

*Departamento de Medicina*

*Programa de Medicina*

*Universitat de València*

2015



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

**TESIS  
DOCTORAL**

**RELACIÓN DE LOS LINFOCITOS B1 (CD19+ CD5+)  
CON LA ENFERMEDAD DE CROHN**

**Doctorando**

**D. Rafael Gil Borràs**

Licenciado en Medicina y Cirugía

Especialista en Medicina Digestiva

**Directores de Tesis:**

**Dr. Miguel Bixquert Jiménez**

*Profesor Titular.*

*Departamento de Medicina.*

*Universitat de València*

**Dr. Juan Carlos Andreu Ballester**

*Unidad de Investigación*

*Hospital Arnau de Vilanova de València*

**Dr. Ferran Ballester Díez**

*Profesor Titular. Departamento de Enfermería.*

*Universitat de València*

*Fundación para el Fomento de la Investigación*

*Sanitaria y Biomédica en la CV (FISABIO). Generalitat Valenciana*



## **CERTIFICADO DE LA DIRECCIÓN DE LA TESIS**

Por la presente certificamos que hemos supervisado y dirigido la realización de la tesis doctoral: "*Relación de los Linfocitos B1 (CD19+ CD5+) con la Enfermedad de Crohn*", del doctorando Rafael Gil Borrás, para optar a ser doctor por la Universitat de València.

Fdo: **Dr. Miguel Bixquert Jiménez**

*Profesor Titular.*

*Departamento de Medicina.*

*Universitat de València*

Fdo: **Dr. Juan Carlos Andreu Ballester**

*Unidad de Investigación*

*Hospital Arnau de Vilanova de València*

Fdo: **Dr. Ferran Ballester Díez**

*Profesor Titular.*

*Departamento de Enfermería. Universitat de València*

*Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y*

*Biomédica en la CV (FISABIO). Generalitat Valenciana*



### **Agradecimientos:**

A mi padre. Siempre luchaste porque esta tesis se hiciera realidad. Es tanto tu sueño como el mío.

A Juan Carlos. Por emocionarte cada vez que nos salía un resultado positivo. Por trabajar más de lo que te tocaba en este proyecto.

A Celeste. Por quererme por encima de todo. Sin tu apoyo no hubiera sido capaz.

A Blanca. Por tu ayuda en el diseño y en todos los detalles.

A mis compañeros del hospital Arnau de Vilanova. Por ayudarme con los pacientes y aguantarme cuando todo me sobrepasaba.

A las enfermeras de endoscopias y de la 4<sup>a</sup> planta. Por su ayuda desinteresada con la extracción de sangre.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

A. INDICE DE FIGURAS .....	13
B. INDICE DE TABLAS .....	15
C. INDICE DE GRÁFICAS .....	17
D. ABREVIATURAS EMPLEADAS EN LA TESIS .....	19
1.-INTRODUCCIÓN GENERAL.....	21
1.1.- QUÉ ES LA ENFERMEDAD DE CROHN (EC) .....	21
1.2.- LA TEORÍA INFECCIOSA COMO ETIOLOGÍA DE LA EC: AGENTES INFECCIOSOS RELACIONADOS CON LA EC.....	25
1.3.- GENÉTICA EN LA ETIOLOGÍA DE LA EC .....	28
1.3.1.- ALTERACIONES GENÉTICAS EN LA EC .....	28
1.3.2.- GENES ASOCIADOS CON LA EII .....	29
1.3.3.- FUNCIÓN DEL GEN NOD2/CARD15 Y SUS MUTACIONES .....	31
1.3.4.- PAPEL DE LA AUTOFAGIA.....	32
1.3.5.- EPIGENÉTICA.....	33
1.4.- FACTORES MEDIOAMBIENTALES .....	37
1.5.- LA TEORÍA INMUNOLÓGIA EN LA EC .....	40
1.6.- DE LA AUTOINMUNIDAD A LA INMUNODEFICIENCIA .....	41

1.7.- LA TEORÍA AUTOINFLAMATORIA EN LA ETIOLOGÍA DE LA EC.....	43
1.8.- LAS DOS INMUNIDADES .....	44
1.9.- ALTERACIONES EN LA INMUNIDAD ADAPTATIVA .....	46
1.9.1.- PAPEL DE LOS LINFOCITOS T EN LA EC .....	47
1.9.2.- DESEQUILIBRIO Th1 / Th2 .....	48
1.9.3.- LINFOCITOS Th 17 en la EC .....	48
1.9.4.- LINFOCITOS T REGULADORES (Treg) EN EII .....	49
1.9.5.-FUNCIONES DE LAS CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS DE LOS LINFOCITOS T .....	49
1.10.- ALTERACIONES DE LA INMUNIDAD INNATA .....	55
1.10.1.-ALTERACIONES EN LA BARRERA MUCOSA INTESTINAL.....	60
1.10.2.- ALTERACIONES EN LA CAPA DE MOCO .....	62
1.10.3.- ALTERACIONES EN LAS DEFENSINAS.....	63
1.10.4.- DEFICIENCIA DE $\beta$ -DEFENSINA EN LA EC DE COLON	64
1.10.5.- ALTERACIONES EN LAS CÉLULAS DE PANETH .....	64
1.10.6.- RECEPTORES TIPO TOLL.....	66
1.10.7.- NOD2 .....	67
1.10.8.-ALTERACIONES DE LA FUNCIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS EN LA EC .....	68

1.10.9.- ALTERACIONES EN LOS LINFOCITOS T $\gamma\delta$ .....	69
1.10.10.-LOS MACRÓFAGOS ACTIVADOS ALTERNATIVAMENTE .....	71
1.10.11.- LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS REGULADORAS .....	73
1.10.12.- PAPEL DE LOS LINFOCITOS B REGULADORES (Breg)73	
1.10.13.- CÉLULAS LINFOIDES INNATAS .....	75
1.11.- LINFOCITOS B1 .....	77
1.12.- CONSECUENCIAS DE LOS ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS EN EL TRATAMIENTO DE LA EC.....	81
1.12.1.- BLOQUEO DE CITOQUINAS CLAVE .....	83
1.12.2.- BLOQUEO DE LA MIGRACIÓN, ADHESIÓN Y DIAPEDESIS LEUCOCITARIA.....	84
1.12.3.- INHIBIDORES DE LA JANUS QUINASA (JAK).....	85
1.12.4.- LAQUINIMOD.....	86
1.12.5.- BLOQUEO DE MOLÉCULAS CONTRA-REGULADORAS .....	86
1.12.6.- TERAPIAS CELULARES.....	87
1.12.7.- MEJORÍA DE LA INMUNIDAD INNATA COMO TRATAMIENTO .....	89
2.- METODOLOGÍA .....	93
2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	93

2.2.-OBJETIVOS .....	93
2.3.-MATERIAL Y MÉTODOS .....	95
2.3.1.-TIPO DE ESTUDIO .....	95
2.3.2.-CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	95
2.3.3.- VARIABLES ESTUDIADAS: .....	96
2.3.4.- POBLACIÓN DE ESTUDIO: TAMAÑO DE LA MUESTRA.	97
2.3.5.- MÉTODO DE ANÁLISIS EN SANGRE PERIFÉRICA .....	98
2.3.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	100
2.3.7.- CONSENTIMIENTO INFORMADO, CONFIDENCIALIDAD Y PROTECCIÓN DE DATOS.....	100
3.- RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL.....	103
3.1.- RESULTADOS.....	103
3.1.1.- CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS .....	103
3.1.2.- CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES CON EC .....	104
3.1.3.- HEMOGRAMA Y SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS CONVENCIONALES, $\alpha\beta$ Y $\gamma\delta$ .....	107
3.1.3.1- Hemograma .....	107
3.1.3.2- Subpoblaciones linfocitarias convencionales, $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ .....	108
3.1.4.- FRECUENCIA MEDIA DE CD19+ (LINFOCITOS B) EN PACIENTES CON EC VS CONTROLES.....	110

