



Universidad  
Católica de  
Valencia  
San Vicente Mártir

TFG

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN  
BIOTECNOLOGÍA

# Perfil inmunitario de la Colitis Ulcerosa

Blanca Sanahuja Dasí

Tutoras externas: Belén Beltrán Niclós e Inés Moret Tatay

Tutor interno: Francisco José Revert Ros

2020 - 2021



Instituto de Investigación  
Sanitaria La Fe



Facultad de Veterinaria  
y Ciencias Experimentales  
Universidad Católica de Valencia  
San Vicente Mártir

## **Agradecimientos**

Me gustaría agradecer su colaboración y apoyo a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de este trabajo.

En primer lugar, a Pilar Nos Mateu como responsable del grupo de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del hospital La Fe por permitirme llevar a cabo mis prácticas curriculares en su grupo.

A mis directoras Belén Beltrán Niclós e Inés Moret Tatay por compartir conmigo sus conocimientos, enseñarme tanto durante mi estancia de prácticas y ayudarme en la elaboración de este trabajo.

A todo el personal que forma el grupo de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del hospital La Fe por acogerme tan bien y hacer que mi estancia haya sido tan agradable.

A mi tutor de la universidad Francisco José Revert Ros por guiarme durante la realización de este trabajo y contar siempre con su atención.

A mi familia por apoyarme en todo momento durante este proceso de prácticas y final de grado.

## Resumen

La Colitis Ulcerosa (CU) es una enfermedad crónica de etiología aún no esclarecida que cursa con una inflamación de la mucosa que recubre la pared interna del intestino grueso. Esta inflamación está causada por una reacción exacerbada y no bien controlada del sistema inmunológico. La CU no tiene cura, pero actualmente hay fármacos que pueden controlar la enfermedad y mantenerla quiescente. En este estudio se pretende analizar el perfil inmunológico de pacientes de CU sometidos a granulocitoaféresis, un sistema de filtrado de componentes específicos de la sangre, y observar las diferencias con controles sanos.

Para ello, muestras de sangre periférica de dos pacientes de CU y dos controles sanos fueron procesadas y analizadas mediante citometría de flujo. Los perfiles inmunológicos y los niveles de citocinas de las muestras de pacientes y de controles fueron comparados.

Los resultados indicaron que no hay un perfil inmunológico diferencial en los pacientes de CU tratados con granulocitoaféresis frente a los controles sanos. Esto se observó en las poblaciones leucocitarias y las citocinas.

La granulocitoaféresis sí que parece que moduló el perfil inmunitario de los pacientes con CU, restableciendo su estado inflamatorio.

**Palabras clave:** sistema inmunológico, leucocitos, granulocitoaféresis, colitis ulcerosa

## **Abstract**

Ulcerative Colitis (UC) is a chronic disease of unclear etiology that causes the inflammation of the mucosa lining, the inner wall of the large intestine. This inflammation is caused by an exacerbated and uncontrolled immune system. UC has no cure, but there are currently drugs that can control the disease so that it remains quiescent. This study aims to analyse the immune profile of UC patients undergoing granulocytapheresis, a system of filtering specific blood components, and to observe the differences with healthy controls.

For this purpose, peripheral blood samples from two UC patients and two healthy controls were processed and analysed by flow cytometry. Immunological profiles and cytokine levels of the patient and control samples were compared.

The results indicated that there is no differential immunological profile in UC patients treated with granulocytapheresis versus healthy controls. This was observed in leukocyte populations and cytokines.

Granulocytapheresis seemed to modulate the immune profile of UC patients, restoring their inflammatory status.

**Key words:** immune system, leucocytes, granulocytapheresis, ulcerative colitis.

## Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>1.1 Enfermedad Inflamatoria Intestinal</b> .....	6
1.1.1 Descripción.....	6
<b>1.2 Enfermedad de Crohn</b> .....	7
1.2.1 Descripción.....	7
<b>1.3 Colitis Ulcerosa</b> .....	9
1.3.1 Descripción.....	9
1.3.2 Tipos de colitis ulcerosa .....	10
1.3.3 Índice de Montreal .....	10
1.3.4 Índice UCEIS .....	10
1.3.5 Respuesta Inmunológica .....	12
1.3.6 Sintomatología .....	16
1.3.7 Diagnóstico.....	17
1.3.8 Tratamiento.....	18
1.3.9 Epidemiología.....	28
1.3.10 Situación actual de la enfermedad .....	29
1.3.11 Perspectivas futuras .....	30
<b>2. Objetivos</b> .....	31
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	32
<b>3.1 Obtención de las muestras</b> .....	32
<b>3.2 Condiciones de las muestras</b> .....	33
<b>3.3 Procesado de las muestras</b> .....	33
<b>3.3.1 Protocolo de tinción de las células mononucleares de sangre periférica</b> .....	33
<b>3.3.2 Protocolo para la obtención del plasma sanguíneo</b> .....	35
<b>3.4 Análisis por citometría de flujo</b> .....	35
<b>3.5 Análisis de citocinas</b> .....	37
<b>4. Resultados</b> .....	37
<b>4.1 Estudio de las células de la serie blanca de sangre periférica mediante citometría de flujo</b> .....	38
<b>4.2 Análisis de citocinas</b> .....	48
<b>5. Discusión</b> .....	49
<b>6. Conclusiones</b> .....	52

<b>7. Líneas futuras.....</b>	<b>53</b>
<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>54</b>

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Enfermedad Inflamatoria Intestinal**

#### **1.1.1 Descripción**

La Colitis Ulcerosa (CU) es una patología que se encuentra dentro de las patologías denominadas Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), junto con la Enfermedad de Crohn. Estas enfermedades han sido estudiadas conjuntamente ya que comparten caracteres comunes como la clínica, tejidos dañados y tratamientos. La EII se desarrolla debido a una respuesta desmesurada del sistema inmunológico del paciente contra su propia microbiota intestinal, por lo que son enfermedades inflamatorias con características de autoinmunidad. La principal diferencia entre la enfermedad de Crohn y la CU es que, a diferencia de lo que sucede en la enfermedad de Crohn, en la CU, como su propio nombre indica, la inflamación tiene lugar en el intestino grueso y en el recto (Souza y Fiocchi, 2016).

La EII es idiopática, es decir, de origen desconocido. Según diversos estudios se cree que pueden influir diferentes factores como la genética de un individuo, factores ambientales como la alimentación, el tabaquismo o el estrés; y tendencia de los anticuerpos del individuo a reaccionar de forma anómala (Stange y Schroeder, 2019).

Los pacientes que padecen EII pueden llevar un nivel de vida normal durante las fases en las que la enfermedad está quiescente, y eso suele implicar que siguen las pautas terapéuticas dadas por sus especialistas. La dieta en la fase de remisión es normal, aunque hay determinados alimentos desaconsejables. Al final, son los propios pacientes los que valoran qué dieta pueden seguir en función de lo que toleran mejor. En periodos en los que aparece un brote, los pacientes deben seguir una dieta blanda, alimentos cocinados al vapor o plancha y evitar alimentos con fibra. Además, deben hidratarse abundantemente (Mentella, Scaldaferri, Pizzoferrato, Gasbarrini y Miggiano, 2020).

Los enfermos de EII acuden periódicamente al hospital para realizarse controles, administración de fármaco o inicio de un nuevo tratamiento. La frecuencia con la que acuden depende del estado del paciente. Los casos más graves requieren ingreso y cirugía.

Además, según estudios, los pacientes de EII sufren un mayor riesgo de desarrollar cáncer del tracto gastrointestinal que el resto de población (Weimers y Munkholm, 2018).

El diagnóstico de estas enfermedades supone al paciente una serie de limitaciones laborales, en relaciones sociales, actividades deportivas o de ocio. Esto conlleva una carga psicológica importante que deben saber sobrellevar y adaptarse a la situación (Flynn y Eisenstein, 2019).

Existen organismos y asociaciones que se encargan de informar y dar soporte tanto físico como psicológico a los pacientes de enfermedad inflamatoria intestinal. Ejemplos de estas asociaciones son: GETECCU y ACCU.

GETECCU es el Grupo Español de Trabajo en Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa. Es una asociación a nivel nacional sin ánimo de lucro que se encarga del estudio y la investigación de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) y procura la homologación de criterios clínico-terapéuticos en el diagnóstico y tratamiento de la misma, promoviendo el desarrollo de los medios terapéuticos idóneos, con su investigación a todos los niveles: básico, experimental, clínico y epidemiológico; procurar la coordinación de estos medios de forma armónica y complementaria; estimular la uniformidad de criterios para el tratamiento de la EII. Está por tanto dirigida a los profesionales sanitarios y de ciencias de la salud para mejorar la vida de las personas afectas por la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), promoviendo la excelencia asistencial, docente, investigadora e influyendo en acciones políticas y sociales (Arévalo, 1980).

ACCU España es una Asociación de pacientes de Crohn y Colitis Ulcerosa a nivel nacional que trabaja sin ánimo de lucro para ayudar a los pacientes de EII. Informa acerca de cualquier cuestión que puedan tener pacientes o familiares, mantiene el contacto entre miembros de la asociación, organiza viajes nacionales e internacionales, fomenta la investigación y divulgación sobre estas patologías y lucha por la igualdad de oportunidades de los pacientes (Accuesp, 1987).

## **1.2 Enfermedad de Crohn**

### **1.2.1 Descripción**

La **Enfermedad de Crohn** (EC) consiste en una inflamación transmural del tracto gastrointestinal, en la que pueden estar afectadas distintas zonas desde la boca hasta la zona perianal. Mayoritariamente suele inflamarse el extremo inferior del intestino delgado y el principio del intestino grueso. Presenta fases de brote, en los que la

persona que sufre la enfermedad padece síntomas y empeora; y fases de quiescencia en las que la enfermedad se encuentra latente y no se manifiesta.

La enfermedad se puede complicar debido a una obstrucción del intestino producida por la formación de estenosis fibrosas, abscesos y fístulas, todo ello debido a la extensión y duración de la inflamación. (Rich et al. 2019).

En condiciones fisiológicas, los linfocitos T reguladores, los linfocitos B, las células dendríticas y las células *natural killer* (NK) permiten la presencia de bacterias comensales, pero reaccionan ante bacterias patógenas (Shen et al., 2018). Además, liberan citocinas antiinflamatorias como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) o la interleukina 10 (IL-10). En cambio, en la enfermedad de Crohn se produce inflamación debido a la alta reactividad de los leucocitos contra toda la microbiota intestinal. Se ha visto que la microbiota intestinal está alterada en pacientes de Crohn, de modo que se produce una inversión en la proporción de las bacterias de los filos Bacteroidetes y Firmicutes. Además, también se ha visto una reducción de *Faecalibacterium prausnitzii* aunque se desconoce si es causa o consecuencia de la enfermedad de Crohn (Stange y Schroeder, 2019).

Se emplea el índice de Harvey-Bradshaw para valorar la actividad de la enfermedad en cada paciente. Se tiene en cuenta el bienestar general del paciente, que se valora de 0 a 4 (siendo 0 el estado óptimo y 4 el peor); el dolor abdominal, de 0 a 3; el número de deposiciones blandas por día (cuenta como 1 cada una); la masa abdominal (de 0 a 3) y la aparición de complicaciones, que cuentan como 1 cada una. Según el valor numérico total obtenido, el proceso inflamatorio estará más o menos activo, de modo que cuanto más alto sea el índice peor será el estado del paciente. Los pacientes que tienen la enfermedad quiescente tienen un índice Harvey menor a 5 (Velásquez, 2014).

Los pacientes con peor pronóstico suelen necesitar una o varias intervenciones quirúrgicas.

Todos los pacientes a lo largo de su vida suelen ser intervenidos quirúrgicamente.

## **1.3 Colitis Ulcerosa**

### **1.3.1 Descripción**

La Colitis Ulcerosa (CU) se trata de una patología inflamatoria crónica de la mucosa colónica. Suele empezar en el recto y va abarcando el colon de manera proximal

pudiendo llegar a estar infectado todo el colon. La inflamación da lugar a la formación de úlceras y, no es transmural. Cuenta con períodos de exacerbación, que pueden ocurrir de forma espontánea o en respuesta a cambios de tratamiento o a enfermedades intercurrentes, y periodos de quiescencia en los que la enfermedad no manifiesta síntomas. El objetivo de los tratamientos es mantener al paciente en estado de remisión (Ordás, Eckmann, Talami, Baumgart y Sandborn, 2012).

Esta patología se conoce desde el año 640 a.C., y se describía como una diarrea no contagiosa. En 1859 fue cuando se nombró por primera vez como Colitis Ulcerosa a la enfermedad que producía dicha diarrea. Fue el Dr. Samuel Wilks, un anatomopatólogo de Londres, que diagnosticó Colitis Ulcerosa a una paciente que había muerto tras semanas padeciendo diarrea sanguinolenta de causa no infecciosa. Desde entonces se han ido actualizando los conocimientos de la enfermedad hasta conocerla como se conoce hoy en día (Arévalo, 1980)

### 1.3.2 Tipos de colitis ulcerosa

Según la localización de la inflamación encontramos (Figura 1):

- Proctitis ulcerosa: cuando la inflamación afecta únicamente al recto
- Colitis ulcerosa distal: se ve afectada la región que forma el ángulo esplénico (entre el colon descendente y el colon transverso).
- Pancolitis: se inflama todo el colon.

(G-Educainflamatoria, 2021)

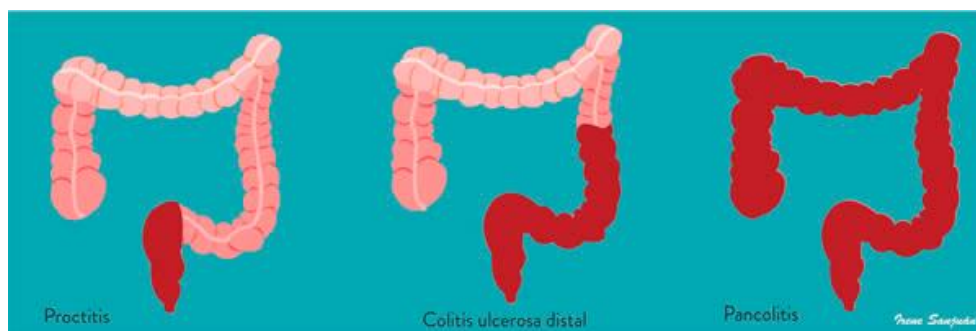


Figura 1. Afectación del colon según los diferentes tipos de colitis ulcerosa (G-educainflamatoria, 2020).

### 1.3.3 Índice de Montreal

Actualmente se considera que la clasificación de Montreal es la que mejor define la extensión de la CU y que determina el tratamiento del paciente, la modalidad de tratamiento y si la terapia oral y/o tópica es necesaria.

<b>Colitis ulcerosa</b>	
Extensión	E1: proctitis
	E2: colitis izquierda (distal al ángulo esplénico)
	E3: colitis extensa (distal al ángulo hepático)
	E4: pancolitis
Severidad	S0: nunca severa
	S1: alguna vez severa (PUCAI > 65)

Tabla 1. Índice de Montreal (Medina, 2013).

Se tiene en cuenta la extensión de la inflamación y elementos clínicos y se clasifica a los pacientes en grupos según la mayor o menor agresividad de la enfermedad. Según la extensión de la colitis ulcerosa encontramos:

- E1: proctitis (se limita al recto la inflamación)
- E2: colitis izquierda (distal al ángulo esplénico)
- E3: colitis extensa (distal al ángulo hepático)
- E4: pancolitis (abarca todo el colon)

Según la severidad clínica:

- S0: nunca ha sido severa
- S1: en alguna ocasión ha sido severa

En ocasiones no se consigue diferenciar fenotípicamente entre Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa, cuando esto ocurre se habla de enfermedad inflamatoria no clasificada o indeterminada (Tabla 1) (Medina, 2013).

### **1.3.4 Índice UCEIS**

El Índice de Severidad Endoscópico de Colitis Ulcerativa (UCEIS por sus siglas en inglés) utiliza el patrón vascular, sangrado y ulceración para capturar la variedad de hallazgos endoscópicos (Polanco, 2016).

Hallazgo	Puntos	Definición
Patrón vascular	Normal (0)	Patrón vascular normal con arborización de los capilares bien definido, o con pérdida en parches
	Obliteración en parches (1)	Obliteración en parches del patrón vascular
	Obliteración (2)	Obliteración completa del patrón vascular
Hemorragia	Ninguna (0)	Sin sangre visible
	Mucosa (1)	Algunas estrías de sangre coagulada en la superficie de la mucosa Sangre líquida libre en la luz
	Luminal leve (2)	Franca sangre visible en la luz frente al endoscopio o sangrado visible de la mucosa después de lavar
	Luminal moderada a severa (3)	
Erosiones o úlceras	Ninguna (0)	Mucosa normal, sin erosiones visible o úlceras
	Erosiones (1)	Pequeños defectos de la mucosa (< 5mm) o un color blanco-amarillento de lesiones aplanadas
	Úlceras superficiales (2)	Lesiones mayores (> 5mm) en la mucosa que son úlceras discretas con fibrina, aun superficiales
	Úlceras profundas (3)	Defectos excavados y más profundos de la mucosa

Tabla 2. Índice de Severidad Endoscópico de Colitis Ulcerativa (UCEIS) (Polanco, 2016).

