana 14 tras el comienzo de la terapia anti-TNF- α y coincidiendo con el inicio del tratamiento de mantenimiento.

Una puntuación CDAI inferior a 150 indicó EC quiescente, de 150 a 250, enfermedad con actividad leve, 251-350, enfermedad moderada y mayor a 350, enfermedad grave.

En cuanto al índice Truelove-Witts modificado, se consideró una puntuación <11 como CU quiescente, de 11 a 15, enfermedad leve, de 16 a 21 enfermedad moderada y una puntuación entre 22 y 27 como enfermedad con actividad clínica grave.

2.2.2. Determinación de la respuesta y/o remisión de los pacientes con EII tratados con fármacos anti-TNF- α

Se definió remisión clínica como una disminución de la puntuación del índice Truelove-witts modificado a valores inferiores a 11 en los pacientes con CU. En el caso de la EC, se consideró este supuesto cuando la puntuación del índice CDAI fue inferior a 150.

Por otro lado, se consideró respuesta una disminución de al menos 5 puntos en el índice Truelove-Witts modificado respecto a los valores basales (189) o una disminución de al menos 70 puntos en el CDAI en pacientes con EC (190, 191).

Estas variables se determinaron antes de la tercera dosis de tratamiento y en la semana 14.

2.2.3. Procesamiento de las muestras de sangre

Cuatro muestras de sangre de 10 ml cada una de ellas fueron tomadas de cada uno de los pacientes con EII en cuatro momentos distintos a lo largo del tratamiento biológico.

En los pacientes que siguieron tratamiento con IFX se obtuvieron muestras en las semanas 0, 2, 6 y 14, Mientras que en los pacientes tratados con ADA, las muestras se tomaron en la semana 0,2, 4 y 14.

En el grupo control se obtuvo una única muestra de 10 ml.

Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente al menos 30 min para permitir su coagulación y fueron posteriormente centrifugadas a 3500 rpm durante 10 minutos. Una vez obtenido el suero, éste fue congelado a -70°C hasta su posterior análisis.

2.2.4. Determinación de los niveles de VEGF-A, PIGF, Ang-1, Ang-2 y Tie-2 en suero

Los niveles de los factores angiogénicos VEGF-A, PIGF, Ang-1, Ang-2 y Tie-2 fueron determinados en suero mediante la técnica de enzimoimmunoensayo ELISA tipo sándwich (ver apartado 2.1.3) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se contó con los Kits de ELISA apropiados para cada mediador de los laboratorios R & D Systems (Human Quantikine) y se utilizaron los anticuerpos suministrados junto al mismo kit comercial.

2.2.5. Análisis estadístico segunda parte del estudio

Se determinaron las frecuencias y los porcentajes para las variables categóricas.

El test de Kolmogorov-Smirnov se utilizó para determinar si una variable continua seguía una distribución normal.

Los valores séricos de los factores angiogénicos estudiados fueron expresados como media \pm desviación estándar.

Los test para muestras no pareadas t-Student o U-Mann-Whitney (en el caso de que la variable no siguiese una distribución normal) fueron utilizados para establecer las posibles diferencias existentes en los niveles de los factores angiogénicos estudiados en pacientes con EII y controles.

La comparación entre los niveles de proteínas angiogénicas antes y después de las distintas dosis del tratamiento anti-TNF- α se realizó mediante el test de t-Student de muestras pareadas.

Los análisis de la varianza de una vía (test ANOVA) o en su defecto los test de Kruskal-Wallis (test no paramétrico para muestras que no siguen una distribución normal) fueron empleados para calcular las diferencias entre variables continuas y variables categóricas de tres o más categorías.

Para analizar la relación existente entre las distintas proteínas angiogénicas y los índices de actividad clínicos, se utilizaron los coeficientes de correlación de Pearson (variables con distribución gaussiana) o Spearman (variables con distribución no gaussiana).

El ABC también fue calculado para determinar los niveles basales de cada proteína capaces de predecir la eficacia del tratamiento con anti-TNF- α .

Valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados (1)

RESULTADOS (1)

1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN EN LA PRIMERA FASE DEL ESTUDIO

1.1. Características basales de los pacientes con EII sometidos a colonoscopia

La cohorte de pacientes con EII estudiada comprendió un total de 72 sujetos, 37 pacientes con CU (51%) y 35 pacientes con EC (49%). La edad media de este grupo fue 42 ± 12 años, 42 mujeres (58%) y 20 fumadores (28 %).

1.1.1 Características basales de los pacientes con EC

Este grupo estuvo compuesto por 21 mujeres (60%) y 14 varones; 18 eran fumadores (51%), 7 pacientes (20%) tenían antecedentes familiares de EII y 10 (29%) con manifestaciones extraintestinales asociadas. El tiempo medio de duración de la EC fue de $7,6 \pm 4,6$ años. El diagnóstico de la EC, fue entre los 17 y 40 años en el 80% de los casos, 1 paciente fue diagnosticado antes de los 16 años y 6 después de los 40.

RESULTADOS (1)

Respecto a la localización de la enfermedad, 8 pacientes (23%) tenía afectación ileal, 9 cólica (26%), 16 ileocólica (46%) y 2 pacientes tuvieron afectación del tracto digestivo alto (uno de ellos junto a afectación ileocólica y el otro con afectación cólica adicional). En cuanto al comportamiento de la EC según la clasificación de Montreal, éste fue inflamatorio en la mayoría de los casos (n=28; 80%, 10 pacientes con enfermedad perianal asociada), fistulizante en 6 pacientes (17%, dos de ellos con enfermedad perianal), y sólo 1 paciente tuvo fenotipo estenosante.

Respecto al tratamiento de la EII, el 26% de los pacientes no tomaban ninguna medicación en el momento del estudio, 46% estaban en tratamiento con inmunomoduladores para el control de su enfermedad y 29% estaban siendo tratados con fármacos biológicos.

Todas estas características basales aparecen representadas en la Tabla XV.

Tabla XV. Características de los pacientes con enfermedad de Crohn estudiados.

Pacientes con EC (N=35)	
Género	
• Femenino	21 (60)
• Masculino	14 (40)
Edad (años): media \pm desviación estándar	38 \pm 9

Tabaco	
• Fumadores	18 (51)
• Exfumadores	6 (17)
• No fumadores	11 (31)
Antecedente familiar de EC	
• Sí	7 (20)
• No	28 (80)
Manifestaciones extraintestinales	
• Ninguna	25 (71)
• Reumatológicas	6 (17)
• Mucocutáneas	3 (9)
• Reumatológicas + mucocutáneas	1 (3)
Duración de la EC (años): media ± desviación estándar	7,6 ± 4,6
Edad al diagnóstico de la EC	
• A1 (≤16)	1 (3)
• A2 (17-40)	28 (80)
• A3 (>40)	6 (17)
Localización de la EC	
• L1 (ileal)	8 (23)
• L2 (cólica)	9 (26)
• L3 (ileocólica)	16 (46)
• L3+ L4 (tracto digestivo alto) /L2+L4	1 (3) /1 (3)
Comportamiento de la EC	
• B1 (inflamatorio)	18 (51)
• B2 (estenosante)	1 (3)
• B3 (fistulizante)	4 (11)
• B1+ enfermedad perianal	10 (29)
• B3+ enfermedad perianal	2 (6)
Medicación en el momento de la endoscopia	
• Sin medicación	9 (26)
• 5-ASA	6 (17)
• Corticoides orales	2 (6)
• Azatioprina/mercaptopurina	16 (46)
• Fármacos anti-TNF-α	10 (29)

1.1.2 Características basales de los pacientes con CU

Esta cohorte estuvo compuesta por 21 mujeres (57%) y 16 varones, con sólo 2 pacientes fumadores (5%), 8 casos (22%) con antecedentes familiares de EII y 11 (20%) con manifestaciones extraintestinales asociadas. El tiempo medio de duración de la CU fue de $11,5 \pm 9,7$ años.

Respecto a la localización de la enfermedad según la clasificación de Montreal, 27 pacientes (73%) tenía una colitis izquierda, 8 (22%) tenía afectación extensa y 2 proctitis (5%).

En lo referente al tratamiento de la CU, una gran parte de los pacientes estaban en tratamiento con mesalazina (82%), 8 pacientes estaban en tratamiento con corticoides orales en el momento de la colonoscopia y 6 lo estaban con un inmunosupresor. Sólo 2 pacientes estaban en tratamiento con fármacos biológicos y 2 no realizaban ningún tratamiento para su enfermedad intestinal.

Todas estas características basales aparecen representadas en la Tabla XVI.

Tabla XVI. Características clínicas y demográficas de los pacientes con colitis ulcerosa estudiados.

Pacientes con CU (N=37)	
Género	
• Femenino	21 (57)
• Masculino	16 (43)
Edad (años): media ± desviación estándar	
46 ± 13	
Tabaco	
• Fumadores	2 (5)
• Exfumadores	17 (46)
• No fumadores	18 (49)
Antecedente familiar de CU	
• Sí	8 (22)
• No	29 (78)
Manifestaciones extraintestinales	
• Ninguna	30 (80)
• Reumatológicas	4 (11)
• Mucocutáneas	1 (3)
• Reumatológicas + mucocutáneas	1 (3)
• Otras manifestaciones	1 (3)
Duración de la CU (años): media ± desviación estándar	
11,5 ± 9,7	
Extensión de la CU	
• Proctitis	2 (5)
• Colitis izquierda	27 (73)
• Pancolitis	8 (22)
Medicación en el momento de la endoscopia	
• Sin medicación	2 (5)
• 5-ASA	31 (84)
• Corticoides orales	8 (22)
• Azatioprina/mercaptopurina	6 (16)
• Fármacos anti-TNF- α	2 (5)

1.2. Características basales de los controles sanos

El grupo control estuvo compuesto por 28 sujetos sanos que acudieron a la realización de una colonoscopia al Servicio de Digestivo del Hospital de Fuenlabrada. El 64% (n=18) fueron mujeres, 35% (n=8) fumadores y la edad media de este grupo fue de 47±6 años (Tabla XVII).

Tabla XVII. Características clínicas y demográficas de los sujetos controles.

Controles (N=28)	
Género	
• Femenino	18 (64)
• Masculino	10 (36)
Edad (años): media ± desviación estándar	47 ± 6
Tabaco	
• Fumadores	8 (35)
• Exfumadores	2 (9)
• No fumadores	13 (56)

2. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES EN SUERO DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS SOLUBLES EN PACIENTES CON ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL Y CONTROLES

Los pacientes con EII fueron clasificados en 4 grupos de acuerdo a criterios clínicos y endoscópicos: pacientes con CU activa (n=21), pacientes con CU quiescente (n=16), pacientes con EC activa (n=16) y pacientes con EC inactiva (n=19) en colon (todos ellos con una puntuación CDAI <150). Los niveles en suero de VEGF-A fueron más elevados en pacientes con CU activa que en pacientes con CU sin actividad (589 ± 383 pg/ml vs. 328 ± 230 pg/ml, $p<0,05$). Comparados con los controles, las concentraciones en suero de VEGFR-3 y Ang-1 fueron significativamente más altas en pacientes con CU activa ($31,8\pm 14$ vs. $24,0\pm 10,5$ ng/ml, $p<0,05$ y $55,7\pm 10,6$ vs. $44,0\pm 16,3$ ng/ml, $p<0,01$, respectivamente). Con respecto a la EC, los pacientes con EC activa tuvieron niveles significativamente más altos de Ang1 que los controles ($61,7\pm 22,8$ vs. $44,0\pm 13$ ng/ml, $p<0,01$). Los pacientes con CU activa o quiescente ($29,7\pm 7,7$ y $28,5\pm 7$ ng/ml, respectivamente) tuvieron niveles significativamente más altos de Tie-2 que los controles ($23,9\pm 5,0$ ng/ml $p<0,05$). Lo mismo sucedió con los pacientes con EC, éstos tuvieron igualmente niveles más altos de Tie-2 que los sujetos controles, independientemente de la presencia de actividad o no ($28,6\pm 6,1$ y $27,6\pm 7,1$ ng/ml, respectivamente vs. $23,9\pm 5$ ng/ml $p<0,05$). No se encontraron otras diferencias en suero para el resto de proteínas estudiadas (Tabla XVIII).

3. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES EN SOBRENADANTE DE TEJIDO DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS SOLUBLES EN PACIENTES CON ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL Y CONTROLES

Al igual que en el apartado anterior los pacientes con EI fueron clasificados en los mismos 4 grupos (CU activa, CU quiescente, EC activa y EC inactiva en colon) de acuerdo a criterios clínicos y endoscópicos. Respecto a los controles, todos los FAL estudiados a excepción de VEGFR-3 estuvieron elevados en pacientes con enfermedad activa ($p < 0,05$) (Tabla XIX). La misma tendencia cercana a la significación estadística, fue observada para los niveles de VEGFR-2 en pacientes con EC activa ($p = 0,054$). Los niveles de los FAL en pacientes con enfermedad quiescente fueron similares a los niveles en los pacientes controles, no encontrándose diferencias significativas a este respecto (Tabla XIX), a excepción de los niveles de Ang-2, que fueron más bajos en pacientes con EC inactiva en colon que los controles ($17,6 \pm 6,6$ vs. $21,5 \pm 6,1$ pg/ml por mg de tejido, $p < 0,01$).

4. CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES EN SUERO Y SOBRENADANTE DE MUCOSA INTESTINAL DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS Y LINFANGIOGÉNICOS

Hubo una correlación positiva entre los niveles en suero de VEGF-D ($r = 0,25$), VEGFR-3 ($r = 0,48$) y Tie-2 ($r = 0,36$) y sus correspondientes concentraciones en SMI ($p < 0,05$). Esta correlación fue negativa para PIGF ($r = -0,45$;

$p < 0,05$). No se encontraron más asociaciones entre suero y SMI para el resto de FAL estudiados.

Tabla XVIII. Concentraciones séricas de los factores angiogénicos y linfangiogénicos en controles y pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa quiescente.

	Controles	CUA	CUQ	ECA	ECQ
VEGF	458±272	589±382 [#]	328±230	570±488	411±298
PIGF	15,8±8	15,4±9,5	13,5±7,6	12,6±4,9	16,3±12,3
VEGF-C	12,0±3,3	13,4±4,5	11,8±2,5	13,6±5,0	11,8±4,4
VEGF-D	673±341	748±568	602±234	749±399	614±361
VEGFR-1	181±56	201±43,2	174±52,9	154±50,2	177±59,2
VEGFR-2	12,4±2,5	12,0±2,4	12,7±2,7	10,8±2,6	12,3±2,8
VEGFR-3	24,0±10,5	31,8±14*	24,6±7,9	20,8±9,0	26,5±12,26
Ang-1	44,0±16,3	55,7±10,6*	49,2±13	61,7±22,8*	50,7±16,5
Ang-2	2,6±0,9	3,0±1,2	2,7±0,7	3,3±2,1	3,1±1,0
Tie-2	23,9±5,0	29,7±7,7*	28,5±7,0*	28,6±6,1*	27,6±7,1*

Las concentraciones de VEGF-A, PIGF, VEGF-D y VEGFR-1 son expresadas en pg/ml, el resto de proteínas en ng/ml. Abreviaturas: CUA, pacientes con colitis ulcerosa activa; CUQ, pacientes con colitis ulcerosa quiescente; ECA, pacientes con enfermedad de Crohn activa; ECQ, pacientes con enfermedad de Crohn quiescente, *Diferencias significativas respecto a los controles ($p < 0,05$). #Diferencias significativas comparado con los pacientes en remisión ($p < 0,05$).

RESULTADOS (1)

Tabla XIX. Concentraciones en sobrenadante de tejido intestinal de los factores angiogénicos y linfangiogénicos en controles y pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa activa y quiescente.

	Controles	CUA	CUQ	ECA	ECQ
VEGF-A	10,7±5,5	20,2±9,5*	12,1±6,1	19,8±12,1*#	8,9±3,9
PIGF	0,9±0,5	1,9±0,8*#	1,1±0,6	2,1±1,1*#	0,7±0,6
VEGF-C	15,7±5,8	26,6±13,5*#	17±6,1	25,2±10,6*#	13,2±5,8
VEGF-D	3,7±1,8	6,4±3,7*#	4,3±2,2	6,4±3,2*#	3,1±2
VEGFR-1	5,5±2,4	14,7±9,1*#	5,8±3,5	12,5±6,2*#	6,3±4,5
VEGFR-2	1,2±0,8	2,7±2,3*	1,1±0,6	1,7±0,9#	1±0,6
VEGFR-3	200±93,8	238±103	170±97,2	206±98,8	170,1±89,9
Ang-1	8,4±2,4	14±5,9*#	8,2±2,7	12,1±4,9*#	7,9±2,9
Ang-2	21,5±6,1	35,6±17,3*#	19,8±8,2	33,5±13,5*#	17,6±6,6*
Tie-2	6,8±2,3	15,6±9,4*#	7,7±3,2	15,2±5,9*#	7,2±3,9

Las concentraciones de VEGF-A, PIGF, VEGF-D y VEGFR-1 son expresadas en pg/ml, el resto de proteínas en ng/ml, Abreviaturas: CUA, pacientes con colitis ulcerosa activa; CUQ, pacientes con colitis ulcerosa quiescente; ECA, pacientes con enfermedad de Crohn activa; ECQ, pacientes con enfermedad de Crohn quiescente. *Diferencias significativas respecto a los controles ($p < 0,05$). #Diferencias significativas comparado con los pacientes en remisión ($p < 0,05$).

5. LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS Y LINFANGIOGÉNICOS Y LA ACTIVIDAD CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Los pacientes fueron clasificados en distintos rangos de actividad clínica en función de las puntuaciones de los índices CDAI y Mayo. De acuerdo a estos índices, el 19% de los pacientes tuvieron actividad leve (n=14); un 24 % actividad moderada (n=17) y un 57% no tenían actividad.

De nuevo, a excepción de VEGFR-3, los niveles de todas las proteínas estudiadas en SMI fueron significativamente diferentes en función de la presencia o no de actividad clínica. Estos niveles fueron mayores en pacientes con actividad clínica respecto a los que no la tenían (Figura 14 y 15).

En las determinaciones en suero, VEGF-A, VEGF-C y Ang-1 fueron mayores en pacientes con actividad clínica que en aquellos sin ella (VEGF-A: 592 ± 447 vs. 395 ± 274 pg/ml, $p=0,02$; VEGF-C: $13,9 \pm 4,8$ vs. $11,8 \pm 3,5$ pg/ml, $p=0,03$ and Ang-1: $58,7 \pm 17,6$ vs. $50,8 \pm 14,5$ ng/ml, $p=0,04$).

Los niveles en SMI de todos los FA, excepto VEGFR-2 y VEGFR-3, correlacionaron significativamente con la actividad de la EC, que fue determinada basándose en el índice CDAI ($p < 0,05$). Respecto a los niveles en suero, VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 correlacionaron negativamente con la actividad de la EC. En

RESULTADOS (1)

los pacientes con CU, se encontró una correlación positiva entre los niveles de VEGF-A, VEGFR-1, PIGF, Ang-1, Ang-2 y Tie-2 en SMI y la actividad según el índice Mayo. Los coeficientes de correlación para estos análisis fueron en todos los casos más bajos que los obtenidos con respecto al índice CDAI. Los niveles séricos de VEGF-A y VEGF-C también correlacionaron significativamente con la puntuación Mayo (Tabla XX).

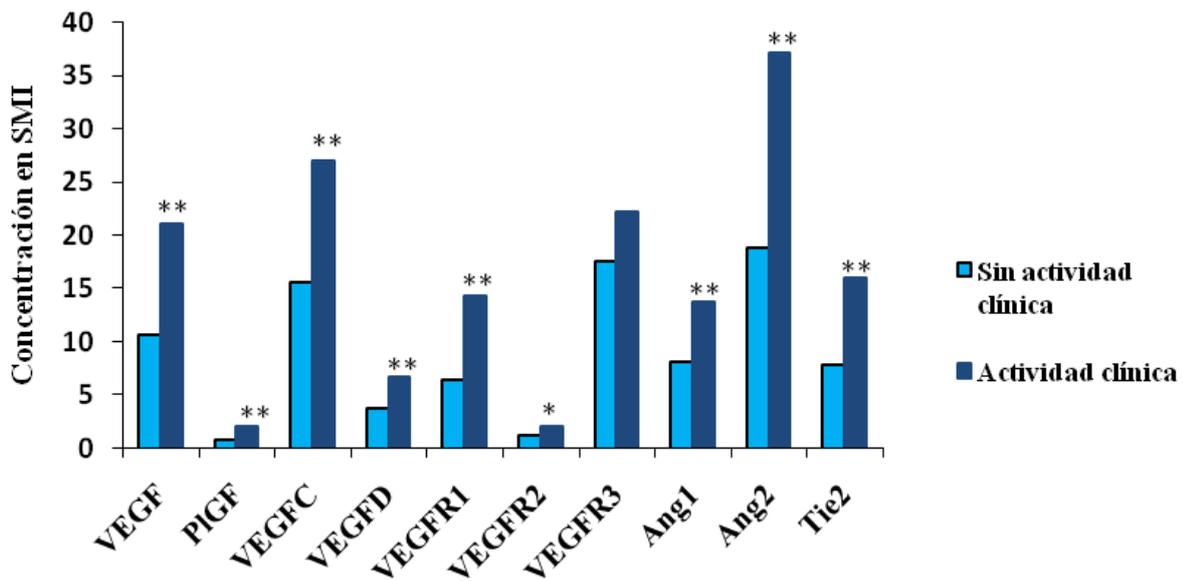


Figura 14. Concentración en sobrenadante de tejido intestinal de los principales factores angiogénicos y linfangiogénicos en función de la presencia o no de actividad clínica.

**p<0,01; *p<0,05

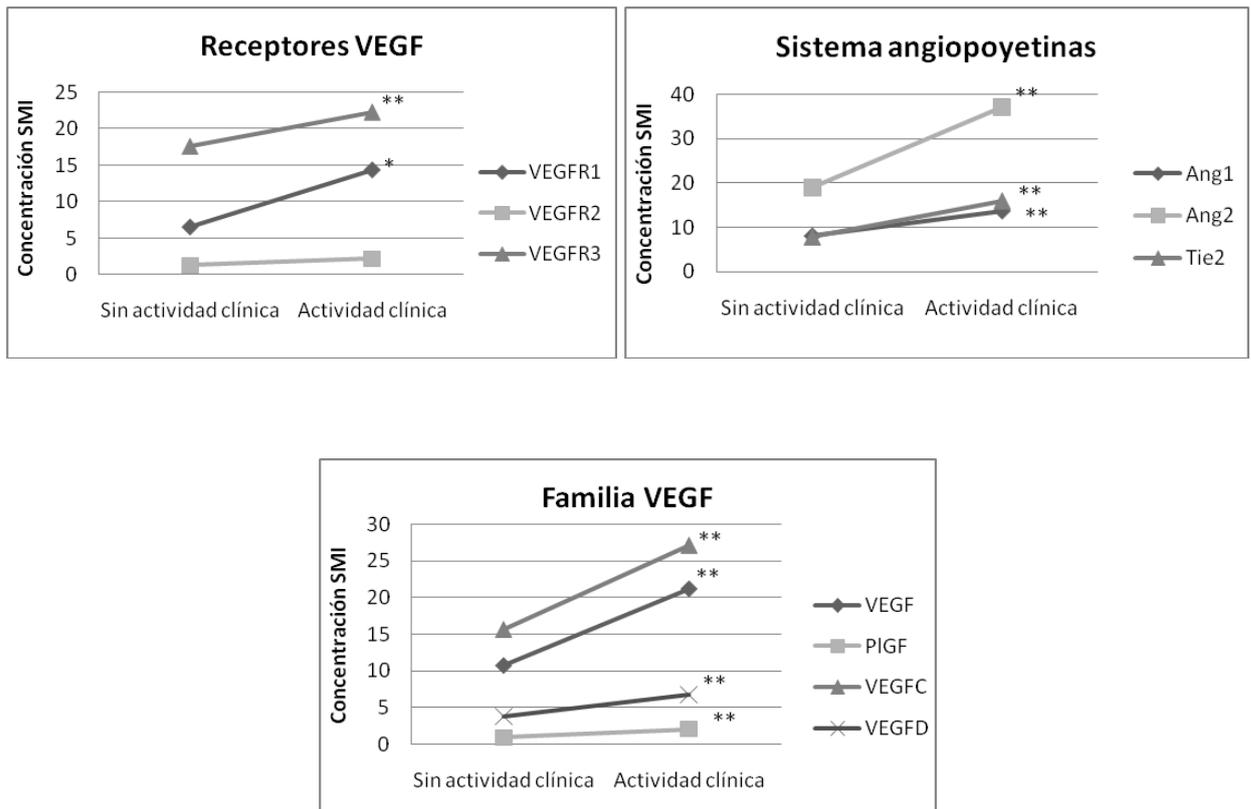


Figura 15. Concentraciones en sobrenadante de mucosa intestinal de los receptores del factor de crecimiento del endotelio vascular, de las proteínas del sistema angiopoyetinas y los miembros de la familia factor de crecimiento del endotelio vascular en pacientes con actividad clínica y sin ella.

Tabla XX. Coeficientes de correlación (r) de la asociación entre los niveles en suero y sobrenadante de tejido de los principales factores angiogénicos y linfangiogénicos y la actividad clínica de la enfermedad inflamatoria intestinal.

	Niveles en suero		Niveles en sobrenadante de tejido	
	Indice CDAI	Indice Mayo	Indice CDAI	Indice Mayo
VEGF-A	0,190; p=0,282	0,389; p=0,017*	0,541; p=0,001*	0,386; p=0,018*
PIGF	-0,06; p=0,973	0,324; p=0,051	0,561; p=0,001*	0,416; p=0,010*
VEGF-C	0,167; p=0,346	0,405; p=0,013*	0,561; p=0,001*	0,147; p=0,391
VEGF-D	0,080; p=0,653	0,075; p=0,661	0,607; p<0,001*	0,111; p=0,512
VEGFR-1	-0,354; p=0,04*	0,294; p=0,78	0,494; p=0,003*	0,424; p=0,011*
VEGFR-2	-0,352; p=0,042*	-0,13; p=0,940	0,273; p=0,118	0,131; p=0,452
VEGFR-3	-0,418; p=0,014*	0,269; p=0,108	0,213; p=0,226	0,197; p=0,249
Ang-1	0,265; p=0,130	0,242; p=0,150	0,599; p<0,001*	0,400; p=0,16*
Ang-2	0,112; p=0,529	0,185; p=0,274	0,662; p<0,001*	0,561; p<0,001*
Tie-2	0,138; p=0,436	0,119; p=0,481	0,558; p=0,001*	0,449; p=0,006*

*Diferencias significativas.

6. LOS NIVELES DE FACTORES ANGIOGÉNICOS Y LINFANGIOGÉNICOS Y LA ACTIVIDAD ENDOSCÓPICA DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Los pacientes fueron divididos en distintos grupos en función de las puntuaciones obtenidas en los índices endoscópicos utilizados, el Mayo *subscore*

para la CU y el índice SES-CD para la EC. De acuerdo a estos índices, la actividad de la EII fue leve en un 11% de los pacientes (n=7), moderada en un 31% (n=19) y grave en un 5% (n=3). El resto de pacientes (n=33; 57%) no mostraron actividad endoscópica.

La concentración de todas las proteínas analizadas, excepto VEGFR-3 variaron de forma significativa en función de la actividad endoscópica ($p < 0,05$). VEGFR-3 mostró una tendencia similar no llegando a conseguir la significación estadística ($p = 0,07$). Estas concentraciones fueron mayores en pacientes con actividad endoscópica que en aquellos sin ella ($p < 0,05$) (Figura 16). Estos hallazgos no fueron observados en suero.

Cuando comparamos de forma independiente la CU y la EC, encontramos que la puntuación del índice Mayo endoscópico correlacionó significativamente con todos los FAL en SMI, mientras la puntuación en el índice SES-CD correlacionó con todos excepto con VEGFR-2 y VEGFR-3. Respecto a los niveles de los FAL en suero, Ang-1 correlacionó con el índice SES-CD y VEGF-A correlacionó con la puntuación Mayo endoscópico (Tabla XXI).

Hubo una correlación significativa entre la actividad endoscópica y la actividad clínica tanto en los pacientes con CU ($r = 0,873$; $p < 0,001$) como en los pacientes con EC ($r = 0,62$; $p < 0,001$).

Tabla XXI. Coeficientes de correlación (r) de la asociación entre los niveles en suero y sobrenadante de tejido de los principales factores angiogénicos y linfangiogénicos y la actividad endoscópica de la enfermedad inflamatoria intestinal.

	Niveles en suero		Niveles en sobrenadante de tejido	
	Indice SES-CD	Indice Mayo endoscópico	Indice SES-CD	Indice Mayo endoscópico
VEGF-A	0,260; p=0,165	0,397; p=0,015*	0,354; p=0,059*	0,531; p=0,001*
PIGF	0,127; p=0,505	0,131; p=0,438	0,429; p=0,020*	0,550; p<0,001*
VEGF-C	0,238; p=0,205	0,114; p=0,503	0,396; p=0,033*	0,338; p=0,044*
VEGF-D	0,278; p=0,137	0,025; p=0,884	0,353; p=0,06*	0,343; p=0,038*
VEGFR-1	-0,114; p=0,549	0,220; p=0,191	0,435; p=0,018*	0,597; p<0,001*
VEGFR-2	-0,124; p=0,514	-0,113; p=0,507	0,247; p=0,197	0,373; p=0,027*
VEGFR-3	-0,287; p=0,125	0,254; p=0,129	0,170; p=0,378	0,399; p=0,016*
Ang-1	0,362; p=0,049*	0,194; p=0,251	0,441; p=0,017*	0,564; p<0,001*
Ang-2	-0,285; p=0,126	0,152; p=0,369	0,451; p=0,014*	0,654; p<0,001*
Tie-2	-0,007; p=0,971	0,017; p=0,918	0,500; p=0,006*	0,571; p<0,001*

*Diferencias significativas

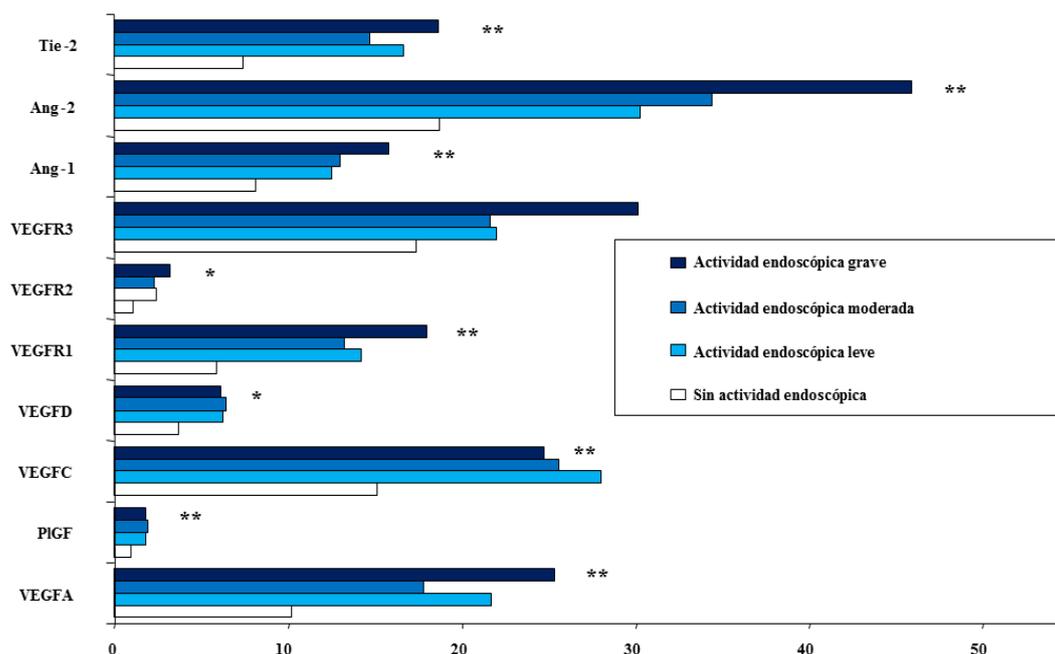


Figura 16. Comparación de los niveles de factores angiogénicos y linfangiogénicos en sobrenadante de mucosa intestinal según el grado de actividad endoscópica.

Todas las concentraciones están expresadas en pg/ml por mg de tejido, exceptuando VEGFR-3 que está expresado en pg/ml/10 mg de tejido. Diferencias significativas: ** $p < 0.01$. * $p < 0.05$.