3.1.5.- FRECUENCIA MEDIA DE CD19+CD5+ (LINFOCITOS B1) EN PACIENTES CON EC VS CONTROLES .....	110
3.1.6.- FRECUENCIA MEDIA CD19+CD5+ (LINFOCITOS B1) EN PACIENTES CON EC SEGÚN ESCENARIOS CLÍNICOS .....	111
3.1.7.- FRECUENCIA MEDIA DE CD19+CD5+ (LINFOCITOS B1) EN PACIENTES CON EC SEGÚN CLASIFICACIÓN DE MONTREAL.....	112
3.1.7.1.-Edad .....	112
3.1.7.2.- Localización .....	113
3.1.7.3.- Patrón .....	114
3.1.8.- FRECUENCIA MEDIA DE LINFOCITOS B1 EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON Y SIN TRATAMIENTO .....	115
3.1.9.- FRECUENCIA MEDIA DE LINFOCITOS B1 EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES SEGÚN PRESENCIA DE CIRUGÍA .....	116
3.1.9.1.- Cirugía previa, durante o posterior a la extracción de sangre en el estudio.....	116
3.1.9.2.- Cirugía previa al estudio (51,5 ± 51,6 meses) .....	117
3.1.9.3.- Cirugía posterior al estudio (Brote) (13,2 ± 12,1 meses) ..	118
3.1.10.- CORRELACIONES DE LOS LINFOCITOS B1 CON LAS POBLACIONES T .....	119
3.1.11.- INMUNOGLOBULINAS EN PACIENTES CON EC Y CONTROLES .....	120
3.1.12.- DEFICIENCIA DE LINFOCITOS B1.....	121

3.1.12.1.- Deficiencia de B1 según Escenarios Clínicos .....	121
3.1.12.2.- Deficiencia de B1 según clasificación de Montreal .....	122
3.1.13.- DEFICIENCIA DE B1 SEGÚN CIRUGÍA .....	124
3.1.14.- RELACIÓN DE LINFOCITOS B1 CON PRESENCIA O NO DE GRANULOMAS EN ANATOMÍA PATOLÓGICA .....	125
3.1.15.- RELACIÓN DE LINFOCITOS B1 CON PRESENCIA DE BROTE.....	126
3.1.16.- RELACIÓN ENTRE ESTADO GENERAL Y LINFOCITOS B1 .....	127
3.1.17.- RELACIÓN LINFOCITOS B1 Y NECESIDAD DE AUMENTAR TRATAMIENTO EN SEGUIMIENTO .....	127
3.1.18.- RELACIÓN LINFOCITOS B1 Y ENFERMEDAD PERIANAL .....	128
3.1.19.- RELACIÓN ILEOCOLONOSCOPIA (Simple Endoscopy Score: SES-CD) Y LINFOCITOS B1 .....	130
3.1.20.- RELACIÓN LINFOCITOS B1 Y TABAQUISMO .....	132
3.1.21.-RELACIÓN LINFOCITOS B1 Y PÉRDIDA DE PESO.....	132
3.2.- DESARROLLO ARGUMENTAL (DISCUSIÓN).....	133
4.- CONCLUSIONES FINALES .....	143
5.- RESUMEN DE LA TESIS .....	145
6.-BIBLIOGRAFIA .....	151

## A. INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Factores etiológicos/teorías en la EC .....	24
<b>Figura 2.</b> Genes asociados con la EII. ....	29
<b>Figura 3.</b> Papel central de la inmunidad en la patogenia de la EC.....	34
<b>Figura 4.</b> Factores medioambientales en la patogénesis de la EII. ....	37
<b>Figura 5.</b> Componentes de la respuesta inmune adaptativa <sup>15</sup> .....	46
<b>Figura 6.</b> Alteraciones de la inmunidad innata. ....	56
<b>Figura 7.</b> Componentes de la respuesta inmunitaria innata <sup>15</sup> .....	57
<b>Figura 8.</b> Alteraciones en la inmunidad innata en EC <sup>45</sup> .....	58
<b>Figura 9.</b> Sistema inmune de intestino delgado sano <sup>6</sup> . ....	59
<b>Figura 10.</b> Sistema inmune intestinal en la EC <sup>6</sup> . ....	59
<b>Figura 11.</b> Mecanismos de defensa de la barrera mucosa intestinal sana <sup>14</sup> ...	60
<b>Figura 12.</b> Bloqueo de citoquinas en EII <sup>183</sup> .....	81
<b>Figura 13.</b> Efecto de vedolizumab y diferentes nuevos fármacos <sup>197</sup> .....	84



## B. INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Inmunidad Innata vs. Adaptativa .....	44
<b>Tabla 2.</b> Características Clínicas de los pacientes con EC .....	104
<b>Tabla 3.</b> Tratamiento de los pacientes con EC .....	105
<b>Tabla 4.</b> Variables continuas .....	106
<b>Tabla 5.</b> Diferencias en el hemograma entre EC y Controles .....	107
<b>Tabla 6.</b> Diferencias en las subpoblaciones linfocitarias (EC-Control) .....	109
<b>Tabla 7.</b> Diferencia medias linfocitos B1 según tratamiento .....	115
<b>Tabla 8.</b> Correlaciones linfocitos B1-Linfocitos T y B2 .....	119
<b>Tabla 9.</b> Inmunoglobulinas EC-Controles.....	120
<b>Tabla 10.</b> Deficiencia B1 en relación a los Escenarios Clínicos .....	121
<b>Tabla 11.</b> Deficiencia B1 según Clasificación Montreal (Edad).....	122
<b>Tabla 12.</b> Deficiencia B1 según Clasificación Montreal (Localización) ....	122
<b>Tabla 13.</b> Deficiencia B1 según Clasificación Montreal (Patrón).....	123
<b>Tabla 14.</b> Deficiencia B1 y su relación con la Cirugía previa en la EC .....	124
<b>Tabla 15.</b> Deficiencia B1 y su relación con el brote quirúrgico en la EC ...	125
<b>Tabla 16.</b> Relación entre linfocitos B1 y la presencia de granulomas en Anatomía patológica.....	125
<b>Tabla 17.</b> Relación entre linfocitos B1 y presencia de brote posteriormente .....	126
<b>Tabla 18.</b> Relación estado general y linfocitos B1 .....	127
<b>Tabla 19.</b> Relación enfermedad perianal y déficit linfocitos B1 .....	128

<b>Tabla 20.</b> Frecuencias medias de linfocitos B1 en pacientes con y sin enfermedad perianal .....	129
<b>Tabla 21.</b> Relación de los linfocitos B1 con ileo-colonoscopy en EC .....	131
<b>Tabla 22.</b> Valores descriptivos de SES CD .....	132

## C. INDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Frecuencia media de Linfocitos B1 pacientes con EC y Controles. .....	110
<b>Gráfica 2.</b> Frecuencia media de Linfocitos B1 en sangre periférica de pacientes con EC según estadios de la enfermedad. ....	111
<b>Gráfica 3.</b> Frecuencia media de Linfocitos B1 en sangre periférica de pacientes con EC según Clasificación de Montreal (Edad). ....	112
<b>Gráfica 4.</b> Frecuencia media de Linfocitos B1 en sangre periférica de pacientes con EC según Clasificación de Montreal (Localización). ....	113
<b>Gráfica 5.</b> Frecuencia media de Linfocitos B1 en sangre periférica de pacientes con EC según Clasificación de Montreal (Patrón). ....	114
<b>Gráfica 6.</b> Frecuencia media de Linfocitos B1 en sangre periférica de pacientes con EC según presencia de cirugía previa durante o posterior a la extracción de sangre en el estudio. ....	116
<b>Gráfica 7.</b> Frecuencia media de Linfocitos B1 en sangre periférica de pacientes con EC según presencia de cirugía previa a la extracción de sangre en el estudio. ....	117
<b>Gráfica 8.</b> Frecuencia media de Linfocitos B1 en sangre periférica de pacientes con EC según aparición de brote quirúrgico posterior a la extracción de sangre en el estudio. ....	118
<b>Gráfica 9.</b> Relación índice endoscópico (SES-CD) y linfocitos B1. ....	130



## **D. ABREVIATURAS EMPLEADAS EN LA TESIS**

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AMP: Adenosín monofosfato.

ARN: ácido ribonucleico.

Breg: linfocitos B reguladores.

CARD15: dominio reclutador de caspasa 15.

CD: cluster of differentiation. Tipo de antígeno propio del sistema inmune de mamíferos.

CDAI: Crohn's disease activity index. Índice de actividad de la enfermedad de Crohn.

CU: Colitis ulcerosa.

DE: Desviación estándar.

EC: Enfermedad de Crohn.

*E.Coli: Escherichia Coli*

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal.

IC: Intervalo de confianza.

ICAM: molécula de adhesión intracelular.

IFN: interferón.

Ig: inmunoglobulina.

IL: Interleuquina.

LB: linfocito B.

MadCAM: molécula de adhesión celular de adreína mucosa.

MDP: Muramil dipéptido.

MHC: moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad.

NF- $\kappa$ B: factor nuclear de transcripción de las células B.

NOD2: dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 2.

OR: Odds ratio

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PRR: receptor de reconocimiento de patrones.

SES-CD: índice endoscópico de gravedad: Simple Endoscopy Score.

Smad: Proteínas intracelulares que traducen señales extracelulares del factor de crecimiento transformante  $\beta$

T-bet: factor regulador de transcripción de linfocitos T.