Como se observa en la Tabla 2, cada parámetro tiene tres o cuatro niveles de severidad. Mediante este índice se evalúa la actividad inflamatoria global en el colon observada endoscópicamente. Es el primer índice de severidad endoscópico validado (Polanco y Waller, 2016)

### 1.3.5 Respuesta Inmunológica

Las células inmunitarias y los microorganismos lumbinales se encuentran separados por una barrera epitelial recubierta de una capa mucinosa que cubre la pared interna del intestino grueso. Es la línea primaria de defensa del sistema inmunológico ya que supone una separación física entre las células inmunitarias y la microbiota luminal, y además sintetiza péptidos antimicrobianos. En la colitis ulcerosa la homeostasis entre la microbiota intestinal y la capa mucinosa se desequilibra por una reacción exacerbada de las células del sistema inmunológico (Tatiya-Aphiradee, Chatuphonprasert y Jarukamjorn, 2018).

En la patogenia de la colitis ulcerosa la microbiota es esencial ya que influye en la inmunidad innata y adaptativa. Hay diversas vías inmunológicas mediante las cuales se desarrolla la inflamación, y están relacionadas con la barrera epitelial, la flora

simbiótica, el reconocimiento de antígenos por los macrófagos, desregularización inmunológica, reclutamiento de leucocitos y factores genéticos.

### **1.3.5.1 Caracterización del sistema inmunológico**

Los pacientes de CU presentan un sistema inmunológico activo debido a la inflamación crónica que sufren. Esto conlleva que presenten unos niveles más elevados de células inmunitarias que las personas sanas. El sistema inmunológico innato y el adaptativo contribuyen en el desarrollo de la CU. El sistema inmunológico innato está compuesto principalmente por monocitos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos y basófilos. Estas células actúan juntas para iniciar la inflamación secretando citocinas y agentes antimicrobianos, como se muestra en la Figura 2. Esto conlleva a la fagocitosis de células y microorganismos infectados, presentación de antígenos y activación del sistema inmunológico adaptativo (Kelly, Houston, Sherwood, Casulli, y Travis, 2017).

La respuesta inmune adaptativa está compuesta principalmente por los linfocitos T y B que, cuando se activan a través de las células dendríticas, generan respuestas efectoras (citocinas y anticuerpos) (Figura 2). A diferencia del sistema inmunológico innato, el sistema inmunológico adaptativo es muy específico y confiere una inmunidad duradera (memoria). Generalmente se piensa que el sistema inmunológico adaptativo es el principal contribuyente a la patogénesis de la CU (Wallace, Zheng, Kanazawa y Shih, 2014).

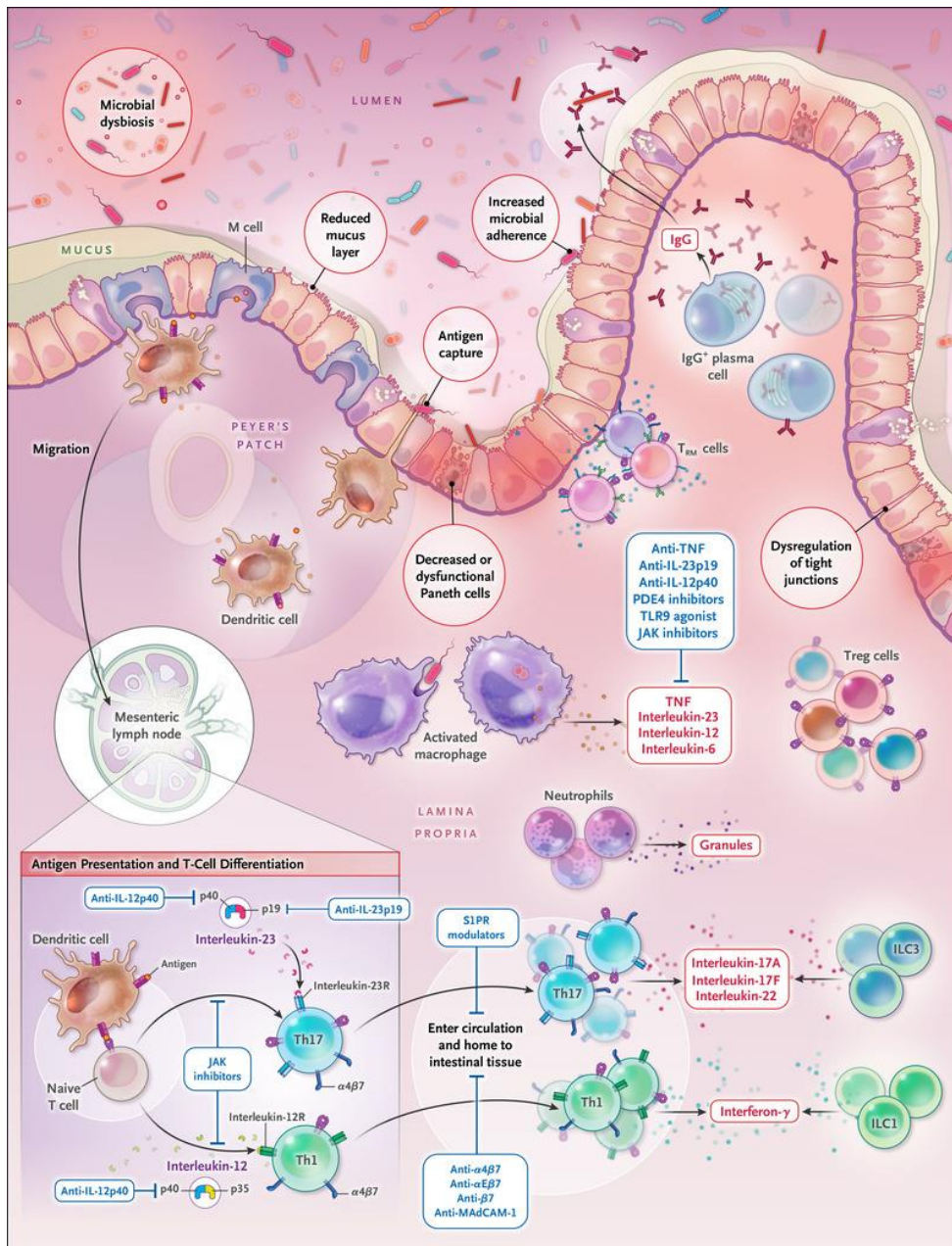


Figura 2. Representación de la migración de células inflamatorias a la barrera mucinosa del intestino grueso (Chang, 2020).

Conforme más se investiga el sistema inmunológico en la patología de CU surgen nuevos subtipos de células leucocitarias involucradas en la patogénesis de ésta.

Los linfocitos T tienen un papel crucial ya que contribuyen a la patogénesis de la CU mediante la regulación, supresión y mantenimiento de la inflamación (Montalvillo, Garrote, Bernardo y Arranz, 2014). En un primer momento se relacionó a los linfocitos T reguladores y los Th1 como los más influyentes en el desarrollo de la CU, pero más recientemente se ha observado en estudios que los linfocitos Th17 están muy

involucrados en el desarrollo de la inflamación crónica en la CU (Li et al., 2020). Las células Th17 son inducidas por TGF- $\beta$  e IL-6. Las funciones de las células Th17 dependen del entorno inmunológico en el que se desarrollan (Ueno et al. 2018). Producen las citocinas IL-17A, IL-17F y IL-22 (Figura 2).

Estudios recientes han observado que las células linfoides innatas (ILC) también están involucradas en la patogenia de la CU, concretamente las ILC de la familia 3. Son responsables de la homeostasis de la mucosa gastrointestinal a través de la generación de IL-22, IL-17 (Figura 2). Están implicadas en las respuestas inmunitarias gastrointestinales. Protegen la mucosa intestinal de infecciones de diversos patógenos para mantener la homeostasis intestinal en estado estable. Este efecto protector se realiza principalmente a través de la secreción de IL22 e IL-17 lo que provoca que las células epiteliales produzcan péptidos antimicrobianos (AMP), que matan a los patógenos, regulando las respuestas de las células T (Zeng et al., 2019).

Las células *natural killer* participan en la inmunidad innata y adaptativa. Identifican y destruyen las células antigénicas (función citotóxica), en el caso de la CU la propia microbiota intestinal. También participan en la patogénesis de la CU mediante la producción de diversas citocinas como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), la IL-13, la IL5 y la IL-4. Citocinas involucradas en la aparición y el desarrollo de CU (Lai, Shen y Ran, 2019).

Los linfocitos T CD4+ y T CD8+ influyen en el desarrollo de la CU ya que atacan a la propia microbiota intestinal porque no la reconocen como propia sino que la consideran como un agente extraño. Provocando así inflamación.

En cuanto a los linfocitos B, son responsables de la inmunidad humoral, es decir, actúan contra patógenos extracelulares produciendo anticuerpos contra éstos. También se ven aumentados sus niveles en pacientes con CU debido a que los linfocitos B producen anticuerpos contra la flora bacteriana del colon. Cada vez parece que estos linfocitos están más involucrados en la CU, las moléculas inmunomoduladoras como la IL-10, la adenosina, el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, la IL-3 y la IL-35 son producidas por las células B (Aziz, Holodick, Rothstein y Wang, 2015).

Los monocitos desempeñan un papel importante en la defensa del organismo contra infecciones y en la eliminación de tejido muerto o dañado y en la destrucción de

neoplasias. Así pues, en los pacientes de CU los monocitos reconocen la microbiota intestinal como un agente extraño del cual hay que defender al organismo y reaccionan contra ésta (Na, Stakenborg, Seok y Matteoli, 2019).

Finalmente, los neutrófilos son la principal célula implicada en la patogénesis de la CU. Migran del torrente circulatorio a la capa mucosa del intestino (Figura 2) y reaccionan contra la microbiota intestinal produciendo las lesiones propias de esta enfermedad mediante su desgranulación y la liberación de diversas proteinasas y citocinas (Adacyte, 2021).

### **1.3.5.2 Perfil de citocinas**

La interacción de las células presentadoras de antígenos con la microbiota intestinal activa la respuesta inmunológica innata. El número de células presentadoras de antígenos aumenta en pacientes de colitis ulcerosa, perpetuando la inflamación. Los linfocitos B y T son activados por las células dendríticas, desencadenando la producción de citocinas y activando el sistema inmunológico adaptativo. Esta reacción favorece de forma desmesurada la inflamación, que está mediada por células NK que producen interleucina-13 y dañan las células epiteliales que a su vez promueven la liberación de citocinas adicionales, como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), IL-23, IL-17, IL-6, IL-1 y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). En particular, la IL-23 induce la diferenciación de células T CD4 vírgenes en células T *helper* que favorecen el desarrollo de la enfermedad. Las células T *helper* más destacadas son las Th1, Th2, Th17, Th9 y Th22 (Allocca et al., 2018; Guo, 2020).

Las citosinas arriba mencionadas son proinflamatorias. La patogenia de la CU también es favorecida por el déficit de IL-10, tradicionalmente considerada como citocina anti-inflamatoria. (Rich et al., 2019).

La IL-13 es una citocina inmunorreguladora que es producida mayoritariamente por células Th2 activadas y participa en la regulación de las respuestas inflamatorias e inmunes. Impide que los monocitos produzcan citocinas y provoca proliferación de los linfocitos B (Instituto Nacional del Cáncer, 2021).

El IFN-gamma (IFN- $\gamma$ ) es clasificado como un interferón tipo II y actúa como factor de activación de macrófagos producido principalmente por linfocitos T y células NK en

respuesta a antígenos de *Staphylococcus*, fitohemaglutinina y otras citocinas (Langer et al., 2019).

La IL-23 humana es una citocina pro-inflamatoria sintetizada mayoritariamente por células presentadoras de antígenos. Induce y mantiene la diferenciación de las células Th17 y las células Th22, una fuente de citocinas proinflamatorias como IL-17 e IL-22 (Puig, 2017). Tiene un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de enfermedades autoinmunes inflamatorias (Yagüe Sanz, 2015).

La interleucina-17 (IL-17) es una citocina con diversas funciones tanto en la protección inmunológica como en la inmunopatología. La IL-17 interviene en la vigilancia inmunológica en las superficies mucosas y de barrera, pero se ha visto que actúa también favoreciendo la inmunopatología en entornos de autoinmunidad e inflamación crónica (Abusleme y Moutsopoulos, 2017).

La IL-6 es una citocina pro-inflamatoria producida por múltiples tipos celulares. La IL-1 y TNF $\alpha$  promueven su síntesis y actúan de forma similar. Actúa fundamentalmente sobre hepatocitos. También es un factor diferenciador tardío de linfocitos B. (Clínica Universidad de Navarra. 2021.) Además, induce la expresión de una variedad de proteínas responsables de la inflamación aguda y promueve la proliferación y diferenciación celular (Uciechowski y Dempke, 2020).

La familia de la interleucina 1 (IL-1) es un grupo de citocinas que regula las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas. La mayoría de las citocinas de la familia IL-1 expresan actividades proinflamatorias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33, IL-36  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), mientras que otras son antiinflamatorias (IL-36Ra, IL-38, IL-37). Además de sus funciones inmunomoduladoras, algunas de ellas también participan en la modulación fisiológica de los procesos homeostáticos y afectan directamente a la transcripción del ARN (Migliorini, Italiani, Pratesi, Puxeddu y Boraschi, 2020).

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) es una citocina sintetizada por diversas células inmunitarias, sobre todo por macrófagos y monocitos. Lleva a cabo acciones pro-inflamatorias y regula otros mediadores inflamatorios como la IL-1 y la IL-6. Actúa a nivel celular y tisular: a nivel celular favorece el reclutamiento de linfocitos y neutrófilos así como el reconocimiento de antígeno; a nivel tisular produce la remodelación y recuperación de los tejidos (Mehaffey y Maiid, 2017).

En cambio, IL-10 e IL-37 y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) son citocinas con actividad antiinflamatoria encargadas de regular negativamente la enfermedad, disminuyendo la inflamación (Rich et al., 2019).

Otro mecanismo de patogenicidad que se ha estudiado se produce mediante la obstrucción de las uniones estrechas del epitelio intestinal provocada por el aumento de IL-13, estimulando un aumento de la Claudina 2 y un efecto tóxico sobre las células intestinales (Rich et al., 2019). Por lo que hay estudios que sugieren que la IL-13 podría ser una diana terapéutica para un tratamiento prometedor para aliviar la colitis ulcerosa (Hoving, 2018).

Otro tipo de mediadores del sistema inmune que también se ha visto que influyen en la patogenicidad de la colitis son los receptores tipo *toll*, (toll-like receptor o TLR), ya que la estimulación de TLR4 y de NF- $\kappa$ B en células epiteliales intestinales confiere ventajas de supervivencia o promueve la proliferación anormal en células susceptibles. (Yao, Dong, Dai y Wu, 2019). Los TLR son proteínas transmembrana de los leucocitos que contienen un dominio de repetición rico en leucina (Leucine-rich repeat o LRR), y que desempeñan un papel central en el reconocimiento y la respuesta a patógenos microbianos y en el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial en el intestino. El receptor tipo Toll 4 (TLR4) un miembro importante de la familia TLR, se expresa principalmente en los segmentos colónicos distales. Aunque solo es mínimamente detectable en las células epiteliales del intestino delgado y del colon de la mucosa normal, un estudio encontró que la expresión de TLR4 en el colon distal era 3 veces mayor que en el resto del colon, intestino delgado y estómago. Estos resultados sugieren que se produce un aumento de la expresión epitelial de TLR4 durante el inicio de la colitis ulcerosa y puede desempeñar un papel en la transición de la inflamación a la neoplasia. (Yao et al., 2019)

### **1.3.6 Sintomatología**

El cuadro de síntomas que presentan los pacientes de CU que debutan o sufren un brote puede ser variado y dependen de la gravedad de la inflamación, pero con frecuencia son: dolor abdominal, diarrea sanguinolenta, cansancio o debilidad, pérdida de peso considerable y fiebre. Sin embargo, no tienen por qué presentar todos los

síntomas, de hecho, hay pacientes que apenas muestran síntomas, o en los que se detecta la enfermedad está activa en una revisión médica rutinaria (G-educainflamatoria, 2020).

### **1.3.7 Diagnóstico**

Para el diagnóstico de la CU se deben valorar los síntomas que presenta el paciente y descartar otras enfermedades compatibles con esos síntomas y que no son CU. Es un diagnóstico complejo, pudiéndose confundir con la Enfermedad de Crohn de localización colónica. Se realiza:

- análisis de sangre y de heces, para observar marcadores de inflamación
- radiografías o técnicas de diagnóstico por imagen, para localizar indicios de anomalías características de CU.
- colonoscopia, considerada la técnica “gold-standard” para el diagnóstico de la CU ya que permite visualizar el colon del paciente y así percibir si hay presencia de lesiones. En la colonoscopia se toman biopsias que se envían al laboratorio de anatomía patológica para ayudar en el diagnóstico.