En un 60% (n=22) de los pacientes con actividad endoscópica se pudieron obtener biopsias de zona afectada y biopsias de zona no afectada para ser comparadas. Los niveles de PIGF, VEGF-C, VEGFR-2, Ang-1 y Tie-2 fueron más altos en las muestras con actividad respecto a las de tejido sin ella (Tabla XXII). Sin embargo, el resto de proteínas estudiadas mantuvieron unos niveles elevados tanto en muestras procedentes de mucosa afectada como aquellas obtenidas en zona no inflamada.

Tabla XXII. Comparación de los niveles de factores angiogénicos y linfangiogénicos en sobrenadante de tejido cólico afecto y no afecto.

	Mucosa no afecta	Mucosa afecta	P- valor
VEGF-A	16,5±10,3	22±11,4	0,07
PIGF	1,6±0,8	2,3±0,8	<0,01*
VEGF-C	24,5±10,5	32±10,8	<0,01*
VEGF-D	8,7±4	8,2±2,8	0,6
VEGFR-1	15,1±15,2	15,5±8,4	0,9
VEGFR-2	2,4±1	4,5±4,6	<0,05*
VEGFR-3	221,6±100,5	228,7±107	0,8
Ang-1	10,7±4,8	14,6±5,9	<0,01*
Ang-2	33,5±17,8	39,1±15,3	0,1
Tie-2	10,7±5,2	16,9±7,8	<0,01*

Las concentraciones aparecen expresadas en pg/ml por mg de tejido. *Diferencias significativas p<0,05.

7. LOS NIVELES DE FACTORES ANGIOGÉNICOS Y LINFANGIOGÉNICOS Y LA ACTIVIDAD HISTOLÓGICA DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

La actividad histológica fue determinada según los índices de Riley para la CU y el índice de D´Haens para EC. En función de estos índices encontramos que: la actividad histológica fue leve en el 20% de los pacientes (n=13), moderada en un

34% (n=22), grave en un 8% (n=5) y un 38% tuvieron enfermedad quiescente (n=25). La concordancia entre la actividad endoscópica e histológica fue más alta en la CU ($\kappa=0,73$) que en la EC ($\kappa=0,55$). Los niveles de todas las proteínas estudiadas en SMI correlacionaron significativamente con la actividad histológica ($p<0,01$). Estas concentraciones aumentaron de forma paralela a la gravedad de las lesiones, de modo que, las concentraciones más altas fueron la de aquellos pacientes con actividad histológica grave (Figura 17).

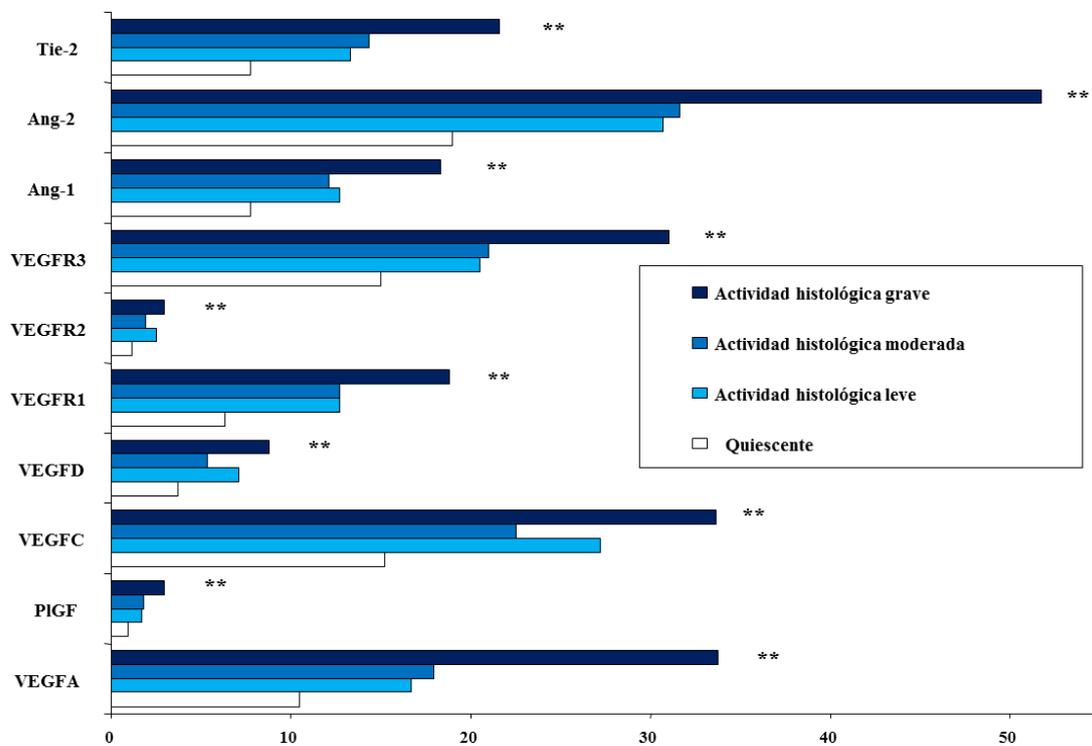


Figura 17. Comparación de los niveles de factores angiogénicos y linfangiogénicos en sobrenadante de mucosa intestinal según el grado de actividad histológica.

Todas las concentraciones están expresadas en pg/ml por mg de tejido, exceptuando VEGFR-3 que está expresado en pg/ml/10 mg de tejido. Diferencias significativas: $**p<0.01$.

En suero, sólo los niveles de VEGF-A y Ang-1 fueron más altos en pacientes con actividad histológica que en pacientes sin ella (577 ± 426 vs. 346 ± 239 pg/ml, $p<0,01$ y $57,8\pm 16,4$ vs. $47,2\pm 14,6$ ng/ml, $p<0,05$). No se encontraron más diferencias a este respecto.

8. ASOCIACIÓN DE LOS NIVELES DE FACTORES ANGIOGÉNICOS Y LINFANGIOGÉNICOS Y LOS REACTANTES DE FASE AGUDA

Los niveles séricos de Ang-1 y VEGF-A correlacionaron significativamente con la PCR, el RL y el RP (Tabla XXIII). Hubo una correlación significativa entre el RP y los niveles en SMI de VEGF-A ($r=0,293$; $p=0,005$); VEGF-C ($r=0,231$; $p=0,028$); VEGFR-1 ($r=0,238$; $p=0,025$); PIGF ($r=0,346$; $p=0,001$); Ang-1 ($r=0,283$; $p=0,007$); Ang-2 ($r=0,291$; $p=0,005$) y Tie-2 ($r=0,254$; $p=0,016$). La PCR también correlacionó con los niveles de SMI de VEGF-A ($r=0,244$; $p=0,040$); VEGFR-1 ($r=0,265$; $p=0,028$); PIGF ($r=0,244$; $p=0,040$) y Tie-2 ($r=0,328$; $p=0,006$).

Tabla XXIII. Coeficientes de correlación (r) para determinar la asociación entre los niveles en suero de los factores angiogénicos y linfangiogénicos y los reactantes de fase aguda.

	PCR	VSG	RL	RP	HB
VEGF-A	0,341;p=0,004*	0,248;p=0,06	0,277;p=0,008*	0,412;p<0,001*	-0,123;p=0,245
PIGF	0,233;p=0,51	0,069;p=0,605	0,257;p=0,014*	0,066;p=0,537	-0,75;p=0,479
VEGF-C	0,052; p=0,665	-0,073;p=0,588	0,360;p<0,001*	0,380;p<0,001*	0,085;p=0,425
VEGF-D	0,054;p=0,656	0,159;p=0,234	-0,46;p=0,664	-0,069;p=0,518	0,008;p=0,938
VEGFR-1	0,040;p=0,743	0,002;p=0,988	0,345;p=0,001*	0,072;p=0,495	0,176;p=0,096
VEGFR-2	-0,073;p=0,545	-0,046;p=0,732	0,319;p=0,002*	0,023;p=0,832	0,094;p=0,376
VEGFR-3	0,033;p=0,786	-0,096;p=0,475	0,196;p=0,062	-0,19;p=0,857	-0,51;p=0,629
Ang-1	0,286;p=0,016*	0,130;p=0,332	0,421;p<0,001*	0,599;p<0,001*	0,064;p=0,549
Ang-2	-0,115;p=0,341	0,041;p=0,761	-0,014;p=0,896	-0,047;p=0,660	0,274;p=0,009*
Tie-2	0,091;p=0,448	0,017;p=0,901	0,040;p=0,704	0,109;p=0,306	-0,52;p=0,625

Abreviaturas: PCR: proteína C-reactiva (mg/l); VSG: velocidad de sedimentación globular (mm/h); RL: recuento de leucocitos ($10^9/l$); RP: recuento de plaquetas ($10^9/l$); HB: hemoglobina (g/l), *Diferencias significativas.

9. VALOR DE LOS NIVELES DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS Y LINFANGIOGÉNICOS EN SUERO Y SOBRENADANTE DE TEJIDO COMO PREDICTORES DE ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD

Hemos obtenido que todos los FAL excepto VEGFR-3 están significativamente asociados con el grado de actividad clínica y endoscópica de la EII y que respecto a la actividad histológica esta asociación está presente para

RESULTADOS (1)

todas las proteínas estudiadas. Estas relaciones aparecen representadas en las figuras 14, 16 y 17, respectivamente. Pero, para estudiar la utilidad de estos factores como predictores de actividad clínica, endoscópica e histológica de esta patología son necesarios análisis adicionales. Para ello, realizamos análisis de la curva ROC que es una representación gráfica de la sensibilidad frente a la especificidad para un sistema clasificador binario según se varía el umbral de discriminación. En este modelo encontramos que, los niveles de Ang-2 en SMI fueron los mejores predictores de actividad endoscópica, histológica y clínica (Tablas XXIV, XXV y XXVI, respectivamente).

Tabla XXIV. Análisis de los factores angiogénicos y linfangiogénicos en sobrenadante de mucosa intestinal como predictores de actividad endoscópica.

	Área bajo la curva ROC	Punto de corte	Sensibilidad(%)	1-Especificidad(%)
VEGF-A	0,82	10,6	82	69
PIGF	0,81	1,0	86	66
VEGF-C	0,75	16,2	71	66
VEGF-D	0,70	3,8	71	60
VEGFR-1	0,82	7,4	82	75
VEGFR-2	0,71	1,34	61	68
VEGFR-3	0,68	182,5	68	66
Ang-1	0,80	9,1	68	69
Ang-2	0,83	18,5	86	66
Tie-2	0,83	10,0	75	81

Tabla XXV. Análisis de los factores angiogénicos y linfangiogénicos en sobrenadante de mucosa intestinal como predictores de actividad histológica.

	Área bajo la curva ROC	Punto de corte	Sensibilidad(%)	1-Especificidad(%)
VEGF-A	0,79	11,7	75	68
PIGF	0,80	1,2	72	72
VEGF-C	0,76	16,0	72	64
VEGF-D	0,72	4,1	69	72
VEGFR-1	0,81	7,4	81	68
VEGFR-2	0,72	1,03	72	64
VEGFR-3	0,74	159,7	72	68
Ang-1	0,84	9,1	72	72
Ang-2	0,85	18,5	89	72
Tie-2	0,81	9,2	75	72

Aunque también los niveles de PIGF, VEGFR-1, Ang-1 y Tie-2 fueron predictores moderados de actividad con un ABC igual o superior a 0,80 en todos los casos (Tablas XXIV, XXV y XXVI, respectivamente).

Respecto a los niveles de FAL en suero, los resultados del ABC para las proteínas estudiadas fueron inferiores respecto a los obtenidos en SMI. Los niveles de VEGF-A y Ang-1 estuvieron más aumentados en pacientes con actividad histológica que en aquellos sin ella. El ABC para el diagnóstico de actividad histológica fue de 0,68 para Ang-1 (punto de corte: 52,0 ng/ml: 64% sensibilidad y

RESULTADOS (1)

68% especificidad) y de 0,67 para VEGF-A (punto de corte: 340,6 ng/ml: 64% sensibilidad y 60% especificidad).

VEGF-A, VEGF-C y Ang-1 tuvieron niveles más altos en suero ($p < 0,05$) en pacientes con actividad clínica respecto a pacientes con enfermedad quiescente. El ABC para el diagnóstico de actividad clínica fue más bajo de 0,65 para todos los casos en suero excepto para VEGF-A que fue de 0,67. El punto de corte con la mayor sensibilidad (60%) y especificidad (68%) para la identificación de actividad clínica fue de 379 pg/ml para VEGF-A.

Tabla XXVI. Análisis de los factores angiogénicos y linfangiogénicos en sobrenadante de mucosa intestinal como predictores de actividad clínica

	Área bajo la curva ROC	Punto de corte	Sensibilidad(%)	1-Especificidad(%)
VEGF-A	0,87	11,7	83	68
PIGF	0,84	1,4	73	84
VEGF-C	0,77	16,2	77	66
VEGF-D	0,74	4,1	73	68
VEGFR-1	0,82	7,7	83	74
VEGFR-2	0,65	1,3	57	63
VEGFR-3	0,63	182,5	63	63
Ang-1	0,82	9,1	73	68
Ang-2	0,90	22,1	83	84
Tie-2	0,82	10,6	73	78

Respecto a la actividad endoscópica, se encontró una correlación positiva sólo entre los niveles en suero de Ang-1 y el índice SES-CD, y entre los niveles de VEGF-A en suero y el subíndice endoscópico Mayo (Tabla XXI). De acuerdo al análisis ROC en los pacientes con EC encontramos que, el ABC para los niveles en suero de Ang-1 fue de 0,65 (punto de corte: 47,8 ng/ml: 67% sensibilidad y 52% especificidad). En pacientes con CU, el ABC para los niveles en suero de VEGF-A fue de 0,72 (punto de corte: 341 ng/ml: 85% sensibilidad y 64% especificidad).

Resultados (2)

RESULTADOS (2)

1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL Y CONTROLES SANOS, SEGUNDA FASE DEL ESTUDIO

La cohorte de pacientes con EII consistió en 37 pacientes, de los cuales 20 eran mujeres (54%) y 14 fumadores (37,8%). La edad media en este grupo fue de 36 ± 13 años. Respecto al tipo de EII, 31 pacientes tenían diagnóstico de EC (83,8%) y 6 eran CU (16,2%). El tiempo medio desde el diagnóstico de la EII fue de $7,3 \pm 8,7$ años. La indicación del tratamiento con anti-TNF- α fue por enfermedad luminal en 23 pacientes (73%) y por enfermedad perianal en los 13 pacientes restantes (27%). El tipo de anti-TNF- α empleado fue IFX en 22 pacientes (59,5%) frente a ADA en 15 (40,5%). Respecto a la duración del tratamiento pautado, sólo dos pacientes (un 5,4%) no pasaron a la terapia de mantenimiento con el fármaco anti-TNF- α . Uno de ellos porque sufrió una reacción infusional frente a IFX y el otro por alcanzar respuesta completa con cierre de las fístulas perianales tras las tres dosis de la inducción (si bien es cierto, que dicho paciente tuvo que retomar el tratamiento un año después de su abandono por recidiva de la enfermedad perianal). El resto de datos de los casos estudiados están representados en la tabla XXVII.

Tabla XXVII. Características basales de los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal que iniciaron tratamiento biológico con anti-TNF- α .

Pacientes con EII (N=37)	
Tipo EII	
• EC	31
• CU	6
Género	
• Femenino	20 (54)
• Masculino	17 (46)
Edad (años): media \pm desviación estándar	
36 \pm 13	
Tabaco	
• Fumadores	14 (38)
• No fumadores	23 (62)
Manifestaciones extraintestinales	
• Ninguna	28 (76)
• Reumatológicas	7 (19)
• Mucocutáneas	2 (5)
Duración de la EII (años): media \pm desviación estándar	
7,3 \pm 8,7	
Extensión de la CU	
• Colitis izquierda	3 (50)
• Pancolitis	3 (50)
Localización de la EC	
• L1 (ileal)	9 (29)
• L2 (cólica)	6 (19)
• L3 (ileocólica)	14 (45)
• L4 (tracto digestivo alto)	2 (7)
Comportamiento de la EC	
• B1 (inflamatorio)	10 (32)
• B2 (estenosante)	6 (19)
• B3 (fistulizante)	6 (19)
• B1+ enfermedad perianal	8(26)
• B3+ enfermedad perianal	1(3)

Medicación en el momento de la endoscopia

• Corticoides orales	27 (73)
• Azatioprina/mercaptopurina	26 (70)
• 5-ASA	12 (32)
• Budesonida	16 (46)
• Metrotrexato	3 (8)

Los números entre paréntesis son porcentajes.

En cuanto al grupo control, éste estuvo compuesto por 40 voluntarios sanos, con una edad media de 43 ± 9 años, 24 mujeres (60%) y 10 fumadores (20%).

2. NIVELES DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS SOLUBLES EN PACIENTES Y CONTROLES

Los niveles en suero de VEGF-A fueron más altos en pacientes respecto a los valores obtenidos en los sujetos controles ($p=0,05$). También, se observó una tendencia a niveles mayores de Ang-2 en suero en pacientes frente a controles ($p=0,07$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de proteínas estudiadas. Estas diferencias fueron similares en pacientes con EC y CU (Tabla XXVIII).

Tabla XXVIII. Comparación de los niveles de factores angiogénicos en pacientes con EII y controles.

	VEGF-A	PIGF	Ang-1	Ang-2	Tie-2
Controles	395,5±256,4	20,2±6,3	42,3±14,0	2,6±0,83	23,9±4,8
Pacientes	511,5±255,6	17,4±11,3	46,2±19,9	3,2±1,9	24,7±7,0
P-valor	0,05	NS	NS	0,07	NS

Las concentraciones de VEGF-A y PIGF son expresadas en pg/ml, el resto de proteínas en ng/ml, NS: diferencias no clínicamente significativas.

3. VARIACIÓN DE LOS NIVELES DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS SOLUBLES DURANTE EL TRATAMIENTO CON LOS FÁRMACOS ANTI-TNF- α

Los niveles en suero de los factores angiogénicos solubles fueron determinados antes de la segunda, tercera y cuarta dosis del fármaco anti-TNF- α y comparados con los niveles basales anteriores al inicio de la terapia biológica. Los niveles de Ang-1 fueron significativamente más bajos antes de la segunda, tercera y cuarta dosis del tratamiento comparado con los niveles iniciales en los pacientes que alcanzaron la remisión tras tres dosis del tratamiento (Figura 18). Los pacientes que estaban en remisión antes de la cuarta dosis del tratamiento también mostraron una tendencia a niveles más bajos de Ang-1, aunque, dichas diferencias no alcanzaron la significación estadística ($p=0,1$).

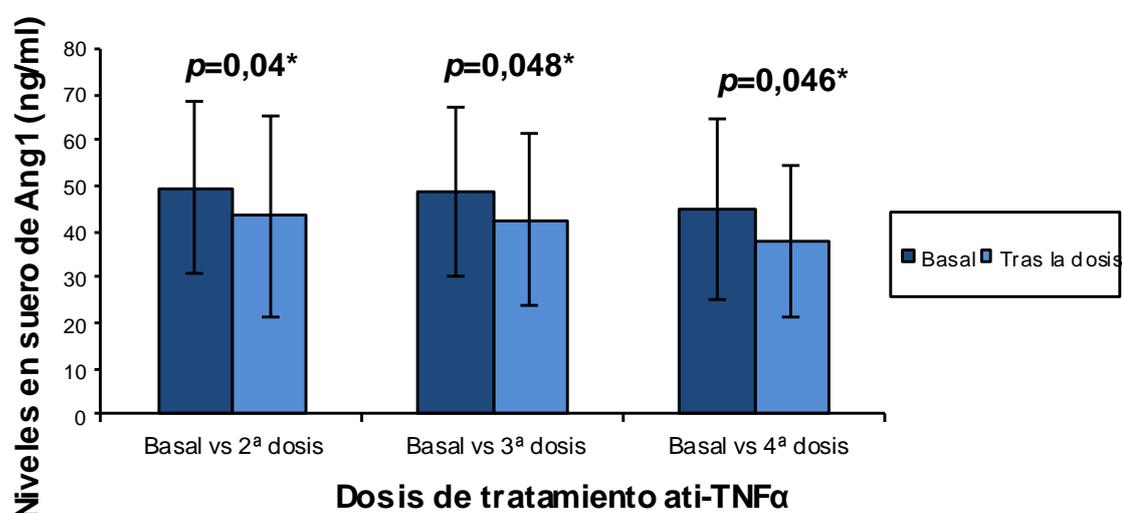


Figura 18. Niveles en suero de angiopoyetina-1 antes y después del tratamiento anti-TNF- α respecto a niveles basales en pacientes que alcanzaron la remisión antes de la tercera dosis.

* Diferencias estadísticamente significativas.

Respecto al tipo de EII, los niveles en suero de PIGF fueron más bajos en pacientes con EC antes de la tercera dosis comparados con los niveles basales ($14,8 \pm 9,8$ pg/mL vs. $17,3 \pm 11,3$; $p=0,038$). No se encontraron diferencias para los pacientes con CU.

Teniendo en cuenta el tipo de biológico administrado, encontramos que los niveles de VEGF-A fueron significativamente más bajos antes de la tercera dosis de IFX que antes de comenzar el tratamiento ($38,1 \pm 19,9$ pg/mL vs. $44,7 \pm 21,3$

pg/mL; $p=0,04$). Por el contrario, ni estas ni otras diferencias fueron obtenidas para el grupo de ADA.

También se determinaron los niveles de las proteínas estudiadas en los cuatro puntos específicos del tratamiento (niveles basales, antes de la segunda y tercera dosis de IFX/ADA y en la semana 14) y se compararon en pacientes con y sin remisión en la tercera dosis del tratamiento. Los pacientes en remisión en la tercera dosis tuvieron niveles significativamente más bajos de VEGF-A en el momento basal ($p=0,04$); en la segunda dosis ($p=0,01$) y en la tercera ($p=0,03$) respecto a aquellos pacientes que no alcanzaron la remisión con el tratamiento (Tabla XXIX).

Esta misma comparación también se hizo en pacientes que estaban en remisión en la cuarta dosis y pacientes en los que persistía actividad. Los niveles de Ang-1 basales y antes de la segunda dosis de anti-TNF- α fueron mayores en pacientes en remisión en la semana 14 comparados con aquellos sin remisión (basal: $48,3\pm 20,4$ vs. $28,8\pm 11,6$ ng/mL, $p=0,04$; semana 14: $46,4 \pm 22,4$ vs. $30,8\pm 7,3$ ng/mL, $p=0,01$). No se encontraron más diferencias a este respecto.

Tabla XXIX. Comparación de los niveles séricos de los factores angiogénicos estudiados en diferentes momentos del tratamiento con anti-TNF- α en pacientes respondedores y no respondedores:

A.) Determinación basal, antes de la primera dosis de infliximab/adalimumab

Baseline (N=37)			
	R	NR	P-valor
VEGF-A (pg/mL)	453,5 \pm 250,7	667,5 \pm 153,9	0,04*
PIGF (ng/mL)	16,1 \pm 9,3	14,8 \pm 9,6	0,75
Ang-1 (ng/mL)	48,6 \pm 18,7	37,0 \pm 25,4	0,29
Ang-2 (ng/mL)	3,5 \pm 2,0	2,7 \pm 1,2	0,32
Tie-2(ng/mL)	24,8 \pm 7,3	25,5 \pm 6,8	0,81

B.) Segunda dosis, semana 2 después del inicio de la terapia anti-TNF- α

Segunda dosis (N=37)			
	R	NR	P-valor
VEGF-A (pg/mL)	409,7 \pm 217	681,3 \pm 350,6	0,01*
PIGF (ng/mL)	15,1 \pm 9,7	13 \pm 7,5	0,60
Ang-1 (ng/mL)	42,7 \pm 21	30,5 \pm 10,8	0,15
Ang-2 (ng/mL)	3,4 \pm 2,2	2,3 \pm 1,2	0,25
Tie-2(ng/mL)	23,3 \pm 6,9	25 \pm 8,1	0,60

RESULTADOS (2)

C.) Tercera dosis, determinación en la semana 6 en el caso de infliximab y en la semana 4 respecto al tratamiento con adalimumab

Tercera dosis(N=32)			
	R	NR	P-valor
VEGF-A (pg/mL)	400,5±222,8	630,4±243,1	0,03*
PIGF (ng/mL)	15,6±10,6	11,1±5,7	0,30
Ang-1 (ng/mL)	41,7±18,4	36,5±20,3	0,52
Ang-2 (ng/mL)	3,4±2,2	2,3±1,2	0,16
Tie-2 (ng/mL)	24,1±7,1	25,3±5,6	0,69

D.) Semana 14, determinación en el momento previo al inicio de la terapia de mantenimiento con el fármaco anti-TNF- α correspondiente

Cuarta dosis(N=22)			
	R	NR	P-valor
VEGF-A (pg/mL)	393,1±229	575,2±208,1	0,10
PIGF (ng/mL)	11,9±6,4	12,1±5,4	0,95
Ang-1 (ng/mL)	38,6±16,3	33,2±12,5	0,47
Ang-2 (ng/mL)	3,6±1,8	2,2±0,95	0,08
Tie-2 (ng/mL)	25,5±9	25,1±6,8	0,92

Abreviaturas: R: pacientes que alcanzaron la remisión en la tercera dosis; NR: pacientes que no alcanzaron la remisión tras el tratamiento anti-TNF- α . *Diferencias estadísticamente significativas.

4. LOS NIVELES EN SUERO DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS COMO PREDICTORES DE EFICACIA DEL TRATAMIENTO ANTI-TNF- α

El valor de estos factores como predictores de remisión o respuesta al tratamiento con fármacos anti-TNF- α fue determinado mediante el análisis de ABC. Se encontró que valores elevados basales de VEGF-A fueron predictores de una mala respuesta al tratamiento con fármacos biológicos (Figura 19). El ABC fue de 0,80 con un punto de corte de 658,36 pg/ml (con una sensibilidad de 85,7% y una especificidad de 78,6%). Por el contrario, niveles basales elevados de Ang-1 estuvieron asociados con la remisión de la enfermedad tras el tratamiento de inducción con los fármacos anti-TNF- α (ABC: 0,70; punto de corte: 36,6 ng/ml; 72% sensibilidad y 71,4% especificidad) (Figura 19).

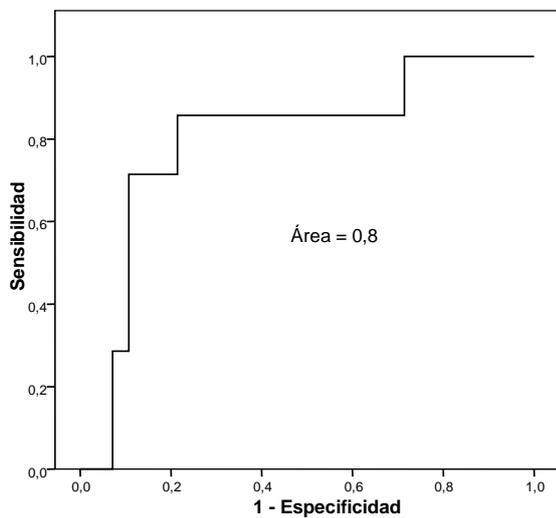
5. LOS NIVELES DE LOS FACTORES PROANGIGÉNICOS Y LA ACTIVIDAD CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Únicamente los pacientes con enfermedad clínica activa en el momento previo al inicio del tratamiento biológico fueron incluidos en este estudio. En función del índice CDAI y el índice modificado de Truelove-Witts, la actividad de la EII al inicio del tratamiento anti-TNF- α era leve en el 67,6% de los pacientes (n=25) y moderada en el 32,4% (n=12). En la semana 14, la actividad de la enfermedad persistía sólo en 6 pacientes (en todos los casos esta actividad era leve) y en el resto dicha actividad había desaparecido (77%). Los valores del índice CDAI fueron

RESULTADOS (2)

disminuyendo tras las distintas dosis del tratamiento, siendo significativamente menores en el momento basal que en la segunda, tercera o cuarta dosis ($219,4 \pm 44,7$ vs. $125,8 \pm 84$; $99,21 \pm 72,7$ y $87,3 \pm 69,6$ respectivamente). Las diferencias con respecto a los valores del índice Truelove-Witts en la CU no fueron analizadas debido al pequeño tamaño muestral de este grupo de datos. Los niveles en suero de VEGF-A, PlGF, Ang-1, Ang-2 y Tie 2 no correlacionaron con los valores del índice CDAI (datos no mostrados).

A.)



B.)

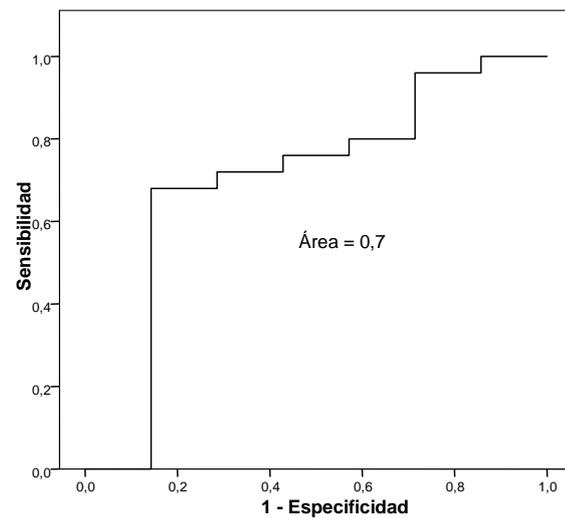


Figura 19. Factor de crecimiento del endotelio vascular (A.) y angiopoyetina-1 (B.) como predictores de remisión en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal en tratamiento con fármacos anti-TNF- α . Análisis de área bajo la curva ROC.

Discusión

DISCUSIÓN

Aunque las causas exactas y los mecanismos que están implicados en la etiología de la EC y la CU son desconocidos hasta la fecha, se sabe que la EII es el resultado de una respuesta inmune inapropiada que ocurre en individuos genéticamente predispuestos como consecuencia de una compleja interacción entre distintos factores ambientales, microbianos y el sistema inmune intestinal (192, 193). De este modo, la EII se caracteriza por una inflamación crónica y está asociada a un daño y remodelación tisular extenso causado por edema, infiltrados inflamatorios y pérdida de integridad de la barrera epitelial (194). En estos procesos relacionados con la fisiopatología de la EII están envueltos distintos tipos celulares y mediadores, e intervienen multitud de mecanismos diferentes (195). Entre estos mecanismos, la angiogénesis, formación de nuevos capilares a partir de vasos preexistentes, podría tener un papel relevante en el desarrollo de la EII (196). Este fenómeno está íntimamente relacionado en numerosos procesos biológicos tanto fisiológicos como patológicos, que incluyen el crecimiento, desarrollo y reparación (99). En modelos experimentales de EII se ha visto que la angiogénesis contribuye a la remodelación de los vasos sanguíneos mediante la sobreexpresión de distintas moléculas de expresión y citoquinas. De entre todas las citoquinas implicadas, VEGF-A y sus receptores han sido las moléculas mejor caracterizadas. Se sabe que VEGF-A es un mediador fundamental de la angiogénesis patológica en diversos desórdenes como neoplasias o inflamación crónica (197-199). Por el contrario, el estudio de los vasos linfáticos y su densidad, y su posible relación con la EII, ha recibido menos atención y los datos obtenidos son escasos (140, 200). La función

de la vasculatura linfática es realizar el drenaje del fluido intersticial y su posterior retorno a la circulación sanguínea, y el transporte de células inmunes y antígenos a los nódulos linfáticos (201). Al igual que la angiogénesis, se ha visto que la formación de vasos linfáticos facilita la diseminación del cáncer y está envuelto en procesos de inflamación crónica y rechazo de trasplantes (202, 203).

Hasta la fecha, el papel real que la angiogénesis y la linfangiogénesis tiene en la EII no está todavía establecido. Nuestra hipótesis de partida es que una formación de vasos sanguíneos alterada podría permitir una continua migración leucocitaria a la mucosa afecta perpetuando y manteniendo la respuesta inflamatoria que es una parte integral de la patogenia de las EII. De este modo, la determinación de los niveles séricos de algunos de los FAL podría tener valor pronóstico de actividad de la EII y tener relación con el grado de afectación de la mucosa. Para ello, en nuestro estudio se analizaron los niveles de los principales FAL: VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PlGF, Ang-1, Ang-2 y Tie-2 en suero y SMI de pacientes con EII y controles sanos y se obtuvo que dichos factores están localmente elevados en SMI. Todas las proteínas estudiadas, a excepción de VEGFR-3, estuvieron significativamente elevadas en los pacientes con EII con actividad endoscópica y clínica comparado con los pacientes en remisión de la enfermedad y los controles sanos.