TCR: receptor para antígeno.

TGF: Factor de crecimiento transformante.

Th: Linfocitos T helper.

TLR: Toll like receptor. Receptor tipo Toll.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

Treg: linfocitos T reguladores.

## 1.-INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.1.- QUÉ ES LA ENFERMEDAD DE CROHN (EC)

La **Enfermedad Inflamatoria intestinal** (EII) agrupa una serie de trastornos de causa desconocida, asociados a una respuesta inmune desmesurada que produce lesiones de profundidad y extensión variable fundamentalmente en el intestino delgado y/o grueso. Incluye la colitis ulcerosa (CU), la EC, la colitis inclasificable (cuando el diagnóstico definitivo no ha podido establecerse tras los estudios habituales) y la colitis indeterminada (cuando el paciente ha sido operado y la histología de la pieza de resección no pueden discriminar si es una EC o una CU)<sup>1</sup>.

La **EC** es un proceso inflamatorio crónico y recidivante, sin tendencia a la curación, que puede afectar a todo el tracto gastrointestinal<sup>2</sup>. Tiene una evolución difícil de predecir, alternando periodos de mayor y menor intensidad sintomática. Su etiología permanece desconocida, aunque se han acumulado múltiples datos de su patogenia, que es compleja y multifactorial<sup>3</sup>. Se piensa que la EC resulta de una respuesta inmune aberrante y continua contra la microbiota intestinal, catalizada por una susceptibilidad genética individual y múltiples factores medioambientales<sup>4,5</sup>.

La **edad** de aparición de la EC presenta una distribución bimodal, con un mayor pico de incidencia entre los 15 y los 35 años y un segundo pico menos acusado entre los 55 y los 65 años<sup>6</sup>. Así pues, predominantemente afecta a individuos jóvenes, con frecuentes brotes que requieren **hospitalizaciones y cirugía**, afectando la calidad de vida de los pacientes y de su entorno. Por esto tiene una influencia enorme en la capacidad de trabajo de los pacientes, con una gran repercusión económica<sup>7</sup>. Un estudio europeo

multicéntrico de 2015 calcula el coste del primer año de tratamiento de un paciente con EC en 1.803 euros por pruebas diagnósticas, 11.489 euros por cirugía, 1.027 euros por tratamiento estándar y 7.376 euros en tratamientos biológicos, cuantificando así su enorme impacto económico<sup>8</sup>.

La EC constituye un problema de salud en los países desarrollados. La **incidencia** de la EC ha aumentado de manera muy destacada en los últimos años en nuestro país, habiéndose igualado prácticamente las diferencias existentes entre el norte y sur de Europa. Estudios epidemiológicos realizados en España muestran una incidencia de la EC de 7,92 por 100.000 habitantes/año, con una **prevalencia** de 87,5 por 100.000 habitantes, muy similar a otros países centroeuropeos<sup>9</sup>. La prevalencia es similar en hombres y mujeres, con un razón hombre/mujer de 2,9-0,76/1<sup>10</sup>. Se estima que en Europa un millón de personas tienen EC<sup>11</sup>. Datos de un estudio realizado en nuestro centro en 2008-2009 en el área del Hospital Arnau de Vilanova de València arrojan una incidencia de 4,43 por 100.000 habitantes/año para la EC<sup>12</sup>.

Por tanto, comprender los aspectos fisiopatológicos de la EC es básico para la prevención y el diseño de estrategias terapéuticas eficaces. Sin embargo, la causa de la EC sigue sin resolverse. Con el presente trabajo pretendemos colaborar al conocimiento de su etiología.

Las teorías básicas de la etiología de la EC son:

- **Teoría infecciosa**, según la cual uno o varios agentes infecciosos estarían en el origen de la enfermedad.

- **Teoría autoinmune**, basada en que la propia inmunidad actúa contra el tracto gastrointestinal. Se han descrito anticuerpos anti-linfocitos, anti-células caliciformes, contra antígenos eritrocitarios o autoanticuerpos

pancreáticos, sin conocer si son una consecuencia serológica de la EC o si es un resultado de la disfunción de la barrera intestinal<sup>13</sup>.

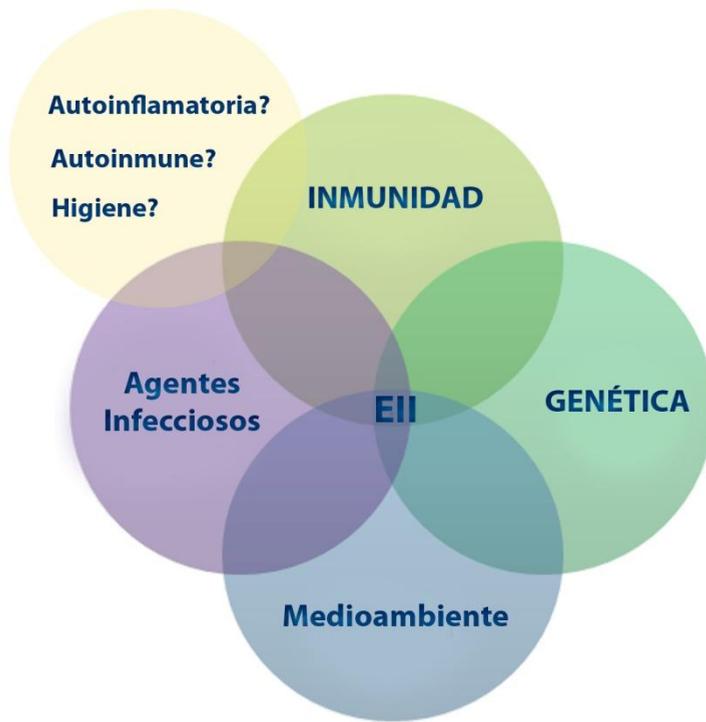
- **Teoría genética**, basada en las alteraciones genéticas presentes en la enfermedad, que se describirán a continuación.

- **Teoría autoinflamatoria**, justificada al ser la EC una enfermedad con brotes, consecuencia de una mala regulación del proceso inflamatorio.

- **Teoría de la higiene**: el uso de antibióticos y la mejora de las condiciones sanitarias ha provocado la disminución de las infecciones en la infancia y el aumento de las enfermedades alérgicas mediadas por linfocitos Thelper 2, con las que se podría relacionar la EII.

- **EC como una inmunodeficiencia**. Es la teoría más en boga en los últimos años, en la que nos basamos para la presente investigación. El origen de la EC sería una inmunodeficiencia, que generaría una respuesta inmune compensatoria que conduciría a las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Explicaremos estas teorías, sus bases, las investigaciones que las sustentan y especialmente los mecanismos fisiopatológicos que justifican la implicación de la inmunidad, más en concreto la inmunidad innata y dentro de ella la posible implicación de los linfocitos B1 en la EC.



**Figura 1.** Factores etiológicos/teorías en la EC  
Original para la presente tesis.

## 1.2.- LA TEORÍA INFECCIOSA COMO ETIOLOGÍA DE LA EC: AGENTES INFECCIOSOS RELACIONADOS CON LA EC

En la **luz intestinal** conviven una enorme cantidad de microorganismos ( **$10^{11-12}$  organismos por g de contenido de colon**), de manera pacífica con el huésped<sup>14</sup>. Además, benefician al huésped a través del metabolismo de componentes alimentarios no absorbidos y la producción de vitaminas<sup>15</sup>. El microbioma humano comprende aproximadamente unas 1.150 especies bacterianas, y cada individuo aloja unas 160 especies<sup>16</sup>.

Existe una prevención de la respuesta inmune contra los gérmenes comensales y también una detección y eliminación de microorganismos patógenos<sup>14</sup>. Los mecanismos fisiológicos por los que **se toleran los gérmenes comensales** y por los que sin embargo, **se detectan los patógenos y se actúa contra ellos**, son complejos y muchos de ellos desconocidos. Se sabe que el balance entre los linfocitos T reguladores y efectores (Th1, Th2 y Th17) es esencial para esta homeostasis intestinal<sup>17</sup>.

La asociación entre los cambios en la microbiota y la EII se ha establecido claramente<sup>18</sup>. Muchos estudios han examinado la flora tanto en la EC como la CU, en segmentos afectados como sanos, y han demostrado que existe una **biodiversidad reducida en el microbioma fecal en estos pacientes** comparados con los controles sanos<sup>19</sup>.