Los marcadores inflamatorios que se analizan son la velocidad de sedimentación de los glóbulos rojos, el fibrinógeno, el nivel de proteína C reactiva (PCR), la calprotectina y la lactoferrina. (G-educainflamatoria, 2020)

Cuando hay actividad inflamatoria activa se produce un incremento en el plasma de la concentración de diversas proteínas que se denominan proteínas reactivas de fase aguda. Este aumento se debe a que se producen en más cantidad en el hígado por las citocinas. La presencia de estas proteínas en el plasma hace que los glóbulos rojos sedimenten a mayor velocidad debido a un cambio en su carga de la superficie (Bray et al., 2016). La velocidad de sedimentación globular (VSG) es muy empleada en la práctica clínica como prueba inespecífica para valorar la existencia de inflamación. El fibrinógeno es la proteína que más involucrada está en el aumento de la VSG (en un 55%), seguido de la alfa-2 macroglobulina, inmunoglobulinas y albúmina (Romero, 2021).

El rango de referencia de la VSG depende del género, edad del paciente y del laboratorio de referencia, que se encarga de determinar el rango para la prueba. La VSG incrementa ligeramente con la edad (Romero, 2021).

La VSG se encuentra elevada en prácticamente todos los procesos que cursan con inflamación (enfermedades inflamatorias o infecciones) y en algunas neoplasias (formaciones anormales de tejido nuevo tumoral benigno o maligno) por lo que es totalmente inespecífica. El aumento se produce a las 24 h del estímulo inflamatorio y no suele normalizarse hasta al cabo de cinco a diez días de su resolución (Romero, 2021).

La proteína C reactiva es una proteína sintetizada por el hígado que interviene en los procesos de respuesta a una inflamación, por lo que se encuentra a altos niveles en el torrente sanguíneo cuando hay inflamación. En condiciones fisiológicas se encuentra a niveles muy bajos (Moutachakir, Lamrani, Baraou, Boukhira y Chellak, 2017).

La calprotectina es una proteína sintetizada por los neutrófilos y se emplea clínicamente como biomarcador de actividad inflamatoria en el tubo digestivo ya que cuando hay inflamación en alguna zona de éste el nivel de calprotectina se ve incrementado. Concretamente, la calprotectina fecal se analiza mediante el análisis de muestras de heces que se les pide a los pacientes y permite saber a los médicos el nivel inflamatorio del paciente a nivel gastrointestinal, cuanto más alto es el nivel de calprotectina fecal más severa es la inflamación. Los niveles de calprotectina en una persona sana son de 50 µg/g o inferiores (Ayling y Kok, 2018).

La lactoferrina es una glicoproteína encargada del transporte de hierro en el organismo y también se analiza su contenido en las heces. Cuando se produce inflamación, los neutrófilos liberan lactoferrina en el lugar de inflamación. Por lo que el nivel de lactoferrina tiene una relación directa con el nivel de inflamación (Rosa, Cutone, Lepanto, Paesano y Valenti, 2017).

Estas pruebas por si solas no confirman la presencia de la CU, pero ayudan a descartar otras enfermedades. Actualmente, el mejor método para diagnosticar la CU (prueba llamada "Gold standard") es a través de la realización de una colonoscopia y análisis de las biopsias intestinales.

### **1.3.8 Tratamiento**

El tratamiento que se administra a los pacientes tiene como finalidad controlar la inflamación y mantener la enfermedad en remisión.

### 1.3.8.1 Fármacos

Los fármacos que existen actualmente y que se emplean para la EII son:

- Aminosalicilatos: son derivados de la aspirina.
  - Mesalazinas: mayoritariamente es el primer tratamiento que se da a los pacientes de EII. Pertenece a la familia de los salicilatos, que presentan propiedades antiinflamatorias. Se conocen también como 5-ASAs ya que se componen de ácido 5 aminosalicílico. Sus efectos antiinflamatorios se deben a una inhibición de los efectos del ácido araquidónico en la mucosa intestinal a través de la inhibición de la ciclooxigenasa. La inhibición de esta enzima reduce la síntesis de prostaglandinas, disminuyendo así la inflamación del colon (Brumós, 2014).
  - Sulfasalazina: mismo mecanismo que la mesalazina, se les receta a los pacientes que presentan manifestaciones adversas extraintestinales debidas a las mesalazinas (Brumós, 2014).
- Inmunomoduladores: moléculas que deprimen la respuesta inmunitaria
  - Corticosteroides: son hormonas esteroides. Regulan la respuesta del sistema inmunitario y disminuyen la producción celular de sustancias inflamatorias. Se deben retirar de forma paulatina ya que de lo contrario podrían producirse importantes efectos adverso. Hay un porcentaje de pacientes que tienen corticodependencia, es decir, en cuanto se les baja las dosis de corticoides vuelven a padecer síntomas y encontrarse mal. En cambio, hay otro porcentaje, hasta el 40% de pacientes, que no responde a los corticoides (Brumós, 2014).
  - Biológicos: son productos biotecnológicos, anticuerpos frente a determinadas moléculas inflamatorias.

- Fármacos anti-TNF: TNF- $\alpha$  es una citocina pro-inflamatoria, como se ha mencionado anteriormente. Los fármacos anti-TNF $\alpha$  juegan un papel fundamental en la resistencia a la apoptosis de las células inmunitarias de la CU, incrementan la apoptosis de las células inmunes (Moret, 2014).
  - Infliximab: El Infliximab es el primer tratamiento basado en anticuerpo monoclonal aprobado para su uso en la CU. Es un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido contra el TNF- $\alpha$ . También es el primer fármaco que inhibe específicamente la actividad del TNF- $\alpha$ . Se une a zonas muy afines de la membrana del TNF- $\alpha$  evitando que éste pueda unirse a sus receptores y desempeñar su función (Brumós, 2014).
  - Adalimumab: es un anticuerpo monoclonal IgG 100% humano (a diferencia del infliximab que es quimérico) dirigido contra el TNF- $\alpha$ , neutralizando su función biológica al bloquear su interacción con los receptores p55 y p75 en la superficie celular y atenuando sus efectos proinflamatorios. (Brumós, 2014).
- Ustekinumab: es un anticuerpo monoclonal que se une a la subunidad proteica p40 de las citocinas humanas IL-12 e IL-23, inhibiendo su actividad al impedir que estas citocinas se unan a su proteína receptora, receptor que se expresa en la superficie de las células inmunes. Este fármaco impide que la IL-12 e IL-13 activen las células inmunes (Brumós, 2014).
- Vedolizumab: bloquea la integrina  $\alpha 4\beta 7$ , que es un mediador de la inflamación gastrointestinal. Se expresa en la superficie de una subpoblación de linfocitos T que migran al tracto

gastrointestinal y que son responsables de la inflamación característica de la CU y EC (Brumós, 2014).

- Inmunosupresores: aunque todos los fármacos empleados para los pacientes de colitis ulcerosa tienen carácter inmunosupresor, los que se clasifican como tal son:
  - Azatioprina: Inmunodepresor y citotóxico, análogo de la purina. Inhibe la síntesis de ADN disminuyendo las reservas de nucleótidos en los linfocitos T y B. La eficacia terapéutica se alcanza después de seis a doce semanas de iniciado el tratamiento. Se puede emplear sola o en combinación con otros agentes (normalmente corticosteroides) (Brumós, 2014).
  - Ciclosporina: Disminuye la respuesta inmunitaria celular, inhibiendo la producción de anticuerpos T- dependientes. También inhibe la producción y liberación de citocinas, incluyendo interleucina 2 (Brumós, 2014).
  - Metotrexato: el metotrexato es un fármaco antimetabolito con efectos inmunodepresores que actúa inhibiendo competitivamente la dihidrofolato-reductasa, enzima responsable de convertir el ácido fólico a tetrahidrofolato, interrumpiendo así la transferencia de un carbono en muchas reacciones metabólicas. Entre las reacciones afectadas se encuentra la síntesis de ácido timidílico, por inhibición de la timidilato-sintasa es, quizás, el efecto más importante del metotrexato resultando en una inhibición de la síntesis del DNA. Los efectos inhibidores del metotrexato dependen de sus concentraciones intracelulares, y los tejidos con crecimiento más rápido y con elevado metabolismo celular son los más afectados. Inhibe la proliferación celular en la fase S del ciclo celular (Brumós, 2014).
  - Tofactinib: inhibidor selectivo de la familia de las Janus Quinasas (JAK). Este fármaco inhibe la ruta de señalización activada por

receptores de citocinas JAK3 y JAK1. La inhibición de JAK1 y JAK3 por tofacitinib atenúa las rutas de señalización activadas por las interleucinas (IL-2, -4, -6, -7, -9, -15 y -21) y por los interferones de tipo I y II, provocando la modulación de la respuesta inmune e inflamatoria (Brumós, 2014).

Muchos de estos fármacos son comunes para la Enfermedad de Crohn y la Colitis Ulcerosa, y otros en cambio están actualmente aceptados para una de las enfermedades y pendiente para la otra, pero en un futuro serán aceptados para ambas entidades.

Aunque estos fármacos han conseguido paliar los efectos de la enfermedad y mejorar la calidad de vida de los pacientes, también tienen limitaciones muy claras: la pérdida de respuesta y los efectos secundarios, que en parte pueden ser graves, aunque poco frecuentes. Además, no todos los pacientes responden igual. Hay pacientes que son refractarios a algunos de los fármacos y otros pacientes, en cambio, mejoran de manera notable. Por lo que, no parece que en todos los pacientes están implicadas las mismas células del sistema inmunológico, es decir, presentan diferentes vías de patogenicidad y dianas farmacológicas (Na et al., 2019).

A los pacientes de colitis ulcerosa se les desaconseja que tomen ibuprofeno, diclofenaco o dexketoprofeno (antiinflamatorios no esteroideos) por ser gastrolesivos.

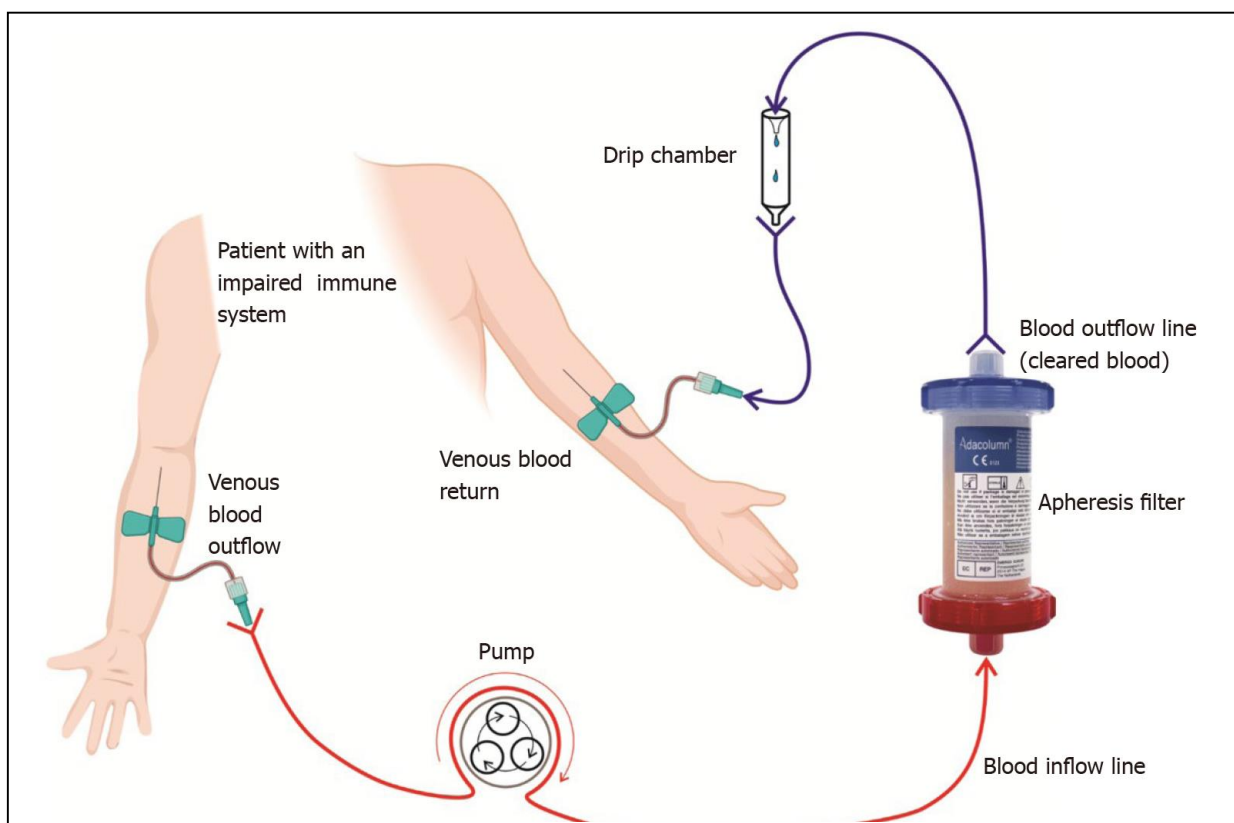
### **1.3.8.2 Aféresis**

La aféresis es un tratamiento no farmacológico que se utiliza en pacientes con falta de respuesta a otros tratamientos empleados en la CU. Hay dos tipos de aféresis: la granulocitoaféresis y la leucocitaféresis. En la práctica clínica se emplea mayoritariamente la granulocitoaféresis, que a continuación se explica en detalle al ser el tratamiento de los pacientes incluidos en este proyecto.

La granulocitoaféresis es un tratamiento que permite la eliminación selectiva de ciertas poblaciones de leucocitos de la sangre periférica, disminuyendo la inflamación en la mucosa intestinal y ayudando a la remisión de la enfermedad (Beltrán et al., 2017). Adacolumn es el sistema de aféresis adsorbente más utilizado, el cual consiste en una columna de 335 mm llena de cuentas de acetato de celulosa especialmente diseñadas que actúan como un sistema de adsorción. Este sistema adsorbe la Inmunoglobulina

G y los inmunocomplejos del plasma sanguíneo, haciendo que sus sitios de unión estén disponibles para los receptores de dominios Fc gamma cristalizables (Fc $\gamma$ R) de mielocitos y de pequeñas subpoblaciones de células B, T y NK. Hay que señalar que los Fc $\gamma$ Rs no se expresan tan ampliamente en los linfocitos (2%) como en los granulocitos (65%) y monocitos (55%); es esta particularidad la que otorga al Sistema Adacolumn® su selectividad hacia células del linaje mieloide. Si esta eliminación celular selectiva puede inducir cambios secundarios en las poblaciones de linfocitos y en la producción de citocinas, y hasta qué punto estos cambios pueden influir en el curso de la enfermedad, aún no se han determinado.

Durante las sesiones de granulocitoaféresis (10 en la fase de inducción durante un mes y después una mensual aproximadamente de mantenimiento) se moviliza alrededor de 1,5-2 L de sangre del paciente. Como se muestra en la Figura 3 al paciente que se somete a la granulocitoaféresis se le ponen dos vías, una en cada brazo. La sangre sale del paciente, pasa por la columna de acetato y vuelve por la otra



vía al paciente.

Figura 3. Esquema del mecanismo del tratamiento de aféresis (Domènech, Grífols, Akbar, Dignass, 2021).