VEGFR-3 es un receptor tirosin quinasa que se expresa en vasos sanguíneos embrionarios, en algunos vasos angiogénicos y en vasos linfáticos

adultos (204). La importancia que esta proteína tiene en el normal funcionamiento de la función linfática queda demostrada en algunos síndromes como el linfedema humano, que puede aparecer en pacientes que tienen una mutación de VEGFR-3 o una sobreexpresión de la forma soluble de VEGFR-3 (da lugar a que las formas VEGF-C y VEGF-D se unan a esta forma soluble y no al receptor anclado a la membrana provocando el linfedema) (205, 206). En modelos animales, se ha estudiado el posible papel de VEGFR-3 en la respuesta cutánea de la piel a los rayos UVB y se ha visto que el bloqueo de la señalización de VEGFR-3 da como resultado un edema inducido por rayos UVB e inflamación cutánea, mientras que la estimulación de este receptor por sus ligandos VEGF-C y VEGF-D inhibe el desarrollo de la inflamación cutánea (207). De igual modo, en un modelo murino de infección pulmonar crónica, la inhibición de VEGFR-3, prolongó el edema mucoso (208). En trabajos experimentales recientes con ratones genéticamente modificados el bloqueo de VEGFR-3 agrava la EII aumentando la inflamación y la infiltración de leucocitos (209). Estos resultados sugieren que VEGFR-3 es requerido para que la función linfática y la linfangiogénesis se desarrollen con normalidad y se elimine el exceso de líquido procedente de los tejidos, y se limpie de células inmunes y antígenos desde el lugar de la inflamación (210). Sin embargo, por el contrario también existen estudios en varios modelos animales de trasplantes de órganos, en los que la inhibición de VEGFR-3, inhibió la inflamación y el rechazo del órgano (211).

En estudios desarrollados en pacientes con cáncer colorrectal, las técnicas inmunohistoquímicas llevadas a cabo en tejido tumoral y no tumoral demostraron

que sólo una pequeña proporción de vasos sanguíneos expresaban VEGFR-3 en las muestras tumorales y que dicha expresión no estaba asociada con el estadio del tumor aunque sí con la presencia de infiltrados inflamatorios (212). Se ha descrito que los polimorfonucleares son una importante fuente de citoquinas inflamatorias (213). Estas citoquinas pueden modular la expresión de los miembros de la familia de VEGF-A, y han demostrado en células endoteliales regular la expresión de VEGFR-2, pero no VEGFR-3 (214). Por el momento, no existe un claro candidato que medie la expresión de VEGFR-3. Paavonen *et al.* han observado que en humanos los niveles de esta proteína están bajos en úlceras inflamatorias cutáneas y la expresión es transitoria en heridas en un modelo experimental porcino (215). Los autores sugieren que esta expresión transitoria podría ser una parte integral del proceso natural de curación de lesiones y que la ausencia de vasos linfáticos podría denotar un proceso anómalo de curación en lesiones crónicas. Los niveles cambiantes de VEGFR-3 en SMI podrían determinar un fallo asociado a la EII en la adecuada movilización de vasos linfáticos y conllevaría una hipofunción general de esta vasculatura. Estos datos están en consonancia con Alexander *et al.*, quienes reportan una incapacidad de expansión de vasos linfáticos como respuesta adaptativa en los pacientes con EII (172). Este fallo linfático en enfermedades crónicas podría resultar en la acumulación de citoquinas y células inmunitarias que exacerbaría la EII. Se ha descrito que en la EII podría existir una potente inhibición del drenaje linfático a nivel del mesenterio mediada por la prostaglandina E y la prostaciclina que sería el causante del edema y el compromiso de la respuesta inmune asociada con la EII (171). Los últimos datos publicados en la literatura han demostrado que la vía VEGF-C/VEGFR-3 regula la plasticidad y activación de los macrófagos *in vivo* en modelos

experimentales de colitis crónica y los autores han sugerido que la corrección de la función linfática defectuosa con VEGF-C podría ser una estrategia terapéutica potencial en la EII (216).

Este comportamiento independiente e incierto de VEGFR-3 en otras entidades clínicas y modelos animales coincide con los resultados obtenidos en este estudio, en el que no hemos encontrado diferencias en los niveles locales de dicha proteína en los pacientes con EII activa comparado con pacientes sin actividad o controles sanos. La sobreexpresión de VEGFR-2, VEGF-C y -D y la estabilidad de los niveles de VEGFR-3 sugieren que la función pro-linfangiogénica de VEGF-C y -D podría ser llevada a cabo vía VEGFR-2 en vez de VEGFR-3 en los períodos de actividad de la EII y que la vía de señalización de VEGFR-3 está bloqueada en estos pacientes como sucede en otras patologías con una linfangiogénesis defectuosa.

Hasta el momento, este es el primer estudio que analiza los niveles de VEGFR-3 en sobrenadante de cultivos primarios de mucosa intestinal en muestras humanas y su asociación con la EII.

Con respecto al resto de proteínas estudiadas, casi la totalidad de los trabajos previos existentes han determinado únicamente los niveles de VEGF-A, han sido realizados en suero o en tejido por inmunohistoquímica y sugieren que una angiogénesis alterada podría tener un papel crítico en la patogénesis de la EII

(217-221). Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio, en el que se ha demostrado un incremento de la expresión cólica de VEGF-A en pacientes con EII. La excepción a esta hipótesis es el estudio de Kapsoritakis *et al.*, en el que los autores observaron una tinción inmunohistoquímica más débil para VEGF-A en pacientes con EC activa respecto a los controles sanos. En el mismo trabajo, la expresión de esta proteína en pacientes con CU fue similar a los controles, sugiriendo que el curso de la CU no era dependiente de VEGF-A (222). Las diferencias que encontramos respecto a nuestro estudio y entre los distintos estudios publicados se deben probablemente en parte a los distintos métodos utilizados para la determinación de las proteínas estudiadas. Tanto la inmunohistoquímica como los niveles proteicos en SMI reflejan la expresión de proteínas en la mucosa cólica, pero mientras en el primer caso la técnica determina principalmente los niveles de proteínas anclados a una localización sub-celular, en el segundo caso se cuantifica de forma más precisa aquellas proteínas solubles que han sido soltadas al medio circundante.

Sea cual sea el método utilizado, por el momento, se desconoce cual es el significado biológico de unas concentraciones elevadas de factores angiogénicos en la mucosa intestinal. Por un lado, la angiogénesis es un proceso crucial que proporciona oxígeno y nutrientes y promueve la curación de la mucosa dañada, pero por otro, un proceso angiogénico excesivo y descontrolado puede provocar una sustancial inflamación facilitando el flujo de células inflamatorias.

Estudios clínicos y modelos animales en ratones con colitis inducida por dextran sódico sulfato han mostrado un aumento de la densidad microvascular en tejido mucoso y submucoso y una sobreexpresión de factores angiogénicos como VEGF-A, el factor de crecimiento fibroblástico básico, el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el PlGF (221, 223). En otras enfermedades crónicas, también se ha observado elevación de diversos factores angiogénicos. Por ejemplo, Schroeder *et al.* encontraron una elevada expresión de VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, Tie-2 y del radio Ang-1/Ang-2 en tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide comparado con pacientes con osteoartritis (175). Man *et al.* encontraron que la expresión de VEGF-A y sus receptores en los keratocitos estaba aumentada en pacientes con psoriasis (224). La neovascularización corneal patológica también se ha asociado a VEGF-A, al factor de crecimiento fibroblástico básico y a distintas metaloproteasas, y desde hace unos años las terapias anti-VEGF son habituales para el control de enfermedades oculares (225, 226). Igualmente, existen estudios en ratones con colitis experimental inducida que han demostrado la mejora de la enfermedad intestinal tras el tratamiento con agentes antiangiogénicos como la talidomida o el ATN-161 (inhibidor de la proteína $\alpha 5\beta 1$) (227, 228). Respecto al origen de esta elevación de factores angiogénicos, se sabe que distintos tipos de leucocitos producen factores angiogénicos y pueden modificar la matriz celular promoviendo la neovascularización (229, 230). Particularmente, ha sido reportado que los neutrófilos son una fuente importante de citoquinas, tales como interleuquina-8 o VEGF-A, así como metaloproteasas que son soltadas en lugar de la inflamación para regular la angiogénesis y que los monocitos y macrófagos también son fuente de citoquinas como VEGF-A, FGFs y TNF entre otros (231, 232). Lo mismo sucede con los linfocitos T, está

ampliamente aceptado que regulan la patogénesis de la EII a través de la producción de citoquinas proinflamatorias (227, 233). Todos estos datos junto con los resultados obtenidos en este estudio apoyarían nuestra hipótesis, de modo que, en la EII se produciría un incremento en el reclutamiento de leucocitos que conllevaría una producción excesiva de diversos mediadores angiogénicos y metaloproteasas que favorecerían la extravasación de dichos leucocitos a través de la membrana facilitando a su vez la neovascularización y la inflamación crónica observada en la enfermedad.

Por el momento se desconoce, si una linfangiogénesis y angiogénesis local alterada es una causa o una consecuencia de la EII, pero si parece que se trata de un proceso dinámico y reversible ya que, en nuestro estudio, los pacientes en remisión clínica y endoscópica tuvieron niveles de FAL iguales a los controles. Además, las diferencias encontradas en los pacientes con actividad fueron similares para los pacientes con EC y CU, sugiriendo un comportamiento similar de ambas entidades respecto a la angiogénesis y linfangiogénesis local.

Para determinar además si la sobreexpresión de los FAL observada también estaba presente en la mucosa sana de los pacientes con EII estudiados, se obtuvieron muestras de zona afectada y zona no afectada para su comparación. En nuestros pacientes, las concentraciones de PIGF, VEGF-C, VEGFR-2, Ang-1 y Tie-2 fueron significativamente mayores en las áreas con afectación macroscópica que en las zonas sin inflamación. Los niveles encontrados para el resto de proteínas

estudiadas estuvieron altos tanto en la mucosa afecta como en la no afecta, los valores obtenidos en la zona no afecta de pacientes con actividad de la enfermedad fueron mayores en cualquier caso que los obtenidos en la mucosa de pacientes en remisión. Griga *et al.* reportaron una mayor inmunotinción para VEGF-A en el epitelio y *lámina propria* de la mucosa cólica inflamada en pacientes con EII respecto a pacientes sin inflamación (221). Los mismos autores observaron un incremento de la expresión de VEGF-A en SMI de pacientes con EII activa respecto a pacientes con síndrome de intestino irritable (221). Según nuestro conocimiento, no existe hasta la fecha ningún otro estudio además del nuestro en el que se compare la zona afecta y no afecta de un mismo paciente y estos resultados reflejan que en los pacientes con la enfermedad activa, la mucosa microscópicamente “normal” también está a veces alterada a nivel microscópico y/o molecular.

Respecto a los niveles en suero de los FAL, lo más destacable sería la posible implicación de VEGF-A y la alteración del sistema angiopoyetinas. Estos resultados coinciden con un gran número de estudios que muestran niveles sistémicos más altos de VEGF-A en pacientes con EII comparados con los pacientes controles sin esta enfermedad (234, 235). Sacaldaferrri *et al.* señalaron a la proteína VEGF-A como el factor principal envuelto en la angiogénesis patológica en la EII (197), probablemente actuando como el nexo entre la angiogénesis inflamatoria y la inflamación de la mucosa. Ferrante *et al.* estudiaron un posible origen genético que explicase esas diferencias mediante el análisis de tres polimorfismos de nucleótido simples dentro del gen VEGF-A (236). Sin embargo,

los autores no encontraron correlación genética entre el genotipo VEGF-A y los niveles en suero de este factor proangiogénico. En lo referente a la alteración del sistema angiopoyetinas, ésta estuvo caracterizada por un aumento en las concentraciones de Ang-1 y Tie-2 principalmente. El sistema angiopoyetina también ha sido propuesto como un objeto clave en el desarrollo de la angiogénesis asociada a la EII (237). Como se ha explicado con anterioridad, la Ang-1 es capaz de estabilizar los vasos nuevos que se van formando, mientras que la Ang-2 facilita la activación de células endoteliales en respuesta a VEGF-A y otros factores de crecimiento clásicos (238), aunque el posible mecanismo de acción de estas proteínas en la patogenia de la EII será explicado más adelante.

Nuestros resultados no muestran una buena correlación de los niveles en suero con los niveles en SMI, indicando que la variación local de las concentraciones de los factores estudiados no corresponde con los niveles circundantes de estas proteínas. Además, estos niveles séricos correlacionaron mal en líneas generales (a excepción de VEGFA y Ang-1) con los índices de actividad clínicos y endoscópicos de la enfermedad. También hubo una correlación entre los niveles séricos de VEGFA y Ang-1 y distintos marcadores de inflamación como PCR y el RL y RP, pero este resultado puede explicarse por el hecho de que estas células como se ha referido con anterioridad liberan factores angiogénicos durante los procesos inflamatorios (230). Estudios previos publicados también muestran una correlación entre los niveles en suero de VEGF-A y la actividad de la enfermedad (197, 234). Kanazawa *et al.* reportaron unos niveles elevados de VEGF-A en el suero y en el tejido cólico de pacientes con CU activa (235). Del

mismo modo, Bousvaros *et al.* mostraron que los niveles en suero de VEGF-A en niños y adultos jóvenes estaban elevados durante la actividad de la EC (239). En nuestro estudio, los niveles en suero de VEGF-A correlacionaron con la actividad clínica en los pacientes con CU pero no en los de EC. Lo mismos resultados obtuvimos con respecto a la actividad endoscópica. Por el contrario, Ang-1 correlacionó con la actividad endoscópica en pacientes con EC, pero no con CU, mientras no se encontró asociación con la actividad clínica. Aunque estas observaciones deben tomarse con cautela porque aunque los valores de p fueron estadísticamente significativos, los coeficientes de correlación no fueron altos.

Por el contrario, la correlación entre los FAL en SMI y la actividad endoscópica, histológica y clínica de la EII fue buena. Aunque los datos publicados a este respecto, son escasos, en modelos animales con ratones, también se han descrito buenas correlaciones entre los procesos angiogénicos y los índices de actividad histológica, de modo que un incremento en la neovascularización coincidió con una mayor afectación histopatológica en las muestras estudiadas (227).

Los datos obtenidos sugieren que los niveles de FAL en SMI son una forma certera de determinar la afectación de la mucosa y dan una idea muy ajustada a la realidad de la gravedad de los daños y, a pesar de que la mayoría de los FAL podrían ser útiles como marcadores de la EII, Ang-2 parece ser el mejor de ellos. Ang-1 y Ang-2 son ligandos antagonistas que se unen a un dominio extracelular del receptor Tie-2, el cual está casi exclusivamente expresado en células endoteliales

(238, 240). Koutrobakis *et al.* fueron los primeros autores que determinaron los niveles en suero de Ang-2 y Tie-2 en pacientes con EII. Los niveles de ambas proteínas estuvieron elevados tanto en pacientes con EC como en pacientes con CU, respecto a controles sanos y Ang-2 correlacionó con la actividad de la enfermedad (241). Otros trabajos también han encontrado una correlación entre angiopoetinas y reactantes de fase aguda (242). En pacientes con enfermedad crítica, se ha confirmado un marcado desequilibrio del sistema angiopoyetina-Tie-2 a favor de Ang-2 (243). Muchos estudios han evidenciado que las concentraciones de Ang-2 correlacionan con la gravedad de la enfermedad (244, 245).

En resumen, en nuestro estudio, las alteraciones a nivel local parecen ser un hecho, encontrándose una inhibición de la linfangiogénesis y una sobreexpresión de factores angiogénicos, que correlacionan muy bien con la actividad clínica, endoscópica e histológica de la EII. No obstante, a pesar de los resultados obtenidos, no podemos determinar si tales variaciones son una causa o una consecuencia de las lesiones de la EII que perpetúan la inflamación existente. Aún así, el estudio de algunas de estas FAL como posibles dianas terapéuticas en la EII, tal y como sucede en otras enfermedades inflamatorias, podría constituir una nueva línea de investigación. Respecto a la utilidad de estos factores como predictores de la enfermedad, lo ideal sería encontrar un marcador de actividad en suero que pudiese evitar la realización de pruebas agresivas como la colonoscopia pero sólo los niveles de VEGF-A y Ang-1 en suero parecen ser marcadores endoscópicos, histológicos y clínicos útiles de actividad de la enfermedad, y a la

vista de los resultados obtenidos, las concentraciones en suero de los FAL no pueden recomendarse como predictores de actividad de la EII por el momento.

Respecto a la segunda fase del estudio se planteó la siguiente hipótesis: si una angiogénesis y linfangiogénesis patológica están implicadas en esta enfermedad, los fármacos más potentes utilizados actualmente para el control de la misma, como son los fármacos biológicos, IFX y ADA también podrían mediar su eficacia mediante un efecto en las concentraciones de estos FAL. Especialmente VEGF-A y Ang-1 en suero podrían modificarse con la terapia anti- TNF- α .

El polipéptido TNF- α es una citoquina proinflamatoria producida principalmente por macrófagos y linfocitos T. La activación de la vía TNF- α a través de los receptores Toll-like receptor 4, provoca la activación de la cascada de señalización mediada por el factor nuclear- $\kappa\beta$ y la proteína kinasa derivada del mitógeno, que se traduce en un aumento de la proliferación celular y la diferenciación de macrófagos, así como en una inducción de la expresión de citoquinas proinflamatorias (246-248). Por todo ello, en años anteriores se realizaron multitud de investigaciones encaminadas a conocer el papel que TNF- α tenía en la EII. En estos trabajos se demostró que esta molécula estaba elevada en la sangre, mucosa intestinal y heces de pacientes con EII y que su expresión disminuía la función de la barrera mucosa en dichos pacientes, exacerbando la enfermedad (249-251). Estas investigaciones dieron paso al uso de terapias específicas para la EII que eran inhibidores de TNF- α particularmente, los

anticuerpos monoclonales IFX y ADA que ejercían su efecto inhibitor mediante la rápida formación de complejos estables (32, 252). IFX es un anticuerpo monoclonal inmunoglobulina G1, quimérico (humano-ratón) de alto peso molecular que neutraliza tanto las moléculas circulantes de TNF- α como las ancladas a membrana, lisa macrófagos e induce apoptosis en monolitos y células-T (252, 253). Por otro lado, ADA es un anticuerpo recombinante completamente humano que inhibe la unión de TNF- α a la superficie de su receptor y también es capaz de inducir apoptosis en monocitos y células T (254). Aunque son numerosos los estudios que se han realizado para conocer la eficacia y optimizar el uso de estos fármacos, poco se sabe sobre los mecanismos de respuesta, particularmente sobre los efectos éstos pudiesen tener en los factores proangiogénicos.

Se ha visto que TNF- α está implicado en la angiogénesis y muestra un efecto dual inhibiendo o estimulando la angiogénesis en función de su concentración (255-258). La angiogénesis inducida por TNF- α puede ser mediada directamente por su actividad inflamatoria e indirectamente por la inducción de otros factores proangiogénicos (259-261). Se sabe que TNF- α aumenta la expresión de VEGF-A, FGF-2, IL-8 y sus receptores en células endoteliales humanas (256, 262, 263). A través de su amplio rango de efectos, esta molécula modula la expresión de varios genes en el endotelio vascular que dan como consecuencia la regulación al alza de moléculas de adhesión envueltas en el reclutamiento de linfocitos, incrementando la expresión de éstos sobre todo en la *lamina propria* del colon de pacientes con EII (264).

Con el fin de conocer más sobre el posible efecto que el tratamiento anti-TNF- α pudiese tener sobre la angiogénesis, aquí presentamos los resultados de este estudio que pretende determinar la variación de los niveles circulantes de diversos factores angiogénicos como consecuencia de la terapia biológica.

Para ello, primero se determinaron los niveles en suero de VEGF-A, PlGF, Ang-1, Ang-2 y Tie 2 antes y después del tratamiento con anti-TNF- α y se compararon con los niveles de éstos obtenidos en un grupo control. Después, los mismos factores fueron determinados en diferentes momentos durante el tratamiento con anti-TNF- α y sus variaciones fueron estudiadas en relación a la respuesta.

Al igual que lo que obtuvimos en la primera parte del estudio, los niveles basales de VEGF-A estuvieron alterados en los pacientes con EII respecto a los controles y respecto al sistema angiopoyetinas, los niveles en suero de Ang-2 tendieron a ser mayores en pacientes con EII que en controles. Oikonomou *et al.* habían reportado anteriormente niveles elevados de Ang-2 en pacientes con EII (265). Estos autores encontraron que los niveles de esta proteína cambiaban en función de la localización de la enfermedad, debido probablemente a la variabilidad de células endoteliales. El resto de proteínas no alcanzaron la significación estadística.

Respecto a las posibles modificaciones en los niveles de las proteínas estudiadas relacionadas con el fármaco biológico, Ang-1 fue el único factor proangiogénico entre las proteínas estudiadas que disminuyó significativamente durante la terapia con anti-TNF- α . Los niveles de Ang-1 disminuyeron en los pacientes que alcanzaron la remisión tras la pauta inducción con el fármaco anti-TNF- α , además los niveles de este factor fueron significativamente menores antes de cada dosis respecto a los valores basales. Por el contrario, todas estas diferencias no se observaron en los pacientes que no respondieron o no alcanzaron la remisión con el tratamiento biológico. En relación a los pacientes que alcanzaron o mantuvieron la remisión en la semana 14, éstos también mostraron niveles de Ang-1 inferiores respecto a los niveles basales, aunque dichas diferencias no alcanzaron la significación estadística debido al pequeño tamaño muestral. Y es que, por problemas técnicos no se pudieron tomar las muestras de suero de todos los pacientes y el número de muestras analizadas fue menor en esta dosis que en el resto de determinaciones.

Tanto estos resultados como los obtenidos en la primera fase del estudio en la que se demostró una buena correlación de esta proteína con varios marcadores de inflamación y con la actividad clínica, endoscópica e histológica de la enfermedad, apuntan a Ang-1 (y por ende al sistema angiopoyetinas) como un factor clave con un papel relevante en la patogenia de la EII que además disminuye de forma significativa con el tratamiento anti-TNF- α en los pacientes en los que dicho tratamiento es eficaz. Aunque la mayoría de estudios publicados anteriormente encuentran unos niveles más bajos de Ang-1 en pacientes con EII

activa y confirman que la repuesta angiogénica es inducida por Ang-2, que en presencia de VEGF-A bloquea el normal efecto de Ang-1, el funcionamiento de este sistema no es tan sencillo (242, 266). Es cierto, que en condiciones normales, Ang-1 tiene propiedades estabilizadoras en las células endoteliales, suprimiendo la migración y aumentando la supervivencia por la inducción de la fosforilación del receptor Tie-2 (p-Tie-2) (238). Y que Ang-2 por el contrario, puede actuar como antagonista o agonista en función de la presencia o no de Ang-1, de modo que en presencia de Ang-1, Ang-2 actúa como antagonista uniéndose al receptor Tie-2 sin llevarse a cabo la fosforilación del mismo e interrumpiendo la señal esencial de Ang-1/Tie-2, por el contrario, en ausencia de Ang-1, puede mostrar actividad agonista (267, 268). Pero la función que estas proteínas en condiciones patológicas aún no se ha establecido. Las últimas publicaciones coincidiendo con nuestros resultados también han descrito niveles elevados de Ang-1 en pacientes con EII u otras patologías que apuntan a que esta proteína también tiene un papel proangiogénico (266, 269). Además, también se ha descrito que tanto Ang-1 como Ang-2 pueden interaccionar con otros receptores, incluyendo integrinas, lo que sugiere que las angiopoyetinas podrían estar envueltas en la adhesión y migración celular, sin la necesidad del receptor Tie-2 (270, 271). Por tanto, lo que se puede establecer hasta el momento es que la alteración de estas proteínas provoca un desequilibrio en este sistema que da lugar a un anormal proceso de maduración y estabilización de los vasos sanguíneos. Hasta la fecha, según nuestro conocimiento, tampoco existen datos disponibles en la literatura que analicen los posibles cambios en los niveles de Ang-1 tras el tratamiento con fármacos anti-TNF- α en pacientes con EII, y los datos que se han publicado a este respecto son en otros procesos inflamatorios. Existen estudios en los se han reportado una

expresión baja del mRNA de Ang-1, junto con unos niveles pequeños de expresión de las proteínas Ang-2, Tie-2 y VEGF-A en estudios con pacientes con psoriasis y artritis psoriásica, y en los que TNF- α parece ser el mayor regulador de la vía Ang/Tie-2 (272).

Los niveles séricos de VEGF-A no disminuyeron durante la terapia con anti-TNF- α , pero fueron marcadamente menores en pacientes que alcanzaron la remisión comparados con los pacientes no respondedores. Sin embargo, cuando los datos obtenidos para IFX y ADA fueron analizados de forma independiente, encontramos que los niveles obtenidos de VEGF-A antes de la tercera dosis disminuyeron respecto a la determinación basal en pacientes tratados con IFX, pero no encontramos estas diferencias en los pacientes tratados con ADA. Aunque no es un efecto directo de la terapia anti-TNF- α en los niveles séricos de VEGF-A, los hallazgos encontrados en el presente estudio si podrían sugerir una participación de esta proteína en la respuesta a IFX. Como se ha comentado con anterioridad, los datos publicados acerca de los posibles cambios en los niveles de factores proangiogénicos relacionados con la terapia anti-TNF- α son escasos y la mayoría se han desarrollado en otras patologías distintas de la EII. Sólo existen dos estudios previos que analizan el efecto de IFX en los niveles de VEGF-A en pacientes con EC. El primero de ellos fue conducido por Di Sabatino *et al.*, en él los autores observaron que IFX inducía una rápida y substancial disminución de los niveles séricos de VEGF-A y el factor de crecimiento fibroblástico básico en pacientes con EC que respondieron al tratamiento biológico (185). Rutella *et al.* también reportaron una disminución de VEGF-A en pacientes tratados con terapia

anti-TNF- α . En ese estudio los autores demostraron que la administración de IFX en pacientes con EC inhibía la angiogénesis en la mucosa y restringía la producción de VEGF-A por los fibroblastos en los pacientes que respondían al tratamiento (186). Este fenómeno, sin embargo, no fue observado en los pacientes no respondedores. Según nuestro conocimiento, el presente estudio es el primero que analiza el efecto de los fármacos anti-TNF- α , IFX y ADA sobre los niveles circulantes de factores angiogénicos en pacientes con EC y CU.

Estudios en otras enfermedades de base inmune han encontrado una mayor disminución en la expresión de VEGF-A y otras citoquinas en pacientes con artritis psoriásica tratados con IFX respecto a pacientes tratados con placebo (183). Sin embargo, dicho estudio fue realizado con muestras de tejido y líquido sinovial, lo que refleja la expresión local, pero no los niveles circulantes. Además, posiblemente debido a problemas metodológicos y/o éticos, las comparaciones fueron hechas entre el momento basal y la semana 8. En una cohorte de pacientes con espondiloartritis axial *naïve* a terapia anti-TNF- α , los pacientes tratados con ADA mostraron una disminución de los niveles en suero de VEGF-A respecto a los pacientes no tratados (273). Los mismos resultados han sido obtenidos en otras patologías como son: espondilitis anquilosante, artritis reumatoide o artritis psoriásica (184, 274-276). El papel dual que TNF- α tiene, pudiendo tener un efecto opuesto en la microvasculatura dependiendo de los niveles titulares locales, podría explicar las diferencias encontradas en estudios *in vitro* vs. *in vivo*, o entre los distintos tipos de muestras o localizaciones anatómicas. En estudios en neovascularización coroidal experimental, la administración intravitreal de IFX a

dosis bajas, disminuyó la angiogénesis, mientras que se obtuvo el efecto contrario a dosis elevadas de fármaco (277). En estudios *in vitro* realizados en cultivos de células endoteliales humanas procedentes de pacientes con EC, se reportó una normalización de los niveles de las proteínas óxido nítrico endotelial y VEGFR-2 (receptor al que se une VEGF-A) tras la adicción de IFX (278).

Como era esperable, el análisis de las curvas ROC determinó que VEGF-A y Ang-1 fueron los mejores predictores de la eficacia del tratamiento anti-TNF- α . Niveles elevados basales de VEGF-A estuvieron asociados con una mala respuesta a la terapia anti-TNF- α , mientras niveles altos de Ang-1 anteriores al inicio de la terapia biológica estuvieron relacionados con remisión de la EII tras la pauta de inducción. Sin embargo, aunque los resultados deben tomarse con cautela ya que los valores del ABC obtenidos fueron moderados (0,8 para VEGFA y 0,7 para Ang-1), éstos podrían sugerir a VEGF-A y Ang-1 como marcadores útiles de respuesta a la terapia anti-TNF- α . Los datos obtenidos no nos permiten establecer si los cambios observados en las concentraciones de estos factores son un efecto directo del fármaco o son secundarios a la acción que los inhibidores del TNF- α tienen en otras vías asociadas a la inflamación. Para investigar si una disminución de los niveles circulantes de los factores está asociado a un descenso de la actividad de la enfermedad durante el tratamiento con anti-TNF- α , los niveles séricos de las proteínas estudiadas durante el tratamiento anti-TNF- α fueron correlacionados con los índices de actividad clínica. Debido al pequeño tamaño muestral en el grupo de pacientes con CU, dicha correlación sólo fue realizada en la cohorte de pacientes con EC. Como ha sido ampliamente publicado en la

literatura existente, los valores del índice CDAI disminuyeron continuamente con cada dosis del tratamiento respecto al momento basal, pero dichas puntuaciones no correlacionaron con los niveles en suero de VEGF-A o Ang-1 (279, 280). Estos resultados pueden ser explicados en parte por las limitaciones asociadas al uso de índices clínicos, los cuales incluyen ítems asociados pero no limitados a la EII, como son el número de deposiciones, y conllevan determinaciones subjetivas como es el estado general que podría reflejar sólo en parte la actividad real de la enfermedad. Sin embargo, debido a que la colonoscopia no tenía indicación médica en esta fase del estudio, el uso de índices que determinen de forma más precisa la actividad de la enfermedad como es el caso de los endoscópicos no estaba justificado y los índices clínicos fueron la única opción para determinar la asociación entre los niveles circulantes de las proteínas angiogénicas y la actividad de la enfermedad.

En resumen, los pacientes con EII activa presentaron al igual que en la primera fase del estudio un perfil angiogénico caracterizado por unos niveles elevados de VEGF-A y una alteración del sistema de angiopoyetinas que apoyan la hipótesis de la implicación de un proceso angiogénico anómalo en la patogénesis de la EII. Además, los fármacos anti-TNF- α parecen modificar los niveles de VEGF-A y Ang-1 en pacientes que responden al tratamiento y que tales cambios podrían predecir la respuesta a esta terapia. Aún así, es necesario establecer si estos cambios en los niveles circulantes de las proteínas estudiadas son un efecto directo de los inhibidores de TNF- α o son una señal secundaria a la mejora de la EII. Por tanto, los datos obtenidos a este respecto podrán servir de base para

DISCUSIÓN

futuros estudios encaminados a dilucidar el efecto real que tiene tratamiento anti-TNF- α sobre los factores angiogénicos en la mucosa intestinal.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Los pacientes con EII activa presentaron un perfil angiogénico caracterizado por unas concentraciones elevadas a nivel local de todas las proteínas estudiadas, a excepción de VEGFR-3, respecto a los pacientes controles y a los pacientes sin actividad, apoyando la implicación de una angiogénesis alterada en la patogenia de la EII.
2. La sobreexpresión de VEGFR-2, VEGF-C y -D y la estabilidad de los niveles de VEGFR-3 sugieren que la función pro-linfangiogénica de VEGF-C y -D podría ser llevada a cabo vía VEGFR-2 en vez de VEGFR-3 en los períodos de actividad de la EII y que la vía de señalización de VEGFR-3 y por tanto, la linfangiogénesis por la vía habitual, podría estar bloqueada en estos pacientes.
3. Las alteraciones angio/linfangiogénicas observadas podrían ser reversibles, ya que los pacientes en remisión clínica y endoscópica tuvieron niveles de FAL en SMI iguales a los sujetos controles. Además, las diferencias encontradas en los pacientes con actividad fueron similares para los pacientes con EC y CU, sugiriendo un comportamiento similar de ambas entidades respecto a la angiogénesis y linfangiogénesis local.