En el colon sano, predominan los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, siendo más del 90% de todos<sup>20</sup>. Contrariamente, en la **EC** la microbiota se caracteriza por una ausencia relativa de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, y un **aumento de enterobacterias**, especialmente *Escherichia Coli* (*E.Coli*) asociado a mucosa. Hay evidencia de que este *E. Coli*, tanto en íleon como en

colon, y su presencia en los granulomas de la EC tiene un papel patogénico primario<sup>4,21,22</sup>. Una reducción de *Faecalibacterium prausnitzii* (una *Firmicute*), se ha asociado con un riesgo aumentado de recurrencia ileal postoperatoria en EC y su restitución experimental ha tenido efectos anti-inflamatorios<sup>23</sup>. Por otro lado, varios productos que producen estos microorganismos como el butirato y el propionato contribuyen a la inflamación intestinal, ya que afectan a las células del sistema inmune y a las citoquinas<sup>24</sup>.

En el colon sano existe una cubierta de moco continua, que está constituida por dos capas: una externa, adherente, buena para el crecimiento bacteriano; y una interna, normalmente estéril. En la EII, especialmente en la EC, hay un marcado aumento de las bacterias asociadas a la capa adherente de moco<sup>25</sup>.

La **EC simula una ileitis infecciosa granulomatosa**, como la tuberculosis intestinal, y la enfermedad de Johne, una zoonosis causada por *Mycobacterium avium paratuberculosis*, que induce respuestas inmunes similares al Crohn. Se han identificado Mycobacterias en tejidos y sangre de pacientes y es un diagnóstico diferencial fundamental. Sin embargo ensayos clínicos con fármacos antituberculosos han fallado en la curación de la enfermedad<sup>26,27</sup>.

Recientemente se ha aislado del íleon de pacientes con EC un grupo patogénico nuevo, la *E.Coli* adherente-invasiva<sup>28</sup>. Parece ser que invade las células epiteliales y sobrevive y se replica dentro de los macrófagos. Se ha hallado en el 22% del íleon inflamado de pacientes con EC, comparado con 6% de controles sanos<sup>20</sup>.

La asociación de la EC con el sarampión y otros virus, *Listeria* o *Yersinia* no ha sido confirmada. Sin embargo, estudios en animales sugieren que las infecciones virales pueden convertir la susceptibilidad genética en el inicio o brote de la enfermedad<sup>6</sup>.

Se ha publicado el papel de los antibióticos en el riesgo de desarrollo de la EII: el uso de antibióticos en el primer año de vida es más frecuente entre los pacientes con EII pediátrica comparado con los controles<sup>29</sup>. Esto apoya el papel de la microbiota intestinal en el origen de la enfermedad, aunque se necesitan más estudios.

La **hipótesis de la higiene** incide en el frecuente uso de antibióticos y la mejora de las condiciones sanitarias en los países industrializados, que ha tenido como consecuencia la disminución de las infecciones en la infancia y el aumento de las enfermedades alérgicas mediadas por linfocitos Thelper 2, entre las que se incluiría la EII<sup>30</sup>.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado la presencia de un aumento de anticuerpos específicos Ig E anti-*Encephalitozoon* en el suero de pacientes con EC, identificando mediante PCR la presencia de microsporidios en el 30% de los tejidos de estos pacientes, frente a su ausencia en pacientes sanos<sup>31</sup>. Estos resultados sugieren que los pacientes con **EC son un grupo de riesgo para la microsporidiasis, una infección oportunista en pacientes inmunocomprometidos**<sup>32,33</sup>.

Como hemos descrito, hay **múltiples agentes microbianos relacionados con la EC, aunque ninguno se ha demostrado como determinante y único** en el mecanismo patogénico de la enfermedad. No está claro si son causa o efecto dentro de la patogenia de la enfermedad<sup>20</sup>. Nuestra investigación va en la línea de otras que defienden una

inmunodeficiencia, más en concreto de la inmunidad innata, y de los linfocitos B1, como factor inicial de esta susceptibilidad a la afectación por estos microorganismos.

### 1.3.- GENÉTICA EN LA ETIOLOGÍA DE LA EC

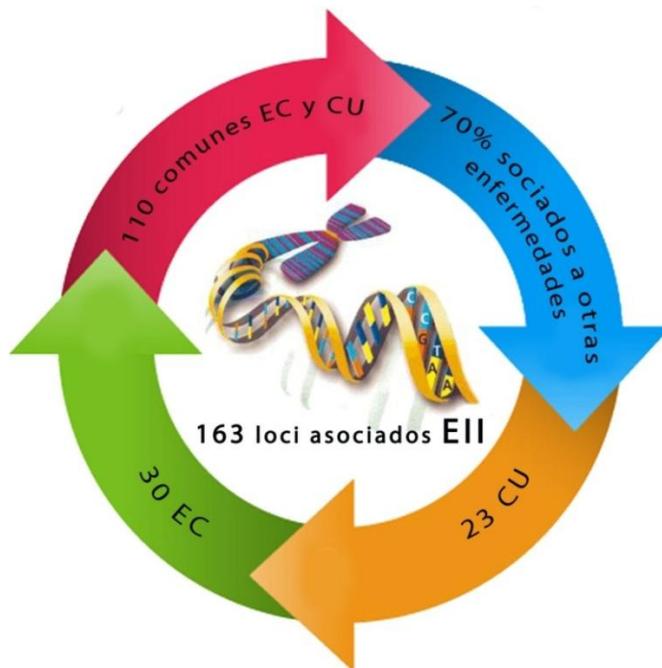
#### 1.3.1.- ALTERACIONES GENÉTICAS EN LA EC

Se han descrito múltiples alteraciones genéticas relacionadas con la EC. El desafío es determinar cómo estas variaciones génicas pueden precipitar y mantener la respuesta inflamatoria inapropiada a los gérmenes intestinales que se observa en la EC<sup>34</sup>.

La **agregación familiar** se conoce desde hace más de 70 años, al igual que la concordancia en gemelos; hechos que demuestran el componente genético de la EC<sup>6</sup>. Un estudio alemán mostró un 35% de **concordancia** de EC en **gemelos monocigóticos**, pero sólo del 3% en bicigóticos<sup>35</sup>. También se ha demostrado concordancia fenotípica sustancial (localización, comportamiento y edad al diagnóstico) en los gemelos monocigóticos<sup>36</sup>.

Se ha objetivado que los factores genéticos se asocian con el fenotipo de la enfermedad, su patrón, su curso evolutivo y su respuesta al tratamiento farmacológico<sup>37,38</sup>.

### 1.3.2.- GENES ASOCIADOS CON LA EII



**Figura 2.** Genes asociados con la EII.

Original para la presente tesis.

Se han objetivado hasta la actualidad **163 loci (lugares cromosómicos)** asociados con la EII, identificados en más de 25.000 casos de la enfermedad, y comparados con 50.000 controles. La mayoría son genes que controlan la expresión inflamatoria como los que codifican la proteína NOD2 (dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 2) o los receptores tipo Toll (TLR)<sup>34</sup>. De estos 163 loci, **110 son comunes** entre la EC y la CU, **30** se presentan en la **EC** y **23 son específicos para la CU**. Esta similitud del riesgo genético de las dos sugiere que casi todos los mecanismos biológicos implicados en una enfermedad tienen algún papel en la otra<sup>39</sup>.

Muchos de estos *loci* (**70%**, 113 ) están también **implicados en otras enfermedades inmunológicas**, especialmente la espondilitis anquilosante y la psoriasis. También se ha demostrado superposición entre estos loci de susceptibilidad para la EII con inmunodeficiencias primarias. Los genes implicados en esta superposición se correlacionan con niveles disminuidos de linfocitos T, disminución en concreto de los linfocitos Th17; o linfocitos T reguladores<sup>39</sup>.

Las inmunodeficiencias primarias que conllevan infecciones por micobacterias están aún más claramente relacionadas. 6 de los 8 genes autosómicos relacionados con la susceptibilidad a enfermedades por micobacterias están localizados en *loci* de la EII. También hay **superposición entre la EII y enfermedades micobacterianas complejas**. Así se ha demostrado asociación entre 7 de los 8 *loci* identificados para la lepra<sup>40</sup>. Se ha objetivado una especial relación entre los loci relacionados con la EII y la producción de citoquinas que median la inflamación, específicamente IFN- $\gamma$  (interferón  $\gamma$ ), IL-12, TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ) y la señalización de IL-10. También con la activación de los linfocitos T y B, y los linfocitos Natural Killer<sup>39</sup>.

Se han hallado más de 20.000 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) relevantes para la EII, de 1,23 millones de polimorfismos analizados en centros de todo el mundo<sup>41</sup>. Sin embargo, **una asociación** (correlación estadísticamente significativa) **no equivale a causalidad**, que es difícil de probar. La identificación de variantes genéticas causales en las secuencias de polimorfismos es el objetivo último<sup>42</sup>.