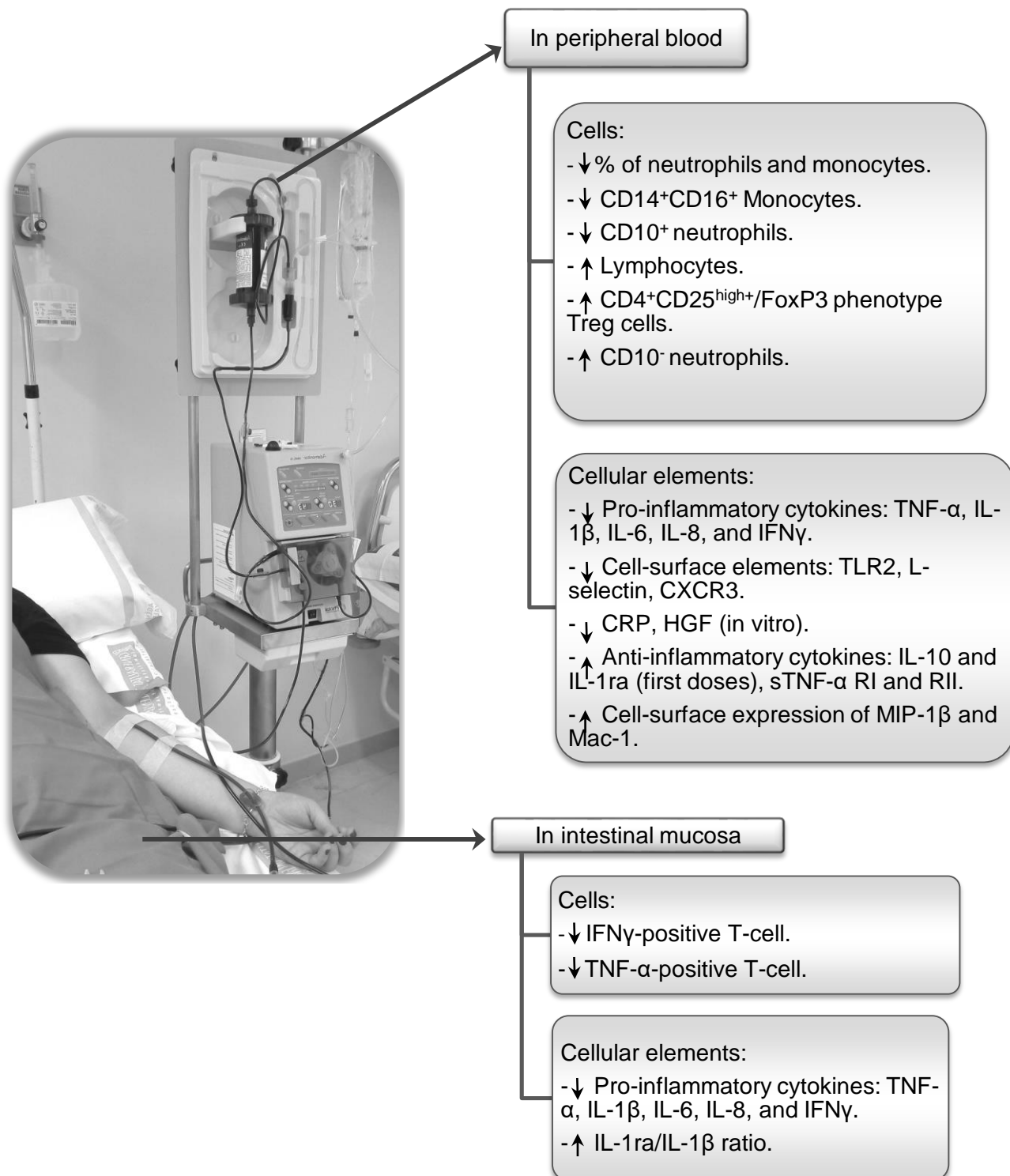


Figura 4. Representación de los cambios en sangre periférica y mucosa intestinal de células inmunológicas y citocinas (Beltrán et al., 2017).

La retención en la columna de las células inmunitarias con características más pro-inflamatorias produce una disminución de la carga inflamatoria que repercute mejorando el estado a nivel intestinal de los pacientes. Se ha visto que funciona, aunque no en todos los pacientes, como ocurre con los fármacos. Resultados recientes confirman que no modifica los niveles de fármaco en sangre del paciente, es decir, no se pierde fármaco, por retención en la columna realizando la aféresis (Sacco, Tanaka, Yamamoto, Bresci y Saniabadi, 2014).

Tras la granulocitoaféresis se ven variaciones en sangre periférica y en la mucosa intestinal. En sangre periférica se produce una bajada del porcentaje de neutrófilos y monocitos, los linfocitos no varían o en todo caso aumentan, las citocinas pro-inflamatorias y elementos de la superficie celular como algunos de los *toll-like receptors* disminuyen sus niveles, las citocinas antiinflamatorias aumentan y finalmente la proteína C reactiva y proteínas inflamatorias de macrófagos disminuyen (Figura 4). En la mucosa intestinal disminuyen las citocinas pro-inflamatorias, el IFN $\gamma$  y el TNF $\alpha$  y aumenta la IL-1 (Figura 4).

### **1.3.8.3 Probióticos**

Según estudios, se ha visto que los probióticos mejoran la función de barrera de la mucosa intestinal y la función del sistema inmunológico y promueven la secreción de factores antiinflamatorios, inhibiendo así el crecimiento de bacterias dañinas en el intestino (Shen et al., 2018).

Sin embargo, el beneficio de los probióticos en las EII es todavía controvertido, de modo que hay estudios que defienden sus beneficios y uso, mientras que otros estudios consideran que no aportan grandes beneficios. Por ese motivo el uso de estos preparados en la práctica clínica no es algo habitual salvo en algunos casos concretos (para la prevención de la infección por *Clostridioides difficile*; para prevenir la enterocolitis necrotizante en prematuros; coadyuvante en el tratamiento con antibióticos) Es necesaria la realización de estudios científicos rigurosos que demuestren su eficacia (Fernández, 2021)

### **1.3.8.4 Cirugía**

En la actualidad, la introducción de nuevas líneas de tratamiento médico con agentes biológicos ha favorecido un mejor control de la enfermedad con periodos cada vez más largos de remisión. A pesar de estos avances en el tratamiento médico, un 15-

20% de los enfermos de CU van a necesitar tratamiento quirúrgico por la aparición de complicaciones o por un control insuficiente de la enfermedad (Perea et al., 2018).

En estos casos, el tratamiento quirúrgico busca la eliminación del colon y recto enfermos, minimizando la mortalidad postoperatoria alterando lo menos posible la calidad de vida tras la operación.

Ante la difícil decisión que supone, en ocasiones la indicación quirúrgica, como siempre sucede en esta enfermedad, se requiere la colaboración estrecha entre gastroenterólogos y cirujanos.

Las indicaciones quirúrgicas de la CU, se enmarcan en dos escenarios; la cirugía urgente y la cirugía electiva o programada.

#### Indicaciones de Cirugía urgente:

- **Colitis fulminante:** inflamación grave del colon asociada a toxicidad sistémica. Aparece diarrea con más de 10 deposiciones diarias, sangre en heces, fiebre alta, anemia, taquicardia, deshidratación, leucocitosis con aumento de la velocidad de sedimentación globular (VSG y de la PCR, dolor abdominal espontáneo y a la palpación. Requiere ingreso hospitalario para llevar un seguimiento estrecho y un tratamiento intensivo. Se debe practicar una rectosigmoidoscopia o colonoscopia en las primeras horas para confirmar el diagnóstico, y también realizar un coprocultivo para descartar la presencia de *Clostridium difficile* que es más frecuente en colitis graves y aumenta la gravedad del proceso.  
El tratamiento se basa en la reposición hidroelectrolítica, corticoides intravenosos, profilaxis antitrombótica con heparina de bajo peso molecular para reducir el riesgo de tromboembolismo, suplementación nutricional, entre otros tratamientos. Se debe evaluar al paciente a los 3 días, y si la respuesta al tratamiento ha sido insuficiente se debe pasar a una segunda línea de tratamiento con la introducción de ciclosporina A, anti TNF, tacrólimus y azatioprina. Si en 6-7 días no se ha controlado el proceso debe indicarse cirugía ya que está demostrado que el retraso innecesario en la indicación de la cirugía se asocia a un aumento en la mortalidad.
- **Megacolon tóxico:** es una colitis fulminante asociada a dilatación del colon (superior a 6 cm en la radiografía simple), todo ello asociado a un cuadro tóxico

generalizado. Esta situación supone un alto riesgo de perforación del colon. Estos pacientes van a requerir cirugía en las próximas 24-48 horas en la mayoría de los casos.

- Hemorragia masiva: es poco frecuente pero su aparición requiere cirugía urgente.

La técnica quirúrgica en la cirugía de urgencias de la CU es: colectomía total o subtotal con ileostomía terminal.

Con la cirugía de urgencia lo que se busca es salvar la vida del paciente, para ello, muchas veces no es necesario hacer una colectomía total, siendo suficiente la subtotal.

El muñón distal puede dejarse cerrado en el abdomen o exteriorizarlo (fístula mucosa) a la parte inferior de la herida. Esta última opción es la mejor porque evita complicaciones como la dehiscencia de la sutura en la cavidad abdominal y además permite hacer lavados por el muñón con corticoides si se considera necesario. Por otro lado, la fístula mucosa facilita la reconstrucción quirúrgica posterior del tránsito intestinal, que es otro de los objetivos de la cirugía de urgencia.

#### Indicaciones de la cirugía electiva:

- Fracaso del tratamiento médico: es la indicación más frecuente (Parrilla y Landa García, 2010). Se puede deber a la aparición de corticodependencia, refractariedad a los corticoides y otros fármacos como la ciclosporina A, aparición de morbilidad con los tratamientos inmunosupresores, manifestaciones extraintestinales mal controladas (poliartropatía, pioderma gangrenoso, colangitis esclerosante,etc) o también a la decisión o deseo del paciente ante una enfermedad crónica invalidante.
- Presencia de displasia o cáncer colorrectal (CCR): el riesgo de desarrollar CCR aparece a partir de los 8-10 años de evolución de la CU. El CCR tras CU supone menos del 1% de todos estos cánceres. (Chambers, Warren, Jewell y Mortensen, 2005).

Entre los factores de riesgo de desarrollar CCR estarían:

- Afectación de recto, colon izquierdo hasta la flexura esplénica en el momento del diagnóstico.
- Colitis extensa asociada a colangitis esclerosante primaria.
- Más de 8 años de evolución.

Las técnicas quirúrgicas en cirugía electiva son:

- Proctocolectomía restauradora (reservorio ileoanal)
- Proctocolectomía total e ileostomía terminal
- Colectomía y anastomosis ileorrectal
- Proctocolectomía e ileostomía de Kock

### **1.3.9 Epidemiología**

En la mayoría de personas que padecen colitis ulcerosa, la enfermedad suele debutar antes de los cuarenta años de edad, aunque puede aparecer a cualquier edad. Según estudios, un 20% de los pacientes son diagnosticados antes de los veinte años (Walfish y Ching, 2021).

En cuanto a la incidencia, se han hecho estudios en los que se ha observado que en los países más desarrollados va en aumento, por lo que los factores ambientales también afectan al desarrollo de la enfermedad, por ejemplo: la alimentación, el estilo de vida, el tabaquismo (Windsor y Kaplan, 2019).

La prevalencia también es más elevada en los países más desarrollados y se prevé que vaya en aumento. Estos últimos años ha aumentado el interés por esta patología y es un importante objeto de estudio debido a su incremento entre la población (Puig et al. 2019).

Los valores más altos de incidencia y prevalencia corresponden a Europa y América del Norte. En cambio, Asia y África son los continentes con menor incidencia y prevalencia, pero siguen el mismo curso que los países de occidente, es decir, van al alza cada año (Figueroa, 2019).

### 1.3.10 Situación actual de la enfermedad

En los últimos años se han producido avances muy importantes a la hora de tratar la enfermedad y de mejorar la calidad de vida de los pacientes. Se han realizado estudios genéticos, inmunitarios, de la microbiota intestinal, de factores ambientales que influyen en ésta y de caracterización celular. Se ha visto que hay factores genéticos, ambientales, inmunológicos y microbianos que influyen en la enfermedad. Además, según estudios, la colitis ulcerosa comparte características genéticas con otras enfermedades autoinmunes como la espondilitis anquilosante y la psoriasis. Los genes codifican vías inmunológicas innatas y adaptativas, señalización de citosinas y detección inmunitaria (Porter, Kalla y Ho, 2020).

Se han visto más de 200 genes implicados en la enfermedad, pero ninguno lo suficientemente significativo como para determinar que es el causante de la enfermedad y por lo tanto para determinar que es una enfermedad de carga genética (Ahluwalia, Morales, Magnusson y Öhman, 2018).

En cuanto a la microbiota, estudios confirman que en la CU hay un déficit de bacterias protectoras como Ruminococcaceae y Lachnospiraceae y una expansión de microorganismos proinflamatorios como Enterobacteriaceae, incluida *Escherichia coli*, y Fusobacteriaceae (Stange y Schroeder, 2019). Es por ello que, en ocasiones, se les ha recomendado a los pacientes tomar prebióticos y en algunos casos se ha visto que han frenado el progreso de la colitis ulcerosa (Hansen y Sartor, 2015). Sin embargo, como mencionado anteriormente, es un tratamiento todavía controvertido que necesita ser investigado en profundidad.

Otro campo muy importante de investigación actual es el de biomarcadores para predecir la respuesta de los pacientes a los diferentes fármacos existentes. Aunque existe una amplia variedad de fármacos para tratar a los pacientes, los médicos administran el que creen conveniente dadas las circunstancias de cada paciente, pero no cuentan con un biomarcador claro que les indique qué fármaco es el idóneo. Por lo que, en diversos casos, el efecto no es el esperado y se pierde tiempo en el cual la enfermedad ha ido avanzando y además disminuyen las posibilidades de éxito del siguiente fármaco (Sands, 2015).

Se están produciendo grandes avances en el campo de los biomarcadores de la enfermedad, lo que es de especial interés dado que el camino a seguir en el

tratamiento de la CU es el de la medicina de precisión, requiere una visión integrada de la etiología, la patogénesis y la terapia de la patología. Se necesita saber el perfil inmunológico y genético de los pacientes, pero además se necesita saber el exposoma de éstos, es decir, los factores externos que puedan afectar al paciente como el estrés, la dieta o el entorno (James et al. 2020).

Algunos biomarcadores genéticos como el gen HLA-DQA1\*5 y el gen FCGR3A permiten predecir la respuesta que tendrán los pacientes a determinados fármacos. También el análisis de la oncostatina (OMS) permite predecir la respuesta que tendrán los pacientes a los fármacos anti-TNF (James et al. 2020).

La predicción de la respuesta a fármacos también es facilitada por la determinación de los niveles de fármaco en sangre de los pacientes tratados, que debe realizarse durante las primeras semanas de tratamiento. Esto también ayuda a variar la dosis en caso de que sea necesario o a cambiar el tratamiento.

A pesar de los avances que se han producido en el estudio de la enfermedad, quedan muchos aspectos de la patología por esclarecer. El objetivo a largo plazo, en el tratamiento de la CU es conocer las diversas vías por las que se manifiesta la enfermedad en cada paciente, para poder así ofrecer unos tratamientos personalizados.

### **1.3.11 Perspectivas futuras**

Hay diversos campos de investigación abiertos en relación a la CU. Se está empezando a investigar con organoides, que se pretenden utilizar en un futuro para investigación y para el ensayo de tratamientos sin que se requiera la participación de pacientes (Yoo y Donowitz, 2019).

También se han iniciado estudios con células madre, que se implantan en fístulas de pacientes con CU. Se ha comprobado que células madre derivadas del tejido adiposo, inyectadas localmente en los tractos de fístula perianal, inducen efectos beneficiosos duraderos (Tatiya-Aphiradee et al. 2018).

Por otro lado, también se está estudiando el trasplante de microbiota fecal de personas donantes sanas a pacientes de CU, ya que este método hace que se

modifique la microbiota intestinal de los pacientes con CU (Shen et al., 2018). El trasplante de microbiota fecal (FMT) es un método complejo y controvertido ya que se deben seleccionar muy bien a las personas donantes y la forma de administración al paciente aún no está esclarecida. Pero en ensayos clínicos se ha demostrado que esta técnica ha dado buenos resultados y que ha sido beneficiosa para los pacientes con infección recurrente por *Clostridium difficile* (Lopetuso et al., 2020).

Además, se están perfeccionando estudios genéticos, inmunológicos y de caracterización celular y se están investigando nuevas dianas terapéuticas basadas en: interleuquinas, citocinas, vías transmisoras de señales (Rich et al., 2019).

Con todo ello se pretende mejorar la calidad de vida de los pacientes que sufren la enfermedad y poder llegar a ofrecer tratamientos más personalizados y efectivos. Y todo con la intención de frenar lo antes posible el progreso de la enfermedad evitar exponer a los pacientes a tratamientos invasivos de baja precisión.

## **2. Objetivos**

Teniendo en cuenta las necesidades presentadas se plantean los siguientes objetivos:

- Identificar el perfil inmunológico en sangre periférica, mediante la técnica de citometría de flujo, de los pacientes con CU tratados mediante granulocitoaféresis en el servicio de Medicina Digestiva del Hospital la Fe.
- Identificar los cambios producidos en las subpoblaciones leucocitarias de los pacientes con CU debidos al tratamiento mediante granulocitoaféresis. Comparar esos cambios con los resultados obtenidos de muestras de sujetos sanos-control, y evaluar si el tratamiento de aféresis genera en los pacientes de CU perfiles inmunitarios semejantes a los controles.
- Ampliar el conocimiento acerca de la respuesta a la granulocitoaféresis de los pacientes valorando también la producción diferencial de determinadas citocinas.

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1 Obtención de las muestras**

Para la realización de este estudio se obtuvieron muestras de sangre de dos pacientes con colitis ulcerosa que fueron sometidos a granulocitoaféresis de mantenimiento y de dos controles sanos. A cada muestra se le asignó un código que se muestra más tarde en los resultados.

Las muestras de los pacientes fueron obtenidas después de la sesión de granulocitoaféresis, a través de una extracción de sangre realizada por las enfermeras encargadas de la aféresis, en tubos hematológicos BD® *Vacutainer*®.

Los tubos hematológicos en la parte final interna llevan un gel que favorece la separación de los componentes de la sangre, facilitando que se diferencien las distintas fases tras la centrifugación. Además, algunos de los tubos llevan un anticoagulante. El anticoagulante puede variar (EDTA, heparina, citrato, ...) dependiendo de la finalidad de la muestra.