CONCLUSIONES

4. Los niveles locales de FAL correlacionan bien con la actividad clínica, endoscópica e histológica de la EII, tienen buen valor pronóstico de actividad de la enfermedad, especialmente Ang-2, y podrían constituir una nueva diana terapéutica en futuras líneas de investigación.
5. Por el contrario, aunque las concentraciones en suero de VEGF-A y el sistema angiopoyetinas estuvieron alteradas en los pacientes con EII activa respecto a los controles, y correlacionaron con marcadores de inflamación como PCR y el RL y RP, la correlación en general de estas proteínas en suero con los niveles en SMI y la actividad clínica, endoscópica e histológica de la enfermedad es baja y por el momento, no se justifica la determinación de éstas como predictores de actividad.
6. En pacientes que alcanzaron la remisión con el tratamiento anti-TNF- α , los niveles séricos de Ang-1 disminuyeron significativamente con el tratamiento administrado, mientras que, los niveles de VEGF-A disminuyeron respecto a la determinación basal en pacientes tratados con IFX y fueron marcadamente menores en pacientes que alcanzaron la remisión comparados con los no respondedores, sugiriendo un papel de estas proteínas en la vía de actuación de los fármacos anti-TNF- α .
7. Los cambios en los niveles de VEGF-A y Ang-1 en pacientes que responden al tratamiento podrían predecir la respuesta a esta terapia, pero por el momento no es posible conocer si tales cambios son un efecto directo de los inhibidores de TNF- α o son una señal secundaria a la mejora de la EII.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 2007 May 12;369(9573):1627-40. PubMed PMID: 17499605.
2. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*. 2007 May 12;369(9573):1641-57. PubMed PMID: 17499606.
3. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology Supplement*. 1989;170:2-6; discussion 16-9. PubMed PMID: 2617184.
4. Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Beglinger C, Kupcinkas L, Geboes K, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut*. 2006 Mar;55 Suppl 1:i1-15. PubMed PMID: 16481628. Pubmed Central PMCID: 1859998.
5. Kornbluth A, Sachar DB, Practice Parameters Committee of the American College of G. Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *The American journal of gastroenterology*. 2004 Jul;99(7):1371-85. PubMed PMID: 15233681.
6. Chutkan RK, Scherl E, Waye JD. Colonoscopy in inflammatory bowel disease. *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America*. 2002 Jul;12(3):463-83, viii. PubMed PMID: 12486939.
7. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine*. 2002 Aug 8;347(6):417-29. PubMed PMID: 12167685.

8. Conrad K, Roggenbuck D, Laass MW. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. *Autoimmunity reviews*. 2014 Apr-May;13(4-5):463-6. PubMed PMID: 24424198.
9. Tanaka M, Saito H, Fukuda S, Sasaki Y, Munakata A, Kudo H. Simple mucosal biopsy criteria differentiating among Crohn disease, ulcerative colitis, and other forms of colitis: measurement of validity. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2000 Mar;35(3):281-6. PubMed PMID: 10766322.
10. Kleeer CG, Appelman HD. Ulcerative colitis: patterns of involvement in colorectal biopsies and changes with time. *The American journal of surgical pathology*. 1998 Aug;22(8):983-9. PubMed PMID: 9706978.
11. Jenkins D, Balsitis M, Gallivan S, Dixon MF, Gilmour HM, Shepherd NA, et al. Guidelines for the initial biopsy diagnosis of suspected chronic idiopathic inflammatory bowel disease. The British Society of Gastroenterology Initiative. *Journal of clinical pathology*. 1997 Feb;50(2):93-105. PubMed PMID: 9155688. Pubmed Central PMCID: 499731.
12. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie*. 2005 Sep;19 Suppl A:5A-36A. PubMed PMID: 16151544.
13. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*. 2006 Jun;55(6):749-53. PubMed PMID: 16698746. Pubmed Central PMCID: 1856208.

14. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J*. 1955 Oct 29;2(4947):1041-8. PubMed PMID: 13260656. Pubmed Central PMCID: 1981500.
15. Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Reinisch W, Geboes K, Barakauskiene A, et al. European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's & colitis*. 2008 Mar;2(1):1-23. PubMed PMID: 21172194.
16. Seo M, Okada M, Yao T, Ueki M, Arima S, Okumura M. An index of disease activity in patients with ulcerative colitis. *The American journal of gastroenterology*. 1992 Aug;87(8):971-6. PubMed PMID: 1642220.
17. Rachmilewitz D. Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomised trial. *Bmj*. 1989 Jan 14;298(6666):82-6. PubMed PMID: 2563951. Pubmed Central PMCID: 1835436.
18. Lichtiger S, Present DH, Kornbluth A, Gelernt I, Bauer J, Galler G, et al. Cyclosporine in severe ulcerative colitis refractory to steroid therapy. *The New England journal of medicine*. 1994 Jun 30;330(26):1841-5. PubMed PMID: 8196726.
19. Powell-Tuck J, Bown RL, Lennard-Jones JE. A comparison of oral prednisolone given as single or multiple daily doses for active proctocolitis. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 1978;13(7):833-7. PubMed PMID: 364626.
20. Sutherland LR, Martin F, Greer S, Robinson M, Greenberger N, Saibil F, et al. 5-Aminosalicylic acid enema in the treatment of distal ulcerative colitis,

proctosigmoiditis, and proctitis. *Gastroenterology*. 1987 Jun;92(6):1894-8. PubMed PMID: 3569765.

21. Sninsky CA, Cort DH, Shanahan F, Powers BJ, Sessions JT, Pruitt RE, et al. Oral mesalamine (Asacol) for mildly to moderately active ulcerative colitis. A multicenter study. *Annals of internal medicine*. 1991 Sep 1;115(5):350-5. PubMed PMID: 1863024.

22. Travis SP, Schnell D, Krzeski P, Abreu MT, Altman DG, Colombel JF, et al. Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). *Gut*. 2012 Apr;61(4):535-42. PubMed PMID: 21997563. Pubmed Central PMCID: 3292713.

23. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *The New England journal of medicine*. 1987 Dec 24;317(26):1625-9. PubMed PMID: 3317057.

24. de Lange T, Larsen S, Aabakken L. Inter-observer agreement in the assessment of endoscopic findings in ulcerative colitis. *BMC gastroenterology*. 2004 May 18;4:9. PubMed PMID: 15149550. Pubmed Central PMCID: 434504.

25. Osada T, Ohkusa T, Yokoyama T, Shibuya T, Sakamoto N, Beppu K, et al. Comparison of several activity indices for the evaluation of endoscopic activity in UC: inter- and intraobserver consistency. *Inflammatory bowel diseases*. 2010 Feb;16(2):192-7. PubMed PMID: 19575359.

26. Gomes P, du Boulay C, Smith CL, Holdstock G. Relationship between disease activity indices and colonoscopic findings in patients with colonic inflammatory bowel disease. *Gut*. 1986 Jan;27(1):92-5. PubMed PMID: 3949241. Pubmed Central PMCID: 1433178.

27. Riley SA, Mani V, Goodman MJ, Herd ME, Dutt S, Turnberg LA. Comparison of delayed release 5 aminosalicylic acid (mesalazine) and sulphasalazine in the treatment of mild to moderate ulcerative colitis relapse. *Gut*. 1988 May;29(5):669-74. PubMed PMID: 2899536. Pubmed Central PMCID: 1433642.
28. Hanauer S, Schwartz J, Robinson M, Roufail W, Arora S, Cello J, et al. Mesalamine capsules for treatment of active ulcerative colitis: results of a controlled trial. Pentasa Study Group. *The American journal of gastroenterology*. 1993 Aug;88(8):1188-97. PubMed PMID: 8338086.
29. Best WR, Beckett JM, Singleton JW. Rederived values of the eight coefficients of the Crohn's Disease Activity Index (CDAI). *Gastroenterology*. 1979 Oct;77(4 Pt 2):843-6. PubMed PMID: 467941.
30. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet*. 1980 Mar 8;1(8167):514. PubMed PMID: 6102236.
31. Irvine EJ. Usual therapy improves perianal Crohn's disease as measured by a new disease activity index. McMaster IBD Study Group. *Journal of clinical gastroenterology*. 1995 Jan;20(1):27-32. PubMed PMID: 7884173.
32. Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezaand RA, et al. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *The New England journal of medicine*. 1999 May 6;340(18):1398-405. PubMed PMID: 10228190.
33. Mary JY, Modigliani R. Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study. Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID). *Gut*. 1989 Jul;30(7):983-9. PubMed PMID: 2668130. Pubmed Central PMCID: 1434265.

34. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, Baert F, Bulois P, Maunoury V, et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointestinal endoscopy*. 2004 Oct;60(4):505-12. PubMed PMID: 15472670.
35. D'Haens G, Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G. The natural history of esophageal Crohn's disease: three patterns of evolution. *Gastrointestinal endoscopy*. 1994 May-Jun;40(3):296-300. PubMed PMID: 8056231.
36. D'Haens G, Geboes K, Ponette E, Penninckx F, Rutgeerts P. Healing of severe recurrent ileitis with azathioprine therapy in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1997 May;112(5):1475-81. PubMed PMID: 9136824.
37. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut*. 2006 Mar;55(3):426-31. PubMed PMID: 16474109. Pubmed Central PMCID: 1856093.
38. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. The role of C-reactive protein as an inflammatory marker in gastrointestinal diseases. *Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology*. 2005 Dec;2(12):580-6. PubMed PMID: 16327837.
39. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2004 Sep;10(5):661-5. PubMed PMID: 15472532.
40. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England journal of medicine*. 1999 Feb 11;340(6):448-54. PubMed PMID: 9971870.
41. Thomas RD, Westengard JC, Hay KL, Bull BS. Calibration and validation for erythrocyte sedimentation tests. *Role of the International Committee on*

Standardization in Hematology reference procedure. Archives of pathology & laboratory medicine. 1993 Jul;117(7):719-23. PubMed PMID: 8323437.

42. Lundberg JO, Hellstrom PM, Fagerhol MK, Weitzberg E, Roseth AG. Technology insight: calprotectin, lactoferrin and nitric oxide as novel markers of inflammatory bowel disease. Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology. 2005 Feb;2(2):96-102. PubMed PMID: 16265127.

43. Sipponen T. Diagnostics and prognostics of inflammatory bowel disease with fecal neutrophil-derived biomarkers calprotectin and lactoferrin. Digestive diseases. 2013;31(3-4):336-44. PubMed PMID: 24246984.

44. Logan I, Bowlus CL. The geoepidemiology of autoimmune intestinal diseases. Autoimmunity reviews. 2010 Mar;9(5):A372-8. PubMed PMID: 19903540.

45. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. Gastroenterology. 2012 Jan;142(1):46-54 e42; quiz e30. PubMed PMID: 22001864.

46. Ponder A, Long MD. A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. Clinical epidemiology. 2013;5:237-47. PubMed PMID: 23922506. Pubmed Central PMCID: 3728155.

47. Burisch J, Pedersen N, Cukovic-Cavka S, Turk N, Kaimakliotis I, Duricova D, et al. Environmental factors in a population-based inception cohort of inflammatory bowel disease patients in Europe--an ECCO-EpiCom study. Journal of Crohn's & colitis. 2014 Jul 1;8(7):607-16. PubMed PMID: 24315795.

48. Calkins BM, Mendeloff AI. Epidemiology of inflammatory bowel disease. Epidemiologic reviews. 1986;8:60-91. PubMed PMID: 3533585.

49. Mahid SS, Minor KS, Stevens PL, Galandiuk S. The role of smoking in Crohn's disease as defined by clinical variables. *Digestive diseases and sciences*. 2007 Nov;52(11):2897-903. PubMed PMID: 17401688.
50. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clinic proceedings*. 2006 Nov;81(11):1462-71. PubMed PMID: 17120402.
51. Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, Blain A, Reijasse D, Gendre JP. Effects of appendectomy on the course of ulcerative colitis. *Gut*. 2002 Dec;51(6):803-7. PubMed PMID: 12427780. Pubmed Central PMCID: 1773481.
52. Radford-Smith GL, Edwards JE, Purdie DM, Pandeya N, Watson M, Martin NG, et al. Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*. 2002 Dec;51(6):808-13. PubMed PMID: 12427781. Pubmed Central PMCID: 1773455.
53. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbohm A. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2003 Jan;124(1):40-6. PubMed PMID: 12512028.
54. Chapman-Kiddell CA, Davies PS, Gillen L, Radford-Smith GL. Role of diet in the development of inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2010 Jan;16(1):137-51. PubMed PMID: 19462428.
55. Cabre E, Domenech E. Impact of environmental and dietary factors on the course of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012 Aug 7;18(29):3814-22. PubMed PMID: 22876032. Pubmed Central PMCID: 3413052.
56. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, Higuchi LM, de Silva P, Fuchs CS, et al. Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's

disease. *Gut*. 2014 May;63(5):776-84. PubMed PMID: 23828881. Pubmed Central PMCID: 3915038.

57. Mann EA, Saeed SA. Gastrointestinal infection as a trigger for inflammatory bowel disease. *Current opinion in gastroenterology*. 2012 Jan;28(1):24-9. PubMed PMID: 22080823.

58. Berg AM, Kelly CP, Farraye FA. Clostridium difficile infection in the inflammatory bowel disease patient. *Inflammatory bowel diseases*. 2013 Jan;19(1):194-204. PubMed PMID: 22508484.

59. Over K, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. Current perspectives on Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis, Johne's disease, and Crohn's disease: a review. *Critical reviews in microbiology*. 2011 May;37(2):141-56. PubMed PMID: 21254832.

60. Cullen G, Baden RP, Cheifetz AS. Varicella zoster virus infection in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2012 Dec;18(12):2392-403. PubMed PMID: 22434654.

61. Khalili H, Higuchi LM, Ananthakrishnan AN, Richter JM, Feskanich D, Fuchs CS, et al. Oral contraceptives, reproductive factors and risk of inflammatory bowel disease. *Gut*. 2013 Aug;62(8):1153-9. PubMed PMID: 22619368. Pubmed Central PMCID: 3465475.

62. Zapata LB, Paulen ME, Cansino C, Marchbanks PA, Curtis KM. Contraceptive use among women with inflammatory bowel disease: A systematic review. *Contraception*. 2010 Jul;82(1):72-85. PubMed PMID: 20682145.

63. Khalili H, Higuchi LM, Ananthakrishnan AN, Manson JE, Feskanich D, Richter JM, et al. Hormone therapy increases risk of ulcerative colitis but not

Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2012 Nov;143(5):1199-206. PubMed PMID: 22841783. Pubmed Central PMCID: 3480540.

64. Ananthakrishnan AN, Higuchi LM, Huang ES, Khalili H, Richter JM, Fuchs CS, et al. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Annals of internal medicine*. 2012 Mar 6;156(5):350-9. PubMed PMID: 22393130. Pubmed Central PMCID: 3369539.

65. Paiotti AP, Marchi P, Miszputen SJ, Oshima CT, Franco M, Ribeiro DA. The role of nonsteroidal antiinflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors on experimental colitis. *In vivo*. 2012 May-Jun;26(3):381-93. PubMed PMID: 22523290.

66. van Eeden SF, Tan WC, Suwa T, Mukae H, Terashima T, Fujii T, et al. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10)). *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001 Sep 1;164(5):826-30. PubMed PMID: 11549540.

67. Dam AN, Berg AM, Farraye FA. Environmental influences on the onset and clinical course of Crohn's disease-part 1: an overview of external risk factors. *Gastroenterology & hepatology*. 2013 Nov;9(11):711-7. PubMed PMID: 24764788. Pubmed Central PMCID: 3995193.

68. Leslie WD, Miller N, Rogala L, Bernstein CN. Vitamin D status and bone density in recently diagnosed inflammatory bowel disease: the Manitoba IBD Cohort Study. *The American journal of gastroenterology*. 2008 Jun;103(6):1451-9. PubMed PMID: 18422819.

69. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A

study of heritability and the influence of smoking. *Gut*. 1988 Jul;29(7):990-6. PubMed PMID: 3396969. Pubmed Central PMCID: 1433769.

70. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *Bmj*. 1996 Jan 13;312(7023):95-6. PubMed PMID: 8555939. Pubmed Central PMCID: 2349773.

71. Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2000 Oct;35(10):1075-81. PubMed PMID: 11099061.

72. Freeman HJ. Familial Crohn's disease in single or multiple first-degree relatives. *Journal of clinical gastroenterology*. 2002 Jul;35(1):9-13. PubMed PMID: 12080219.

73. Satsangi J, Jewell DP, Rosenberg WM, Bell JI. Genetics of inflammatory bowel disease. *Gut*. 1994 May;35(5):696-700. PubMed PMID: 8200569. Pubmed Central PMCID: 1374760.

74. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen TI, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine*. 1991 Jan 10;324(2):84-8. PubMed PMID: 1984188.

75. Naser SA, Arce M, Khaja A, Fernandez M, Naser N, Elwasila S, et al. Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012 Feb 7;18(5):412-24. PubMed PMID: 22346247. Pubmed Central PMCID: 3270503.

76. Muzes G, Tulassay Z, Sipos F. Interplay of autophagy and innate immunity in Crohn's disease: a key immunobiologic feature. *World journal of gastroenterology :*

WJG. 2013 Jul 28;19(28):4447-54. PubMed PMID: 23901219. Pubmed Central PMCID: 3725368.

77. Tsianos EV, Katsanos KH, Tsianos VE. Role of genetics in the diagnosis and prognosis of Crohn's disease. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2011 Dec 28;17(48):5246-59. PubMed PMID: 22219593. Pubmed Central PMCID: 3247688.

78. Nalle SC, Turner JR. Endothelial and epithelial barriers in graft-versus-host disease. *Advances in experimental medicine and biology*. 2012;763:105-31. PubMed PMID: 23397621.

79. Jewell DP. Immunology of inflammatory bowel disease--an update. *Journal of gastroenterology*. 1995 Nov;30 Suppl 8:78-82. PubMed PMID: 8563898.

80. Cobrin GM, Abreu MT. Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease. *Immunological reviews*. 2005 Aug;206:277-95. PubMed PMID: 16048555.

81. Targan SR, Karp LC. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunological reviews*. 2005 Aug;206:296-305. PubMed PMID: 16048556.

82. Marks DJ, Harbord MW, MacAllister R, Rahman FZ, Young J, Al-Lazikani B, et al. Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation. *Lancet*. 2006 Feb 25;367(9511):668-78. PubMed PMID: 16503465.

83. Buning C, Geissler N, Prager M, Sturm A, Baumgart DC, Buttner J, et al. Increased small intestinal permeability in ulcerative colitis: rather genetic than environmental and a risk factor for extensive disease? *Inflammatory bowel diseases*. 2012 Oct;18(10):1932-9. PubMed PMID: 22344959.

84. John LJ, Fromm M, Schulzke JD. Epithelial barriers in intestinal inflammation. *Antioxidants & redox signaling*. 2011 Sep 1;15(5):1255-70. PubMed PMID: 21294654.

85. Catalioto RM, Maggi CA, Giuliani S. Intestinal epithelial barrier dysfunction in disease and possible therapeutical interventions. *Current medicinal chemistry*. 2011;18(3):398-426. PubMed PMID: 21143118.
86. Pousa ID, Gisbert JP, Mate J. [Vascular development in inflammatory bowel disease]. *Gastroenterologia y hepatologia*. 2006 Aug-Sep;29(7):414-21. PubMed PMID: 16938258. El desarrollo vascular en la enfermedad inflamatoria intestinal.
87. Felmeden DC, Blann AD, Lip GY. Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *European heart journal*. 2003 Apr;24(7):586-603. PubMed PMID: 12657217.
88. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):932-6. PubMed PMID: 16355210.
89. Risau W. Embryonic angiogenesis factors. *Pharmacology & therapeutics*. 1991;51(3):371-6. PubMed PMID: 1792240.
90. Kazemi S, Wenzel D, Kolossov E, Lenka N, Raible A, Sasse P, et al. Differential role of bFGF and VEGF for vasculogenesis. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2002;12(2-3):55-62. PubMed PMID: 12077550.
91. Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *The New England journal of medicine*. 1995 Dec 28;333(26):1757-63. PubMed PMID: 7491141.
92. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Current molecular medicine*. 2003 Nov;3(7):643-51. PubMed PMID: 14601638.
93. Dachs GU, Tozer GM. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *European journal of cancer*. 2000 Aug;36(13 Spec No):1649-60. PubMed PMID: 10959051.

94. Ruegg C, Mariotti A. Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS. 2003 Jun;60(6):1135-57. PubMed PMID: 12861381.
95. Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *The Journal of clinical investigation*. 2003 May;111(9):1287-95. PubMed PMID: 12727920. Pubmed Central PMCID: 154450.
96. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical science*. 2005 Sep;109(3):227-41. PubMed PMID: 16104843.
97. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *Journal of biochemistry*. 2013 Jan;153(1):13-9. PubMed PMID: 23172303. Pubmed Central PMCID: 3528006.
98. McDonald DM. Angiogenesis and remodeling of airway vasculature in chronic inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001 Nov 15;164(10 Pt 2):S39-45. PubMed PMID: 11734465.
99. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*. 2003 Jun;9(6):653-60. PubMed PMID: 12778163.
100. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Seminars in cancer biology*. 1992 Apr;3(2):65-71. PubMed PMID: 1378311.
101. Krankel N, Luscher TF, Landmesser U. "Endothelial progenitor cells" as a therapeutic strategy in cardiovascular disease. *Current vascular pharmacology*. 2012 Jan;10(1):107-24. PubMed PMID: 22112352.

102. Tahergorabi Z, Khazaei M. A review on angiogenesis and its assays. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2012 Nov;15(6):1110-26. PubMed PMID: 23653839. Pubmed Central PMCID: 3646220.
103. Kent DL. Age-related macular degeneration: beyond anti-angiogenesis. *Molecular vision*. 2014;20:46-55. PubMed PMID: 24426775. Pubmed Central PMCID: 3888498.
104. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. 2003 Jun;9(6):669-76. PubMed PMID: 12778165.
105. Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Seminars in cancer biology*. 1999 Jun;9(3):211-20. PubMed PMID: 10343072.
106. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *Journal of cell science*. 2001 Mar;114(Pt 5):853-65. PubMed PMID: 11181169.
107. Cueni LN, Detmar M. New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease. *The Journal of investigative dermatology*. 2006 Oct;126(10):2167-77. PubMed PMID: 16983326.
108. Luo J, Xiong Y, Han X, Lu Y. VEGF non-angiogenic functions in adult organ homeostasis: therapeutic implications. *Journal of molecular medicine*. 2011 Jul;89(7):635-45. PubMed PMID: 21365187.
109. Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, et al. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 Sep 29;95(20):11709-14. PubMed PMID: 9751730. Pubmed Central PMCID: 21705.

110. Li X, Aase K, Li H, von Euler G, Eriksson U. Isoform-specific expression of VEGF-B in normal tissues and tumors. *Growth factors*. 2001;19(1):49-59. PubMed PMID: 11678209.
111. Silvestre JS, Tamarat R, Ebrahimian TG, Le-Roux A, Clergue M, Emmanuel F, et al. Vascular endothelial growth factor-B promotes in vivo angiogenesis. *Circulation research*. 2003 Jul 25;93(2):114-23. PubMed PMID: 12805240.
112. Li X, Kumar A, Zhang F, Lee C, Tang Z. Complicated life, complicated VEGF-B. *Trends in molecular medicine*. 2012 Feb;18(2):119-27. PubMed PMID: 22178229.
113. Li X, Lee C, Tang Z, Zhang F, Arjunan P, Li Y, et al. VEGF-B: a survival, or an angiogenic factor? *Cell adhesion & migration*. 2009 Oct-Dec;3(4):322-7. PubMed PMID: 19684473. Pubmed Central PMCID: 2802739.
114. Zhang F, Tang Z, Hou X, Lennartsson J, Li Y, Koch AW, et al. VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009 Apr 14;106(15):6152-7. PubMed PMID: 19369214. Pubmed Central PMCID: 2669337.
115. Li Y, Zhang F, Nagai N, Tang Z, Zhang S, Scotney P, et al. VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1-mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats. *The Journal of clinical investigation*. 2008 Mar;118(3):913-23. PubMed PMID: 18259607. Pubmed Central PMCID: 2230661.
116. Lahteenvuo JE, Lahteenvuo MT, Kivela A, Rosenlew C, Falkevall A, Klar J, et al. Vascular endothelial growth factor-B induces myocardium-specific angiogenesis and arteriogenesis via vascular endothelial growth factor receptor-1-

and neuropilin receptor-1-dependent mechanisms. *Circulation*. 2009 Feb 17;119(6):845-56. PubMed PMID: 19188502.

117. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, et al. Role of PIGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nature medicine*. 2003 Jul;9(7):936-43. PubMed PMID: 12796773.

118. Taylor AP, Goldenberg DM. Role of placenta growth factor in malignancy and evidence that an antagonistic PIGF/Flt-1 peptide inhibits the growth and metastasis of human breast cancer xenografts. *Molecular cancer therapeutics*. 2007 Feb;6(2):524-31. PubMed PMID: 17308051.

119. Pipp F, Heil M, Issbrucker K, Ziegelhoeffer T, Martin S, van den Heuvel J, et al. VEGFR-1-selective VEGF homologue PIGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circulation research*. 2003 Mar 7;92(4):378-85. PubMed PMID: 12600898.

120. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*. 1997 Jul 4;277(5322):48-50. PubMed PMID: 9229772.

121. Clauss M. Functions of the VEGF receptor-1 (FLT-1) in the vasculature. *Trends in cardiovascular medicine*. 1998 Aug;8(6):241-5. PubMed PMID: 14987558.

122. Ambati BK, Nozaki M, Singh N, Takeda A, Jani PD, Suthar T, et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature*. 2006 Oct 26;443(7114):993-7. PubMed PMID: 17051153. Pubmed Central PMCID: 2656128.

123. Sela S, Itin A, Natanson-Yaron S, Greenfield C, Goldman-Wohl D, Yagel S, et al. A novel human-specific soluble vascular endothelial growth factor receptor 1: cell-type-specific splicing and implications to vascular endothelial growth factor

homeostasis and preeclampsia. *Circulation research*. 2008 Jun 20;102(12):1566-74. PubMed PMID: 18515749.

124. Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993 Nov 15;90(22):10705-9. PubMed PMID: 8248162. Pubmed Central PMCID: 47846.

125. Koch S, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012 Jul;2(7):a006502. PubMed PMID: 22762016. Pubmed Central PMCID: 3385940.

126. Meadows KN, Bryant P, Pumiglia K. Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Dec 28;276(52):49289-98. PubMed PMID: 11682481.

127. Zachary I, Glik G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovascular research*. 2001 Feb 16;49(3):568-81. PubMed PMID: 11166270.

128. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *The Journal of biological chemistry*. 1998 Nov 13;273(46):30336-43. PubMed PMID: 9804796.

129. Garrido-Urbani S, Bradfield PF, Lee BP, Imhof BA. Vascular and epithelial junctions: a barrier for leucocyte migration. *Biochemical Society transactions*. 2008 Apr;36(Pt 2):203-11. PubMed PMID: 18363562.

130. Mahabeleshwar GH, Feng W, Phillips DR, Byzova TV. Integrin signaling is critical for pathological angiogenesis. *The Journal of experimental medicine*. 2006

Oct 30;203(11):2495-507. PubMed PMID: 17030947. Pubmed Central PMCID: 2118124.

131. Ochiuni T, Kitadai Y, Tanaka S, Akagi M, Yoshihara M, Chayama K. Neuropilin-1 is involved in regulation of apoptosis and migration of human colon cancer. *International journal of oncology*. 2006 Jul;29(1):105-16. PubMed PMID: 16773190.

132. Shim WS, Ho IA, Wong PE. Angiopoietin: a TIE(d) balance in tumor angiogenesis. *Molecular cancer research : MCR*. 2007 Jul;5(7):655-65. PubMed PMID: 17634421.

133. Singh H, Tahir TA, Alawo DO, Issa E, Brindle NP. Molecular control of angiopoietin signalling. *Biochemical Society transactions*. 2011 Dec;39(6):1592-6. PubMed PMID: 22103492.

134. Tammela T, Saaristo A, Lohela M, Morisada T, Tornberg J, Norrmen C, et al. Angiopoietin-1 promotes lymphatic sprouting and hyperplasia. *Blood*. 2005 Jun 15;105(12):4642-8. PubMed PMID: 15746084.

135. Thurston G. Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell and tissue research*. 2003 Oct;314(1):61-8. PubMed PMID: 12915980.

136. Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry Biokhimiia*. 2008 Jul;73(7):751-62. PubMed PMID: 18707583.

137. Batard P, Sansilvestri P, Scheinecker C, Knapp W, Debili N, Vainchenker W, et al. The Tie receptor tyrosine kinase is expressed by human hematopoietic progenitor cells and by a subset of megakaryocytic cells. *Blood*. 1996 Mar 15;87(6):2212-20. PubMed PMID: 8630381.

138. Reiss Y. Angiopoietins. Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer. 2010;180:3-13. PubMed PMID: 20033375.
139. Popkov M, Jendreyko N, McGavern DB, Rader C, Barbas CF, 3rd. Targeting tumor angiogenesis with adenovirus-delivered anti-Tie-2 intrabody. Cancer research. 2005 Feb 1;65(3):972-81. PubMed PMID: 15705898.
140. Linares PM, Gisbert JP. Role of growth factors in the development of lymphangiogenesis driven by inflammatory bowel disease: a review. Inflammatory bowel diseases. 2011 Aug;17(8):1814-21. PubMed PMID: 21744436.
141. Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. The Journal of experimental medicine. 2002 Dec 2;196(11):1497-506. PubMed PMID: 12461084. Pubmed Central PMCID: 2194262.
142. Wu TF, MacNaughton WK, von der Weid PY. Lymphatic vessel contractile activity and intestinal inflammation. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2005 Mar;100 Suppl 1:107-10. PubMed PMID: 15962107.
143. Makinen T, Alitalo K. Lymphangiogenesis in development and disease. Novartis Foundation symposium. 2007;283:87-98; discussion -105, 238-41. PubMed PMID: 18300416.
144. Karpanen T, Alitalo K. Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. Annual review of pathology. 2008;3:367-97. PubMed PMID: 18039141.

145. Shimoda H, Kato S. A model for lymphatic regeneration in tissue repair of the intestinal muscle coat. *International review of cytology*. 2006;250:73-108. PubMed PMID: 16861064.
146. Kenney BC, Jain D. Identification of lymphatics within the colonic lamina propria in inflammation and neoplasia using the monoclonal antibody D2-40. *The Yale journal of biology and medicine*. 2008 Sep;81(3):103-13. PubMed PMID: 18827885. Pubmed Central PMCID: 2553648.
147. Fogt F, Pascha TL, Zhang PJ, Gausas RE, Rahemtulla A, Zimmerman RL. Proliferation of D2-40-expressing intestinal lymphatic vessels in the lamina propria in inflammatory bowel disease. *International journal of molecular medicine*. 2004 Feb;13(2):211-4. PubMed PMID: 14719125.
148. Butler MG, Isogai S, Weinstein BM. Lymphatic development. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews*. 2009 Sep;87(3):222-31. PubMed PMID: 19750516. Pubmed Central PMCID: 2755610.
149. Pula B, Witkiewicz W, Dziegiel P, Podhorska-Okolow M. Significance of podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts: a comprehensive review. *International journal of oncology*. 2013 Jun;42(6):1849-57. PubMed PMID: 23588876.
150. Kalof AN, Cooper K. D2-40 immunohistochemistry--so far! *Advances in anatomic pathology*. 2009 Jan;16(1):62-4. PubMed PMID: 19098468.
151. Jackson DG. Biology of the lymphatic marker LYVE-1 and applications in research into lymphatic trafficking and lymphangiogenesis. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2004 Jul-Aug;112(7-8):526-38. PubMed PMID: 15563314.