### 1.3.3.- FUNCIÓN DEL GEN NOD2/CARD15 Y SUS MUTACIONES

El gen NOD2 fue descubierto en 2001. Está localizado en el cromosoma 16q12. Fue el primer gen descrito que confería susceptibilidad para la EC y es el que más susceptibilidad confiere<sup>43,44</sup>. Existe una fuerte asociación entre los polimorfismos NOD2/CARD15 y la EC<sup>24</sup>.

NOD2 codifica una proteína que es un receptor intracelular para reconocer el MDP (muramil dipéptido), un peptidoglicano presente en bacterias gram positivas y negativas. La unión del MDP conlleva la activación del factor nuclear de transcripción de las células B (NF-κB), que induce la secreción de citoquinas proinflamatorias<sup>45</sup>. La estimulación de este MDP induce la autofagia, y modula tanto la inmunidad innata como la adaptativa. NOD2 también participa en la regulación de la respuesta inmune de las células T<sup>4</sup>.

El conocimiento del gen NOD2/CARD15 es básico en la apreciación de la importancia de la inmunidad innata en la EC. Su comprensión ha mejorado en los últimos años, aunque aún es incompleta. NOD2 se expresa de forma constitutiva en macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, así como en las células epiteliales y células de Paneth<sup>46,47</sup>.

Se han **asociado de manera definitiva mutaciones del gen NOD2 con un aumento de susceptibilidad a la EC ileal** en poblaciones occidentales y africanas<sup>48-50</sup>. La presencia de estas mutaciones de manera heterocigota conlleva un riesgo de EC ileal de 2-4 veces la normalidad, y la presencia homocigota o heterocigota compuesta 20-40 veces el riesgo<sup>51</sup>.

Los mutantes de NOD2 producen defectos selectivos funcionales en los leucocitos de los pacientes, que conllevan una producción disminuida de

TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , pero a un aumento de la secreción de IL-8. Además, los monocitos aislados de pacientes con la mutación 1007fs demostraron defectos en la producción de citoquinas proinflamatorias, en concreto de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8, así como la anti-inflamatoria IL-10<sup>52</sup>.

#### 1.3.4.- PAPEL DE LA AUTOFAGIA

La autofagia es un mecanismo celular consistente en la formación de una vesícula con doble membrana alrededor de una bacteria intracelular o con material citoplásmico celular, que permite una degradación eficiente<sup>53</sup>. Típicamente ocurre en respuesta al estrés, infección o inanición, para reutilizar proteínas celulares o aminoácidos<sup>15</sup>. La autofagia es uno de los mecanismos para mantener la homeostasis celular y se considera básico para la defensa del huésped contra microorganismos intracelulares<sup>4</sup>.

Los estudios de asociación del genoma completo han indicado que el **procesamiento intracelular de las bacterias por autofagia es un mecanismo patogénico fundamental de la EC**<sup>41</sup>. Se ha publicado la presencia de dos genes relacionados con la autofagia, ATG16L1 y IRGM, relacionados con riesgo de padecer EC<sup>54,55</sup>.

Las alteraciones en la autofagia resultan en un aclaramiento reducido de patógenos, que contribuye al inicio de desórdenes inflamatorios<sup>56</sup>.

### 1.3.5.- EPIGENÉTICA

Todos estos avances en la genética de la EC indican que los genes son un componente crítico en la patogénesis, pero también que los loci descubiertos hasta ahora pueden significar el 20-25% de la "heredabilidad" de esta patología<sup>6,57</sup>. Los **factores genéticos identificados suponen sólo una modesta proporción de la variabilidad de la enfermedad**: 13,6% para la EC y 7,5% para la CU<sup>39</sup>. Por lo tanto los factores genéticos tienen una influencia sólo parcial, indicando la necesidad de explorar mejor las interacciones gen-medio ambiente en el desarrollo de la enfermedad.

Los factores epigenéticos (cambios heredables en el ADN e histonas que no implican alteraciones en la secuencia de nucleótidos y modifican la estructura y condensación de la cromatina, por lo que afectan a la expresión génica y al fenotipo) pueden mediar interacciones entre el genoma y el medio ambiente. La epigenetización comienza en la fertilización y continúa a lo largo de toda la vida, causada por una gran cantidad de factores medioambientales, incluyendo tabaco, microbiota y dieta. Puede proporcionar una nueva visión en la patogénesis de la EC<sup>41</sup>.

La expresión genética puede ser alterada por cambios en la estructura y función de la cromatina. Los principales mecanismos epigenéticos son: metilación del ADN, modificaciones de las histonas, la interferencia del ARN y el posicionamiento de nucleosomas<sup>41</sup>.

El epigenoma puede considerarse tanto estable como plástico. Estable porque los cambios epigenéticos se pasan a las células hijas durante la mitosis. Sin embargo, el azar y los factores medioambientales causan cambios dinámicos al epigenoma a lo largo del tiempo<sup>58</sup>.

Durante la mitosis, el nivel de fidelidad de la replicación epigenómica es mucho menor que el de la secuencia genética (tasa de error de  $1 \times 10^6$  para la secuencia de ADN comparada con  $1 \times 10^3$  para las modificaciones del ADN) conduciendo a una acumulación de cambios epigenéticos a lo largo del tiempo<sup>59</sup>.



**Figura 3.** Papel central de la inmunidad en la patogenia de la EC Original para la presente tesis.

La inmunidad innata, y también la adaptativa, están en el centro del origen de la EC. Recogen influencias de la genética y epigenética, así como de factores medioambientales y nutricionales; y modifican la protección y

tolerancia de la microbiota intestinal, originando la inflamación crónica y perpetuando los mecanismos que perpetúan la enfermedad. Median entre los agentes medioambientales para determinar el tipo de fenotipo de la EII.



#### 1.4.- FACTORES MEDIOAMBIENTALES

No hay duda de que los factores medioambientales juegan un papel importante en la patogénesis de la EII. Múltiples agentes se han considerado de riesgo: tabaco, dieta, lactancia, fármacos, contaminantes, localización geográfica, estrés social y factores psicológicos.



**Figura 4.** Factores medioambientales en la patogénesis de la EII.

Original para la presente tesis.

Se han identificado en todo el mundo **gradientes geográficos** para la EC: norte-sur, este-oeste y urbano-rural. Sin embargo, un análisis geográfico sistemático, nuevos estudios de países del hemisferio sur hallando tasas que son casi las mismas que en el hemisferio norte y trabajos de una

incidencia aumentada en el medio rural y periurbano, van en contra de un componente geográfico independiente<sup>60</sup>.

De entre todos los factores medioambientales, el **tabaco** es el más estudiado, habiéndose confirmado su efecto protector en el desarrollo de la CU, con una tasa baja de brotes, y el aumento de riesgo de EC, con un aumento de riesgo de desarrollo de la enfermedad ante un consumo temprano del mismo y una mayor tasa de recidiva postquirúrgica<sup>61</sup>. Se ha relacionado también en la exposición fetal y en la infancia. Aparentemente ni la nicotina ni el monóxido de carbono son la causa<sup>6</sup>.

Se ha relacionado de manera amplia el **estilo de vida** como explicación posible de la enfermedad. Esto viene sugerido por las tasas de incidencia aumentada en grupos étnicos previamente menos afectados como los asiáticos y los hispanos, y en inmigrantes de zonas con baja incidencia que se trasladan a áreas con una elevada<sup>62</sup>.

Múltiples cambios en el estilo de vida de la población han sido relacionados con la EC, como el elevado nivel educativo, la presencia de situaciones vitales estresantes, el menor porcentaje de lactancia materna, la existencia de familias más pequeñas con condiciones de vida menos masificadas, la buena higiene doméstica y sanitaria, el mejor acceso y calidad del agua potable, el estilo de vida sedentario, la exposición a polución ambiental, y el consumo de dieta occidental con exceso de azúcar y grasas poliinsaturadas<sup>6</sup>.

Otro factor de riesgo novedoso es la **vitamina D**. Estudios recientes sugieren que juega un papel multifactorial, asociada a la EC. Son fundamentales las exposiciones al inicio de la vida: vitamina D de la madre y lactancia. Se ha demostrado un déficit frecuente de esta vitamina en pacientes

con EII y señalado que un nivel bajo de la misma aumentaría el riesgo de padecer la enfermedad<sup>63</sup>.

El efecto de la aspirina y los **antiinflamatorios no esteroideos** en el tracto gastrointestinal está bien documentado. Se han relacionado con el inicio o los brotes de la EII. *Ananthakrishnan et al.* no encontraron asociación entre la dosis, duración o frecuencia del uso de aspirina y el riesgo de EC o CU, pero la duración y el uso frecuente de antiinflamatorios se ha asociado con riesgo aumentado de estas dos patologías<sup>64</sup>.