Para este estudio se recogió cada muestra en un tubo con anticoagulante EDTA, dado que favorece el recuento de las células mononucleares de sangre periférica para su posterior análisis mediante citometría de flujo.

Una vez las muestras fueron obtenidas, el personal de investigación acudió a la sala de aféresis, en la planta 0 del hospital torre B, a recoger las muestras. Antes de la inclusión de estos y otros pacientes en los diferentes proyectos que se realizan en el laboratorio, y siguiendo las pautas dadas por la legislación vigente, se explicó al paciente en qué consistía el estudio y se le pidió permiso para emplear su muestra en el estudio. Todos aquellos que participaron en el estudio firmaron un consentimiento donde consta que aprobaron el empleo de su muestra de sangre en esta investigación. Se obtuvieron dos muestras de pacientes y dos de controles sanos.

Además de estas muestras, para esta determinación de perfiles de citocinas se pudo emplear muestras preservadas a -80°C en la seroteca del grupo de investigación de EII. Para la determinación de citocinas se pueden emplear muestras congeladas. Sin embargo, esto no es posible para el análisis por citometría de flujo ya que el protocolo requiere que las muestras sean obtenidas en fresco.

De este modo obtuvimos cuatro muestras (dos pacientes y dos controles) para analizar mediante citometría de flujo y diez muestras (cinco de pacientes y cinco de controles) para analizar sus niveles de citocinas mediante el sistema de análisis MAGPIX®.

### 3.2 Condiciones de las muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron y se procesaron a temperatura ambiente, se procesaron lo antes posible ya que así las células se conservaron en mejores condiciones. El tiempo máximo de espera para procesarlas fue de hasta una hora tras la extracción.

### 3.3 Procesado de las muestras

#### 3.3.1 Protocolo de tinción de las células mononucleares de sangre periférica

Para preparar las muestras para su análisis por citometría se siguió el protocolo estandarizado en el laboratorio para la tinción de células mononucleares de sangre periférica. Primero se preparó todo el material necesario: cinco tubos de citometría, los anticuerpos necesarios, un vórtex, FACS Lysing solution, y el panel de marcaje. Se rotuló cada tubo con números del 1 al 5:

- Se añadieron 100 µL de sangre total por tubo.
- En el tubo utilizado para identificar las células B, se realizaron lavados previos con la solución tampón PBS para eliminar Igs (inmunoglobulinas) circulantes y así disminuir el “ruido de fondo” y mejorar la identificación de esas células. La centrifugación se realizó a 1700 rpm 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.
- Se añadieron a cada tubo los anticuerpos específicos, establecidos previamente en el laboratorio, para la identificación celular concreta. Estos anticuerpos están a continuación indicados (Tabla 3):

	PB	OC515	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-C750
--	----	-------	------	----	-------------	--------	-----	----------

Tubo 1	Poblaciones	CD56	CD45	CD8	CD16	CD4	CD19	CD14	CD3
Tubo 2	Linfos B		CD45	IgD	CD5	IgM	CD19	CD27	CD38

Tabla 3. Panel de marcaje con los anticuerpos empleados en cada tubo.

Según el anticuerpo el volumen añadido era diferente y correspondía al indicado por el proveedor.

- Se efectuó una resuspensión con vórtex rápido y se incubó en oscuridad 30 minutos. La resuspensión de las células, que no debía causar su lisis, tenía el objetivo de favorecer el reconocimiento de los antígenos de membrana por parte de los anticuerpos marcados con fluoróforos.

- Una vez pasaron los 30 minutos, se añadieron 2 ml de FACS Lysing solution 1x para el lisado de los hematíes (pues interfieren en el análisis citométrico de los leucocitos) y la fijación leve de los leucocitos para evitar, en cierta manera, la endocitosis de los complejos antígeno-anticuerpo que provocaría una pérdida de señal y disminución de la capacidad del citómetro de detectar las células de interés.

- Se mezcló con vórtex y se volvió a incubar 10 minutos a temperatura ambiente.

- Después se lavó con 2 mL de PBS, se centrifugó a 1700 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante.

- Se repitió el lavado.

- Finalmente, se resuspendieron las células con 200 µL de PBS utilizando el vórtex y se pusieron en hielo hasta el momento del análisis con el citómetro.

- Se analizaron las muestras el mismo día que se obtuvieron, y transcurrida una hora como máximo desde la finalización del protocolo de tinción.

### 3.3.2 Protocolo para la obtención del plasma sanguíneo

Para obtener el plasma para analizar las citocinas se siguió el protocolo de procesamiento de muestra de sangre con Histopaque-®1077 Sigma-Aldrich. Primero se sacó el

histopaque para que se atemperase. Mientras tanto, se rotularon los tubos a emplear con el código de la muestra y la fecha.

A continuación, se agitó suavemente el tubo hematológico de EDTA con la sangre, con precaución de no provocar hemolisis. Se dispensaron 6 ml de *histopaque* en dos tubos de 15 ml y después se añadieron 5 ml de la sangre a cada tubo con una pipeta *pasteur*. La sangre se depositó lentamente para que no se mezclase con el *histopaque*. A continuación, se centrifugaron ambos tubos a 1300 rpm durante 30 minutos.

Tras la centrifugación de los tubos se observaron cuatro fases: el plasma, las células, el *histopaque* y los glóbulos rojos. Se recogieron con una micropipeta de 100 µl el plasma y las células y se pusieron en otro tubo de 15 ml, tras lo que se mezcló el contenido del tubo. Después, la mezcla de plasma y células fue trasvasada a 6 tubos *ependorf* rotulados con la palabra “células”, el código de la muestra y la fecha. Se centrifugaron los *ependorf* a 5000 rpm durante 10 minutos. La cantidad de *ependorf* dependía del volumen de plasma y células que hubiese en el tubo de 15 ml, que normalmente es de 6 ml.

Terminada la centrifugación se recogió el sobrenadante (el plasma) de cada *ependorf* con una micropipeta y se pasó a otros *ependorf* nuevos rotulados como “plasma” con el código de la muestra y la fecha. De modo que se obtuvieron 6 *ependorf* de células y 6 de plasma por cada muestra de sangre.

Finalmente, los *ependorf* se guardaron en los congeladores a -80°C.

### **3.4 Análisis por citometría de flujo**

La citometría de flujo es un tipo de análisis mediante el cual se miden caracteres físicos y químicos de células individuales o de otras partículas. En este caso se midieron células individuales. Se empleó un haz de luz láser que emitió diferentes dispersiones que fueron leídas e interpretadas y permitieron clasificar las diferentes células leucocitarias (Cytognos,2021).

El dispositivo en el cual se llevó a cabo el análisis fue un citómetro de flujo BD FACSCanto™ (EE.UU.). En el análisis las células se encontraban suspendidas en

una corriente de fluido y atravesaban de forma individual el haz de luz láser. Cada célula dispersaba la luz láser de una forma determinada en función de sus características citométricas (Cytognos, 2021).

Las señales eran leídas por detectores que eran mayoritariamente fotodiodos o tubos fotomultiplicadores, uno alineado con el haz de luz (forward scatter) y el resto lateralmente respecto al recorrido que realiza el haz de luz (side scatter), además de varios detectores de fluorescencia (McKinnon, K. 2019). El detector frontal brindaba información acerca del volumen de la partícula, mientras que los detectores laterales brindan información acerca de la complejidad interna de la misma. Eran transformadas en señales electrónicas interpretadas con el *software* apropiado (Pérez, Santiago, Romero y Rodríguez, 2018).

Para la observación e interpretación de los resultados se empleó el *software Infinicyt* de la empresa *Cytognos*. Es el software de análisis de resultados de citometría que utiliza el Servicio de Hematología-Citometría del Hospital La Fe, y es también el *software* que utiliza el laboratorio de EII.

Se diferenciaron con distintas herramientas del programa los diferentes tipos de poblaciones leucocitarias de cada muestra: linfocitos T, linfocitos CD4+, linfocitos CD8+, células NK, linfocitos B, monocitos y neutrófilos. Se marcaron con diferentes colores para visualizarlos bien y facilitar el análisis.

Los diferentes diagramas obtenidos en el análisis y los anticuerpos empleados para distintos marcadores permitieron identificar distintos tipos de leucocitos. Así, los linfocitos son los leucocitos de menor tamaño y el diagrama que enfrenta *forward scatter* y *side scatter* se sitúan en la región inferior. Respecto a los marcadores, cada clase de célula leucocitaria tiene un marcador característico: los linfocitos T son positivos para el anticuerpo anti-CD3, los linfocitos B para el anticuerpo anti-CD19, las células *natural killer* para anti-CD56, los monocitos para anti-CD14 y finalmente, los neutrófilos son positivos para el anticuerpo anti-CD16. Sabiendo esto se observó cada diagrama y se pudieron deducir las diferentes células leucocitarias.

*Infinicyt* permitió realizar un análisis estadístico de las poblaciones leucocitarias de cada muestra. Se calcularon las medias y desviaciones estándar de las proporciones (porcentajes parciales) en las que cada tipo de leucocitos estaba representado

respecto al total de leucocitos, y se compararon los valores de las muestras control con los de las muestras de pacientes tratados.

### **3.5 Análisis de citocinas**

La medición de la concentración de citocinas en plasma se determinó mediante el sistema de análisis MAGPIX® utilizando el kit comercial HSTCMA6-285K de Sigma-Merck. Los datos fueron recogidos utilizando el *software* informático Luminex xPONENT®.

La técnica empleada se basa en la utilización de microesferas magnéticas con diferentes fluorescencias, cada una cubierta por un anticuerpo de captura específico. Una vez que la citocina se une al anticuerpo de la microesfera, se añaden anticuerpos de detección biotinilados que unen la Estreptavidina-Ficoeritrina conjugada.

En este estudio se analizaron las citocinas  $1\beta$ , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, IL-21, IL-23, interferón gamma (IF $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral alpha (TNF $\alpha$ ). Para ello se utilizaron los protocolos indicados por el fabricante.

## **4. Resultados**

Uno de los objetivos de este proyecto es identificar el perfil inmunológico de los pacientes de CU sometidos a tratamiento mediante granulocitoaféresis y compararlo con el perfil inmunológico de controles sanos. Para ello se determinó el perfil inmunológico mediante el análisis de muestras sanguíneas de dos pacientes y de dos controles por citometría de flujo y se compararon los resultados para cada subpoblación leucocitaria, que fueron los que interesaron en este caso. El porcentaje parcial se refiere al porcentaje que hay de una determinada subpoblación leucocitaria respecto al total de leucocitos.

Debido a las particularidades del desarrollo del trabajo experimental durante este periodo, no se pudo obtener un tamaño muestral mayor.

Las muestras que se han empleado en este estudio tienen los códigos que se indican en la Tabla 4:

CONTROLES	PACIENTES
CTR1	PAC1
CTR2	PAC2

Tabla 4. Códigos de las muestras empleadas en este trabajo, CTR corresponde a control y PAC a paciente.

#### 4.1 Estudio de las células de la serie blanca de sangre periférica mediante citometría de flujo

A continuación, a modo informativo, aparecen algunos de los diagramas de puntos obtenidos del análisis de citometría de flujo a partir de los cuales se han obtenido los datos:

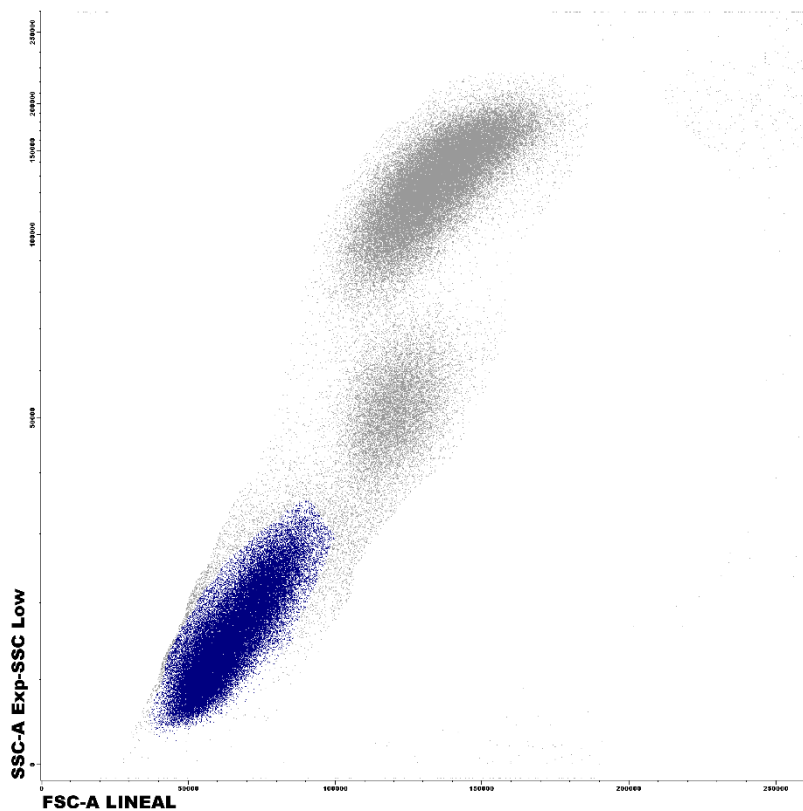


Figura 5. Diagrama de puntos donde están marcados los linfocitos de la muestra PAC1 (azul oscuro) en leucocitos totales.

A partir de los datos obtenidos del análisis de citometría de flujo se obtuvieron diagramas de puntos como el de la Figura 5. El análisis empieza en este diagrama, que enfrenta *side scatter* (SSC) y *forward scatter* (FSC), y permite separar células en función del tamaño de las células. Se diferencian claramente tres grupos de células, y como se conoce que los linfocitos son las células leucocitarias de menor tamaño, el cúmulo de puntos inferior se corresponde con los linfocitos. El cúmulo de puntos situado en la mitad son los monocitos y el agregado de puntos superior se corresponde con los neutrófilos.

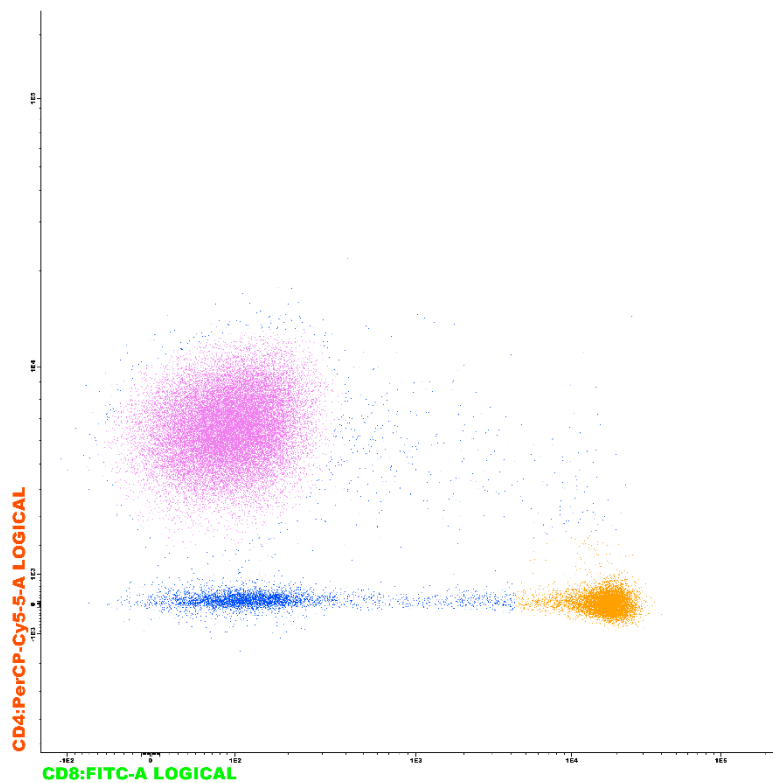


Figura 6. Diagrama de puntos de la muestra PAC1 donde se marcan los linfocitos T CD4+ CD8- (lila), los linfocitos CD8+CD4- (naranja) y los linfocitos CD4-CD8- (Azul).

El diagrama de la Figura 6 muestra los linfocitos que son CD4+CD8+ y CD4-CD8-. Para visualizarlo están marcados con diferentes colores. Se observan claramente las diferentes poblaciones de linfocitos T.