152. Kato S, Shimoda H, Ji RC, Miura M. Lymphangiogenesis and expression of specific molecules as lymphatic endothelial cell markers. *Anatomical science international*. 2006 Jun;81(2):71-83. PubMed PMID: 16800291.
153. Veikkola T, Jussila L, Makinen T, Karpanen T, Jeltsch M, Petrova TV, et al. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *The EMBO journal*. 2001 Mar 15;20(6):1223-31. PubMed PMID: 11250889. Pubmed Central PMCID: 145532.
154. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *The EMBO journal*. 1996 Apr 1;15(7):1751. PubMed PMID: 8612600. Pubmed Central PMCID: 450088.
155. Wang J, Guo Y, Wang B, Bi J, Li K, Liang X, et al. Lymphatic microvessel density and vascular endothelial growth factor-C and -D as prognostic factors in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of the literature. *Molecular biology reports*. 2012 Dec;39(12):11153-65. PubMed PMID: 23054001.
156. Alitalo A, Detmar M. Interaction of tumor cells and lymphatic vessels in cancer progression. *Oncogene*. 2012 Oct 18;31(42):4499-508. PubMed PMID: 22179834.
157. Van Trappen PO, Steele D, Lowe DG, Baithun S, Beasley N, Thiele W, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D, and their receptor VEGFR-3, during different stages of cervical carcinogenesis. *The Journal of pathology*. 2003 Dec;201(4):544-54. PubMed PMID: 14648657.
158. Zhao YC, Ni XJ, Li Y, Dai M, Yuan ZX, Zhu YY, et al. Peritumoral lymphangiogenesis induced by vascular endothelial growth factor C and D promotes lymph node metastasis in breast cancer patients. *World journal of surgical*

oncology. 2012;10:165. PubMed PMID: 22906075. Pubmed Central PMCID: 3499230.

159. Duong T, Koltowska K, Pichol-Thievend C, Le Guen L, Fontaine F, Smith KA, et al. VEGFD regulates blood vascular development by modulating SOX18 activity. *Blood*. 2014 Feb 13;123(7):1102-12. PubMed PMID: 24269955.

160. Orlandini M, Spreafico A, Bardelli M, Rocchigiani M, Salameh A, Nucciotti S, et al. Vascular endothelial growth factor-D activates VEGFR-3 expressed in osteoblasts inducing their differentiation. *The Journal of biological chemistry*. 2006 Jun 30;281(26):17961-7. PubMed PMID: 16624815.

161. Le Bras B, Barallobre MJ, Homman-Ludiye J, Ny A, Wyns S, Tammela T, et al. VEGF-C is a trophic factor for neural progenitors in the vertebrate embryonic brain. *Nature neuroscience*. 2006 Mar;9(3):340-8. PubMed PMID: 16462734.

162. Schmeisser A, Christoph M, Augstein A, Marquetant R, Kasper M, Braun-Dullaeus RC, et al. Apoptosis of human macrophages by Flt-4 signaling: implications for atherosclerotic plaque pathology. *Cardiovascular research*. 2006 Sep 1;71(4):774-84. PubMed PMID: 16887107.

163. Petrova TV, Bono P, Holnthoner W, Chesnes J, Pytowski B, Sihto H, et al. VEGFR-3 expression is restricted to blood and lymphatic vessels in solid tumors. *Cancer cell*. 2008 Jun;13(6):554-6. PubMed PMID: 18538738.

164. Galvagni F, Pennacchini S, Salameh A, Rocchigiani M, Neri F, Orlandini M, et al. Endothelial cell adhesion to the extracellular matrix induces c-Src-dependent VEGFR-3 phosphorylation without the activation of the receptor intrinsic kinase activity. *Circulation research*. 2010 Jun 25;106(12):1839-48. PubMed PMID: 20431062.

165. Deng Y, Simons M. Lymphatic fate determination: playing RAF with ERK. *Cell cycle*. 2013 Apr 15;12(8):1157-8. PubMed PMID: 23549166. Pubmed Central PMCID: 3674076.
166. Kaiserling E, Krober S, Geleff S. Lymphatic vessels in the colonic mucosa in ulcerative colitis. *Lymphology*. 2003 Jun;36(2):52-61. PubMed PMID: 12926829.
167. Pedica F, Ligorio C, Tonelli P, Bartolini S, Baccarini P. Lymphangiogenesis in Crohn's disease: an immunohistochemical study using monoclonal antibody D2-40. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2008 Jan;452(1):57-63. PubMed PMID: 18040712.
168. Geleff S, Schoppmann SF, Oberhuber G. Increase in podoplanin-expressing intestinal lymphatic vessels in inflammatory bowel disease. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2003 Mar;442(3):231-7. PubMed PMID: 12647212.
169. Rahier JF, De Beauce S, Dubuquoy L, Erdual E, Colombel JF, Jouret-Mourin A, et al. Increased lymphatic vessel density and lymphangiogenesis in inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2011 Sep;34(5):533-43. PubMed PMID: 21736598.
170. Rahier JF, Dubuquoy L, Colombel JF, Jouret-Mourin A, Delos M, Ferrante M, et al. Decreased lymphatic vessel density is associated with postoperative endoscopic recurrence in Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2013 Sep;19(10):2084-90. PubMed PMID: 23851640.
171. Von Der Weid PY, Rehal S. Lymphatic pump function in the inflamed gut. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010 Oct;1207 Suppl 1:E69-74. PubMed PMID: 20961308.

172. Alexander JS, Chaitanya GV, Grisham MB, Boktor M. Emerging roles of lymphatics in inflammatory bowel disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010 Oct;1207 Suppl 1:E75-85. PubMed PMID: 20961310.
173. Loges S, Clausen H, Reichelt U, Bubenheim M, Erbersdobler A, Schurr P, et al. Determination of microvessel density by quantitative real-time PCR in esophageal cancer: correlation with histologic methods, angiogenic growth factor expression, and lymph node metastasis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007 Jan 1;13(1):76-80. PubMed PMID: 17200341.
174. Iwata T, Miyata Y, Kanda S, Nishikido M, Hayashi T, Sakai H, et al. Lymphangiogenesis and angiogenesis in conventional renal cell carcinoma: association with vascular endothelial growth factors A to D immunohistochemistry. *Urology*. 2008 Apr;71(4):749-54. PubMed PMID: 18295862.
175. Schroeder M, Viezens L, Fuhrhop I, Ruther W, Schaefer C, Schwarzloh B, et al. Angiogenic growth factors in rheumatoid arthritis. *Rheumatology international*. 2013 Feb;33(2):523-7. PubMed PMID: 22068355.
176. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature medicine*. 1995 Jan;1(1):27-31. PubMed PMID: 7584949.
177. Canavese M, Altruda F, Ruzicka T, Schaubert J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in the pathogenesis of psoriasis--a possible target for novel therapies? *Journal of dermatological science*. 2010 Jun;58(3):171-6. PubMed PMID: 20430590.
178. Gao Q, Meijer MJ, Schluter UG, van Hogezaand RA, van der Zon JM, van den Berg M, et al. Infliximab treatment influences the serological expression of matrix

metalloproteinase (MMP)-2 and -9 in Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2007 Jun;13(6):693-702. PubMed PMID: 17243139.

179. Polzer K, Baeten D, Soleiman A, Distler J, Gerlag DM, Tak PP, et al. Tumour necrosis factor blockade increases lymphangiogenesis in murine and human arthritic joints. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008 Nov;67(11):1610-6. PubMed PMID: 18174217.

180. Olson JL, Courtney RJ, Mandava N. Intravitreal infliximab and choroidal neovascularization in an animal model. *Archives of ophthalmology*. 2007 Sep;125(9):1221-4. PubMed PMID: 17846362.

181. Meijer MJ, Mieremet-Ooms MA, van Duijn W, van der Zon AM, Hanemaaijer R, Verheijen JH, et al. Effect of the anti-tumor necrosis factor-alpha antibody infliximab on the ex vivo mucosal matrix metalloproteinase-proteolytic phenotype in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2007 Feb;13(2):200-10. PubMed PMID: 17206679.

182. Goedkoop AY, Kraan MC, Picavet DI, de Rie MA, Teunissen MB, Bos JD, et al. Deactivation of endothelium and reduction in angiogenesis in psoriatic skin and synovium by low dose infliximab therapy in combination with stable methotrexate therapy: a prospective single-centre study. *Arthritis research & therapy*. 2004;6(4):R326-34. PubMed PMID: 15225368. Pubmed Central PMCID: 464872.

183. Canete JD, Pablos JL, Sanmarti R, Mallofre C, Marsal S, Maymo J, et al. Antiangiogenic effects of anti-tumor necrosis factor alpha therapy with infliximab in psoriatic arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2004 May;50(5):1636-41. PubMed PMID: 15146434.

184. Strunk J, Bundke E, Lange U. Anti-TNF-alpha antibody Infliximab and glucocorticoids reduce serum vascular endothelial growth factor levels in patients

with rheumatoid arthritis: a pilot study. *Rheumatology international*. 2006 Jan;26(3):252-6. PubMed PMID: 15999273.

185. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Armellini E, Morera R, Ricevuti L, Cazzola P, et al. Serum bFGF and VEGF correlate respectively with bowel wall thickness and intramural blood flow in Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2004 Sep;10(5):573-7. PubMed PMID: 15472517.

186. Rutella S, Fiorino G, Vetrano S, Correale C, Spinelli A, Pagano N, et al. Infliximab therapy inhibits inflammation-induced angiogenesis in the mucosa of patients with Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology*. 2011 Apr;106(4):762-70. PubMed PMID: 21364546.

187. Hanabata N, Sasaki Y, Tanaka M, Tsuji T, Hatada Y, Hada R, et al. Vascular endothelial growth factor expression and microvessel parameters of colonic mucosa correlate with sensitivity to steroid in patients with ulcerative colitis. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2005 Feb;40(2):188-93. PubMed PMID: 15764150.

188. Danese S, Sans M, Scaldaferri F, Sgambato A, Rutella S, Cittadini A, et al. TNF-alpha blockade down-regulates the CD40/CD40L pathway in the mucosal microcirculation: a novel anti-inflammatory mechanism of infliximab in Crohn's disease. *Journal of immunology*. 2006 Feb 15;176(4):2617-24. PubMed PMID: 16456024.

189. Ochsenkuhn T, Sackmann M, Goke B. Infliximab for acute, not steroid-refractory ulcerative colitis: a randomized pilot study. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2004 Nov;16(11):1167-71. PubMed PMID: 15489577.

190. Keshav S, Vanasek T, Niv Y, Petryka R, Howaldt S, Bafutto M, et al. A randomized controlled trial of the efficacy and safety of CCX282-B, an orally-

administered blocker of chemokine receptor CCR9, for patients with Crohn's disease. *PloS one*. 2013;8(3):e60094. PubMed PMID: 23527300. Pubmed Central PMCID: 3603920.

191. Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Colombel JF, Panaccione R, et al. Adalimumab induction therapy for Crohn disease previously treated with infliximab: a randomized trial. *Annals of internal medicine*. 2007 Jun 19;146(12):829-38. PubMed PMID: 17470824.

192. Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2006 Aug 14;12(30):4807-12. PubMed PMID: 16937461. Pubmed Central PMCID: 4087613.

193. Danese S, Dejana E, Fiocchi C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *Journal of immunology*. 2007 May 15;178(10):6017-22. PubMed PMID: 17475823.

194. Fiocchi C. Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *The American journal of physiology*. 1997 Oct;273(4 Pt 1):G769-75. PubMed PMID: 9357817.

195. Danese S. Inflammation and the mucosal microcirculation in inflammatory bowel disease: the ebb and flow. *Current opinion in gastroenterology*. 2007 Jul;23(4):384-9. PubMed PMID: 17545773.

196. Bagli E, Xagorari A, Papetropoulos A, Murphy C, Fotsis T. Angiogenesis in inflammation. *Autoimmunity reviews*. 2004 Jun;3 Suppl 1:S26. PubMed PMID: 15309776.

197. Scaldaferrri F, Vetrano S, Sans M, Arena V, Straface G, Stigliano E, et al. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease

- pathogenesis. *Gastroenterology*. 2009 Feb;136(2):585-95 e5. PubMed PMID: 19013462.
198. Danese S. VEGF in inflammatory bowel disease: a master regulator of mucosal immune-driven angiogenesis. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2008 Aug;40(8):680-3. PubMed PMID: 18406217.
199. Goebel S, Huang M, Davis WC, Jennings M, Siahaan TJ, Alexander JS, et al. VEGF-A stimulation of leukocyte adhesion to colonic microvascular endothelium: implications for inflammatory bowel disease. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2006 Apr;290(4):G648-54. PubMed PMID: 16293653.
200. Becker F, Yi P, Al-Kofahi M, Ganta VC, Morris J, Alexander JS. Lymphatic dysregulation in intestinal inflammation: new insights into inflammatory bowel disease pathomechanisms. *Lymphology*. 2014 Mar;47(1):3-27. PubMed PMID: 25109166.
201. Alitalo K. The lymphatic vasculature in disease. *Nature medicine*. 2011;17(11):1371-80. PubMed PMID: 22064427.
202. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nature medicine*. 2001 Feb;7(2):192-8. PubMed PMID: 11175850.
203. Kerjaschki D, Regele HM, Moosberger I, Nagy-Bojarski K, Watschinger B, Soleiman A, et al. Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2004 Mar;15(3):603-12. PubMed PMID: 14978162.

204. Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC, et al. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *The EMBO journal*. 2001 Sep 3;20(17):4762-73. PubMed PMID: 11532940. Pubmed Central PMCID: 125596.
205. Karkkainen MJ, Ferrell RE, Lawrence EC, Kimak MA, Levinson KL, McTigue MA, et al. Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphoedema. *Nature genetics*. 2000 Jun;25(2):153-9. PubMed PMID: 10835628.
206. Makinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, et al. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nature medicine*. 2001 Feb;7(2):199-205. PubMed PMID: 11175851.
207. Kajiya K, Detmar M. An important role of lymphatic vessels in the control of UVB-induced edema formation and inflammation. *The Journal of investigative dermatology*. 2006 Apr;126(4):919-21. PubMed PMID: 16470183.
208. Baluk P, Tammela T, Ator E, Lyubynska N, Achen MG, Hicklin DJ, et al. Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation. *The Journal of clinical investigation*. 2005 Feb;115(2):247-57. PubMed PMID: 15668734. Pubmed Central PMCID: 544601.
209. Jurisic G, Sundberg JP, Detmar M. Blockade of VEGF receptor-3 aggravates inflammatory bowel disease and lymphatic vessel enlargement. *Inflammatory bowel diseases*. 2013 Aug;19(9):1983-9. PubMed PMID: 23835443. Pubmed Central PMCID: 3732464.
210. Angeli V, Randolph GJ. Inflammation, lymphatic function, and dendritic cell migration. *Lymphatic research and biology*. 2006;4(4):217-28. PubMed PMID: 17394405.

211. Cursiefen C, Cao J, Chen L, Liu Y, Maruyama K, Jackson D, et al. Inhibition of hemangiogenesis and lymphangiogenesis after normal-risk corneal transplantation by neutralizing VEGF promotes graft survival. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2004 Aug;45(8):2666-73. PubMed PMID: 15277490.
212. White JD, Hewett PW, Kosuge D, McCulloch T, Enholm BC, Carmichael J, et al. Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. *Cancer research*. 2002 Mar 15;62(6):1669-75. PubMed PMID: 11912138.
213. McCourt M, Wang JH, Sookhai S, Redmond HP. Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis. *Archives of surgery*. 1999 Dec;134(12):1325-31; discussion 31-2. PubMed PMID: 10593330.
214. Ristimaki A, Narko K, Enholm B, Joukov V, Alitalo K. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *The Journal of biological chemistry*. 1998 Apr 3;273(14):8413-8. PubMed PMID: 9525952.
215. Paavonen K, Puolakkainen P, Jussila L, Jahkola T, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *The American journal of pathology*. 2000 May;156(5):1499-504. PubMed PMID: 10793061. Pubmed Central PMCID: 1876915.
216. D'Alessio S, Correale C, Tacconi C, Gandelli A, Pietrogrande G, Vetrano S, et al. VEGF-C-dependent stimulation of lymphatic function ameliorates experimental inflammatory bowel disease. *The Journal of clinical investigation*. 2014 Sep 2;124(9):3863-78. PubMed PMID: 25105363. Pubmed Central PMCID: 4151217.

217. Danese S, Sans M, de la Motte C, Graziani C, West G, Phillips MH, et al. Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology*. 2006 Jun;130(7):2060-73. PubMed PMID: 16762629.
218. Koutroubakis IE, Tsiolakidou G, Karmiris K, Kouroumalis EA. Role of angiogenesis in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2006 Jun;12(6):515-23. PubMed PMID: 16775497.
219. Sandor Z, Deng XM, Khomenko T, Tarnawski AS, Szabo S. Altered angiogenic balance in ulcerative colitis: a key to impaired healing? *Biochemical and biophysical research communications*. 2006 Nov 10;350(1):147-50. PubMed PMID: 17011522.
220. Griga T, Voigt E, Gretzer B, Brasch F, May B. Increased production of vascular endothelial growth factor by intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Hepato-gastroenterology*. 1999 Mar-Apr;46(26):920-3. PubMed PMID: 10370639.
221. Griga T, May B, Pfisterer O, Muller KM, Brasch F. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Hepato-gastroenterology*. 2002 Jan-Feb;49(43):116-23. PubMed PMID: 11941933.
222. Kapsoritakis A, Sfiridaki A, Maltezos E, Simopoulos K, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. Vascular endothelial growth factor in inflammatory bowel disease. *International journal of colorectal disease*. 2003 Sep;18(5):418-22. PubMed PMID: 12761641.
223. Wejman J, Pyzlak M, Szukiewicz D, Jarosz D, Tarnowski W, Szewczyk G. Thrombospondin and VEGF-R: is there a correlation in inflammatory bowel

disease? Mediators of inflammation. 2013;2013:908259. PubMed PMID: 23970816. Pubmed Central PMCID: 3732645.

224. Man XY, Yang XH, Cai SQ, Yao YG, Zheng M. Immunolocalization and expression of vascular endothelial growth factor receptors (VEGFRs) and neuropilins (NRPs) on keratinocytes in human epidermis. *Molecular medicine*. 2006 Jul-Aug;12(7-8):127-36. PubMed PMID: 17088944. Pubmed Central PMCID: 1626599.

225. Qazi Y, Maddula S, Ambati BK. Mediators of ocular angiogenesis. *Journal of genetics*. 2009 Dec;88(4):495-515. PubMed PMID: 20090210. Pubmed Central PMCID: 3306772.

226. Chang JH, Garg NK, Lunde E, Han KY, Jain S, Azar DT. Corneal neovascularization: an anti-VEGF therapy review. *Survey of ophthalmology*. 2012 Sep;57(5):415-29. PubMed PMID: 22898649. Pubmed Central PMCID: 3709023.

227. Chidlow JH, Jr., Langston W, Greer JJ, Ostanin D, Abdelbaqi M, Houghton J, et al. Differential angiogenic regulation of experimental colitis. *The American journal of pathology*. 2006 Dec;169(6):2014-30. PubMed PMID: 17148665. Pubmed Central PMCID: 1762465.

228. Danese S, Sans M, Spencer DM, Beck I, Donate F, Plunkett ML, et al. Angiogenesis blockade as a new therapeutic approach to experimental colitis. *Gut*. 2007 Jun;56(6):855-62. PubMed PMID: 17170016. Pubmed Central PMCID: 1954843.

229. Shamamian P, Schwartz JD, Pocock BJ, Monea S, Whiting D, Marcus SG, et al. Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: a role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. *Journal of cellular physiology*. 2001 Nov;189(2):197-206. PubMed PMID: 11598905.

230. Cassatella MA. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Advances in immunology*. 1999;73:369-509. PubMed PMID: 10399011.
231. Schrufer R, Lutze N, Schymeinsky J, Walzog B. Human neutrophils promote angiogenesis by a paracrine feedforward mechanism involving endothelial interleukin-8. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2005 Mar;288(3):H1186-92. PubMed PMID: 15498828.
232. Knowles H, Leek R, Harris AL. Macrophage infiltration and angiogenesis in human malignancy. *Novartis Foundation symposium*. 2004;256:189-200; discussion -4, 59-69. PubMed PMID: 15027491.
233. Ten Hove T, The Olive F, Berkhout M, Bruggeman JP, Vyth-Dreese FA, Slors JF, et al. Expression of CD45RB functionally distinguishes intestinal T lymphocytes in inflammatory bowel disease. *Journal of leukocyte biology*. 2004 Jun;75(6):1010-5. PubMed PMID: 15020649.
234. Griga T, Tromm A, Spranger J, May B. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 1998 May;33(5):504-8. PubMed PMID: 9648990.
235. Kanazawa S, Tsunoda T, Onuma E, Majima T, Kagiya M, Kikuchi K. VEGF, basic-FGF, and TGF-beta in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *The American journal of gastroenterology*. 2001 Mar;96(3):822-8. PubMed PMID: 11280558.
236. Ferrante M, Pierik M, Henckaerts L, Joossens M, Claes K, Van Schuerbeek N, et al. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2006 Sep;12(9):870-8. PubMed PMID: 16954806.

237. Linares PM, Chaparro M, Gisbert JP. Angiopoietins in inflammation and their implication in the development of inflammatory bowel disease. A review. *Journal of Crohn's & colitis*. 2014 Mar;8(3):183-90. PubMed PMID: 23859759.
238. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*. 1996 Dec 27;87(7):1161-9. PubMed PMID: 8980223.
239. Bousvaros A, Leichtner A, Zurakowski D, Kwon J, Law T, Keough K, et al. Elevated serum vascular endothelial growth factor in children and young adults with Crohn's disease. *Digestive diseases and sciences*. 1999 Feb;44(2):424-30. PubMed PMID: 10063933.
240. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 1997 Jul 4;277(5322):55-60. PubMed PMID: 9204896.
241. Koutroubakis IE, Xidakis C, Karmiris K, Sfiridaki A, Kandidaki E, Kouroumalis EA. Potential role of soluble angiopoietin-2 and Tie-2 in patients with inflammatory bowel disease. *European journal of clinical investigation*. 2006 Feb;36(2):127-32. PubMed PMID: 16436095.
242. Pousa ID, Mate J, Salcedo-Mora X, Abreu MT, Moreno-Otero R, Gisbert JP. Role of vascular endothelial growth factor and angiopoietin systems in serum of Crohn's disease patients. *Inflammatory bowel diseases*. 2008 Jan;14(1):61-7. PubMed PMID: 17879276.
243. Ganter Gallagher DC, Parikh SM, Balonov K, Miller A, Gautam S, Talmor D, et al. Circulating angiopoietin 2 correlates with mortality in a surgical population with acute lung injury/adult respiratory distress syndrome. *Shock*. 2008 Jun;29(6):656-61. PubMed PMID: 18091573. Pubmed Central PMCID: 4037741.

244. Ganter MT, Cohen MJ, Brohi K, Chesebro BB, Staudenmayer KL, Rahn P, et al. Angiopoietin-2, marker and mediator of endothelial activation with prognostic significance early after trauma? *Annals of surgery*. 2008 Feb;247(2):320-6. PubMed PMID: 18216540.
245. Ganta VC, Cromer W, Mills GL, Traylor J, Jennings M, Daley S, et al. Angiopoietin-2 in experimental colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2010 Jun;16(6):1029-39. PubMed PMID: 19902545. Pubmed Central PMCID: 2881632.
246. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2005 Jul;129(1):50-65. PubMed PMID: 16012934.
247. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008 May;42(2):145-51. PubMed PMID: 18304834.
248. Coskun M, Olsen J, Seidelin JB, Nielsen OH. MAP kinases in inflammatory bowel disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2011 Mar 18;412(7-8):513-20. PubMed PMID: 21185271.
249. Murch SH, Lamkin VA, Savage MO, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut*. 1991 Aug;32(8):913-7. PubMed PMID: 1885073. Pubmed Central PMCID: 1378961.
250. MacDonald TT, Hutchings P, Choy MY, Murch S, Cooke A. Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. *Clinical and experimental immunology*. 1990 Aug;81(2):301-5. PubMed PMID: 2117510. Pubmed Central PMCID: 1535044.

251. Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, Stephens S, MacDonald TT. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet*. 1992 Jan 11;339(8785):89-91. PubMed PMID: 1345871.
252. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *The New England journal of medicine*. 1997 Oct 9;337(15):1029-35. PubMed PMID: 9321530.
253. Liang S, Dai J, Hou S, Su L, Zhang D, Guo H, et al. Structural basis for treating tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-associated diseases with the therapeutic antibody infliximab. *The Journal of biological chemistry*. 2013 May 10;288(19):13799-807. PubMed PMID: 23504311. Pubmed Central PMCID: 3650416.
254. Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, MacIntosh D, et al. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology*. 2006 Feb;130(2):323-33; quiz 591. PubMed PMID: 16472588.
255. Ordas I, Mould DR, Feagan BG, Sandborn WJ. Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2012 Apr;91(4):635-46. PubMed PMID: 22357456.
256. Giraud E, Primo L, Audero E, Gerber HP, Koolwijk P, Soker S, et al. Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells.

The Journal of biological chemistry. 1998 Aug 21;273(34):22128-35. PubMed PMID: 9705358.

257. Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J, Prionas SD, Allison AC. Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. The American journal of pathology. 1992 Mar;140(3):539-44. PubMed PMID: 1372154. Pubmed Central PMCID: 1886157.

258. Fajardo LF, Grau GE. Tumor necrosis factor in human disease. The Western journal of medicine. 1991 Jan;154(1):88-9. PubMed PMID: 2024513. Pubmed Central PMCID: 1002681.

259. van Hinsbergh VW, van den Berg EA, Fiers W, Dooijewaard G. Tumor necrosis factor induces the production of urokinase-type plasminogen activator by human endothelial cells. Blood. 1990 May 15;75(10):1991-8. PubMed PMID: 2140060.

260. Hanemaaijer R, Koolwijk P, le Clercq L, de Vree WJ, van Hinsbergh VW. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. The Biochemical journal. 1993 Dec 15;296 (Pt 3):803-9. PubMed PMID: 8280080. Pubmed Central PMCID: 1137766.

261. Koolwijk P, van Erck MG, de Vree WJ, Vermeer MA, Weich HA, Hanemaaijer R, et al. Cooperative effect of TNFalpha, bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity. The Journal of cell biology. 1996 Mar;132(6):1177-88. PubMed PMID: 8601593. Pubmed Central PMCID: 2120755.

262. Frater-Schroder M, Risau W, Hallmann R, Gautschi P, Bohlen P. Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994 Jun 14;91(12):5555-9. PubMed PMID: 1282753. Pubmed Central PMCID: 2241155.

States of America. 1987 Aug;84(15):5277-81. PubMed PMID: 2440047. Pubmed Central PMCID: 298838.

263. Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, et al. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Molecular and cellular biology*. 1997 Jul;17(7):4015-23. PubMed PMID: 9199336. Pubmed Central PMCID: 232254.

264. Scaldaferri F, Sans M, Vetrano S, Correale C, Arena V, Pagano N, et al. The role of MAPK in governing lymphocyte adhesion to and migration across the microvasculature in inflammatory bowel disease. *European journal of immunology*. 2009 Jan;39(1):290-300. PubMed PMID: 19130554.

265. Oikonomou KA, Kapsoritakis AN, Kapsoritaki AI, Manolakis AC, Tiaka EK, Tsiopoulos FD, et al. Angiogenin, angiopoietin-1, angiopoietin-2, and endostatin serum levels in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2011 Apr;17(4):963-70. PubMed PMID: 20629092.

266. Yoshizaki A, Nakayama T, Naito S, Sekine I. Expression patterns of angiopoietin-1, -2, and tie-2 receptor in ulcerative colitis support involvement of the angiopoietin/tie pathway in the progression of ulcerative colitis. *Digestive diseases and sciences*. 2009 Oct;54(10):2094-9. PubMed PMID: 19051019.

267. Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, Hegen A, Grunow V, Schmidt JM, et al. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood*. 2004 Jun 1;103(11):4150-6. PubMed PMID: 14976056.

268. Teichert-Kuliszewska K, Maisonpierre PC, Jones N, Campbell AI, Master Z, Bendeck MP, et al. Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of

angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovascular research*. 2001 Feb 16;49(3):659-70. PubMed PMID: 11166279.

269. Hua J, He ZG, Qian DH, Lin SP, Gong J, Meng HB, et al. Angiopoietin-1 gene-modified human mesenchymal stem cells promote angiogenesis and reduce acute pancreatitis in rats. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014;7(7):3580-95. PubMed PMID: 25120736. Pubmed Central PMCID: 4128971.

270. Dallabrida SM, Ismail NS, Pravda EA, Parodi EM, Dickie R, Durand EM, et al. Integrin binding angiopoietin-1 monomers reduce cardiac hypertrophy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008 Aug;22(8):3010-23. PubMed PMID: 18502941. Pubmed Central PMCID: 2493452.

271. Weber CC, Cai H, Ehrbar M, Kubota H, Martiny-Baron G, Weber W, et al. Effects of protein and gene transfer of the angiopoietin-1 fibrinogen-like receptor-binding domain on endothelial and vessel organization. *The Journal of biological chemistry*. 2005 Jun 10;280(23):22445-53. PubMed PMID: 15781448.

272. Markham T, Mullan R, Golden-Mason L, Rogers S, Bresnihan B, Fitzgerald O, et al. Resolution of endothelial activation and down-regulation of Tie2 receptor in psoriatic skin after infliximab therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2006 Jun;54(6):1003-12. PubMed PMID: 16713454.

273. Appel H, Janssen L, Listing J, Heydrich R, Rudwaleit M, Sieper J. Serum levels of biomarkers of bone and cartilage destruction and new bone formation in different cohorts of patients with axial spondyloarthritis with and without tumor necrosis factor-alpha blocker treatment. *Arthritis research & therapy*. 2008;10(5):R125. PubMed PMID: 18945353. Pubmed Central PMCID: 2592815.

274. Visvanathan S, Wagner C, Marini JC, Baker D, Gathany T, Han J, et al. Inflammatory biomarkers, disease activity and spinal disease measures in patients with ankylosing spondylitis after treatment with infliximab. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008 Apr;67(4):511-7. PubMed PMID: 17644552. Pubmed Central PMCID: 2564765.
275. Paleolog EM, Young S, Stark AC, McCloskey RV, Feldmann M, Maini RN. Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1998 Jul;41(7):1258-65. PubMed PMID: 9663484.
276. Cordiali-Fei P, Trento E, D'Agosto G, Bordignon V, Mussi A, Ardigo M, et al. Decreased levels of metalloproteinase-9 and angiogenic factors in skin lesions of patients with psoriatic arthritis after therapy with anti-TNF-alpha. *Journal of autoimmune diseases*. 2006;3:5. PubMed PMID: 17022813. Pubmed Central PMCID: 1601955.
277. Regatieri CV, Dreyfuss JL, Melo GB, Lavinsky D, Farah ME, Nader HB. Dual role of intravitreal infliximab in experimental choroidal neovascularization: effect on the expression of sulfated glycosaminoglycans. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009 Nov;50(11):5487-94. PubMed PMID: 19516009.
278. Altorjay I, Vereb Z, Serfozo Z, Bacskai I, Batori R, Erdodi F, et al. Anti-TNF-alpha antibody (infliximab) therapy supports the recovery of eNOS and VEGFR2 protein expression in endothelial cells. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2011 Apr-Jun;24(2):323-35. PubMed PMID: 21658307.
279. Armuzzi A, De Pascalis B, Lupascu A, Fedeli P, Leo D, Mentella MC, et al. Infliximab in the treatment of steroid-dependent ulcerative colitis. *European review*

BIBLIOGRAFÍA

for medical and pharmacological sciences. 2004 Sep-Oct;8(5):231-3. PubMed PMID: 15638236.

280. Fiorino G, Szabo H, Fries W, Malesci A, Peyrin-Biroulet L, Danese S. Adalimumab in Crohn's disease: tips and tricks after 5 years of clinical experience. Current medicinal chemistry. 2011;18(8):1230-8. PubMed PMID: 21291363.