Otro factor muy propuesto ha sido el **estrés**. Se ha sugerido que los individuos con bajos niveles de estrés tienen un riesgo reducido de iniciar la enfermedad. La ansiedad y la depresión pueden jugar un papel en mediar el deterioro de la enfermedad<sup>65</sup>. Sin embargo, una revisión Cochrane muestra que no hay beneficio de las intervenciones psicológicas en la EII<sup>66</sup>.

Por último, estudios epidemiológicos sugieren que la **polución** del aire puede contribuir al riesgo tanto de EC como de CU. A favor de estas investigaciones iría la incidencia creciente de estas patologías en paralelo al desarrollo de la industrialización. También que la polución elevada se asocia con un aumento de los polimorfonucleares circulantes y las citoquinas plasmáticas. Se ha encontrado que los niveles elevados de NO<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub> se correlacionan con un riesgo aumentado de EC y CU<sup>67</sup>. De igual manera, la polución conduciría a tasas aumentadas de hospitalización para las dos enfermedades<sup>68</sup>.

## 1.5.- LA TEORÍA INMUNOLÓGICA EN LA EC

Se ha publicado que los pacientes con EC presentan una respuesta inflamatoria alterada, que conlleva un aclaramiento retrasado de las bacterias que penetran la barrera intestinal, predisponiendo a la formación de granulomas y la cronicidad<sup>69</sup>.

Durante muchos años, la investigación de la patogénesis de la EII ha sido dominada por estudios de la inmunidad mucosa, especialmente la respuesta de las células T. La evidencia sugiere que la **disfunción de las respuestas inmunes, tanto adaptativa como innata, contribuye a la actividad inflamatoria intestinal aberrante**. La mayoría de estudios en las últimas dos décadas se han centrado en la respuesta adaptativa. Se pensaba que los dos tipos de EII tenían claramente dos formas diferentes de inflamación intestinal: la EC se consideraba consecuencia de una respuesta de los linfocitos Th1, mientras que la CU se asociaba con una respuesta anómala Th2<sup>4,70</sup>.

Recientemente se han descrito los linfocitos Th17, y se han implicado también en la respuesta inflamatoria en la EC, sobre todo a través de la citoquina proinflamatoria IL-23<sup>71</sup>. Este aumento de la actividad Th1 y Th17 conllevaría también un incremento de interferón- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 y IL-22<sup>72</sup>.

## 1.6.- DE LA AUTOINMUNIDAD A LA INMUNODEFICIENCIA

La teoría más en boga sobre el origen de la EC hasta hace pocos años era la de la autoinmunidad, pero en la última década cobra fuerza la **teoría de la inmunodeficiencia** como alteración primaria en la patogénesis<sup>73</sup>. Un buen número de estudios hacen pensar en la inmunodeficiencia como el factor etiopatogénico primario más relacionando, y concretamente con un déficit de la inmunidad innata<sup>45,70,74-9</sup>.

Estudios en animales y en enfermos con EC sugieren que existe una respuesta inmune innata aberrante contra las bacterias lumenales intestinales que podría ser el factor inicial en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, los mecanismos por los que los linfocitos T se activan son un dilema no resuelto<sup>45,76</sup>.

*Coloumbe* ha publicado en *Lancet* esta teoría de la inmunodeficiencia, basándose en estudios previos. Opina que la evidencia genética implica fuertemente defectos en la respuesta inmune temprana, especialmente los mecanismos de la **inmunidad innata y el manejo de las bacterias intracelulares en la patogénesis de la EC**<sup>76</sup>. Se ha demostrado una respuesta inflamatoria aguda alterada en la EC, tras una agresión o una lesión bacteriana<sup>80</sup>. Así, se ha objetivado un reclutamiento de neutrófilos disminuido tras la agresión con *Escherichia coli* subcutánea comparado con controles. También se ha demostrado una secreción de inmunoglobulinas alterada en los macrófagos obtenidos de sangre de enfermos con EC comparados con controles tras estimulación con *E. Coli*<sup>69</sup>. Basándose en estos estudios, los autores proponen que los niveles alterados de citoquinas pro-inflamatorias durante la fase aguda de la infección bacteriana conducen a un aclaramiento disminuido de estos organismos y su persistencia, que

provoca una inflamación crónica. Esto conllevaría una alteración del manejo de las infecciones bacterianas, especialmente las extracelulares, como *Salmonella*, *Listeria* o *Mycobacteria*<sup>69,76</sup>.

## 1.7.- LA TEORÍA AUTOINFLAMATORIA EN LA ETIOLOGÍA DE LA EC

Algunos autores creen que la EC se clasificaría dentro de las **enfermedades autoinflamatorias** (conjunto de enfermedades poco frecuentes caracterizadas todas ellas por la presencia de episodios inflamatorios agudos y recurrentes, que son consecuencia de una disregulación del control del proceso inflamatorio), debido a sus potentes vías inflamatorias. Son enfermedades como la fiebre mediterránea familiar o el síndrome periódico asociado al receptor del factor de necrosis tumoral o fiebre hiberniana familiar<sup>81</sup>.

Hay diversa evidencia a favor de esta teoría. Los pacientes con EII tienen un riesgo aumentado de desarrollar otras enfermedades inflamatorias crónicas<sup>20</sup>. Además, está demostrada, mediante estudios de asociación del genoma, la existencia de genes que confieren susceptibilidad para la EC y están compartidos con múltiples enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias<sup>34</sup>. También la positividad de anticuerpos antinucleares y anti-citoplasma del neutrófilo (ANCA) en un nivel mayor en la EC que en la población general. Por último, entre el 40 y el 70% de los pacientes con EC tienen niveles positivos de anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) que están asociados con la gravedad de la enfermedad<sup>82</sup>.

## 1.8.- LAS DOS INMUNIDADES

Aunque la inmunidad es única, sus componentes se suelen asignar a dos grandes bloques que trabajan en coordinación:

Tabla 1. Inmunidad Innata vs. Adaptativa		
	<b>INMUNIDAD INNATA</b>	<b>INMUNIDAD ADAPTATIVA</b>
<b>Nomenclatura</b>	Inespecífica	Específica o adquirida
<b>Distribución</b>	Todos los seres vivos	Vertebrados
<b>Velocidad de acción</b>	Segundos o minutos	Una semana
<b>Especificidad</b>	No identifica patógenos concretos	Identifica patógenos muy concretos
<b>Desarrollo</b>	Adquirida desde el nacimiento	Se desarrolla en el tiempo

Original para la presente tesis.

1- La **inmunidad innata o inespecífica**, que tienen todos los seres vivos. Carece de memoria inmunológica, pero es rápida, actúa en segundos o minutos. Es innata porque nacemos con ella. Es inespecífica porque no identifica patógenos concretos, sino más bien grupos de patógenos<sup>83</sup>.

Es la primera línea de defensa contra microorganismos invasores y es importante en el reconocimiento temprano y el inicio subsecuente de una respuesta inflamatoria<sup>79</sup>. Ayuda a iniciar la respuesta adaptativa<sup>20</sup>.

2- La **inmunidad adaptativa, específica o adquirida**, que es exclusiva de los vertebrados. Tarda aproximadamente una semana en desarrollarse y es la responsable de la memoria inmunológica. Es adaptativa porque se adapta al patógeno. Es específica porque identifica patógenos muy concretos. Es adquirida porque se desarrolla en el tiempo, no se nace con ella<sup>83</sup>.

La especificidad para cada antígeno es el resultado de una compleja maduración y desarrollo de las células inmunes. La respuesta adaptativa se basa en las células<sup>15</sup>.

## 1.9.- ALTERACIONES EN LA INMUNIDAD ADAPTATIVA

Se cree que la inmunidad adaptativa en la EC media y perpetúa, pero probablemente no inicie, la inflamación intestinal<sup>6</sup>. Sus alteraciones serían una consecuencia secundaria de la patología primaria en la barrera intestinal, dentro de la inmunidad innata<sup>70</sup>.

Se han descrito:

- Desequilibrio de los linfocitos T reguladores y efectores.
- Desequilibrio de diversas citoquinas.
- Alteraciones de la migración y retención de leucocitos<sup>6</sup>.