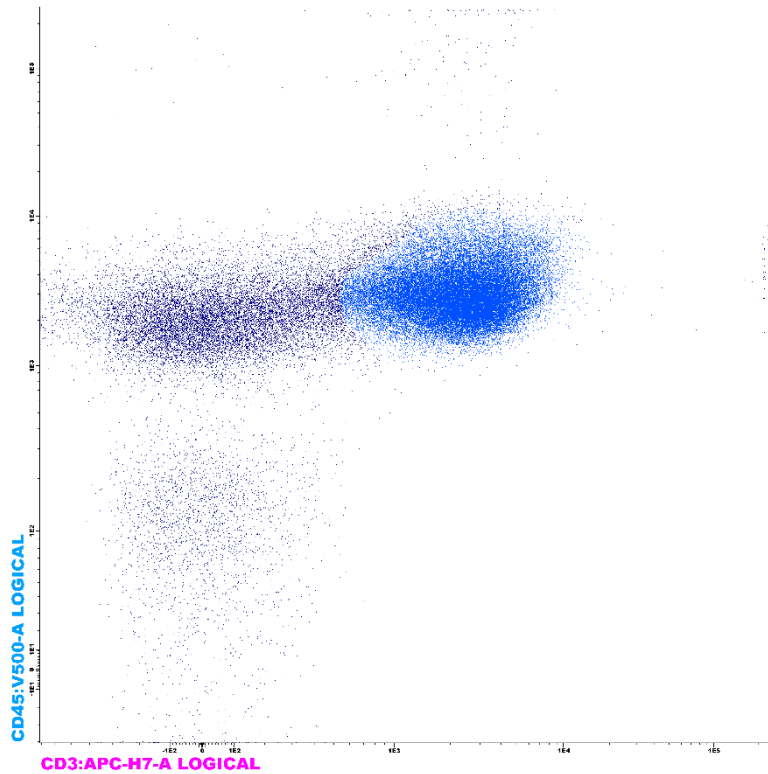


Figura 7. Diagrama de puntos de la muestra PAC1 en el que se muestran los linfocitos T (azul claro).

El diagrama de la Figura 7 muestra los linfocitos T marcados en azul claro. Estos linfocitos son CD3+ por eso se conoce que el agregado de puntos que se encuentra más hacia la derecha se corresponde con los linfocitos T. El marcador CD45, que también aparece en la Figura 7, marca todos los leucocitos vivos.

A continuación, se muestran las Tablas con los resultados obtenidos del porcentaje parcial de cada subpoblación leucocitaria de las muestras de los dos pacientes que han sido sometidos a granulocitoaféresis y de los dos controles sanos, y su correspondiente diagrama de barras. De esta manera se pudieron apreciar claramente las diferencias entre controles y pacientes. Además, se aplicó el test estadístico t de Student para determinar si las diferencias entre los dos grupos de muestras eran significativas. Tan solo se obtuvo un p valor menor a 0,05 en las células NK, es decir, sólo las células NK presentaron una diferencia significativa entre pacientes y controles.

Linfocitos T: Marcaje CD3+

	<b>CTR</b>	<b>PAC</b>
<b>1</b>	65,53	73,29
<b>2</b>	63,67	66,29
<b>Media</b>	64,6	69,79
<b>SD</b>	0,93	3,5

Tabla 5. Datos del porcentaje parcial de linfocitos T obtenidos tras analizar las muestras mediante citometría de flujo y su desviación estándar.

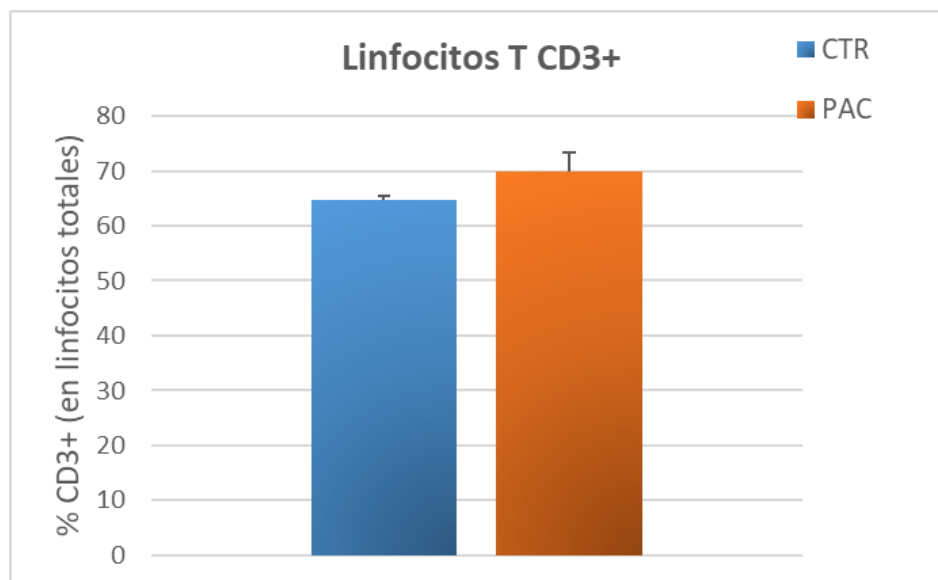


Figura 8. Medias y desviaciones estándar de los % parciales de los linfocitos T de los pacientes y los controles.

En la Figura 8 se observa que los linfocitos T en pacientes sometidos a granulocitoaféresis se encontraban en mayor proporción respecto al total de leucocitos que en los controles sanos, aunque la diferencia era pequeña. La media del porcentaje parcial de linfocitos T en pacientes fue de 69,79, y en cambio en pacientes sanos fue de 64,60 (Tabla 5).

Células *natural killer* (NK): marcaje CD56+

	<b>CTR</b>	<b>PAC</b>
<b>1</b>	1,20	9,48
<b>2</b>	1,01	8,42
<b>Media</b>	1,10	8,95
<b>SD</b>	0,095	0,53

Tabla 6. Datos de porcentaje parciales de células *natural killer* en las muestras indicadas obtenidos mediante análisis por citometría de flujo. Se muestra la media y su desviación estándar.

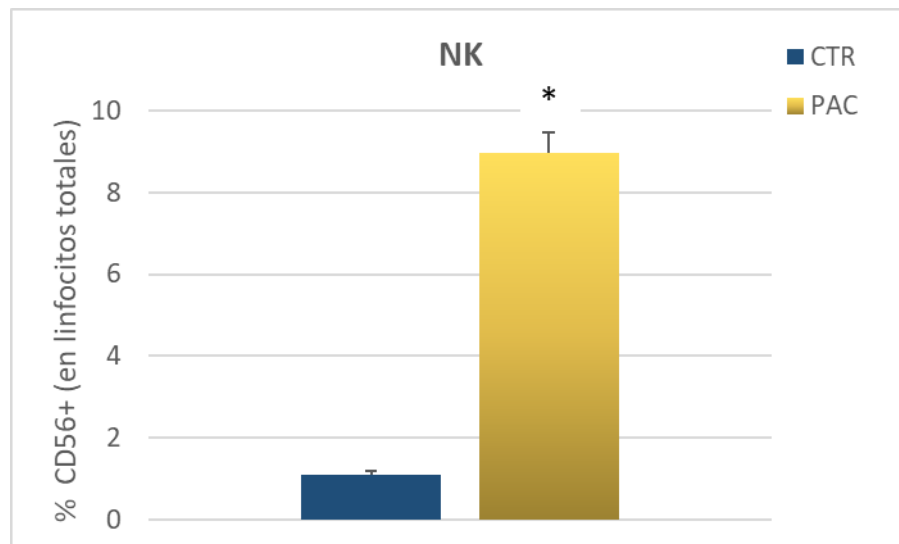


Figura 9. Medias y desviaciones estándar de los % parciales de células *natural killer* de pacientes y controles (\* test t de Student;  $p = 0,00047$ )

En el caso de las células *NK*, estaban mucho más representadas en los leucocitos de los pacientes tratados mediante granulocitoaféresis que en controles, según se aprecia en la Figura 9. La media de los porcentajes parciales de las células *NK* de pacientes fue de 8,95 y en controles sanos de 1,10 (Tabla 6, Figura 9). El asterisco de la Figura 9 indica que las diferencias entre pacientes y los controles fueron significativas, según el test estadístico t de Student ( $p = 0,00047$ ). En las células *NK* es donde mayores diferencias se observaron entre pacientes tratados y controles.

Linfocitos CD4+:

	<b>CTR</b>	<b>PAC</b>
<b>1</b>	53,57	67,57
<b>2</b>	52,74	66,47
<b>Media</b>	53,16	67,02
<b>SD</b>	0,42	0,55

Tabla 7. Datos del porcentaje parcial de linfocitos CD4+ - CD8- obtenidos tras analizar las muestras mediante citometría de flujo. Se muestra la media y su desviación estándar.

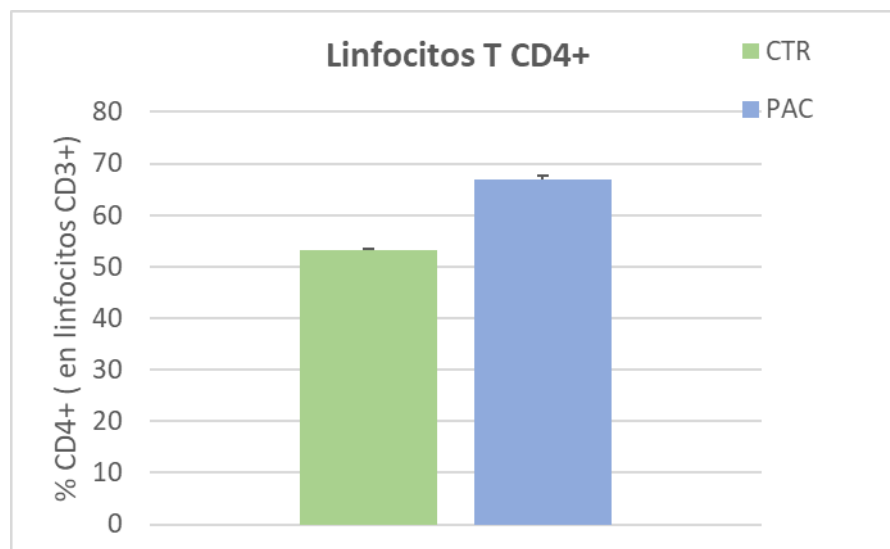


Figura 10. Medias y desviaciones estándar de los % parciales de los linfocitos CD4+ - CD8- en pacientes tratados y controles.

En cuanto a linfocitos CD4, estaban más representados en las muestras de pacientes tratados (media= 67,02) que en las de individuos control (media= 53,16). (Tabla 7, Figura 10).

Linfocitos CD8+:

	<b>CTR</b>	<b>PAC</b>
<b>1</b>	26,43	21,09
<b>2</b>	38,04	22,73
<b>Media</b>	32,235	21,91
<b>SD</b>	5,085	0,82

Tabla 8. Datos del porcentaje parcial de linfocitos CD8+ - CD4- obtenidos tras analizar las muestras mediante citometría de flujo.

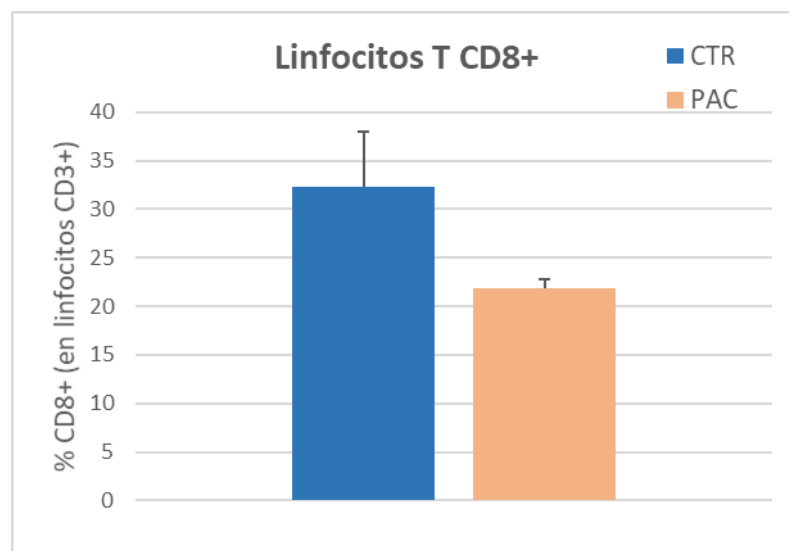


Figura 11. Medias y desviaciones estándar de los % parciales de los linfocitos CD8+ - CD4- de los pacientes y los controles.

Los linfocitos CD8, por el contrario, se encontraban en mayor proporción respecto a leucocitos totales en los controles sanos (media= 32,235) que en los pacientes (21,91) (Tabla 8, Figura 11)

Linfocitos B: marcaje CD19+

	<b>CTR</b>	<b>PAC</b>
<b>1</b>	10,70	5,02
<b>2</b>	7,35	5,50
<b>Media</b>	9,025	5,26
<b>SD</b>	1,675	0,24

Tabla 9. Datos del porcentaje parcial de linfocitos B obtenidos tras analizar las muestras mediante citometría de flujo. Se muestra la media y su desviación estándar.

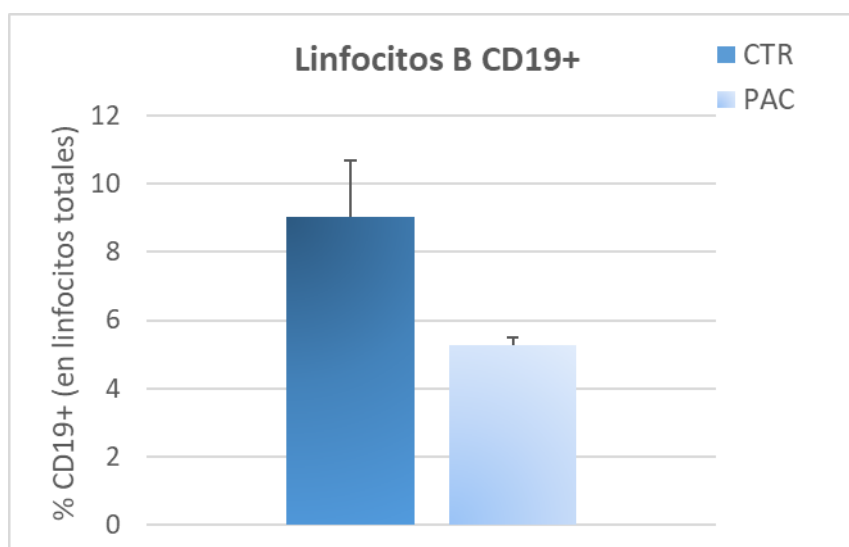


Figura 12. Medias y desviaciones estándar de los % parciales de los linfocitos B de pacientes y controles.

Los linfocitos B también mostraron un porcentaje parcial en pacientes tratados (media= 5,26) inferior al de controles sanos (media= 9,025), tal y como se aprecia en la Tabla 9 y en la Figura 12.

Monocitos: marcaje CD14+

	<b>CTR</b>	<b>PAC</b>
<b>1</b>	17,06	16,36
<b>2</b>	39,94	11,71
<b>Media</b>	28,50	14,035
<b>SD</b>	11,44	2,325

Tabla 10. Datos del porcentaje parcial de monocitos obtenidos tras analizar las muestras mediante citometría de flujo. Se muestra la media y su desviación estándar.

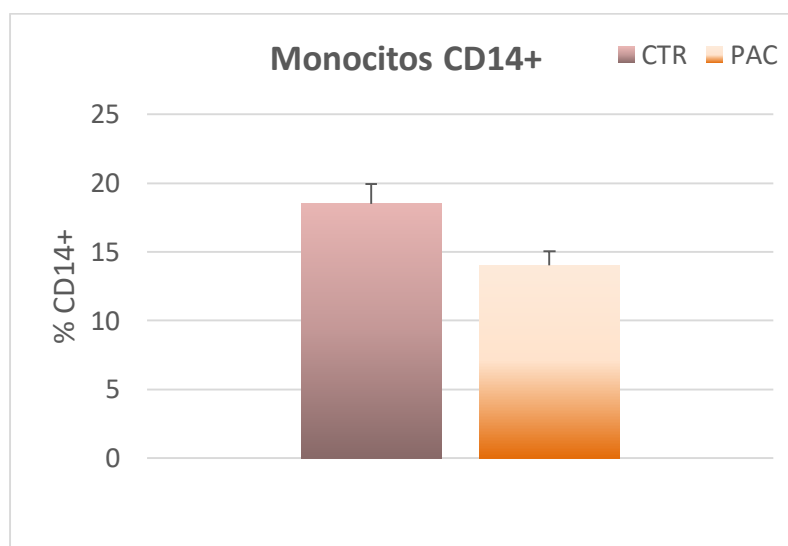


Figura 13. Medias y desviaciones estándar de los % parciales de monocitos de pacientes y controles.

Como se observa en la Figura 13, la proporción de monocitos (media= 14,035) en los pacientes de CU tras el tratamiento por granulocitoaféresis fue menor que en controles sanos (media= 28,50) (Tabla 10).

Neutrófilos: marcaje CD16+

	<b>CTR</b>	<b>PAC</b>
<b>1</b>	54,58	14,3
<b>2</b>	39,94	11,28
<b>Media</b>	47,26	12,79
<b>SD</b>	7,32	1,51

Tabla 11. Datos del porcentaje parcial de neutrófilos obtenidos tras analizar las muestras mediante citometría de flujo.