Abreviaturas

ABREVIATURAS

-EII: enfermedad inflamatoria intestinal

-EC: enfermedad de Crohn

-CU: colitis ulcerosa

-CDAI: *Crohn's disease activity index*

-CDEIS: *Crohn's disease endoscopic index of severity*

-SES-CD: *simplified endoscopic activity score for Crohn's disease*

-VSG: velocidad de sedimentación globular

- PCR: Proteína C reactiva

- RL: Recuento de leucocitos

- RP: Recuento de plaquetas

- HB: Hemoglobina

- VEGF: Vascular endotelial growth factor

- VEGF-A: Vascular endotelial growth factor A

- VEGF-B: Vascular endotelial growth factor B

- VEGF-C: Vascular endotelial growth factor C

- VEGF-D: Vascular endotelial growth factor D

- VEGFR-1: Vascular endotelial growth factor receptor 1
- VEGFR-2: Vascular endotelial growth factor receptor 2
- VEGFR-3: Vascular endotelial growth factor receptor 3
- Ang-1: Angiopoyetina-1
- Ang-2: Angiopoyetina-2
- Tie-2: *endothelium specific-receptor tyrosine kinasa*
- FGF: *fibroblast growth factor*
- IFX: infliximab
- ADA: adalimumab
- TNF- α : *tumor necrosis factor alpha*
- FAL: principales factores angiogénicos y linfangiogénicos
- SMI: sobrenadante de mucosa intestinal
- ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*
- ANOVA: *analysis of variance*
- ROC: *receiver operating characteristic*
- ABC: área bajo la curva

Anexos



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



Alicia Algaba ^{a,*}, Pablo M. Linares ^b, M. Encarnación Fernández-Contreras ^b, Amparo Ordoñez ^c, Javier Trápaga ^c, Iván Guerra ^a, María Chaparro ^b, Gema de la Poza ^a, Javier P. Gisbert ^b, Fernando Bermejo ^a

^a Department of Gastroenterology of the Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid, Spain

^b Hospital Universitario de La Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IP) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Madrid, Spain

^c Department of Clinical Biochemistry, Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid, Spain

Received 15 December 2012; received in revised form 2 April 2013; accepted 4 April 2013

KEYWORDS

Angiogenesis;
Angiogenic and lymphangiogenic factors;
Inflammatory bowel disease;
Lymphangiogenesis;
Vascular endothelial growth factor

Abstract

Background: Angiogenic and lymphangiogenic factors (ALFs) may play an important role in inflammatory bowel disease (IBD). Our aims were to evaluate levels of ALFs in serum and the colonic mucosa culture supernatant (MCS) of patients with active and quiescent IBD and healthy subjects and to correlate them with the endoscopic, clinical and histological activity and with acute-phase reactants.

Methods: This is a prospective study of 28 controls and 72 IBD patients. Serum and MCS concentration of VEGFA, VEGFC, VEGFD, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PlGF, Ang1, Ang2 and Tie2 were measured by ELISA. Activity was established by specific indexes (CDAI, Mayo score, SES-CD, D'Haens scale and Riley index). Acute-phase reactants were routinely measured.

Results: MCS levels of all ALFs except VEGFR3 were higher in patients with endoscopic ($p < 0.05$), clinical ($p < 0.05$) and histological ($p < 0.01$) activity than in those without it. In serum, VEGFA, VEGFC and Ang1 and VEGFA and Ang1 levels were lower in patients in remission than in patients with clinical and histological activity, respectively ($p < 0.05$). There was a correlation between serum and MCS concentrations for VEGFD, VEGFR3, PlGF and Tie2 ($r = 0.25$, $r = 0.48$, $r = -0.45$ and

* Corresponding author at: C/Isaac Peral, 43. Bloque D1, 1ºB. 28330, San Martín de la Vega. Madrid, Spain. Tel.: +34 699646717; fax.: +34 916006175.

E-mail address: alicia_algaba@hotmail.com (A. Algaba).

$r = 0.36$; $p < 0.05$). Ang2 in MCS was the best predictor for the diagnosis of endoscopic, histological and clinical activity (area under ROC curve > 0.8).

Conclusions: MCS determination suggests a local increase in ALFs that correlates with IBD activity. Although the correlation between ALFs in serum and MCS was not good, the study of some of these factors as possible targets of new drugs for IBD constitutes a key new line of research.

© 2013 European Crohn's and Colitis Organisation. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Angiogenesis is defined as the formation of new blood vessels from pre-existing ones.¹ This process occurs during various physiological processes, e.g., embryogenesis, female reproductive cycle, hair growth cycle, wound healing or tissue growth.^{2,3} In physiological angiogenesis, after stabilization and structuralisation of the new formed capillary network, the balance between pro- and anti-angiogenic factors returns to baseline levels and the process ends.⁴ However, an imbalance between positive and negative regulators probably leads to pathological angiogenesis which has been suggested to promote diseases such as cancer, ischemic cardiovascular disease, diabetic retinopathy and rheumatoid arthritis.^{5,6}

In contrast to blood vessels, lymphatic vessel biology is much less understood. Lymphatic vessels carry out important physiological functions including draining excess body fluid from tissues, intestinal fat absorption and immune cell trafficking through the lymph nodes.^{3,7} Several studies have documented the association of lymphangiogenesis with tumour growth and metastatic spread.^{8–10}

Inflammatory bowel disease (IBD) includes Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). The etiology of CD or UC has not been fully elucidated. There is growing clinical and experimental evidence suggesting that the initiation and progression of these inflammatory disorders involve complex interactions among genetic, immune and environmental factors.^{11–13} Recent findings indicate that angiogenesis and lymphangiogenesis also play a crucial role in IBD.^{14–19}

New biochemical, molecular and immunohistochemical studies indicate that several families of growth factors, such as the vascular endothelial growth factor (VEGF) family and their receptors, and the angiopoietin system may play an important role in the onset of IBD. To date, there is a lack of comparative studies analysing these growth factors at a systemic and local level using colonic mucosa culture supernatant (MCS), and levels of these proteins have not been correlated with either the clinical, endoscopic or histological activity of IBD.

The aims of this study were: (i) to evaluate and compare the levels of the main angiogenic and lymphangiogenic factors (ALFs) and their receptors in serum and MCS from patients with active and quiescent IBD and healthy controls, and (ii) to correlate ALF levels with the endoscopic, clinical and histological activity, and with acute-phase reactants (APR) in patients with CD and UC. A complete characterization of angiogenic and lymphangiogenic processes should help to elucidate the pathogenesis of IBD and help to propose lines for future research in this field.

2. Materials and methods

2.1. Patients and controls

A prospective study was carried-out on 28 non-IBD controls and 72 patients with IBD (37 UC and 35 CD) that underwent a colonoscopy by medical criteria at *Hospital Universitario de Fuenlabrada*. IBD was diagnosed by clinical, radiological, endoscopic and histological criteria.²⁰ IBD location was established in accordance with the Montreal classification.²¹ Patients were classified into active or quiescent CD and UC by endoscopic and clinical criteria, as defined below. All participants were asked to sign an informed consent form prior recruitment. The study was approved by the Research Ethics Committee at *Hospital Universitario de Fuenlabrada* and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

2.2. Endoscopic activity of IBD

Experienced gastroenterologists performed the ileocolonoscopies and graded the findings according to the Simple Endoscopic Score index for CD (SES-CD) and the endoscopic Mayo subscore for UC.

An SES-CD score between 0 and 2 suggested inactive disease in the colon and terminal ileum, 3–6 mildly active, 7–15 moderately active, and > 16 severely active disease.^{22,23}

Regarding UC activity, a Mayo endoscopic subscore of 0 was considered inactive disease, 1 as mild activity, 2 as moderate activity and 3 as severe activity.²⁴

2.3. Histological activity of IBD

All specimens were subjected to histological examination by an experienced pathologist.

In CD patients, histological activity was graded according to a scale of mucosal alterations developed by D'Haens et al.²⁵ The total histological score was a sum of the following variables: epithelial damage [normal (score = 0), focal pathology (score = 1) or extensive pathology (score = 2)]; architectural changes [normal (score = 0), moderately disturbed (score = 1) or severely disturbed (score = 2)]; infiltration of the lamina propria by mononuclear polymorphonuclear cells [normal (score = 0), moderate increase (score = 1), severe increase (score = 2)]; polymorphonuclear cells in the epithelium [in surface epithelium (score = 1), cryptitis (score = 2) and crypt abscess (score = 3)]; presence of erosion and/or ulcer and presence of granuloma [both scored as yes (score = 1) or no (score = 0)] and the number of biopsies

affected [none (score = 0), <33% (score = 1) and 33–66% (score = 2)].

Histological findings in UC patients were evaluated by using the Riley Index.²⁶ Six histological features of UC were considered: acute inflammatory cell infiltrate (polymorphonuclear cells in the lamina propria), crypt abscesses, mucin depletion, surface epithelial integrity, chronic inflammatory cell infiltrate (round cells in the lamina propria), and crypt architectural irregularities. Each feature was graded on a four-point scale from 0 to 3.

2.4. Clinical activity of IBD

CD and UC clinical activity were ascertained by Crohn's Disease Activity Index (CDAI) and Mayo Score respectively.²⁷ A CDAI score below 150 indicated a quiescent disease; 150–250, mild disease; 251–350, moderate disease; and >350, severe disease. A Mayo score ≤ 2 was considered disease remission; 3–5, mild disease; 6–10 moderate disease, and a score between 10 and 12 was considered severe disease.

2.5. APR

Blood leukocytes (normal range $4.0\text{--}11.0 \times 10^9/\text{L}$), haemoglobin (normal range 13.0–17.3 g/dL), C-reactive protein (CRP, upper limit of normal 5 mg/L), platelet count (normal range: $140\text{--}450 \times 10^9/\text{L}$) and erythrocyte sedimentation rate (ESR, upper limit of normal < 15 mm/h) were routinely determined before endoscopy procedures.

2.6. Samples and determinations

Three different specimens were obtained per subject:

- Blood samples for ALF measurement in serum: Peripheral blood was collected before colonoscopy in serum separator tubes, allowed to clot for 30 min at room temperature and centrifuged for 15 min at 3500 rpm. Serum was stored at -70°C until analysis.
- Tissue samples for ALF determination in MCS: Four colon biopsies were taken from non-affected (controls and non-active IBD patients) and/or affected mucosa (active IBD patients). In patients with active disease, samples from both inflamed and non-inflamed colonic mucosa were also taken when the disease extension was allowed. Biopsies were washed for 3–4 h in Complete Medium (RPMI supplemented with foetal calf serum (10%), HEPES, antibiotics and antifungal mixture) at 4°C on a shaker. After washing, mucosal specimens were incubated at 37°C and 5% CO_2 over inserts with $0.2\ \mu\text{m}$ pore size and well plates with Complete Medium. 24 h later, biopsies were weighed and culture supernatants were collected and stored at -70°C until ALF determination.
- Biopsies for histological analyses: Samples were obtained from the same area as those for MCS. Tissues were fixed in 4% paraformaldehyde and sent to the Department of Pathology for histological examination.

Vascular endothelial growth factors A, C and D (VEGFA, VEGFC, VEGFD), their receptors 1, 2 and 3 (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), placental growth factor (PIGF), angiopoietins 1 and 2 (Ang1, Ang2) and their receptor (Tie2) levels in serum and MCS were determined by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Human Immunoassay Quantikine, R & D Systems,

Minneapolis, USA) following the manufacturer's directions. Inter- and intra-assay variations and precision were calculated in-house as previously described.^{24,25,28,29}

2.7. Statistical analysis

Frequencies and percentages were determined for categorical variables. For quantitative variables, data were shown as the mean \pm standard deviation (SD). The Kolmogorov–Smirnov test was used to evaluate normality in continuous variables. Comparison between quantitative variables and two groups of categorical variables were made by Student's *t*-test or by the Mann–Whitney *U*-test when normal distribution was not followed. Comparisons between quantitative and qualitative variables with three or more categories were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) test or by non-parametric Kruskal–Wallis test. To analyse the relationship between two quantitative variables, Pearson's and Spearman's correlation coefficients were determined for variables with a Gaussian and non-Gaussian distribution, respectively. Concordance analysis was determined by the kappa coefficient (κ). The area under the receiver operating characteristics (ROC) curve was calculated to evaluate the accuracy of each ALF to predict endoscopic, histological and clinical activity of IBD. Statistical significance was assumed for *p* values less than 0.05.

3. Results

3.1. Characteristics of patients and non-IBD controls

Seventy-two patients were studied, their mean age was 42 ± 12 years, 58% were female, and 28% were smokers. The control group consisted of 28 subjects with a mean age of 47 ± 6 years; 64% were female, and 35% were smokers. IBD diagnosis was CD in 49% and UC in 51% of the patients. Their mean disease duration was 9.6 ± 7.9 years. All the clinical and demographic characteristics of IBD patients and controls are shown in Table 1. A clear association between smoking and concentrations of these proteins in both patients and control groups was not found (data not shown).

3.2. Determination of ALFs in Serum and colonic mucosa culture supernatant in patients with IBD and controls

Patients were classified into four groups according to endoscopic and clinical criteria: active ($n = 21$) and quiescent ($n = 16$) UC, active ($n = 16$) and inactive ($n = 19$) colonic CD (all of them with a CDAI < 150).

Table 2 shows differences between serum levels of all ALFs and controls. VEGF concentration was higher in active UC patients than in patients in remission. Compared with controls, serum VEGFR3 and Ang1 concentrations were significantly higher in patients with active UC and serum Ang1 was higher in patients with active CD. Subjects with active or quiescent UC and CD had significantly higher serum levels of Tie2 than controls.

Table 3 summarizes the results in MCS. When comparing IBD patients to controls, all studied ALFs except VEGFR3,

Table 1 Clinical and demographic characteristics of the studied inflammatory bowel disease patients and controls.

	CD	UC	Controls
N	35	37	28
Gender			
– Female	21 (60)	21 (57)	18 (64)
– Male	14 (40)	16 (43)	10 (36)
Age (years): mean ± SD	38 ± 9	46 ± 13	47 ± 6
Smoking status			
– Smoker	18 (51)	2 (5)	8 (35)
– Former smoker	6 (17)	17 (46)	2 (9)
– Non-smoker	11 (31)	18 (49)	13 (56)
Family history of IBD			
– Yes	7 (20)	8 (22)	–
– No	28 (80)	29 (78)	–
Extraintestinal manifestations of IBD			
– None	25 (71)	30 (81)	–
– Rheumatic	6 (17)	4 (11)	–
– Mucocutaneous	3 (9)	1 (3)	–
– Rheumatic + mucocutaneous	1 (3)	1 (3)	–
– Other manifestations	0 (0)	1 (3)	–
Disease duration (years): mean ± SD	7.6 ± 4.6	11.5 ± 9.7	–
Disease extension UC ^a			
– Proctitis	–	2 (6)	–
– Left-sided colitis	–	26 (72)	–
– Pancolitis	–	8 (22)	–
Age at diagnosis CD (years) ^a			
A1 (≤16)	1 (3)	–	–
A2 (17–40)	28 (80)	–	–
A3 (>40)	6 (17)	–	–
Disease Location CD ^a			
– L1 (ileal)	8 (23)	–	–
– L2 (colic)	9 (26)	–	–
– L3 (ileocolic)	16 (46)	–	–
– L3+ L4 (upper gastrointestinal tract)	1 (3)	–	–
– L2 + L4	1 (3)	–	–
Behaviour CD ^a			
– B1 (non-stricturing non-penetrating)	18 (51)	–	–
– B2 (structuring)	1 (3)	–	–
– B3 (penetrating)	4 (11)	–	–
– B1+ peri-anal disease	10 (29)	–	–
– B3+ peri-anal disease	2 (6)	–	–
Medication at endoscopy ^b			
– No medication	9 (26)	2 (5)	–
– 5-ASA	6 (17)	31 (84)	–
– Oral corticosteroids	2 (6)	8 (22)	–
– Azathioprine/ mercaptopurine	16 (46)	6 (16)	–
– Methotrexate	1 (3)	0 (0)	–
– TNF- α inhibitors	10 (29)	2 (5)	–

Abbreviations: SD, standard deviation; inflammatory bowel disease, IBD; CD, Crohn's Disease; UC, ulcerative colitis (numbers in parenthesis are percentages).

^a In accordance with the Montreal classification.

^b Some therapy regimens may overlap.

were elevated in patients with active disease ($p < 0.05$). The same trend close to statistical significance was observed for VEGFR2 levels in patients with active CD ($p = 0.054$). ALF MCS levels observed in patients with quiescent IBD did not diverge from those of controls. An exception was observed for Ang2, which was lower in patients with inactive colonic CD than in controls (17.6 ± 6.6 vs. 21.5 ± 6.1 pg/mL per mg of tissue, $p < 0.01$).

3.3. Correlation between serum and MCS ALF levels

VEGFD, VEGFR3 and Tie2 serum levels showed a positive correlation with their corresponding concentrations in MCS ($r = 0.25$, $r = 0.48$, and $r = 0.36$, respectively; $p < 0.05$). This correlation was negative for PlGF ($r = -0.45$; $p < 0.05$). Further associations between serum and MCS levels were not found for the remaining ALFs (data not shown).

3.4. ALF levels and IBD clinical activity

According to CDAI and Mayo global indexes, disease activity was mild in 19% of patients ($n = 14$), moderate in 24% ($n = 17$), and 57% ($n = 41$) had no activity. Again, with the exception of VEGFR3, the levels of all the studied proteins in MCS were higher in patients with clinical activity than in those without it (Fig. 1) ($p < 0.05$). In serum measurements, VEGFA, VEGFC and Ang1 were significantly higher in patients with clinical activity compared to those with inactive disease (VEGFA: 592 ± 447 vs. 395 ± 274 pg/mL, $p = 0.02$; VEGFC: 13.9 ± 4.8 vs. 11.8 ± 3.5 pg/mL, $p = 0.03$ and Ang1: 58.7 ± 17.6 vs. 50.8 ± 14.5 ng/mL, $p = 0.04$).

MCS levels of all ALFs, except VEGFR2 and VEGFR3, significantly correlated with CD activity, as measured by the CDAI index ($p < 0.05$). Regarding serum levels, VEGFR1, VEGFR2 and VEGFR3 correlated negatively with CD activity (Table 4). In UC patients, a positive correlation was found between VEGFA, VEGFR1, PlGF, Ang1, Ang2 and Tie2 MCS levels, and the Mayo score (Table 4). The correlation coefficients for these analyses were weaker than those for CDAI index in all cases. Serum VEGFA and VEGFC also correlated significantly with the Mayo score (Table 4).

There was a significant correlation between endoscopic and clinical activity in both UC ($r = 0.873$; $p < 0.001$) and CD ($r = 0.62$; $p < 0.001$).

3.5. ALF levels and endoscopic activity of IBD

According to the Mayo subscore and the SES-CD endoscopic indexes, IBD activity was mild in 11% ($n = 7$) of patients, moderate in 31% ($n = 19$) and severe in 5% ($n = 3$). The remaining 53% ($n = 33$) did not show endoscopic activity.

MCS concentrations of all studied ALFs except VEGFR3 were significantly varied with the endoscopic activity ($p < 0.05$). VEGFR3 showed a similar trend, close to the threshold of statistical significance ($p = 0.07$) (Fig. 2). These concentrations were higher in patients with endoscopic activity than in those without it ($p < 0.05$). These findings were not observed for serum ALFs (data not shown).

When we studied UC and CD separately, the Mayo endoscopic sub-score significantly correlated with all ALFs in MCS and the SES-CD score correlated with all except

Table 2 Serum concentration of ALFs in controls and patients with active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease.

	Controls	AUC	QUC	ACD	QCD
VEGF	458.1 ± 272.4	588.5 ± 382.5 [#]	328.2 ± 230.3	570.3 ± 487.7	411.5 ± 298.5
PlGF	15.8 ± 8	15.4 ± 9.5	13.5 ± 7.6	12.6 ± 4.9	16.3 ± 12.3
VEGFC	12 ± 3.3	13.4 ± 4.5	11.8 ± 2.5	13.6 ± 5	11.8 ± 4.4
VEGFD	672.9 ± 340.6	748.2 ± 567.7	602.2 ± 234.2	748.8 ± 398.7	613.8 ± 361.4
VEGFR1	181.3 ± 55.9	200.7 ± 43.2	173.6 ± 52.9	154.2 ± 50.2	176.8 ± 59.2
VEGFR2	12.4 ± 2.5	12 ± 2.4	12.7 ± 2.7	10.8 ± 2.6	12.3 ± 2.8
VEGFR3	24 ± 10.5	31.8 ± 14 [*]	24.6 ± 7.9	20.8 ± 9	26.5 ± 12.26
Ang1	44 ± 16.3	55.7 ± 10.6 [*]	49.2 ± 13	61.7 ± 22.8 [*]	50.7 ± 16.5
Ang2	2.6 ± 0.9	3 ± 1.2	2.7 ± 0.7	3.3 ± 2.1	3.1 ± 1
Tie2	23.9 ± 5	29.7 ± 7.7 [*]	28.5 ± 7 [*]	28.6 ± 6.1 [*]	27.6 ± 7.1 [*]

Vascular endothelial growth factor A and D (VEGFA, VEGFD), placental growth factor (PlGF) and vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1) concentrations are expressed in pg/mL, all other proteins in ng/mL. Abbreviations: AUC (active ulcerative colitis patients), QUC (quiescent ulcerative colitis patients), ACD (colonic active Crohn's disease patients), QCD (colonic inactive Crohn's disease patients).

^{*} Significant differences compared to control ($p = 0.05$).

[#] Significant differences compared to patients in remission ($p = 0.05$).

VEGFR2 and VEGFR3. Regarding serum ALF levels, Ang1 correlated with the SES-CD score and VEGFA correlated with the Mayo endoscopic subscore (Table 5).

In 60% ($n = 22$) of patients with endoscopic activity, biopsies of affected and non-affected mucosa were taken for comparison. As shown in Table 6, PlGF, VEGFR2, Ang1 and Tie2 levels were higher in the affected tissue than in the non-affected tissue.

3.6. ALF levels and histological activity

Histological activity was mild in 20% of patients ($n = 13$), moderate in 34% ($n = 22$), severe in 8% ($n = 5$), and 38% ($n = 25$) had quiescent IBD. The concordance between endoscopic and histological activity indexes was higher in UC ($\kappa = 0.73$) than in CD patients ($\kappa = 0.55$). Levels of all the studied proteins in MCS also correlated significantly ($p < 0.01$) with histological

activity. These concentrations diverged with the severity of histological lesions, with the highest ALF levels corresponding to patients with severe lesions (Fig. 3).

Only VEGFA and Ang1 serum levels were higher in patients with histological activity than in those without it (577 ± 426 vs. 346 ± 239 pg/mL, $p < 0.01$ and 57.8 ± 16.4 vs. 47.2 ± 14.6 ng/mL, $p < 0.05$, respectively). Further differences in serum ALF levels related to histological activity were not observed (data not shown).

3.7. Association of ALFs with APR

The correlations between serum ALFs and APR are shown in Table 7. Ang1 and VEGFA correlated significantly with CRP and platelet and leukocyte counts. There was a significant correlation between platelet count and VEGFA ($r = 0.293$; $p = 0.005$); VEGFC ($r = 0.231$; $p = 0.028$); VEGFR1 ($r = 0.238$;

Table 3 Tissue supernatant concentration of angiogenic and lymphangiogenic factors in controls and patients with active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease.

	Controls	AUC	QUC	ACD	QCD
VEGFA	10.7 ± 5.5	20.2 ± 9.5 ^{*,#}	12.1 ± 6.1	19.8 ± 12.1 ^{*,#}	8.9 ± 3.9
PlGF	0.9 ± 0.5	1.9 ± 0.8 ^{*,#}	1.1 ± 0.6	2.1 ± 1.1 ^{*,#}	0.7 ± 0.6
VEGFC	15.7 ± 5.8	26.6 ± 13.5 ^{*,#}	17 ± 6.1	25.2 ± 10.6 ^{*,#}	13.2 ± 5.8
VEGFD	3.7 ± 1.8	6.4 ± 3.7 ^{*,#}	4.3 ± 2.2	6.4 ± 3.2 ^{*,#}	3.1 ± 2
VEGFR1	5.5 ± 2.4	14.7 ± 9.1 ^{*,#}	5.8 ± 3.5	12.5 ± 6.2 ^{*,#}	6.3 ± 4.5
VEGFR2	1.2 ± 0.8	2.7 ± 2.3 [*]	1.1 ± 0.6	1.7 ± 0.9 [#]	1 ± 0.6
VEGFR3	200.5 ± 93.8	237.9 ± 103.1	170 ± 97.2	206 ± 98.8	170.1 ± 89.9
Ang1	8.4 ± 2.4	14 ± 5.9 ^{*,#}	8.2 ± 2.7	12.1 ± 4.9 ^{*,#}	7.9 ± 2.9
Ang2	21.5 ± 6.1	35.6 ± 17.3 ^{*,#}	19.8 ± 8.2	33.5 ± 13.5 ^{*,#}	17.6 ± 6.6 [*]
Tie2	6.8 ± 2.3	15.6 ± 9.4 ^{*,#}	7.7 ± 3.2	15.2 ± 5.9 ^{*,#}	7.2 ± 3.9

Vascular endothelial growth factor A and D (VEGFA, VEGFD), placenta growth factor (PlGF) and vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1) concentrations are expressed in pg/mL, all other proteins in ng/mL. Abbreviations: AUC (active ulcerative colitis patients), QUC (quiescent ulcerative colitis patients), ACD (colonic active Crohn's disease patients), QCD (colonic inactive Crohn's disease patients).

^{*} Significant differences compared to control ($p = 0.05$).

[#] Significant differences compared to patients in remission ($p = 0.05$).

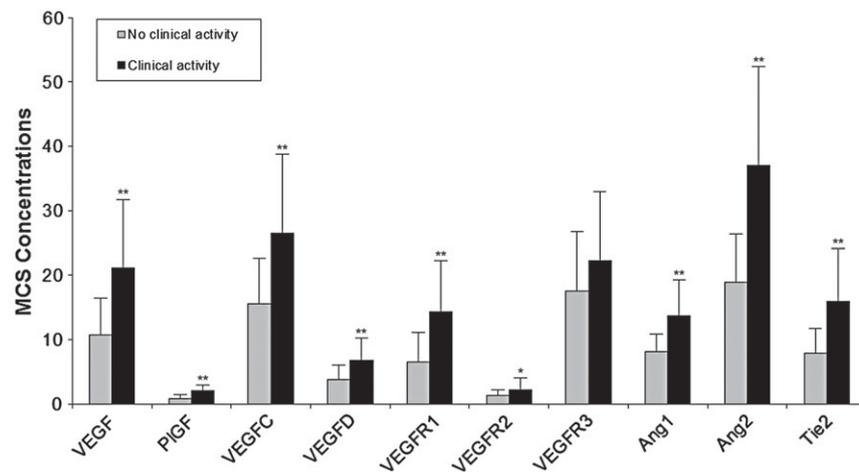


Figure 1 Colonic mucosa culture supernatant (MCS) concentration of angiogenic and lymphangiogenic factors based on clinical activity (in accordance to CDAI for Crohn's disease and Mayo Score for ulcerative colitis). All concentrations are expressed in pg/mL per mg of tissue, except vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3) concentration, which is expressed in pg/mL/10 per mg of tissue. Significant differences ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

$p = 0.025$); PlGF ($r = 0.346$; $p = 0.001$); Ang1 ($r = 0.283$; $p = 0.007$); Ang2 ($r = 0.291$; $p = 0.005$) and Tie2 ($r = 0.254$; $p = 0.016$) in MCS. CRP also correlated with MCS levels of VEGFA ($r = 0.244$; $p = 0.040$); VEGFR1 ($r = 0.265$; $p = 0.028$); PlGF ($r = 0.244$; $p = 0.040$) and Tie2 ($r = 0.328$; $p = 0.006$).

3.8. ALFs levels in serum and MCS as predictors of disease activity

MCS levels of all studied ALFs except VEGFR3 were significantly associated with endoscopic and clinical activity, and all of them with histological activity ($p < 0.05$; Figs. 1, 2 and 3). The utility of these ALFs to predict endoscopic, histological and clinical activity of IBD was analysed based on the area under the ROC curve (AUC). Ang2 was the best predictor of endoscopic (AUC: 0.83, cut-off at 18.5 ng/mL, 86% sensitivity and 66% specificity), histological (AUC: 0.85, cut-off at 18.5 ng/mL, 89% sensitivity and 72% specificity)

and clinical activity (AUC: 0.90, cut-off at 22.1 ng/mL, 83% sensitivity and 84% specificity).

For ALFs in serum, the AUCs were lower than those for the corresponding ALFs in MCS (data not shown). VEGFA and Ang-1 levels were more increased in patients with histological activity than in those without it. The AUC for the diagnosis of histological activity was 0.68 for Ang1 (cut-off at 52.0 ng/mL: 64% sensitivity and 68% specificity) and 0.67 for VEGFA (cut-off at 340.6 ng/mL: 64% sensitivity and 60% specificity).

VEGFA, VEGFC and Ang1 had higher serum levels ($p < 0.05$) in patients with clinically-active IBD compared to those with inactive disease. The AUC for the diagnosis of this clinical activity was lower than 0.65 for all ALFs in serum except for VEGFA (0.67). The cut-off point with the best sensitivity (60%) and specificity (68%) for the identification of clinical activity was 379 pg/mL/per mg of tissue for serum VEGFA.

Regarding endoscopic activity, a significant positive correlation was only found between Ang1 serum levels and the SES-CD index, and between VEGFA serum levels and the

Table 4 Correlation coefficients (r) for the relationships between serum and colonic mucosa culture supernatant angiogenic (MCS) and lymphangiogenic factors levels and clinical indexes.

	Serum levels		MCS levels	
	CDAI index	Mayo Index	CDAI index	Mayo index
VEGFA	0.190; $p = 0.282$	0.389; $p = 0.017^a$	0.541; $p = 0.001^a$	0.386; $p = 0.018^a$
PlGF	-0.06; $p = 0.973$	0.324; $p = 0.051$	0.561; $p = 0.001^a$	0.416; $p = 0.010^a$
VEGFC	0.167; $p = 0.346$	0.405; $p = 0.013^a$	0.561; $p = 0.001^a$	0.147; $p = 0.391$
VEGFD	0.080; $p = 0.653$	0.075; $p = 0.661$	0.607; $p < 0.001^a$	0.111; $p = 0.512$
VEGFR1	-0.354; $p = 0.04^a$	0.294; $p = 0.78$	0.494; $p = 0.003^a$	0.424; $p = 0.011^a$
VEGFR2	-0.352; $p = 0.042^a$	-0.13; $p = 0.940$	0.273; $p = 0.118$	0.131; $p = 0.452$
VEGFR3	-0.418; $p = 0.014^a$	0.269; $p = 0.108$	0.213; $p = 0.226$	0.197; $p = 0.249$
Ang1	0.265; $p = 0.130$	0.242; $p = 0.150$	0.599; $p < 0.001^a$	0.400; $p = 0.16^a$
Ang2	0.112; $p = 0.529$	0.185; $p = 0.274$	0.662; $p < 0.001^a$	0.561; $p < 0.001^a$
Tie2	0.138; $p = 0.436$	0.119; $p = 0.481$	0.558; $p = 0.001^a$	0.449; $p = 0.006^a$

^a Statistically significant differences.

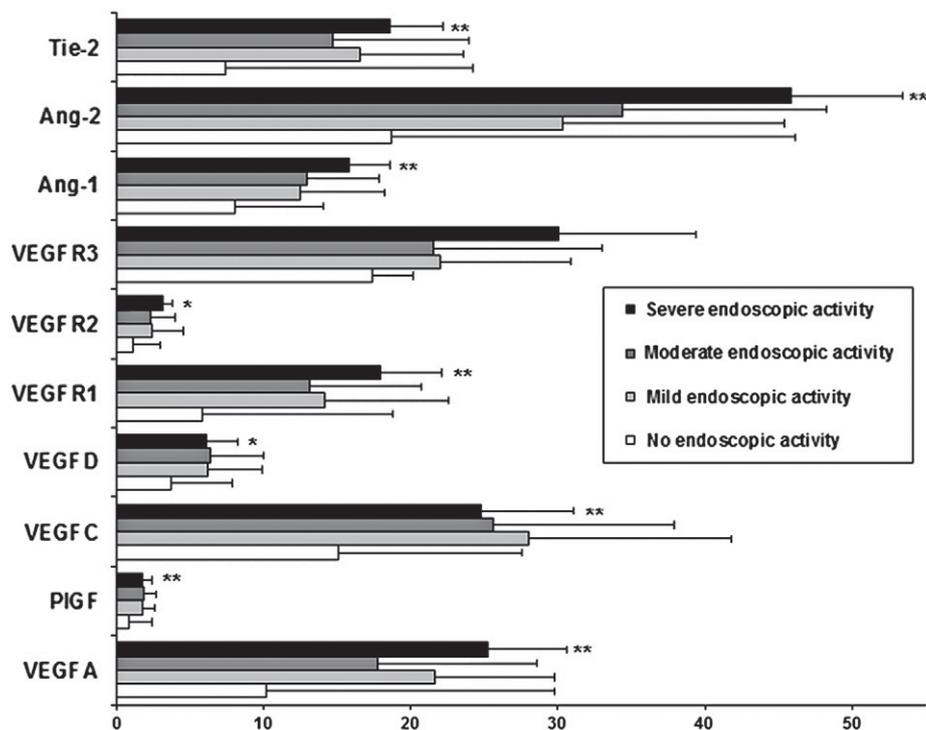


Figure 2 Comparison of angiogenic and lymphangiogenic factor levels in colonic mucosa culture supernatant according to endoscopic activity. All concentrations are expressed in pg/mL per mg of tissue, except vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3) concentration, which is expressed in pg/mL/10 per mg of tissue. Significant differences ** $p = 0.01$. * $p = 0.05$.