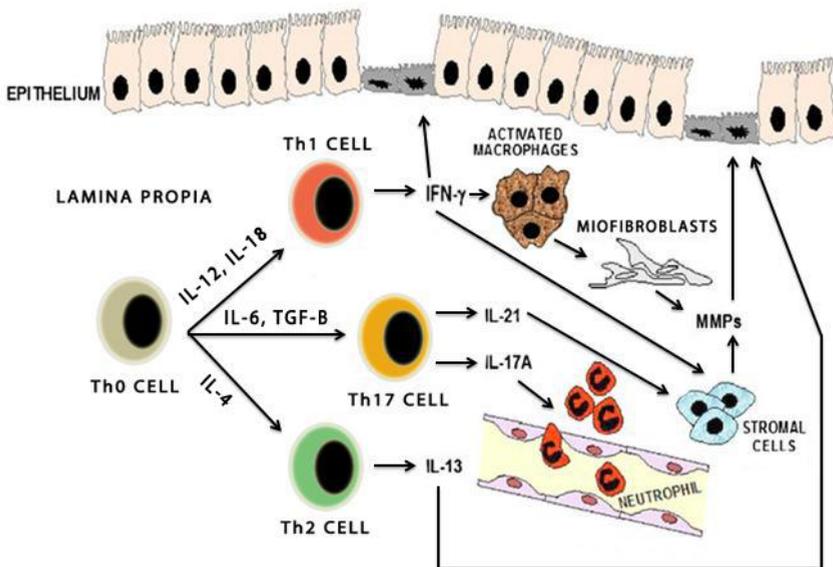


Figura 5. Componentes de la respuesta inmune adaptativa<sup>15</sup>.

### 1.9.1.- PAPEL DE LOS LINFOCITOS T EN LA EC

Los componentes del sistema inmune adaptativo cooperan unos con otros, y con el sistema innato, para construir una respuesta efectiva, capaz de eliminar los patógenos invasores. Los linfocitos Th0 pueden activarse y diferenciarse en **Th1, Th2 ó Th17**<sup>84</sup>.

Sin embargo, una respuesta de células T mal regulada, con desarrollo anormal de células T activadas, puede conducir al inicio de la inflamación por un exceso de citoquinas, con múltiples efectos patogénicos, tanto en la inmunidad innata como adaptativa. Así, basándose fundamentalmente en los niveles de citoquinas derivadas de las células T detectadas en la mucosa de pacientes con EII (IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-13), varios estudios han asociado EC y CU a diferentes respuestas inmunes proinflamatorias<sup>15</sup>. En la EC es característico un desequilibrio entre las células T efectoras y las células T reguladoras.

\*Los **linfocitos T efectores** son predominantemente T helper tipo 1 o 17, que defienden la mucosa contra bacterias, hongos y virus mediante la secreción de interferón  $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e interleuquinas (IL) 17 y 22.

\*Los **linfocitos T reguladores** secretan IL-10, factor de crecimiento transformante  $\beta$  o IL-35.

Estos dos fenotipos opuestos fundamentales, Th17 y T reguladores, están inversamente regulados. Los estudios de genoma en EC confirman este modelo, uniendo *loci* que están crucialmente involucrados en la diferenciación de los linfocitos reguladores (IL10, IL2RA, SMAD3) y de los TH1 y Th17 (CPEB4), con la EC<sup>85</sup>.

### **1.9.2.- DESEQUILIBRIO Th1 / Th2**

Analizando las interleuquinas en muestras de enfermos, se ha pensado que la EC se caracteriza por una respuesta inmune Th1, mientras que la CU se ha considerado una enfermedad mediada por las células Th2<sup>15,86</sup>. Sin embargo, múltiples estudios nos hacen reconsiderar el paradigma Th1/Th2, cosa aún en controversia<sup>86</sup>.

### **1.9.3.- LINFOCITOS Th 17 en la EC**

Los linfocitos Th17 son un tipo de células T caracterizados por la producción de gran cantidad de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22<sup>87</sup>. Se ha identificado otro subtipo de linfocito T, los linfocitos Th1/Th17, que liberan tanto IFN  $\gamma$  como IL-17A<sup>88</sup>.

El papel de los linfocitos Th17 y especialmente su citoquina IL-17A en la inflamación intestinal ha sido ampliamente estudiado<sup>15</sup>. Niveles de transcripción altos de IL-17A se han detectado tanto en mucosa de EC como en CU, en comparación con el intestino normal. También se ha estudiado por inmunohistoquímica que la IL-17A está sobreexpresada en la lámina propia de pacientes con EII<sup>89</sup>. Asimismo, la mucosa inflamada en la EII cultivada *ex vivo* produce niveles más elevados de IL-17A que la mucosa control, y la lámina propia de los pacientes con EII contiene más Th1 y Th1/Th17 que los controles<sup>90</sup>.

Además los linfocitos Th17 son una importante fuente de IL-21, una citoquina relacionada con la IL-2, que está regulada de forma positiva en la mucosa inflamada de la EII. La IL-21 induce las respuestas inmunes de Th1 y Th17 en el intestino<sup>91</sup>.

#### **1.9.4.- LINFOCITOS T REGULADORES (Treg) EN EII**

Los Treg están crucialmente involucrados en el mantenimiento de la homeostasis de la mucosa intestinal, suprimiendo las respuestas inmunes anormales contra la flora comensal o los antígenos de la dieta. En concreto lo realizan **produciendo citoquinas anti-inflamatorias**, Il-10 y TGF- $\beta$ , y previniendo la activación y la función efectora de las células T<sup>92</sup>.

Los Treg ejercen una **acción anti-inflamatoria** potente. Están deplecionados en la sangre periférica de pacientes con EII activa, comparados con pacientes con EII quiescente y controles<sup>93</sup>. De manera inversa, los Treg están aumentados en la mucosa intestinal de pacientes con EII, y su función es normal, como se demuestra por su capacidad de suprimir la proliferación de los linfocitos T efectores<sup>94</sup>. Sin embargo se ha observado que las células T en la lámina propia de los pacientes con EII no responden a la acción de los Treg<sup>95</sup>.

Por lo tanto, la disminución de la actividad anti-inflamatoria de los Treg puede ser tan importante como la mejora de los mecanismos efectores en la patogénesis de la EII<sup>15</sup>.

#### **1.9.5.- FUNCIONES DE LAS CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS DE LOS LINFOCITOS T**

Hay evidencias que establecen la contribución de las células T y sus citoquinas en el inicio y mantenimiento de la inflamación mucosa en la EII. La secreción de TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  e interferón  $\gamma$  se han relacionado con el inicio y establecimiento de la EC<sup>56</sup>. Además de la activación anormal de mecanismos efectores, la inflamación en la EII parece conducirse también por defectos en

los procesos anti-inflamatorios que tienen impacto en la respuesta inmune adaptativa<sup>96</sup>.

Las citoquinas y sus efectos básicos son:

**\*Interferón  $\gamma$ :**

Producida por las células Natural Killer dentro de la respuesta innata y por los linfocitos Th1 dentro de la adaptativa. Está aumentada en la EC, pero no en la CU<sup>97</sup>.

Induce la apoptosis de los enterocitos y desencadena la liberación de TNF- $\alpha$  por los macrófagos activados de la mucosa<sup>15</sup>.

**\*TNF- $\alpha$ :**

Citoquina central que induce la diferenciación de las células estromales a miofibroblastos y condiciona que produzcan metaloproteinasas de la matriz, un tipo de enzimas degradadoras de tejido que también inducen la apoptosis de los enterocitos<sup>98</sup>.

Además, el TNF- $\alpha$  une la inmunidad innata y la adaptativa, y tiene un papel crucial en la patogénesis de la EII, como demuestran los impresionantes resultados de los fármacos biológicos que lo bloquean<sup>99</sup>.

**\*IL-4**

Promueve la diferenciación de los linfocitos Th naive (Th0) a Th2.

Los Th2 producen IL-4, con efectos autocrinos en la diferenciación de los linfocitos.

Las células productoras de IL-4 están disminuidas en la EC<sup>97</sup>.

**\*IL-6:**

Está producida por macrófagos y linfocitos T, y tiene tanto actividad pro como anti-inflamatoria.

No se ha demostrado un papel central en la EII.

Su expresión está aumentada en la EC, y sus niveles están correlacionados con la actividad<sup>100</sup>.

**\*IL-7:**

No es una proteína relacionada de forma habitual con la EII. Aunque se produce fundamentalmente en la médula ósea, también se genera por las células epiteliales intestinales, regulando la proliferación de linfocitos en la mucosa intestinal.

Se ha descrito un aumento significativo en pacientes con EC pediátrica en remisión, comparados con los que presentaban enfermedad activa<sup>101</sup>. Nuestro grupo de investigación ha descrito niveles bajos de IL-7 en pacientes con EC respecto a los controles, tanto en remisión como en actividad<sup>102</sup>.

**IL-8:**

Producida por macrófagos y células epiteliales.

Su función principal es la quimiotaxis, con la atracción de los neutrófilos al lugar de la inflamación.

Está aumentada en EC, tanto en biopsias como en suero<sup>97</sup>.

**\*IL-10:**

Induce la respuesta Th2 que juega un papel crucial en la inmunidad adaptativa, induciendo anticuerpos específicos para evitar la invasión microbiana. Es también reguladora y anti-inflamatoria, contribuyendo a mantener la homeostasis corporal<sup>103</sup>.