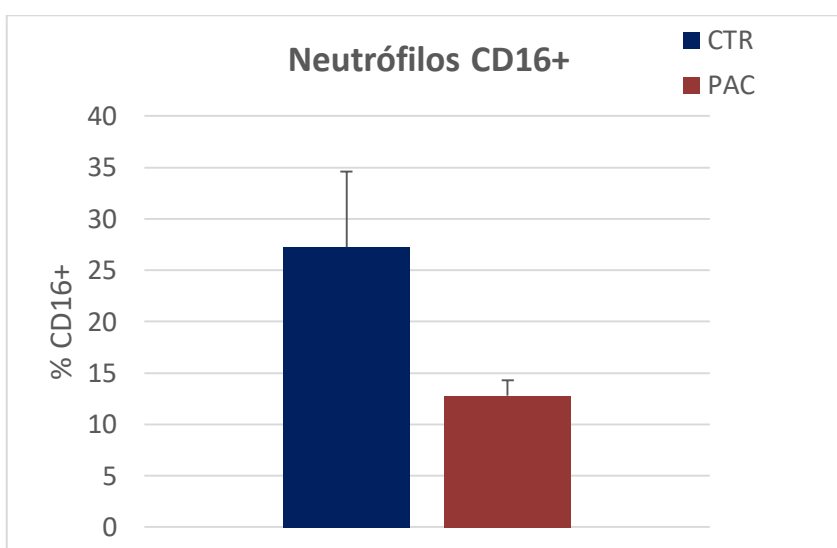


Figura 14. Medias y desviaciones estándar de los % parciales de los neutrófilos de los pacientes y los controles.

En lo que respecta a neutrófilos, como se distingue en la Figura 14, los niveles de neutrófilos de los pacientes tras la granulocitoaféresis estaban muy por debajo de la observado en controles sanos. De hecho, la media de los porcentajes parciales en los pacientes es de 12,79 y en los controles de 47,26 (Tabla 11).

## 4.2 Análisis de citocinas

A continuación, se muestran los resultados obtenidos del análisis de las citocinas mediante el sistema de análisis MAGPIX® en la Figura 15, donde CU se refiere al grupo de pacientes con colitis ulcerosa y CTR se refiere a los controles. Se han analizado las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, IL-21, IL-23, interferón gamma (IFg) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). Se ha aplicado el test t de Student a los datos obtenidos de cada citocina, y los asteriscos de la Figura 15 marcan las citocinas en las cuales las diferencias entre pacientes y controles han sido significativas.

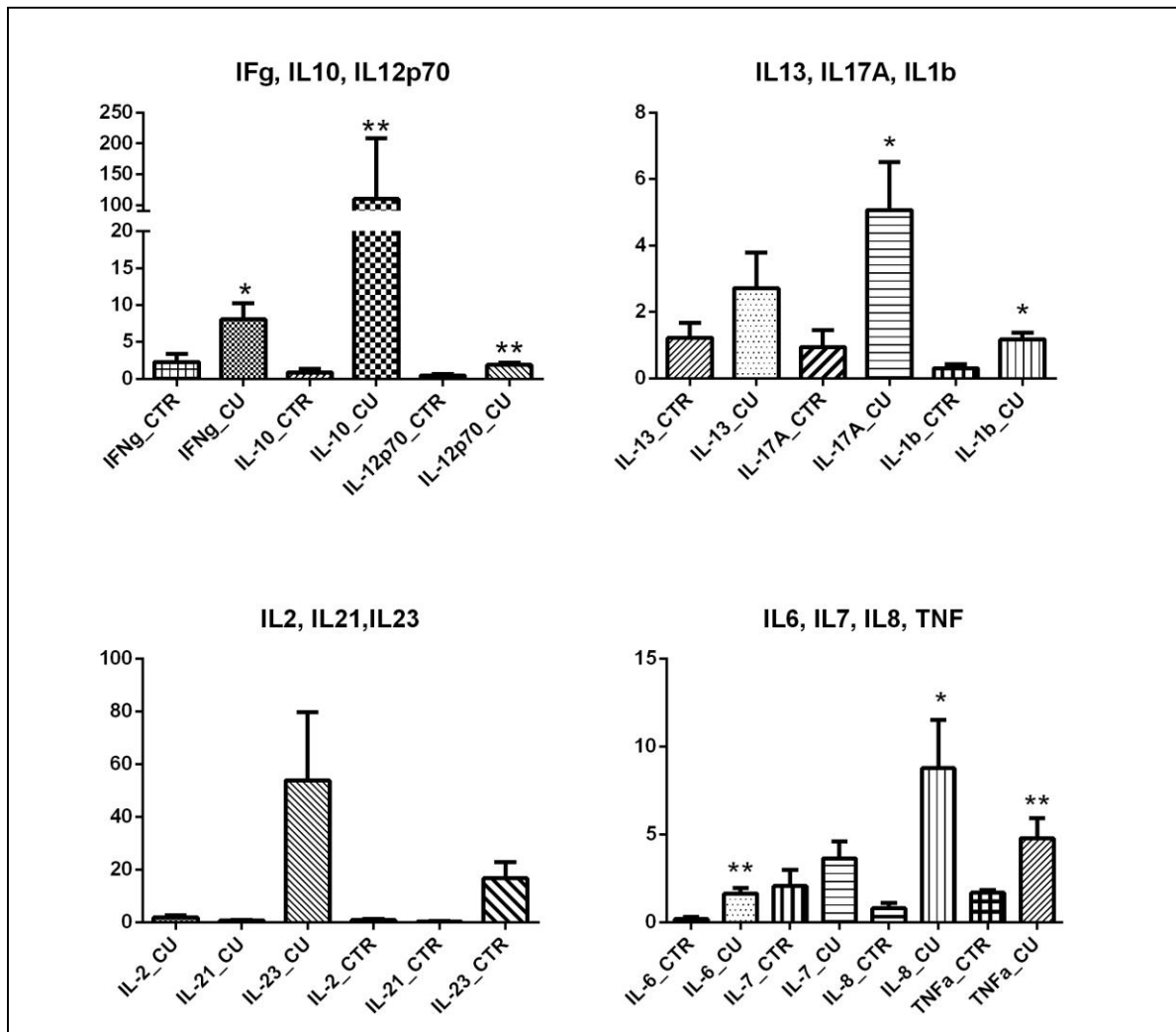


Figura 15. Resultados obtenidos de los niveles de citocinas de los pacientes y los controles del estudio. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; test t de Student.

El IFN $\gamma$  resultó ser más abundante en los pacientes que en los controles, y el test t de Student indicó que las diferencias eran significativas. IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ , también presentaron en pacientes de CU niveles significativamente superiores a los de individuos control (Figura 15).

Para las demás citocinas analizadas también se observaron diferencias entre grupos, pero no alcanzaron significación estadística según el test t de Student.

Prácticamente todas las citocinas analizadas presentaron en sangre periférica de pacientes niveles superiores a los hallados en controles.

## 5. Discusión

La CU es una patología cada vez más incidente, sobre todo en los países desarrollados, y muy invalidante (dependiendo del grado de gravedad) a pesar de los avances producidos en cuanto a conocimientos y tratamientos de la enfermedad. Antes del año 2000 los únicos fármacos disponibles eran las mesalazinas; más tarde aparecieron los anti-TNF y actualmente hay una amplia variedad de tratamientos con diferentes mecanismos de acción (como se ha explicado anteriormente). Sin embargo, es necesario que se sigan llevando a cabo investigaciones relacionadas con los tratamientos de la CU y ampliar los conocimientos que se tienen a día de hoy ya que todavía hay pacientes que no reaccionan bien a ninguno de los fármacos disponibles.

Al tratarse de una enfermedad autoinmune, en la que el sistema inmunitario reacciona de una manera exacerbada contra la microbiota intestinal, los niveles de células de la serie blanca y de citocinas en sangre periférica de pacientes son elevados en comparación con los niveles en personas sanas.

Por eso, en este estudio se comparan los niveles de células leucocitarias y de citocinas de pacientes de CU con los de controles sanos. Además, se ha aplicado el test estadístico t de Student a los resultados obtenidos para comprobar que las diferencias sean significativas. Tan sólo se han indicado los resultados del test t de Student para aquellos tipos celulares y citocinas que han presentado diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Una de las limitaciones del estudio realizado es el pequeño tamaño muestral, que no ha podido ser mayor debido a las circunstancias de pandemia en la que se ha desarrollado. Se han encontrado muchas dificultades para la recolección de muestras

porque muchos pacientes se mostraban reacios a acudir al hospital a no ser que fuese estrictamente necesario. Además, ha sido difícil acceder a diferentes áreas del hospital dadas las circunstancias y el aforo reducido de personal ha impedido en ocasiones realizar determinadas tareas.

Los resultados muestran que la granulocitoaféresis ha tenido un impacto positivo en el perfil inmunitario de los pacientes que a continuación se analiza detalladamente.

En primer lugar, teniendo en cuenta los resultados de las subpoblaciones leucocitarias analizadas, los datos de linfocitos T en general muestran que se encuentran más elevados en los pacientes que en los controles, aunque no demasiado, ya que la media de los pacientes es de 69,79 y la de los controles es de 64,60 (Tabla 5). Este resultado entra dentro de lo esperado ya que la granulocitoaféresis no influye sobre el nivel de linfocitos en sangre periférica o en todo caso hace que aumenten un poco como se ha observado en estudios previos (Beltrán et al., 2017).

El nivel de células NK en sangre periférica de los pacientes tratados fue superior al de los controles (8,95 frente a 1,10, Tabla 6), lo que era esperado ya que la granulocitoaféresis no influye en los niveles de células NK, tal y como se había observado en estudios previos similares (Beltrán et al., 2017). El test t de Student indicó que la diferencia del nivel de células NK entre controles y pacientes era altamente significativa, ya que se obtuvo un valor de p de 0,00047, siendo el tipo leucocitario en para el que más diferencias entre controles y pacientes se encontraron en el estudio.

Los niveles de los linfocitos CD4+ en sangre periférica de los pacientes resultaron superiores a los de los controles, ya que la media del porcentaje parcial en pacientes fue de 67,02 y la de los controles de 53,16 (Tabla 7). Se corresponde con lo esperado ya que como se ha mencionado anteriormente, en los linfocitos no se espera observar cambios tras la granulocitoaféresis.

En lo que respecta a linfocitos CD8+, los niveles también fueron mayores en pacientes que en controles, como cabía esperar.

Analizando los linfocitos B se observaba que la media de porcentaje parcial de los pacientes era un poco menor al de los controles siendo la media de los pacientes de 5,26 y la de los controles de 9,025 (Tabla 9). No hay evidencias previas donde haya ocurrido esto pero no es una diferencia significativa, y puede deberse a un caso puntual entre las muestras analizadas.

Los monocitos vieron reducidos sus niveles por la granulocitoaféresis, como indican los datos de la Tabla 10: la media de porcentaje parcial de los pacientes es de 14,035 y la de los controles es de 28,50 (Tabla 10). En este caso se observa claramente el impacto positivo de la granulocitoaféresis en el perfil inmunológico de los pacientes, siendo los niveles de monocitos en sangre periférica la mitad que el de los controles y por lo tanto aliviando el estado inflamatorio de los pacientes, estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio (Beltrán et al., 2017).

En los neutrófilos vio una gran diferencia entre los valores de los pacientes y de los controles, siendo la media del porcentaje parcial de neutrófilos en los pacientes de 12,79 y la de los controles de 47,26 (Tabla 11). Es donde más se ha visto el efecto de la granulocitoaféresis; estos datos indican que este tratamiento ha tenido un buen efecto sobre los neutrófilos en sangre periférica de los pacientes, rebajando la actividad del sistema inmune, coincidiendo con evidencias previas (Beltrán et al., 2017)

En cuanto a las citocinas, los resultados indican que siguen estando elevadas en pacientes tratados en comparación con los controles sanos. Si bien es cierto que es más difícil detectar el efecto de la granulocitoaféresis sobre las citosinas, ya que según el contexto pueden actuar como antiinflamatorias o pro-inflamatorias (efecto pleiotrópico). Las citocinas que presentaron diferencias significativas entre pacientes y controles fueron IFN $\gamma$ , IL-10, IL-12p70, IL17A, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ . En todas ellas los valores en pacientes fueron más elevados que en controles.

Respecto a las demás citocinas, aunque también presentan valores elevados los pacientes respecto a los controles, estas diferencias no fueron significativas.

En evidencias anteriores se había observado que IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-8 disminuyen tras la granulocitoaféresis (Beltrán et al., 2017; Sakanoue, Higashi y Kanekura, 2017), a diferencia de lo que ocurre en este estudio.

En cambio, en la IL-10 también se ha observado un aumento en estudios previos (Beltrán et al., 2017; Montiel, 2007) correspondiéndose con los resultados obtenidos de la IL-10.

Teniendo todo esto en cuenta, se ha observado claramente el efecto de la granulocitoaféresis sobre las subpoblaciones leucocitarias, que ha resultado ser exitoso, disminuyendo los monocitos y neutrófilos como se esperaba. Aliviando así la carga inmunológica de los pacientes del estudio. Si bien es cierto que en las citocinas

no se ha observado tan claramente el efecto de la granulocitoaféresis como en los leucocitos.

A pesar de ello se puede concluir que los resultados de este estudio coinciden con evidencias anteriores, como en el estudio de Dignass et al. (2018) en el que se afirma que la granulocitoaféresis proporciona un resultado seguro y beneficioso a largo plazo para pacientes con CU.

Estos resultados marcan una tendencia sobre el efecto de la granulocitoaféresis pero no son representativos, sería necesario corroborarlos con un estudio similar de un tamaño muestral mayor.

## 6. Conclusiones

- 1) Los resultados muestran que todas las citocinas se encuentran elevadas en los pacientes de CU, de modo que no se ha visto un efecto claro de la granulocitoaféresis.
- 2) Combinar los análisis de citocinas con los de células leucocitarias permite conocer los perfiles inmunitarios implicados en la CU.
- 3) El efecto de la granulocitoaféresis sobre los pacientes se ha apreciado ya que presentaron un perfil inmunológico de linfocitos T en sangre periférica con diferencias respecto a los controles que no fueron significativas: la proporción de linfocitos CD4 respecto al total de leucocitos en pacientes tratados y en controles fue similar, la de linfocitos CD8 en pacientes tratados fue inferior a la de los controles, y la de células *natural killer* en pacientes tratados fue superior a la de los controles sanos. Por su parte, los linfocitos B se encontraban relativamente más representados en la población leucocitaria de controles que en la de pacientes tratados.
- 4) Los niveles de monocitos y neutrófilos en sangre periférica parece que disminuyen en los pacientes tratados con granulocitoaféresis, pero no son significativos los datos.

## 7. Líneas futuras

Como se ha visto en el presente proyecto, es esencial la investigación de los mecanismos de patogenicidad de la CU y por lo tanto el estudio a fondo del perfil inmunológico de los pacientes, muy involucrado en esta patología.

En relación con este estudio, se debe seguir evaluando el perfil inmunológico de los pacientes con todos los tratamientos disponibles, y realizar estudios similares antes, durante y después de haber sido sometidos a dichos tratamientos y con un elevado tamaño muestral. De esta forma se pretende tener una visión más amplia de cómo reaccionan los pacientes antes, durante y después de los tratamientos y se establecerían patrones moleculares que podrían ser biomarcadores y permitirían conocer los diferentes mecanismos de respuestas a los fármacos para así conseguir tratamientos personalizados y más efectivos.

Todo esto generaría una gran cantidad de información que habría que gestionar con tecnología *big data*, por lo que también es necesario el manejo y la implantación de la tecnología *big data* en las investigaciones científicas, en este caso, de CU. De esta forma se podría generar una clasificación molecular de los subtipos de pacientes, ya que dentro de los pacientes de CU hay diferentes subgrupos porque, como se ha mencionado en diversas ocasiones en este estudio, no todos reaccionan igual sino que hay un amplio abanico de respuestas de los pacientes frente a los tratamientos y hoy en día se está tratando a todos los pacientes por igual debido a que no se tienen en cuenta distintos factores microbianos, genéticos, inmunológicos o ambientales que influyen en los pacientes y que actualmente se desconocen.

También sería necesario estudiar el efecto de la combinación de fármacos en el perfil inmunitario de los pacientes, puesto que se ha comprobado que en pacientes refractarios a determinados fármacos, cuando se suprime un mecanismo inflamatorio se dispara otro. Por ejemplo: cuando se les suministra agentes anti-TNF a pacientes refractarios a estos fármacos, aumentan los niveles de IL-23 y esto es responsable de la reducción del efecto farmacológico (Schmitt H, et al. Gut. 2018). Por consiguiente, bloqueando ambos mecanismos con una combinación de dos fármacos se podría revertir esta situación. Esto hace pensar que en un futuro las combinaciones de

fármacos serán útiles y podrían estar indicadas en algunos pacientes, aunque son necesarios más estudios para poder afirmarlo con rotundidad.

Por otro lado, también sería conveniente realizar estudios del exposoma de los pacientes, es decir, de cómo reaccionan los pacientes con su entorno: con las dietas, estrés, antibióticos, etc. Y cómo se ve reflejado en su perfil inmune.

Teniendo todo esto en cuenta, la enfermedad puede estar en un futuro mucho más controlada y tener establecidos determinados parámetros que indiquen cómo se debe actuar dependiendo del paciente, mejorando así su calidad de vida.