Mayo endoscopic sub-score (Table 5). To predict endoscopic activity in CD patients, the AUC for Ang1 in serum was 0.65 (cut-off at 47.8 ng/mL, 67% sensitivity and 52% specificity). In UC patients, the AUC for the diagnosis of endoscopic activity was 0.72 for VEGFA (cut-off at 341 ng/mL, 85% sensitivity and 64% specificity).

4. Discussion

The role played by angiogenesis and lymphangiogenesis in IBD is still being elucidated. In our study, ALF levels were locally high in MCS. All studied proteins except VEGFR3 were significantly higher in patients with endoscopic and clinical IBD activity compared to those in remission. In colorectal cancer, immunohistochemical studies carried out in both normal and tumour tissues show that only a small proportion of blood vessels express VEGFR3. The expression of this factor was not associated with tumour stage, but it was closely related with the presence of inflammatory infiltrate.³⁰ It has been reported that infiltrating macrophages are an important source of ALFs such as VEGFA and inflammatory cytokines.³¹ These cytokines may modulate the expression of VEGF family members, and have been shown to up-regulate expression of VEGFR2, but not VEGFR3, in endothelial cells.^{30,32} There is no clear candidate molecule that might up-regulate the expression of VEGFR3. Paavonen et al.³³ have observed low levels of this protein in inflammatory skin ulcers in humans, together with transient expression in experimental wounds in a pig model. They suggest that this transient expression may be an integral

part of normal wound healing and the relative absence of lymphatic vessels might account for impaired healing in chronic wounds. The unchanged VEGFR3 levels in MCS might be consistent with an IBD associated failure to adequately mobilize lymphatics leading to an overall hypofunction of this vasculature. These data are in accordance with Alexander et al.³⁴, who reported an inability to mobilize lymphatic expansion as an adaptive response in IBD. Lymphatic failure in chronic disease would result in accumulation of cytokines and immune cells exacerbating IBD.

The independent and uncertain behaviour of VEGFR3 in other pathologies and animal models coincide with the lack of differences in the levels of this protein between patients with active IBD compared to inactive IBD and also vs. healthy controls shown in this study. The up-regulation of VEGFR2 and the stability of VEGFR3 levels suggest that the pro-lymphangiogenic function of VEGFC and D could be driven by VEGFR2 instead of the VEGFR3 pathway during the active period of IBD.

This is the first study to analyse the levels of VEGFR3 in supernatant from primary cultures of bowel mucosa and their association with this disease.

With respect to the remaining proteins studied, most of the previous investigations on ALFs have been carried out in serum and tissue by immunohistochemistry. Recent publications suggest that altered angiogenesis may be a critical component of IBD pathogenesis.^{15,35,36} The exception is the study by Kapsoritakis et al.³⁷, who observed weaker VEGFA immunostaining intensity in patients with active CD vs. healthy controls, while that of patients with UC was similar, suggesting that the course of UC is not VEGFA-dependent.

Table 5 Correlation coefficients (r) for the relationships between endoscopic indexes and angiogenic and lymphangiogenic factors levels in serum and colonic mucosa culture supernatant (MCS).

	Serum levels		MCS levels	
	SES-CD index Score	Mayo endoscopic subscore	SES-CD index score	Mayo endoscopic subscore
VEGFA	0.260; <i>p</i> = 0.165	0.397; <i>p</i> = 0.015 ^a	0.354; <i>p</i> = 0.059 ^a	0.531; <i>p</i> = 0.001 ^a
PIGF	0.127; <i>p</i> = 0.505	0.131; <i>p</i> = 0.438	0.429; <i>p</i> = 0.020 ^a	0.550; <i>p</i> < 0.001 ^a
VEGFC	0.238; <i>p</i> = 0.205	0.114; <i>p</i> = 0.503	0.396; <i>p</i> = 0.033 ^a	0.338; <i>p</i> = 0.044 ^a
VEGFD	0.278; <i>p</i> = 0.137	0.025; <i>p</i> = 0.884	0.353; <i>p</i> = 0.06 ^a	0.343; <i>p</i> = 0.038 ^a
VEGFR1	-0.114; <i>p</i> = 0.549	0.220; <i>p</i> = 0.191	0.435; <i>p</i> = 0.018 ^a	0.597; <i>p</i> < 0.001 ^a
VEGFR2	-0.124; <i>p</i> = 0.514	-0.113; <i>p</i> = 0.507	0.247; <i>p</i> = 0.197	0.373; <i>p</i> = 0.027 ^a
VEGFR3	-0.287; <i>p</i> = 0.125	0.254; <i>p</i> = 0.129	0.170; <i>p</i> = 0.378	0.399; <i>p</i> = 0.016 ^a
Ang1	0.362; <i>p</i> = 0.049 ^a	0.194; <i>p</i> = 0.251	0.441; <i>p</i> = 0.017 ^a	0.564; <i>p</i> < 0.001 ^a
Ang2	-0.285; <i>p</i> = 0.126	0.152; <i>p</i> = 0.369	0.451; <i>p</i> = 0.014 ^a	0.654; <i>p</i> < 0.001 ^a
Tie2	-0.007; <i>p</i> = 0.971	0.017; <i>p</i> = 0.918	0.500; <i>p</i> = 0.006 ^a	0.571; <i>p</i> < 0.001 ^a

^a Statistically significant differences.

The differences with our results are probably due to the method used to assess the levels of the proteins studied. The authors Kapsoritakis et al. measured tissue expression while we evaluated levels of soluble ALFs. Both immunohistochemistry and MCS levels reflect ALF expression in colonic mucosa, but the latter detects proteins that have been released to the surrounding medium and are not anchored to a sub-cellular location.

The biological meaning of elevated ALF concentrations in MCS with respect to the development of IBD is unknown. Our results concur with those of previous studies, showing increased expression of VEGFA in colonic mucosa from IBD patients.^{16,38,42} The intestinal mucosa has been considered a possible origin of elevated VEGFA serum levels in patients with active IBD.⁴³ Clinical studies and animal models of experimental colitis also showed increased microvascular density in the mucosal and submucosal tissue^{15,17,35} and up-regulation of pro-angiogenic factors such as VEGFA,^{16,38-42} basic fibroblast growth factor (bFGF),⁴² platelet-derived growth factor (PDGF),⁴² and placental growth factor (PIGF).⁴⁴ Concerning other chronic inflammatory diseases, Schroeder et al. found elevated expression of VEGFA, VEGFR1, -R2, Tie2, and

the Ang1/Ang2 ratio in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis compared to patients with osteoarthritis.⁶

Regarding the site of the tissue collection, Griga et al.⁴¹ reported significantly higher VEGFA immunohistochemical staining in the epithelium and the lamina propria of inflamed colonic mucosa of patients with IBD, compared with non-inflamed patients. The same authors⁴¹ observed increased expression of VEGFA in MCS from patients with active IBD compared with a group of patients with irritable bowel syndrome. To our knowledge, further studies comparing both affected and non-affected mucosa from the same subject have not been reported. In our patients, VEGFA levels tended to be higher in MCS from affected mucosa (*p* = 0.07) PIGF, VEGFC, VEGFR2, Ang1 and Tie2 concentrations were significantly higher in areas with macroscopic damage than in non-affected areas. High levels of the remaining proteins were found in both affected and non-affected mucosa, but the values observed in non-affected tissue were still higher than those found in patients in remission. These results reflect that in patients with active disease, macroscopically "normal" mucosa is sometimes altered at the microscopic and/or molecular level.

With respect to clinical disease indexes, most of the studies show a correlation between serum VEGFA levels and disease activity.^{39,42,45,46} Kanazawa et al.⁴² reported increased VEGFA levels in the serum and colonic tissue of patients with active UC. Likewise, Bousvaros et al.⁴⁶ showed that serum VEGFA levels in children and young adults were elevated during active CD. In our study, serum VEGFA levels correlated with clinical activity in UC but not in CD patients. The same was found with respect to endoscopic activity. In contrast, Ang1 correlated with endoscopic activity in patients with CD, but not with UC, while no association was found with clinical activity. These observations should be considered with caution because, although *p* values were significant, the correlation coefficients were not very high. Finally, serum concentrations of both factors were higher in patients with a histological diagnosis of active vs. non-active disease, suggesting that they are a reflection of the events that are taking place at the microscopic level. VEGFA and Ang1 also correlated with the inflammatory marker CRP and with an increase in the number of leukocytes and platelets, which release both angiogenic factors during inflammation processes.

Table 6 Comparison of angiogenic and lymphangiogenic factor levels in colonic mucosa culture supernatant (MCS) from affected and non-affected mucosa. Concentrations are expressed in pg/mL per mg of tissue.

	Non-affected mucosa	Affected mucosa	<i>p</i> -Value
VEGF	16.5 ± 10.3	22 ± 11.4	0.07
PIGF	1.6 ± 0.8	2.3 ± 0.8	<0.01*
VEGFC	24.5 ± 10.5	32 ± 10.8	<0.01*
VEGFD	8.7 ± 4	8.2 ± 2.8	0.6
VEGFR1	15.1 ± 15.2	15.5 ± 8.4	0.9
VEGFR2	2.4 ± 1	4.5 ± 4.6	<0.05*
VEGFR3	221.6 ± 100.5	228.7 ± 107	0.8
Ang1	10.7 ± 4.8	14.6 ± 5.9	<0.01*
Ang2	33.5 ± 17.8	39.1 ± 15.3	0.1
Tie2	10.7 ± 5.2	16.9 ± 7.8	<0.01*

* Significant differences *p* < 0.05.

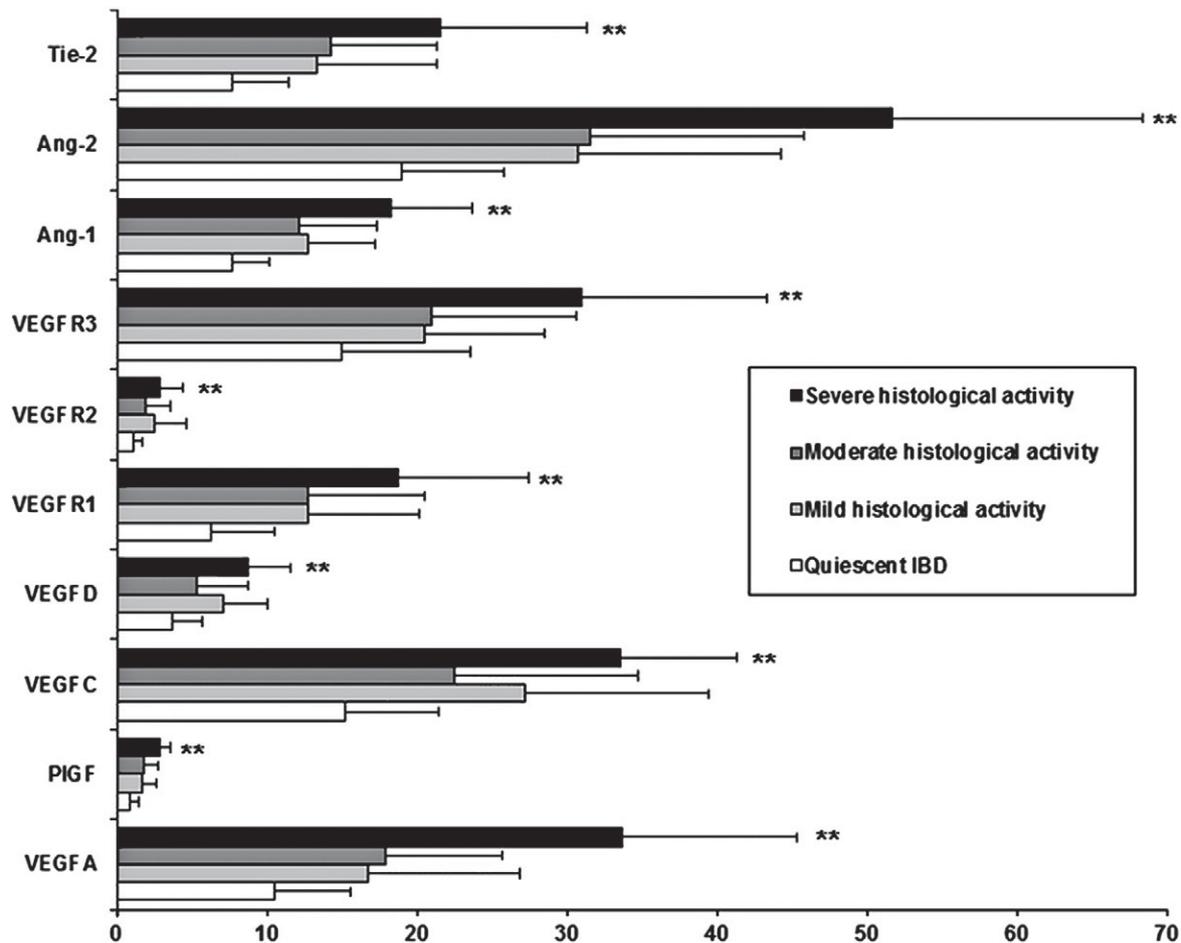


Figure 3 Comparison of angiogenic and lymphangiogenic factor levels in colonic mucosa culture supernatant according histological activity. All concentrations are expressed in pg/mL per mg of tissue, except vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3) concentration, which is expressed in pg/mL/10 per mg of tissue. **Significant differences $p < 0.01$.

There was a good correlation between ALFs in MCS and the endoscopic, histological and clinical activity of the IBD. This gives us an idea of the severity of the injuries and, although most of the ALFs could be useful as IBD markers,

Ang2 seems to be the most accurate. Ang1 and Ang2 are antagonistic ligands that bind to the extracellular domain of Tie2 receptor, which is almost exclusively expressed by endothelial cells. In critically ill patients, a marked imbalance

Table 7 Correlation coefficients (r) for the relationships between serum angiogenic and lymphangiogenic factors levels and acute phase reactants.

	CRP	ESR	LC	PLC	Haemoglobin
VEGFA	0.341; $p = 0.004^a$	0.248; $p = 0.06$	0.277; $p = 0.008^a$	0.412; $p < 0.001^a$	-0.123; $p = 0.245$
PlGF	0.233; $p = 0.51$	0.069; $p = 0.605$	0.257; $p = 0.014^a$	0.066; $p = 0.537$	-0.75; $p = 0.479$
VEGFC	0.052; $p = 0.665$	-0.073; $p = 0.588$	0.360; $p < 0.001^a$	0.380; $p < 0.001^a$	0.085; $p = 0.425$
VEGFD	0.054; $p = 0.656$	0.159; $p = 0.234$	-0.46; $p = 0.664$	-0.069; $p = 0.518$	0.008; $p = 0.938$
VEGFR1	0.040; $p = 0.743$	0.002; $p = 0.988$	0.345; $p = 0.001^a$	0.072; $p = 0.495$	0.176; $p = 0.096$
VEGFR2	-0.073; $p = 0.545$	-0.046; $p = 0.732$	0.319; $p = 0.002^a$	0.023; $p = 0.832$	0.094; $p = 0.376$
VEGFR3	0.033; $p = 0.786$	-0.096; $p = 0.475$	0.196; $p = 0.062$	-0.19; $p = 0.857$	-0.51; $p = 0.629$
Ang1	0.286; $p = 0.016^a$	0.130; $p = 0.332$	0.421; $p < 0.001^a$	0.599; $p < 0.001^a$	0.064; $p = 0.549$
Ang2	-0.115; $p = 0.341$	0.041; $p = 0.761$	-0.014; $p = 0.896$	-0.047; $p = 0.660$	-0.274; $p = 0.009^a$
c	0.091; $p = 0.448$	0.017; $p = 0.901$	0.040; $p = 0.704$	0.109; $p = 0.306$	-0.52; $p = 0.625$

Abbreviations: CRP: C-reactive protein (mg/L); LC: leukocyte count ($10^9/L$); PLC: platelet count ($10^9/L$); haemoglobin (g/L); and ESR: erythrocyte sedimentation rate (mm/h).

^a Statistically significant correlation.

of the angiopoietin-Tie system in favour of Ang2 has been confirmed. Several studies evidence that Ang2 concentrations correlate with the severity of the illness.^{47–49}

Our results do not show a good correlation between ALF levels in serum and MCS, indicating that local variations in the concentrations of the factors studied do not correspond with circulating proteins. Nevertheless, in our study, ALF alterations at a local level appear to be a fact, although in view of the results obtained, we cannot determine whether such variations are a cause or a consequence of IBD lesions that perpetuate the existing inflammation. In spite of this, the study of some of these ALFs as possible targets in new therapies for IBD constitutes a key new line of research. Our ideal would be to find a serum activity marker that could avoid the performance of aggressive procedures like colonoscopy. Only serum VEGFA and Ang1 seem to be useful markers of endoscopic, histological and clinical activity. In view of our results, serum ALF levels cannot be recommended as predictors of IBD activity at the moment.

Conflicts of interest

Alicia Algaba benefited from a grant by Merck Sharp and Dohme (MSD) Spain. This activity is outside the submitted work.

Acknowledgements

This research was funded by a grant from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain (Ref. PS02369).

We thank Mc Lehm Lague Services for kindly reviewing the English used in this paper.

References

- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;**386**:671–4.
- Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med* 2006;**57**:1–18.
- Halin C, Detmar M. Chapter 1. Inflammation, angiogenesis, and lymphangiogenesis. *Methods Enzymol* 2008;**445**:1–25.
- Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2005;**109**:227–41.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;**1**:27–31.
- Schroeder M, Viezens L, Fuhrhop I, R  ther W, Schaefer C, Schwarzloh B, et al. Angiogenic growth factors in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* Nov 9 2011.
- Shimoda H, Kato S. A model for lymphatic regeneration in tissue repair of the intestinal muscle coat. *Int Rev Cytol* 2006;**250**:73–108.
- Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005;**438**:946–53.
- Cao Y. Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nat Rev Cancer* 2005;**5**:735–43.
- Cueni LN, Detmar M. New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease. *J Invest Dermatol* 2006;**126**:2167–77.
- Bamias G, Martin C, Mishina M, Ross WG, Rivera-Nieves J, Marini M, et al. Proinflammatory effects of TH2 cytokines in a murine model of chronic small intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2005;**128**:654–66.
- Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;**115**:182–205.
- Katz JA, Itoh J, Fiocchi C. Pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 1999;**15**:291–7.
- Hatoum OA, Binion DG. The vasculature and inflammatory bowel disease: contribution to pathogenesis and clinical pathology. *Inflamm Bowel Dis* 2005;**11**:304–13.
- Danese S, Sans M, de la Motte C, Graziani C, West G, Phillips MH, et al. Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2006;**130**:2060–73.
- Sandor Z, Deng XM, Khomenko T, Tarnawski AS, Szabo S. Altered angiogenic balance in ulcerative colitis: a key to impaired healing? *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**350**:147–50.
- Chidlow Jr JH, Langston W, Greer JJ, Ostanin D, Abdelbaqi M, Houghton J, et al. Differential angiogenic regulation of experimental colitis. *Am J Pathol* 2006;**169**:2014–30.
- Pousa ID, Mate J, Gisbert JP. Angiogenesis in inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Invest* 2008;**38**:73–81.
- Linares PM, Gisbert JP. Role of growth factors in the development of lymphangiogenesis driven by inflammatory bowel disease: a review. *Inflamm Bowel Dis* 2011;**17**:1814–21.
- Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989;**170**:2–6 [discussion 16–9].
- Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;**55**:749–53.
- Sipponen T, Nuutinen H, Turunen U, F  rkkil   M. Endoscopic evaluation of Crohn's disease activity: comparison of the CDEIS and the SES-CD. *Inflamm Bowel Dis* 2010;**16**:2131–6.
- Moskovitz D, Daperno M, Van Assche G. Defining and validating cut-offs for the simple endoscopic score for Crohn's disease. *Gastroenterology* 2007;**132**:A-S1097.
- Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med* 1987;**317**:1625–9.
- D'Haens G, Geboes K, Ponette E, Penninckx F, Rutgeerts P. Healing of severe recurrent ileitis with azathioprine therapy in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997;**112**:1475–81.
- Riley SA, Mani V, Goodman MJ, Herd ME, Dutt S, Turnberg LA. Comparison of delayed release 5 aminosalicylic acid (mesalazine) and sulphasalazine in the treatment of mild to moderate ulcerative colitis relapse. *Gut* 1988;**29**:669–74.
- Best WR, Becktel JM, Singleton JW. Rederived values of the eight coefficients of the Crohn's Disease Activity Index (CDAI). *Gastroenterology* 1979;**77**:843–6.
- Salcedo X, Medina J, Sanz-Cameno P, García-Buey L, Martín-Vilchez S, Borque MJ, et al. The potential of angiogenesis soluble markers in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005;**42**:696–701.
- Pousa ID, Mate J, Salcedo-Mora X, Abreu MT, Moreno-Otero R, Gisbert JP. Role of vascular endothelial growth factor and angiopoietin systems in serum of Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2008;**14**:61–7.
- White JD, Hewett PW, Kosuge D, McCulloch T, Enholm BC, Carmichael J, et al. Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 2002;**62**:1669–75.
- McCourt M, Wang JH, Sookhai S, Redmond HP. Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis. *Arch Surg* 1999;**134**:1325–31 [discussion 31–2].
- Ristimaki A, Narko K, Enholm B, Joukov V, Alitalo K. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem* 1998;**273**:8413–8.

33. Paavonen K, Puolakkainen P, Jussila L, Jahkola T, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol* 2000;**156**:1499–504.
34. Alexander JS, Chaitanya GV, Grisham MB, Boktor M. Emerging roles of lymphatics in inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* Oct 2010;**1207**(Suppl 1):E75–85.
35. Spalinger J, Patriquin H, Miron MC, Marx G, Herzog D, Dubois J, et al. Doppler US in patients with crohn disease: vessel density in the diseased bowel reflects disease activity. *Radiology* 2000;**217**:787–91.
36. Koutroubakis IE, Tsiolakidou G, Karmiris K, Kouroumalis EA. Role of angiogenesis in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;**12**:515–23.
37. Kapsoritakis A, Sfiridaki A, Maltezos E, Simopoulos K, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. Vascular endothelial growth factor in inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 2003;**18**:418–22.
38. Pousa ID, Algaba A, Linares PM, Sanz-Cameno P, Maté J, Moreno-Otero R, et al. Corticosteroids modulate angiogenic soluble factors in ulcerative colitis patients. *Dig Dis Sci* 2011;**56**:871–9.
39. Griga T, Tromm A, Spranger J, May B. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1998;**33**:504–8.
40. Griga T, Voigt E, Gretzer B, Brasch F, May B. Increased production of vascular endothelial growth factor by intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 1999;**46**:920–3.
41. Griga T, May B, Pfisterer O, Müller KM, Brasch F. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 2002;**49**:116–23.
42. Kanazawa S, Tsunoda T, Onuma E, Majima T, Kagiya M, Kikuchi K. VEGF, basic-FGF, and TGF-beta in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol* 2001;**96**:822–8.
43. Griga T, Werner S, Koller M, Tromm A, May B. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in Crohn's disease: increased production by peripheral blood mononuclear cells and decreased VEGF165 labeling of peripheral CD14+ monocytes. *Dig Dis Sci* 1999;**44**:1196–201.
44. Hindryckx P, Waeytens A, Laukens D, Peeters H, Van Huisse J, Ferdinande L, et al. Absence of placental growth factor blocks dextran sodium sulfate-induced colonic mucosal angiogenesis, increases mucosal hypoxia and aggravates acute colonic injury. *Lab Invest* 2010;**90**:566–76.
45. Scaldaferrri F, Vetrano S, Sans M, Arena V, Straface G, Stigliano E, et al. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2009;**136**:585–95 [e5].
46. Bousvaros A, Leichtner A, Zurakowski D, Kwon J, Law T, Keough K, et al. Elevated serum vascular endothelial growth factor in children and young adults with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1999;**44**:424–30.
47. Ganter MT, Cohen MJ, Brohi K, Chesebro BB, Staudenmayer KL, Rahn P, et al. Angiopoietin-2, marker and mediator of endothelial activation with prognostic significance early after trauma? *Ann Surg* 2008;**247**:320–6.
48. Gallagher DC, Parikh SM, Balonov K, Miller A, Gautam S, Talmor D, et al. Circulating angiopoietin 2 correlates with mortality in a surgical population with acute lung injury/adult respiratory distress syndrome. *Shock* 2008;**29**:656–61.
49. Ganta VC, Cromer W, Mills GL, Traylor J, Jennings M, Daley S, et al. Angiopoietin-2 in experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* Jun 2010;**16**(6):1029–39.

The Effects of Infliximab or Adalimumab on Vascular Endothelial Growth Factor and Angiopoietin 1 Angiogenic Factor Levels in Inflammatory Bowel Disease: Serial Observations in 37 Patients

Alicia Algaba, MSc,* Pablo M. Linares, MSc,^{†,‡} M. Encarnación Fernández-Contreras, PhD, MD,^{†,‡} Ariadna Figuerola, MSc,^{§,||} Xavier Calvet, PhD, MD,^{§,||} Iván Guerra, MD,* Inés de Pousa, PhD, MD,^{†,‡} María Chaparro, PhD, MD,^{†,‡} Javier P. Gisbert, PhD, MD,^{†,‡} and Fernando Bermejo, PhD, MD*

Background: Infliximab and adalimumab effectiveness might be related with changes in angiogenic factors. The aim of the study was to compare the concentrations of angiogenic proteins in patients with inflammatory bowel disease (IBD) and healthy controls and to analyze changes in the levels during infliximab and adalimumab treatment.

Methods: A prospective case-control study was conducted in 37 patients with IBD starting treatment with infliximab (16 with Crohn's disease and 6 with ulcerative colitis) or adalimumab (15 with Crohn's disease) and 40 control subjects. Four samples were taken from IBD patients, one before each of the first 3 doses of infliximab/adalimumab and one at week 14. Serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), placental growth factor, angiopoietin 1 (Ang1), angiopoietin 2, and Tie2 were measured using enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: Patients with IBD had higher VEGF levels than control subjects (511.5 ± 255.6 versus 395.5 ± 256.4 ; $P = 0.05$). Patients who achieved remission at the third dose of anti-TNF-alpha had lower VEGF levels at baseline (453.5 ± 250.7 versus 667.5 ± 153.9 pg/mL) and before the second (409.7 ± 217 versus 681.3 ± 350.6 pg/mL) and third (400.5 ± 222.8 versus 630.4 ± 243.1 pg/mL) doses compared with those with no remission ($P < 0.05$). Ang1 levels decreased before each treatment dose in patients who achieved remission ($P < 0.05$). High baseline VEGF levels predicted for a poor response to anti-TNF-alpha therapy (area under the receiver operating characteristics curve = 0.8), whereas high Ang1 levels were associated with disease remission (area under the receiver operating characteristics curve = 0.7). Concentrations of angiogenic proteins did not correlate with clinical activity scores.

Conclusions: Circulating VEGF and Ang1 levels decrease after anti-TNF-alpha therapy and may predict response to treatment. Whether these changes are a direct effect of anti-TNF-alpha therapy or a sign of disease improvement remains to be elucidated.

(*Inflamm Bowel Dis* 2014;20:695-702)

Key Words: infliximab, adalimumab, angiogenic factors, inflammatory bowel disease, vascular endothelial growth factor, angiopoietin

Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) inhibitors adalimumab (ADA) and infliximab (IFX) have been shown to be effective for the treatment of inflammatory bowel disease (IBD). They both

are monoclonal antibodies that block human TNF-alpha through rapid formation of stable complexes and reduce the expression of several proinflammatory molecules and mucosal cytokines.¹⁻³

TNF-alpha, a macrophage/monocyte-derived polypeptide, is a proinflammatory cytokine mainly produced by activated macrophages and T lymphocytes. It is clearly involved in angiogenesis and shows a concentration-dependent dual effect, either inhibiting or stimulating this process.^{1,4,5}

Among a wide range of effects, TNF-alpha modulates the expression of several genes in vascular endothelium.² It upregulates adhesion molecules involved in lymphocyte recruitment, markedly increasing their expression in the *lamina propria* of the colon of patients with IBD.⁶ These findings support research on specific therapies for IBD focused on the use of TNF-alpha inhibitors, particularly the monoclonal antibodies ADA and IFX.^{7,8}

Angiogenesis is considered an essential mechanism in many physiological processes,^{9,10} and it is strongly implicated in the pathogenesis of diseases such as cancer or ischemic cardiovascular diseases.¹⁰⁻¹² Although Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) etiology remains unclear, recent evidence suggests a role of angiogenesis and lymphangiogenesis. Angiogenic factors may

Received for publication December 7, 2013; Accepted January 19, 2014.

From the *Department of Gastroenterology, Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid, Spain; [†]Gastroenterology Unit, Hospital Universitario de La Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, Madrid, Spain; [‡]Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Madrid, Spain; [§]Gastroenterology Unit, Hospital de Sabadell, Institut Parc Taulí, Sabadell, Barcelona, Spain; and ^{||}Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Barcelona, Spain.

The authors have no conflicts of interest to disclose.

A. Algaba and P. B. Linares contributed equally to this study and should be considered as first coauthors.

Supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (P.M.L.: PS02369), Ministerio de Economía y Competitividad, Spain, and from AbbVie Laboratories (A.A.). A. Algaba and F. Bermejo received grant from MSD. F. Bermejo received consultancy fee from AbbVie, and received payment for development of educational presentations from MSD and AbbVie.

Reprints: Alicia Algaba, MSc, C/Isaac Peral, 43. Bloque D1, 1ºB, 28330, San Martín de la Vega, Madrid, Spain (e-mail: alicia_algaba@hotmail.com).

Copyright © 2014 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc.

DOI 10.1097/MIB.0000000000000004

Published online 20 February 2014.

promote chronic inflammation and fibrosis in the bowel but also be beneficial in healing and repair.^{13–15}

It has been suggested that IFX may be involved in the inhibition of inflammation in bowel mucosa of CD patients. However, effectiveness of TNF- α inhibitors in IBD may also be associated to changes in several proangiogenic molecules. TNF- α -induced angiogenesis is mediated both directly by its inflammatory activity and indirectly by inducing other angiogenesis-promoting factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors.^{16–18}

Several families of growth factors are involved in angiogenesis and could play a significant role in IBD. Among them, VEGFs are especially relevant. To date, 5 members have been identified within this family, but the term “VEGF” commonly refers to VEGF-A, which is considered as the main proangiogenic mediator.^{19–23} Another member of the VEGF family is placental growth factor (PLGF), which is involved in plasma extravasation and inflammation²⁴ and may induce arteriogenesis.²⁵ Angiopoietin 1 (Ang1), angiopoietin 2 (Ang2), and their Tie2 receptor are members of another family of molecules known as the angiopoietin system. Ang1 controls blood vessel maturation and has anti-inflammatory properties. Meanwhile, Ang2 is a competitive antagonist of the Tie2 receptor and is responsible for the initiation of angiogenesis.

Studies aimed at elucidating the impact of IFX and ADA on the expression of proangiogenic factors are scarce, and most of them have been conducted in animal models or in other rheumatic diseases, such as ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, or rheumatoid arthritis.^{26–28} To our knowledge, only 2 studies^{29,30} have previously measured serum VEGF levels in patients with CD treated with IFX. Data on other proangiogenic factors are lacking, and no patients with UC or on ADA therapy have been studied so far.

Our objectives were to evaluate the circulating levels of VEGF, PlGF, Ang1, Ang2, and Tie2 in patients with IBD, to study their potential changes during IFX or ADA treatment, and to correlate such changes with the effectiveness of anti-TNF- α therapy.

METHODS

Patients

A prospective study was conducted in patients with IBD starting treatment with IFX or ADA at the Gastroenterology Department of Hospital Universitario de La Princesa and Hospital Universitario de Fuenlabrada (Madrid, Spain), and Hospital de Sabadell, Institut Parc Taulí (Barcelona, Spain). The control group consisted of healthy volunteers matched by age and sex with IBD patients. Patients were consecutively enrolled, and all participants signed an informed consent form before recruitment. The study was approved by the Research Ethics Committees of the 3 participating centers.

IBD was diagnosed by clinical, radiological, endoscopic, and histological criteria.³¹ IBD location was established in accordance with Montreal's classification.¹³ CD and UC disease activities were ascertained by the Crohn's disease activity index (CDAI) and modified Truelove–Witts indexes, respectively,^{32,33} and determined at

weeks 0 (baseline), 2, 4 (ADA), or 6 (IFX), and 14 after the start of anti-TNF therapy. A CDAI score below 150 indicated quiescent disease; 150–250, mild disease; 251–350, moderate disease; and >350, severe disease. A Truelove–Witts score of ≤ 11 was considered disease remission; 11–15, mild disease; 16–21 moderate disease; and 22–27, severe disease.

Anti-TNF- α treatment was administered at standard dosages: IFX 5 mg/kg at weeks 0, 2, and 6 as induction treatment, followed by maintenance treatment consisting of 5 mg/kg intravenously every 8 weeks or ADA 160/80 mg as induction treatment at weeks 0 and 2, followed by maintenance therapy consisting of 40 mg subcutaneously every other week. Previous use of a TNF- α inhibitor was considered an exclusion criterion.

Only patients with active clinical disease at baseline were included in this study. UC and CD clinical remission was, respectively, defined as a reduction to a score <11 points in the modified Truelove–Witts index or <150 points in the CDAI index (Truelove–Witts or CDAI values <11 or <150 are, respectively, established as inactive disease). This variable was determined before the third dose of the TNF- α inhibitor and at week 14. Clinical response of patients with active disease at the baseline visit was defined as a decrease by at least 5 points in the modified Truelove–Witts index for UC patients or a decrease by at least 70 points in the CDAI for CD patients.^{32,33}

Samples

Four 10-mL samples of peripheral blood were taken from IBD patients, one before administration of each of the first 3 doses of IFX (weeks 0, 2, and 6) or ADA (weeks 0, 2, and 4), and the remaining one at week 14. A single blood sample was taken from control subjects. Blood was allowed to clot for 30 minutes at room temperature and subsequently centrifuged at 1200 \times g for 10 minutes. Serum was stored at -80°C until analysis.

Measurements

Levels of soluble angiogenic factors were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (Human Immunoassay Quantikine; R & D Systems, Minneapolis, MN) following the manufacturer's instructions. Interassay and intraassay precision were determined and calculated in-house, as previously described.^{34,35}

Statistical Analysis

Frequencies and percentages were determined for categorical variables. A Kolmogorov–Smirnov test was used to evaluate normality of continuous variables. Serum levels of angiogenic factors were expressed as the arithmetic mean \pm standard deviation. A Student's *t* test or a Mann–Whitney *U* test for unpaired data was used to assess differences between control subjects and patients with IBD. Comparison between angiogenic protein levels before and after different doses of anti-TNF- α treatment was performed using a Student's *t* test for paired samples. A 1-way analysis of variance test or a Kruskal–Wallis test as nonparametric test was carried out to calculate differences between continuous and qualitative variables with 3 or more categories. To analyze the

relationship between angiogenic factor levels and clinical index scores, Pearson's and Spearman's correlation coefficients were determined for variables with a Gaussian and non-Gaussian distribution, respectively. The area under the receiver operating characteristics (ROC) curve was calculated to assess the accuracy of baseline levels of each angiogenic protein for predicting effectiveness of anti-TNF- α treatment. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Baseline Characteristics of Patients and Healthy Controls

Thirty-seven patients with IBD with a mean age of 36 ± 13 years were studied, of whom 20 (54%) were women and 14 (37.8%) were smokers. Mean age of healthy volunteers ($n = 40$) was 43 ± 9 years; 24 (60%) were women, and 10 (27%) were smokers.

IBD diagnosis was CD in 31 patients (83.8%) and UC in 6 (16.2%). Mean disease duration was 7.3 ± 8.7 years. The indication for anti-TNF- α treatment was luminal activity in 23 patients (73%) and penetrating disease in the remaining 13 (27%). The TNF- α inhibitor administered was IFX in 22 patients (59.5%) and ADA in 15 (40.5%). Only 2 patients (5.4%) did not proceed to maintenance therapy, one of them due to an adverse reaction to IFX infusion, and the other one because complete response of his perianal disease was achieved after 3 doses of induction treatment (one year later, this patient had to resume IFX treatment due to recurrence of perianal fistula). All clinical features of the studied cases are shown in Table 1.

Soluble Angiogenic Factors in Patients and Control Subjects

Higher serum levels of VEGF were found in patients as compared with control subjects, P value borderlining the statistical significance ($P = 0.05$). A similar trend was observed for Ang2 ($P = 0.07$) (Table 2). No differences were found in the remaining angiogenic factors. These differences were similar in patients with CD and UC.

Levels of Soluble Angiogenic Factors During Anti-TNF- α Treatment

Serum levels of angiogenic proteins before the second, third, and fourth doses of anti-TNF- α were measured and compared with the baseline findings. Patients who achieved remission at the third dose had significantly lower Ang1 levels before the second, third, and fourth doses as compared with baseline levels (Fig. 1). Patients in remission at the fourth dose also tended to show lower Ang1 levels, but the difference was not statistically significant ($P = 0.1$).

By the type of IBD, serum levels of PIGF were lower in CD patients before the third dose of treatment as compared with baseline (14.8 ± 9.8 pg/mL versus 17.3 ± 11.3 ; $P = 0.038$). No differences were found in UC patients.

TABLE 1. Characteristics of the IBD Patients Studied

	n (%)
Disease extent (UC) ^a	
Left-sided colitis	3 (50.0)
Pancolitis	3 (50.0)
Disease location (CD) ^a	
L1 ileal	9 (29.0)
L2 colic	6 (19.4)
L3 ileocolic	14 (45.2)
L4 upper gastrointestinal tract	2 (6.5)
Behavior (CD) ^a	
B1 nonstricturing, nonpenetrating	10 (32.3)
B2 stricturing	6 (19.4)
B3 penetrating	6 (19.4)
B1+ perianal disease	8 (25.8)
B2+ perianal disease	1 (3.2)
Extraintestinal manifestations	
None	28 (75.7)
Rheumatic	7 (18.9)
Mucocutaneous	2 (5.4)
IBD concomitant treatment ^b	
Oral corticosteroids	27 (73.0)
Azathioprine/mercaptopurine	26 (70.3)
5-Aminosalicylic acid	12 (32.4)
Budesonide	5 (13.5)
Methotrexate	3 (8.1)

^aAccording to Montreal's classification.

^bSome treatment regimens may overlap.

By the type of the administered TNF- α inhibitor, a decrease in VEGF levels was seen in the IFX group before the third dose as compared with the pretreatment baseline visit (38.1 ± 19.9 pg/mL versus 44.7 ± 21.3 pg/mL; $P = 0.04$). No differences were seen in the ADA group (data not shown).

Table 3 shows the serum levels of the tested proteins at 4 different time points during anti-TNF- α therapy (baseline, before the second dose of IFX/ADA, before the third dose of IFX/ADA, and at week 14) in patients with and without remission at the third dose. In patients with remission at the third dose, VEGF levels were significantly lower at baseline ($P = 0.04$) and at the second ($P = 0.01$) and third ($P = 0.03$) doses.

The same comparisons were made in patients who were in remission at the fourth dose (week 14) as compared with those with persistent activity. Ang1 levels at baseline and before the second TNF- α dose were higher in patients with remission at week 14 as compared with those with no remission (baseline: 48.3 ± 20.4 versus 28.8 ± 11.6 ng/mL, $P = 0.04$; week 14: 46.4 ± 22.4 versus 30.8 ± 7.3 ng/mL, $P = 0.01$). No differences were found in the remaining proangiogenic factors when comparing patients achieving remission versus those who did not.

TABLE 2. Serum Levels of Proangiogenic Factors in Patients and Controls

	VEGF (pg/mL)	PIGF (pg/mL)	Ang1 (ng/mL)	Ang2 (ng/mL)	Tie2 (ng/mL)
Controls (n = 40)	395.5 ± 256.4	20.2 ± 6.3	42.3 ± 14.0	2.6 ± 0.83	23.9 ± 4.8
Patients (n = 37)	511.5 ± 255.6	17.4 ± 11.3	46.2 ± 19.9	3.2 ± 1.9	24.7 ± 7.0
<i>P</i>	0.05	NS	NS	0.07	NS

NS, nonstatistically significant difference.

Serum Levels of Angiogenic Factors as Predictors of Anti-TNF-alpha Therapy Efficacy

The value of these factors to predict for remission or response to anti-TNF-alpha therapy was analyzed based on the area under the ROC curve (AUC). A high baseline serum VEGF level was a predictor of poor response to anti-TNF-alpha therapy. The AUC was 0.8, and the cutoff value with the best sensitivity (85.7%) and specificity (78.6%) was 658.36 pg/mL (Fig. 2A). Elevated baseline serum Ang1 levels were associated with disease remission after induction treatment (AUC, 0.7; cutoff value, 36.6 ng/ml; 72% sensitivity; 71.4% specificity) (Fig. 2B).

Serum Levels of Proangiogenic Factors and IBD Clinical Activity

Only patients with active clinical disease at baseline were enrolled into this study. According to CDAI and the modified Truelove-Witts index, IBD activity was mild in 67.6% of patients (n = 25) and moderate in 32.4% (n = 12) before the start of anti-TNF-alpha therapy. At week 14, disease activity persisted in only 6 patients (mild in all cases) and was absent in the remaining 77%. CDAI values significantly decreased from baseline to the second, third, and fourth doses of anti-TNF-alpha drugs (219.4 ± 44.7 versus 125.8 ± 84, 99.21 ± 72.7, and 87.3 ± 69.6, respectively; *P* < 0.001). Differences in Truelove-Witts values in UC patients were not analyzed due to the small sample size.

VEGF, PIGF, Ang1, Ang2, and Tie2 serum levels during anti-TNF-alpha treatment did not correlate with CDAI values (data not shown).

DISCUSSION

Serum Levels of VEGF and Ang2 Are Higher in IBD Patients Than in Control Subjects

Baseline serum VEGF levels were higher in patients with IBD as compared with control subjects. Our results are consistent with a number of studies showing higher serum VEGF levels in patients with IBD as compared with non-IBD control subjects.³⁶⁻³⁸ Our group recently found similar results in a previous case-control study regardless of the need to proceed to anti-TNF-alpha therapy in patients with IBD.³⁹ Scaldaferrri et al³⁸ pointed out VEGF as the main proangiogenic factor involved in pathological angiogenesis in IBD, probably acting at the crossroads between inflammatory-driven angiogenesis and mucosal inflammation.

A genetic background that could explain these differences was investigated by Ferrante et al,⁴⁰ who studied 3 single-nucleotide polymorphisms within the VEGF gene. However, they found no genetic correlation between the VEGF genotype and serum levels of this proangiogenic factor.

Although statistical significance was not reached, serum Ang2 levels tended to be higher in IBD patients than in control

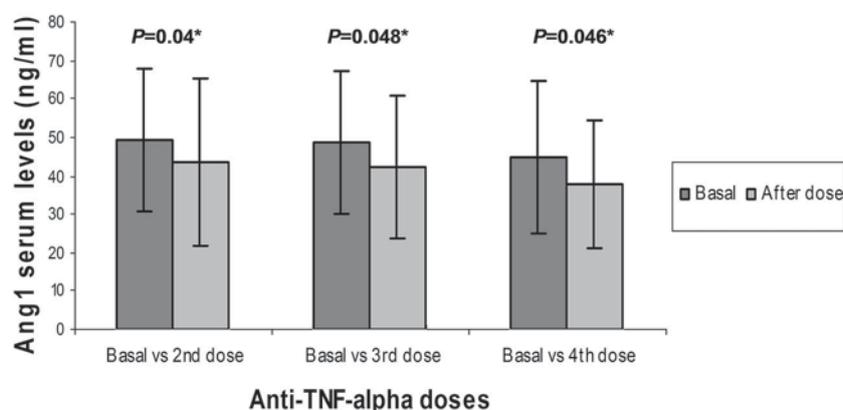


FIGURE 1. Serum Ang1 levels before and after TNF-alpha inhibitor therapy in patients who achieved remission at the third dose as compared with baseline. *Statistically significant difference.

TABLE 3. Serum Levels of Angiogenic Factors at 4 Different Time points During Anti-TNF-alpha Therapy

	Baseline (n = 37)			Second Dose (n = 37)			Third Dose (n = 32)			Fourth Dose (n = 22)		
	R	NR	P	R	NR	P	R	NR	P	R	NR	P
VEGF (pg/mL)	453.5 ± 250.7	667.5 ± 153.9	0.04 ^a	409.7 ± 217	681.3 ± 350.6	0.01 ^a	400.5 ± 222.8	630.4 ± 243.1	0.03 ^a	393.1 ± 229	575.2 ± 208.1	0.10
PIGF (ng/mL)	16.1 ± 9.3	14.8 ± 9.6	0.75	15.1 ± 9.7	13 ± 7.5	0.60	15.6 ± 10.6	11.1 ± 5.7	0.30	11.9 ± 6.4	12.1 ± 5.4	0.95
Ang1 (ng/mL)	48.6 ± 18.7	37.0 ± 25.4	0.29	42.7 ± 21	30.5 ± 10.8	0.15	41.7 ± 18.4	36.5 ± 20.3	0.52	38.6 ± 16.3	33.2 ± 12.5	0.47
Ang2 (ng/mL)	3.5 ± 2.0	2.7 ± 1.2	0.32	3.4 ± 2.2	2.3 ± 1.2	0.25	3.4 ± 2.2	2.3 ± 1.2	0.16	3.6 ± 1.8	2.2 ± 0.95	0.08
Tie2 (ng/mL)	24.8 ± 7.3	25.5 ± 6.8	0.81	23.3 ± 6.9	25 ± 8.1	0.60	24.1 ± 7.1	25.3 ± 5.6	0.69	25.5 ± 9	25.1 ± 6.8	0.92

^aStatistically significant difference.

Baseline, before first dose of IFX/ADA; second dose, at week 2 before anti-TNF-alpha; third dose, at week 4 for ADA therapy; fourth dose, at week 14 (before starting anti-TNF-alpha maintenance therapy); R, patients achieving remission at third dose; NR, patients with no remission.

subjects. Oikonomou et al⁴¹ previously reported elevated Ang2 levels in patients with IBD. The authors found that levels of this protein changed with disease location, probably due to variability of endothelial cells. The angiopoietin system has been postulated to play a key role in IBD-associated angiogenesis.⁴² Ang1 is thought to stabilize the newly formed blood vessels,^{43,44} whereas Ang2 facilitates the activation of endothelial cells in response to VEGF and other classical growth factors.⁴⁵

Serum Ang1 Decreases in Patients Achieving Remission With Anti-TNF-alpha Therapy

Ang1 was the only proangiogenic factor that decreased during anti-TNF-alpha therapy. Ang1 levels decreased in patients who achieved remission at the third dose, and differences from baseline levels were significant at every time point during therapy. Serum samples could not be taken from all patients at week 14 due to technical problems. Thus, although patients in remission at the fourth dose also showed low Ang1 levels, statistical significance was not achieved due to decreased sample size. Such changes were not seen in nonresponders. To our knowledge, no data are available in the literature about Ang1 changes with TNF-alpha inhibitors in IBD patients, and the reported studies have been conducted in other inflammatory disorders. A decreased Ang1 messenger RNA expression, together with reduced Ang2, Tie2, and VEGF protein expression, has been reported in patients with psoriasis and psoriatic arthritis, TNF-alpha being proposed as a major regulator of the Ang/Tie2 pathway.⁴⁶

In patients with IBD, Ang1 is elevated before the treatment and decreases during the anti-TNF-alpha therapy. Our group recently found that VEGF-A and Ang1 serum levels correlated with the inflammatory marker C-reactive protein and with an increase in the number of leukocytes and platelets, which release both angiogenic factors during inflammation processes.³⁹ Also, we found that there was a good correlation between Ang1 in colonic mucosa culture supernatant and the endoscopic, histological, and clinical activity of the IBD. All these findings support an increase of Ang1 in patients with IBD and might explain its decrease with anti-TNF-alpha therapy.

Ang1 has stabilizing properties on endothelial cells, suppressing migration and enhancing survival by inducing Tie2 phosphorylation (p-Tie2).⁴³ This effect is probably maintained in patients in remission, and although Ang1 levels decrease in this patients, phosphorylated Tie2 receptor prevents Ang2 binding to Tie2, keeping the quiescence. If phosphorylation does not take place, Ang2 interrupts the essential Ang1/Tie2 signaling, showing agonist activity in the absence of Ang1, but functioning as a dose-dependent antagonist when Ang1 is present.⁴⁷ Endothelial cells produce Ang2 but not Ang1, and this endogenous Ang2 maintains endothelial cell survival by balancing the decrease in Ang1 levels. In active patients, endogenous Ang2 might be balancing the decrease of Ang1, thus maintaining the activation of Tie2.⁴²

Serum VEGF Levels Are Lower in Responders to Anti-TNF-alpha Therapy

Serum VEGF levels did not decrease during anti-TNF-alpha therapy but were markedly lower in patients with remission as

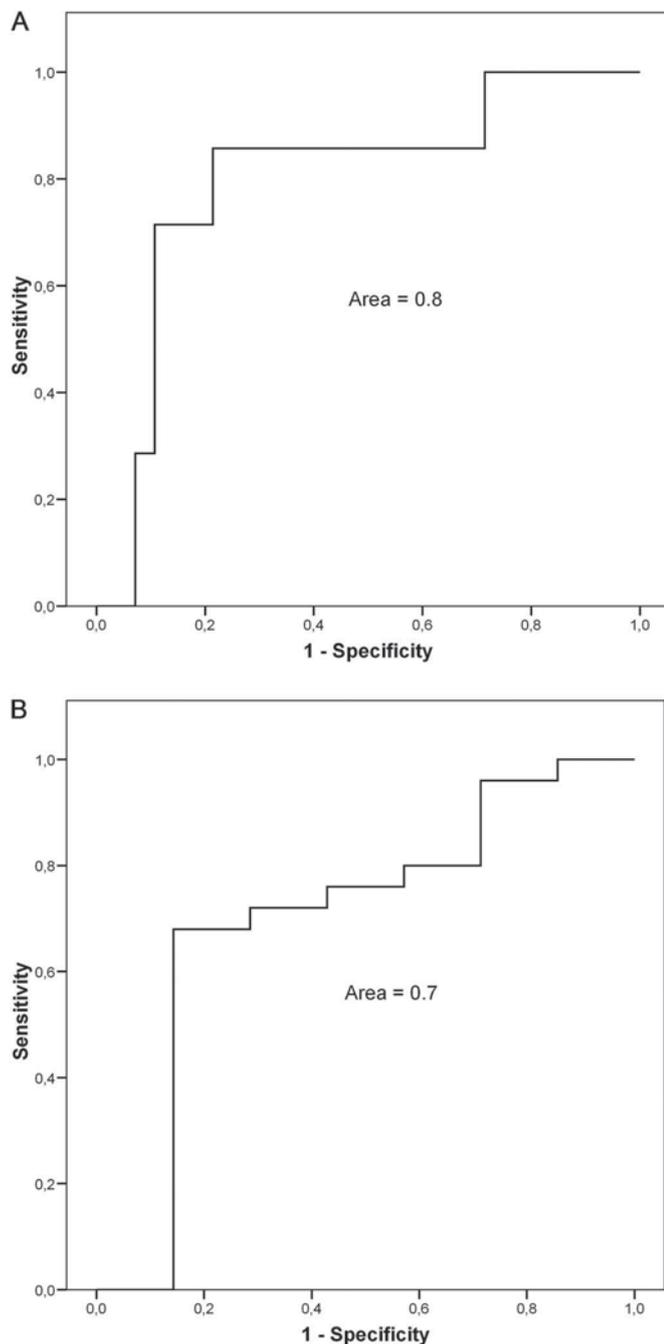


FIGURE 2. VEGF (A) and Ang1 (B) as predictors of remission in patients with IBD on anti-TNF-alpha treatment.

compared with nonresponders. However, when IFX and ADA were separately studied, decreased VEGF levels were seen before the third dose as compared with baseline in patients treated with IFX but not with ADA. A direct effect of anti-TNF-alpha therapy on serum VEGF levels could not be shown, but this finding might suggest the involvement of this protein in response to IFX.

Data about changes in proangiogenic factors with anti-TNF-alpha therapy are scarce and have mostly been collected in other

diseases. There are only 2 previous studies analyzing the effect of IFX on VEGF in patients with CD. The first one was conducted by Di Sabatino et al,²⁹ who found that IFX induced a rapid and sustained reduction in serum VEGF and basic fibroblast growth factor levels in patients with CD who responded to anti-TNF-alpha therapy. Decreased VEGF levels were also reported by Rutella et al.³⁰ These authors demonstrated that IFX administration downregulated mucosal angiogenesis in patients with CD and restricted VEGF production by mucosal fibroblasts. This process was not seen in non-responding patients. To our knowledge, the present study is the first to analyze the effect of the anti-TNF-alpha drugs, IFX and ADA, on circulating levels of angiogenic factors in both CD and UC.

As regards other autoimmune conditions, a significantly greater decrease in the expression of VEGF and other cytokines was found in patients with psoriatic arthritis treated with IFX as compared with patients given placebo.²⁷ However, as stated above, the study was conducted on tissue and synovial fluid, therefore reflecting local expression but not circulating levels. In addition, possibly due to methodological and/or ethical concerns, comparisons were made between baseline and week 8. In a cohort of patients with axial spondyloarthritis naive to anti-TNF-alpha drugs, patients treated with ADA showed a significant decrease in serum VEGF levels as compared with untreated patients.⁴⁸ The same has been found in ankylosing spondylitis,²⁸ rheumatoid arthritis,^{26,49,50} or psoriatic arthritis. A dual role of TNF-alpha in angiogenesis has been reported by several authors.^{4,51} TNF-alpha may have opposite effects on microvessels depending on local tissue levels. In experimental choroidal neovascularization, intravitreal infliximab decreased angiogenesis at low doses, whereas the opposite effect was seen at high doses.⁵² This may explain the differences found in vitro versus in vivo or between the types of samples or anatomical locations.

Serum Levels of VEGF and Ang1 Predict Response to Anti-TNF-alpha Therapy

The AUC showed VEGF and Ang1 to be the best predictors of anti-TNF-alpha efficacy. Elevated baseline VEGF levels were associated with a poor response to therapy with TNF-alpha inhibitors, whereas high Ang1 levels were related to disease remission after induction treatment. Our results should be taken with caution because AUC values were moderate (0.8 for VEGF and 0.7 for Ang1), but they suggest that VEGF and Ang1 are useful markers of response to anti-TNF-alpha therapy. It remains to be established whether these changes are a direct effect of the drug or secondary to the action of TNF-alpha inhibitors on other physiological inflammatory pathways. To investigate whether the decrease in circulating levels of proangiogenic factors was associated with a decreased disease activity during anti-TNF-alpha therapy, serum levels of the tested proteins were correlated with the clinical index score. Due to the limited sample size of patients with UC, changes in serum levels of the tested proangiogenic factors were studied in the CD group only. As widely reported in the literature, CDAI values decreased over time from baseline to the fourth anti-TNF-alpha dose⁵³⁻⁶⁰ but did not correlate with serum VEGF or Ang1 levels.

This may partly be explained by some limitations of clinical indexes. As they include some items associated but not limited to IBD, like number of stools, or subjective factors like general status, they may only partly reflect the actual disease activity. However, as endoscopy was not a medical indication for our study patients, the use of more accurate indexes of disease activity, such as endoscopic indexes, was a major ethical concern. Thus, clinical indexes were the only option to test the association between circulating angiogenic proteins and disease activity.

CONCLUSIONS

In our study, patients with active IBD exhibited an angiogenic profile characterized by elevated levels of circulating VEGF and angiopoietins, particularly Ang2. This supports the hypothesis that an altered angiogenic process is involved in the pathogenesis of IBD.

Anti-TNF- α drugs seem to decrease soluble levels of VEGF and Ang1 in patients who respond to treatment. Such changes could be predictive of response to anti-TNF- α therapy. Further research is needed to establish whether the changes seen in circulating levels of the tested proangiogenic factors are a direct effect of TNF- α inhibitors or a secondary sign of disease improvement. In this regard, the results obtained in this survey probably will serve as base of future studies aimed at elucidating the real effect of anti-TNF treatment on angiogenic factors at mucosa level.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Celer Soluciones for kindly reviewing the English used in this article.

REFERENCES

- Giraud E, Primo L, Audero E, et al. Tumor necrosis factor- α regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1998;273:22128–22135.
- Rosenbaum JT, Howes EL Jr, Rubin RM, et al. Ocular inflammatory effects of intravitreally-injected tumor necrosis factor. *Am J Pathol*. 1988;133:47–53.
- Nguyen H, Hay J, Gallinger S, et al. Isolation of human single chain antibodies (scFv) against human TNF- α from human peripheral blood lymphocyte-SCID mice. *Hum Antibodies*. 2002;11:65–72.
- Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J, et al. Dual role of tumor necrosis factor- α in angiogenesis. *Am J Pathol*. 1992;140:539–544.
- Fajardo LF, Grau GE. Tumor necrosis factor in human disease. *West J Med*. 1991;154:88–89.
- Veltkamp C, Anstaett M, Wahl K, et al. Apoptosis of regulatory T lymphocytes is increased in chronic inflammatory bowel disease and reversed by anti-TNF α treatment. *Gut*. 2011;60:1345–1353.
- Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol*. 1999;9:211–220.
- Nguyen VP, Chen SH, Trinh J, et al. Differential response of lymphatic, venous and arterial endothelial cells to angiopoietin-1 and angiopoietin-2. *BMC Cell Biol*. 2007;8:10.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386:671–674.
- Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev*. 2000;52:237–268.
- Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol*. 2001;61:253–270.
- Schroeder M, Viezens L, Fuhrhop I, et al. Angiogenic growth factors in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2013;33:523–527.
- Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, et al. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*. 2006;55:749–753.
- Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Simopoulos C, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in operable gallbladder carcinomas. *Eur J Surg Oncol*. 2003;29:879–883.
- Linares PM, Gisbert JP. Role of growth factors in the development of lymphangiogenesis driven by inflammatory bowel disease: a review. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:1814–1821.
- van Hinsbergh VW, van den Berg EA, Fiers W, et al. Tumor necrosis factor induces the production of urokinase-type plasminogen activator by human endothelial cells. *Blood*. 1990;75:1991–1998.
- Hanemaaijer R, Koolwijk P, le Clercq L, et al. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. *Biochem J*. 1993;296:803–809.
- Koolwijk P, van Erck MG, de Vree WJ, et al. Cooperative effect of TNF α , bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity. *J Cell Biol*. 1996;132:1177–1188.
- McDonald DM. Angiogenesis and remodeling of airway vasculature in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:S39–S45.
- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003;9:653–660.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9:669–676.
- Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, et al. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res*. 2000;60:203–212.
- Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci*. 2001;114:853–865.
- Carmeliet P, Moons L, Luttun A, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med*. 2001;7:575–583.
- Tammela T, Enholm B, Alitalo K, et al. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res*. 2005;65:550–563.
- Strunk J, Bundke E, Lange U. Anti-TNF- α antibody infliximab and glucocorticoids reduce serum vascular endothelial growth factor levels in patients with rheumatoid arthritis: a pilot study. *Rheumatol Int*. 2006;26:252–256.
- Canete JD, Pablos JL, Sanmarti R, et al. Antiangiogenic effects of anti-tumor necrosis factor alpha therapy with infliximab in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2004;50:1636–1641.
- Visvanathan S, Wagner C, Marini JC, et al. Inflammatory biomarkers, disease activity and spinal disease measures in patients with ankylosing spondylitis after treatment with infliximab. *Ann Rheum Dis*. 2008;67:511–517.
- Di Sabatino A, Cicciocioppo R, Armellini E, et al. Serum bFGF and VEGF correlate respectively with bowel wall thickness and intramural blood flow in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2004;10:573–577.
- Rutella S, Fiorino G, Vetrano S, et al. Infliximab therapy inhibits inflammation-induced angiogenesis in the mucosa of patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:762–770.
- Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1989;170:2–6; discussion 16–19.
- Best WR, Becktel JM, Singleton JW. Rederived values of the eight coefficients of the Crohn's disease activity index (CDAI). *Gastroenterology*. 1979;77:843–846.
- Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J*. 1955;2:1041–1048.
- Salcedo X, Medina J, Sanz-Cameno P, et al. The potential of angiogenesis soluble markers in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2005;42:696–701.
- Pousa ID, Mate J, Salcedo-Mora X, et al. Role of vascular endothelial growth factor and angiopoietin systems in serum of Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:61–67.
- Griga T, Tromm A, Spranger J, et al. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 1998;33:504–508.
- Kanazawa S, Tsunoda T, Onuma E, et al. VEGF, basic-FGF, and TGF- β in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:822–828.

38. Scaldaferrì F, Vetrano S, Sans M, et al. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology*. 2009;136:585–595 e585.
39. Algaba A, Linares PM, Fernandez-Contreras ME, 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;7:e569–e579.
40. Ferrante M, Pierik M, Henckaerts L, et al. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12:870–878.
41. Oikonomou KA, Kapsoritakis AN, Kapsoritaki AI, et al. Angiogenin, angiopoietin-1, angiopoietin-2, and endostatin serum levels in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:963–970.
42. Linares PM, Chaparro M, Gisbert JP. Angiopoietins in inflammation and their implication in the development of inflammatory bowel disease. A review. *J Crohns Colitis*. 2014;8:183–190.
43. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*. 1996;87:1161–1169.
44. Sundberg C, Kowanetz M, Brown LF, et al. Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo. *Lab Invest*. 2002;82:387–401.
45. Nilsson I, Shibuya M, Wennstrom S. Differential activation of vascular genes by hypoxia in primary endothelial cells. *Exp Cell Res*. 2004;299:476–485.
46. Markham T, Mullan R, Golden-Mason L, et al. Resolution of endothelial activation and down-regulation of Tie2 receptor in psoriatic skin after infliximab therapy. *J Am Acad Dermatol*. 2006;54:1003–1012.
47. Yuan HT, Khankin EV, Karumanchi SA, et al. Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. *Mol Cell Biol*. 2009;29:2011–2022.
48. Appel H, Janssen L, Listing J, et al. Serum levels of biomarkers of bone and cartilage destruction and new bone formation in different cohorts of patients with axial spondyloarthritis with and without tumor necrosis factor-alpha blocker treatment. *Arthritis Res Ther*. 2008;10:R125.
49. Paleolog EM, Young S, Stark AC, et al. Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1998;41:1258–1265.
50. Cordiali-Fei P, Trento E, D'Agosto G, et al. Decreased levels of metalloproteinase-9 and angiogenic factors in skin lesions of patients with psoriatic arthritis after therapy with anti-TNF-alpha. *J Autoimmune Dis*. 2006;3:5.
51. Frater-Schroder M, Risau W, Hallmann R, et al. Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:5277–5281.
52. Regatieri CV, Dreyfuss JL, Melo GB, et al. Dual role of intravitreal infliximab in experimental choroidal neovascularization: effect on the expression of sulfated glycosaminoglycans. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:5487–5494.
53. Armuzzi A, De Pascalis B, Lupascu A, et al. Infliximab in the treatment of steroid-dependent ulcerative colitis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2004;8:231–233.
54. Schroder O, Blumenstein I, Stein J. Combining infliximab with methotrexate for the induction and maintenance of remission in refractory Crohn's disease: a controlled pilot study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006;18:11–16.
55. Sorrentino D, Terrosu G, Avellini C, et al. Prevention of postoperative recurrence of Crohn's disease by infliximab. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006;18:457–459.
56. Lawson MM, Thomas AG, Akobeng AK. Tumour necrosis factor alpha blocking agents for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006:CD005112.
57. Rahimi R, Nikfar S, Abdollahi M. Meta-analysis technique confirms the effectiveness of anti-TNF-alpha in the management of active ulcerative colitis when administered in combination with corticosteroids. *Med Sci Monit*. 2007;13:PI13–PI18.
58. Behm BW, Bickston SJ. Tumor necrosis factor-alpha antibody for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008:CD006893.
59. Martin-de-Carpi J, Pociello N, Varea V. Long-term efficacy of adalimumab in paediatric Crohn's disease patients naive to other anti-TNF therapies. *J Crohns Colitis*. 2010;4:594–598.
60. Fiorino G, Szabo H, Fries W, et al. Adalimumab in Crohn's disease: tips and tricks after 5 years of clinical experience. *Curr Med Chem*. 2011; 18:1230–1238.