## 8. Bibliografía

Abusleme, L., Moutsopoulos, N. M. (2017). IL-17: *overview and role in oral immunity and microbiome*. *Oral diseases*, 23(7), 854–865. <https://doi.org/10.1111/odi.12598>

Accuesp.com. (2021). Recuperado de: <https://accuesp.com>

Adacyte. 2021. *Inicio - Adacyte*. Recuperado de: <<https://www.adacyte.com/es/>>

Ahluwalia, B., Moraes, L., Magnusson, M. K., y Öhman, L. (2018). *Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies*. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 53(4), 379–389. <https://doi.org/10.1080/00365521.2018.1447597>

Allocca, M., Furfaro, F., Fiorino, G., Gilardi, D., D'Alessio, S., y Danese, S. (2018). *Can IL-23 be a good target for ulcerative colitis?. Best practice y research. Clinical gastroenterology*, 32-33, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2018.05.016>

Arévalo, J., 1980. *GETECCU - Grupo Español de Trabajo en Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa*. [online] [Geteccu.org](http://geteccu.org). Recuperado de: <<https://geteccu.org/>>

Ayling, R. M., y Kok, K. (2018). *Fecal Calprotectin*. *Advances in clinical chemistry*, 87, 161–190. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.07.005>

Aziz, M., Holodick, N. E., Rothstein, T. L., y Wang, P. (2015). *The role of B-1 cells in inflammation*. *Immunologic research*, 63(1-3), 153–166. <https://doi.org/10.1007/s12026-015-8708-3>

- Beltrán, B., Sáez-González, E., Moret, I., Díaz-Jaime, F. C., Alvarez-Sotomayor, D., Cerrillo, E., et. al. (2018). *Adsorptive granulocyte/monocyte apheresis use in severe ulcerative colitis and determination of changes in plasma cytokines. Journal of clinical apheresis*, 33(1), 99–103. <https://doi.org/10.1002/jca.21552>
- Bray C, Bell LN, Liang H, Haykal R, Kaiksow F, Mazza JJ, et al. (2016). *Erythrocyte Sedimentation Rate and C-reactive Protein Measurements and Their Relevance in Clinical Medicine. WMJ*. 115(6):317-21. PMID: 29094869.
- Brumós, L. (2014). *1025 interacciones farmacológicas que se deben conocer*. Barcelona: Editorial Médica Jims.
- Chambers, W. M., Warren, B. F., Jewell, D. P., Mortensen, N. J. (2005). *Cancer surveillance in ulcerative colitis. The British journal of surgery*, 92(8), 928–936. <https://doi.org/10.1002/bjs.5106>
- Chang, J. (2020). *Pathophysiology of Inflammatory Bowel Diseases. New England Journal Of Medicine*: 383(27), 2652-2664. <https://doi.org/10.1056/nejmra2002697>
- Dignass, A., Akbar, A., Baumgart, D. C., Bommelaer, G., Bouguen, G., Cadiot, G. (2018). *Granulocyte/monocyte adsorptive apheresis for the treatment of therapy-refractory chronic active ulcerative colitis. Scandinavian journal of gastroenterology*, 53(4), 442–448. <https://doi.org/10.1080/00365521.2018.1447598>
- Domènech E, Grífols JR, Akbar A, Dignass A. (2021). *Use of granulocyte/monocytapheresis in ulcerative colitis: A practical review from a European perspective. World Journal of Gastroenterology*. 27(10), 908-918  
Recuperado de: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v27/i10/908.htm>
- Fernández, R. (2021). *Probióticos y respuesta inmune*. Revactamedicacentro.sld.cu. Retrieved 10 June 2021, from <http://www.revactamedicacentro.sld.cu/index.php/amc/article/view/766/1009>.
- Figuroa, C. (2019). *Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal. Revista Médica Clínica Las Condes*, 30(4), 257-261. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2019.06.003>

Flynn, S., y Eisenstein, S. (2019). Inflammatory Bowel Disease Presentation and Diagnosis. *The Surgical clinics of North America*, 99(6), 1051–1062. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2019.08.001>

G-Educainflamatoria. (2021). *Enfermedad inflamatoria intestinal Crohn y Colitis ulcerosa*. Recuperado de: <https://educainflamatoria.com/>.

Guo, X. Y., Liu, X. J., y Hao, J. Y. (2020). *Gut microbiota in ulcerative colitis: insights on pathogenesis and treatment*. *Journal of digestive diseases*, 21(3), 147–159. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12849>

Hansen, J. J., y Sartor, R. B. (2015). *Therapeutic Manipulation of the Microbiome in IBD: Current Results and Future Approaches*. *Current treatment options in gastroenterology*, 13(1), 105–120. <https://doi.org/10.1007/s11938-014-0042-7/>

Hoving J. C. (2018). *Targeting IL-13 as a Host-Directed Therapy Against Ulcerative Colitis*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 395. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00395>

Instituto Nacional del Cáncer. 2021. *Diccionario de cáncer del NCI*. Recuperado de: <<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/il-13>>

*Interleuquina-6 (IL-6)*. *Diccionario médico*. Clínica Universidad de Navarra. Cun.es. (2021). Retrieved 10 June 2021, from <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/interleuquina-6>.

James, J. P., Riis, L. B., Malham, M., Høgdall, E., Langholz, E., y Nielsen, B. S. (2020). *MicroRNA Biomarkers in IBD-Differential Diagnosis and Prediction of Colitis-Associated Cancer*. *International journal of molecular sciences*, 21(21), 7893. <https://doi.org/10.3390/ijms21217893>

Kelly, A., Houston, S. A., Sherwood, E., Casulli, J., y Travis, M. A. (2017). *Regulation of Innate and Adaptive Immunity by TGFβ*. *Advances in immunology*, 134, 137–233. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2017.01.001>

Lai, L. J., Shen, J., y Ran, Z. H. (2019). *Natural killer T cells and ulcerative colitis*. *Cellular immunology*, 335, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.08.010>

- Langer, V., Vivi, E., Regensburger, D., Winkler, T. H., Waldner, M. J., Rath, T. et al. (2019). *IFN- $\gamma$  drives inflammatory bowel disease pathogenesis through VE-cadherin-directed vascular barrier disruption*. *The Journal of clinical investigation*, 129(11), 4691–4707. <https://doi.org/10.1172/JCI124884>
- Li, B., Huang, L., Lv, P., Li, X., Liu, G., Chen, Y., et al. (2020). *The role of Th17 cells in psoriasis*. *Immunologic research*, 68(5), 296–309. <https://doi.org/10.1007/s12026-020-09149-1>
- Lopetuso, L. R., Ianiro, G., Allegretti, J. R., Bibbò, S., Gasbarrini, A., Scaldaferri, F., y Cammarota, G. (2020). *Fecal transplantation for ulcerative colitis: current evidence and future applications*. *Expert opinion on biological therapy*, 20(4), 343–351. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1733964>
- McKinnon K. M. (2018). *Flow Cytometry: An Overview*. *Current protocols in immunology*, 120, 5.1.1–5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- Medina, E. (2013). *Enfermedad inflamatoria intestinal (I): clasificación, etiología y clínica*. *Anales De Pediatría Continuada*, 11(2), 59-67. [https://doi.org/10.1016/s1696-2818\(13\)70120-3](https://doi.org/10.1016/s1696-2818(13)70120-3)
- Mehaffey, E., y Majid, D. (2017). *Tumor necrosis factor- $\alpha$ , kidney function, and hypertension*. *American journal of physiology. Renal physiology*, 313(4), F1005–F1008. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00535.2016>
- Mentella, M. C., Scaldaferri, F., Pizzoferrato, M., Gasbarrini, A., y Miggiano, G. (2020). *Nutrition, IBD and Gut Microbiota: A Review*. *Nutrients*, 12(4), 944. <https://doi.org/10.3390/nu12040944>
- Migliorini, P., Italiani, P., Pratesi, F., Puxeddu, I., y Boraschi, D. (2020). *The IL-1 family cytokines and receptors in autoimmune diseases*. *Autoimmunity reviews*, 19(9), 102617. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102617>
- Montalvillo, E., Garrote, J., Bernardo, D., y Arranz, E. (2014). *Células linfoides innatas y células T natural killer en el sistema inmune del tracto gastrointestinal*. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 5(106), 334-345
- Montiel, M. P.. (2007). *Granulocitoaféresis: viejos procedimientos, nuevas soluciones*. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 99(11), 623-627.

Recuperado en 10 de junio de 2021, de [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1130-01082007001100001&lng=es&tyt=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082007001100001&lng=es&tyt=es).

- Moret, I., Cerrillo, E., Navarro-Puche, A., Iborra, M., Rausell, F., Tortosa, L., y Beltrán, B. (2014). *Estrés oxidativo en la enfermedad de Crohn*. *Gastroenterología Y Hepatología*, 37(1), 28-34. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2013.01.008>
- Moutachakkir, M., Lamrani Hanchi, A., Baraou, A., Boukhira, A., y Chellak, S. (2017). *Immunoanalytical characteristics of C-reactive protein and high sensitivity C-reactive protein. Caractéristiques immunoanalytiques de la protéine C-réactive et de la protéine C-réactive ultrasensible*. *Annales de biologie clinique*, 75(2), 225–229. <https://doi.org/10.1684/abc.2017.1232>
- Na, Y. R., Stakenborg, M., Seok, S. H., y Matteoli, G. (2019). *Macrophages in intestinal inflammation and resolution: a potential therapeutic target in IBD*. *Nature reviews. Gastroenterology y hepatology*, 16(9), 531–543. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0172-4>
- Ordás, I., Eckmann, L., Talamini, M., Baumgart, D. C., y Sandborn, W. J. (2012). *Ulcerative colitis*. *Lancet (London, England)*, 380(9853), 1606–1619. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60150-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60150-0)
- Parrilla Paricio, P., y Landa García, J. (2010). *Cirugía AEC*. (2ª Ed). Editorial Médica Panamericana.
- Perea, R., Martín, I., Escobresca, P., González, R., Martínez, B., García, R. et. al. (2018). *Actualización del tratamiento quirúrgico en la colitis ulcerosa*. *Cirugía Andaluza*. 4(29), 477-482
- Pérez, C., Santiago, W., Romero, H., Rodríguez, J.C. (2018). *Fundamentos de Citometría de flujo: Su aplicación diagnóstica en la investigación biomédica y clínica*. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*: 2(11), 41-52.
- Polanco, S., y Waller, L. (2016). *Validación del Índice de Severidad Endoscópico de Colitis Ulcerativa para la población mexicana*. *Endoscopia*, 28(1), 2-8. <https://doi.org/10.1016/j.endomx.2016.02.003>

- Porter, R. J., Kalla, R., y Ho, G. T. (2020). *Ulcerative colitis: Recent advances in the understanding of disease pathogenesis*. *F1000Research*, 9, F1000 Faculty Rev-294. <https://doi.org/10.12688/f1000research.20805.1>
- Puig L. (2017). *The role of IL 23 in the treatment of psoriasis*. *Expert review of clinical immunology*, 13(6), 525–534. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2017.1292137>
- Puig, L., Morales, J., Dauden, E., Andreu, J., Cervera, R., Adán, A. et al. (2019). *La prevalencia de diez enfermedades inflamatorias inmunomediadas (IMID) en España*. *Revista Española de Salud Pública*: 9(93), 202-214
- Rich, R., y Fleisher, T., Shearer, W., Schroeder, H., Frew, A., Weyand, C. (2019). *Inmunología clínica*. (5ª Ed). Barcelona: Elsevier.
- Romero, J., (2021). *Utilidad diagnóstica de la velocidad de sedimentación globular*. Elsevier. 7(39), 325-329
- Rosa, L., Cutone, A., Lepanto, M. S., Paesano, R., y Valenti, P. (2017). *Lactoferrin: A Natural Glycoprotein Involved in Iron and Inflammatory Homeostasis*. *International journal of molecular sciences*, 18(9), 1985. <https://doi.org/10.3390/ijms18091985>
- Sacco, R., Tanaka, T., Yamamoto, T., Bresci, G., y Saniabadi, A. R. (2015). *Adacolumn leucocytapheresis for ulcerative colitis: clinical and endoscopic features of responders and unresponders*. *Expert review of gastroenterology and hepatology*, 9(3), 327–333. <https://doi.org/10.1586/17474124.2014.953060>
- Sakanoue, M., Higashi, Y., y Kanekura, T. (2017). *Inhibition of Inflammatory Cytokines and Induction of Myeloid-Derived Suppressor Cells by the Effects of Granulocyte and Monocyte Adsorption Apheresis*. *Therapeutic apheresis and dialysis : official peer-reviewed journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy*, 21(6), 628–634. <https://doi.org/10.1111/1744-9987.12580>
- Sands B. E. (2015). *Biomarkers of Inflammation in Inflammatory Bowel Disease*. *Gastroenterology*, 149(5), 1275–1285.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.07.003>

- Schmitt, H., Billmeier, U., Dieterich, W., Rath, T., Sonnewald, S., Reid, S. (2019). *Expansion of IL-23 receptor bearing TNFR2+ T cells is associated with molecular resistance to anti-TNF therapy in Crohn's disease*. *Gut*, 68(5), 814–828. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315671>
- Shen, Z. H., Zhu, C. X., Quan, Y. S., Yang, Z. Y., Wu, S., Luo, W. et al. (2018). *Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation*. *World journal of gastroenterology*, 24(1), 5–14. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i1.5>
- Souza, H. S., y Fiocchi, C. (2016). *Immunopathogenesis of IBD: current state of the art*. *Nature reviews. Gastroenterology y hepatology*, 13(1), 13–27. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.186>
- Stange, E. F., y Schroeder, B. O. (2019). *Microbiota and mucosal defense in IBD: an update*. *Expert review of gastroenterology y hepatology*, 13(10), 963–976. <https://doi.org/10.1080/17474124.2019.1671822>
- Tatiya-Aphiradee, N., Chatuphonprasert, W., y Jarukamjorn, K. (2018). *Immune response and inflammatory pathway of ulcerative colitis*. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 30(1), 1–10. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2018-0036>
- Uciechowski, P., y Dempke, W. (2020). *Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network*. *Oncology*, 98(3), 131–137. <https://doi.org/10.1159/000505099>
- Ueno, A., Jeffery, L., Kobayashi, T., Hibi, T., Ghosh, S., y Jijon, H. (2018). *Th17 plasticity and its relevance to inflammatory bowel disease*. *Journal of autoimmunity*, 87, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.12.004>
- Velásquez, M. J. R. (2014). *Enfermedad de Crohn. Enfoque diagnóstico y terapéutico de las primeras visitas*. *Revista Colombiana de Gastroenterología*: 4(29), 404–416. <https://doi.org/10.22516/25007440.438>
- Walfish, A., Ching, R. (2021). *Colitis ulcerosa - Trastornos gastrointestinales - Manual MSD versión para público general*. *Manual MSD versión para público general*. Recuperado de: <https://www.msmanuals.com/es-es/hogar/trastornos-gastrointestinales/enfermedad-inflamatoria-intestinal/colitis-ulcerosa>.

- Wallace, K. L., Zheng, L. B., Kanazawa, Y., y Shih, D. Q. (2014). *Immunopathology of inflammatory bowel disease*. *World journal of gastroenterology*, 20(1), 6–21. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i1.6>
- Weimers, P., y Munkholm, P. (2018). *The Natural History of IBD: Lessons Learned*. *Current treatment options in gastroenterology*, 16(1), 101–111. <https://doi.org/10.1007/s11938-018-0173-3>
- What is flow cytometry? – Cytognos, S.L.*. Cytognos, S.L. (2021). Recuperado de: <https://www.cytognos.com/academy/cytognos-technology/flow-cytometry/what-is-flow-cytometry/>.
- Windsor, J. W., y Kaplan, G. G. (2019). *Evolving Epidemiology of IBD*. *Current gastroenterology reports*, 21(8), 40. <https://doi.org/10.1007/s11894-019-0705-6>
- Yagüe, P. (2015). *Papel de la interleuquina-13 en la diferenciación de las células Th17*. (Trabajo final de grado, Universidad Politécnica de Madrid). Recuperado de: [http://oa.upm.es/38390/7/PFC\\_PATRICIA\\_YAGUE\\_SANZ.pdf](http://oa.upm.es/38390/7/PFC_PATRICIA_YAGUE_SANZ.pdf)
- Yao, D., Dong, M., Dai, C., y Wu, S. (2019). *Inflammation and Inflammatory Cytokine Contribute to the Initiation and Development of Ulcerative Colitis and Its Associated Cancer*. *Inflammatory bowel diseases*, 25(10), 1595–1602. <https://doi.org/10.1093/ibd/izz149>
- Yoo, J. H., y Donowitz, M. (2019). *Intestinal enteroids/organoids: A novel platform for drug discovery in inflammatory bowel diseases*. *World journal of gastroenterology*, 25(30), 4125–4147. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i30.4125>
- Zeng, B., Shi, S., Ashworth, G., Dong, C., Liu, J., y Xing, F. (2019). *ILC3 function as a double-edged sword in inflammatory bowel diseases*. *Cell death y disease*, 10(4), 315. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1540-2>