**\*IL-13:**

Aumenta la permeabilidad intestinal e induce la diferenciación de los enterocitos y su apoptosis<sup>104</sup>.

**\* IL-17A:**

Induce reclutamiento de neutrófilos al lugar inflamatorio, y media la regulación positiva de moléculas inflamatorias<sup>15</sup>. Además, provoca la producción de citoquinas pro-inflamatorias por los macrófagos<sup>105</sup>. Estudios recientes han demostrado que la IL-17A puede tener tanto efectos pro-inflamatorios como protectores del tejido intestinal, dependiendo del modelo usado<sup>99,106</sup>.

**\*IL-21:**

Tiene un papel importante en la patogénesis de la EII.

Estimula las células estromales a producir metaloproteinasas, degradadoras de tejido, y mejora la secreción de proteína inflamatoria de macrófagos  $3\alpha$ <sup>15</sup>.

Potencia la expresión de los factores de transcripción relacionados con los Th1 y del IFN- $\gamma$  en los linfocitos T y en las células Natural Killer<sup>107</sup>.

Tiene capacidad pleiotrópica (un sólo gen es responsable de efectos fenotípicos distintos) para regular la diferenciación y función de los linfocitos T, aumentar la expansión clonal de los linfocitos T naïve CD4+ y CD8+ activados por antígenos, e inducir la expresión de los genes que codifican los receptores de la IL-12 y IL-18, el Interferón- $\gamma$  y el factor de transcripción T-bet en los linfocitos T de memoria activados<sup>107-8</sup>.

En los linfocitos B regula la diferenciación y producción de anticuerpos, incluyendo la producción de todos los tipos de Ig G, y estimula la activación de los linfocitos B, su expansión clonal y maduración<sup>107,109</sup>.

Se ha demostrado que la IL-21 se produce en exceso en el intestino de los pacientes con EC. Estudios con células humanas *in vitro* y en ratones sugieren el papel de la IL-21 como citoquina pro-inflamatoria en el intestino<sup>99,107,110</sup>.

Posee pues, múltiples vías por las que puede dañar el intestino, y la neutralización de la misma podría tener un papel terapéutico potencial en la EC<sup>107</sup>. Se ha demostrado que la expresión de IL-21 disminuye tras el tratamiento con Infliximab, el fármaco anti-TNF más conocido<sup>111</sup>.

#### **\*IL-23:**

Es una de la citoquinas críticas en la EC, y esencial en promover la inflamación crónica intestinal. Está fundamentalmente producida por los macrófagos<sup>112</sup>.

Es clave tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, y posee un papel central en conducir las respuestas tempranas contra microbios. Los polimorfismos de la IL-23 se han asociado tanto con la EC como con la CU<sup>4</sup>.

La IL-23 actúa sobre los linfocitos Th17, y además actúa sobre las células del sistema inmune innato. Estimula las poblaciones de células T innatas, que se encuentran especialmente en las mucosas, como los linfocitos T  $\gamma\delta$ , los linfocitos natural killer invariantes (invariant natural killer T cells) y las células T invariantes asociadas a mucosa. Tras la estimulación por la IL-23, estas células secretan citoquinas relacionadas con los linfocitos Th 17<sup>113</sup>.

#### **\*IL-25:**

También conocida como IL-17E, está involucrada en las respuestas inmunes en la mucosa intestinal, donde se expresa en las células T. Tiene un papel crítico en la atenuación de la inflamación intestinal destructiva. Su administración previene la inflamación intestinal en colitis experimental<sup>114</sup>.

Está disminuida en la mucosa inflamada de los pacientes con EII. Podría ser un regulador negativo de la respuesta inflamatoria en la mucosa intestinal<sup>115</sup>.

#### **IL-27:**

Producida fundamentalmente por las células mieloides, está aumentada en la mucosa en la EII, y se sugiere que es un mediador proinflamatorio. Sin embargo, se ha objetivado que reduce la producción de citoquinas proinflamatorias<sup>116</sup>.

## 1.10.- ALTERACIONES DE LA INMUNIDAD INNATA

Como hemos mencionado antes, en los últimos años se ha creado una corriente que encuadra la EII como un defecto primario de la inmunidad innata más que de la inmunidad adaptativa<sup>70</sup>. En este sentido va nuestra investigación sobre linfocitos B1.

La respuesta inmune innata representa nuestra primera línea de defensa frente a patógenos. Está mediada por una gran variedad de diferentes tipos celulares incluyendo:

-Células epiteliales

-Neutrófilos

-Células dendríticas

-Monocitos

-Macrófagos<sup>4</sup>

-Células de Paneth<sup>79</sup>

-Linfocitos Natural Killer<sup>4</sup>

-Miofibroblastos<sup>15</sup>

-Linfocitos T  $\gamma\delta$ <sup>117</sup>

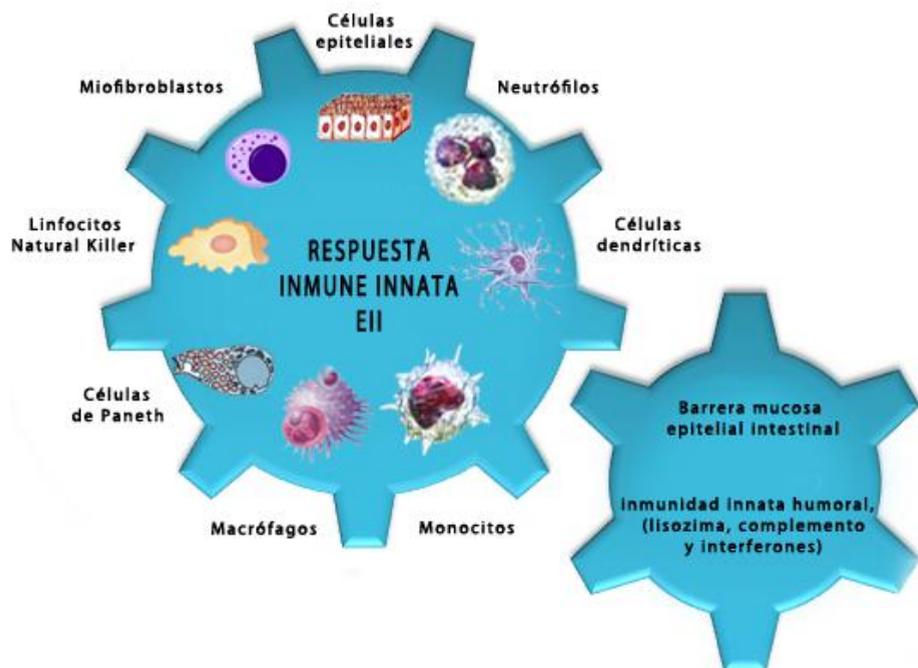
-Células linfoides innatas<sup>118</sup>

-Linfocitos B reguladores, dentro de los que se incluirían los linfocitos B1<sup>119</sup>.

También se incluye dentro de la inmunidad innata:

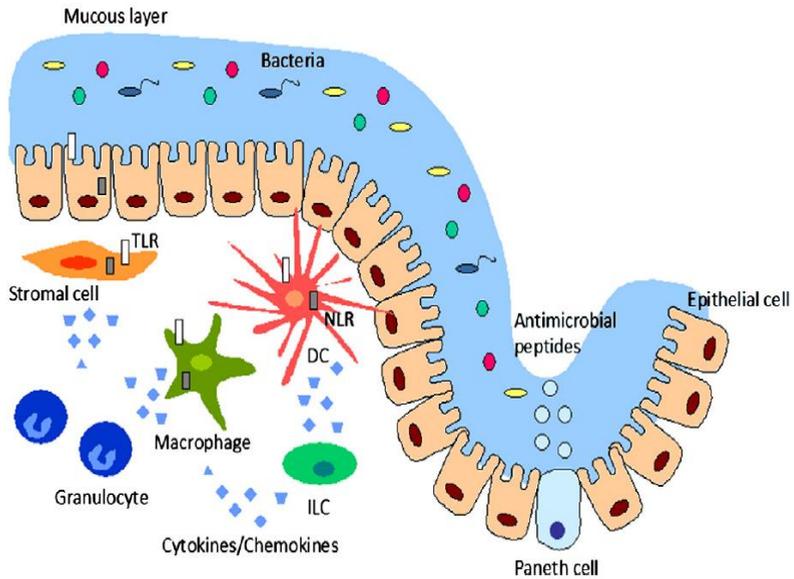
-La barrera mucosa epitelial intestinal

-La inmunidad innata humoral, que incluye la lisozima, el complemento y los interferones<sup>3,11</sup>.



**Figura 6.** Alteraciones de la inmunidad innata.

Original para la presente tesis.

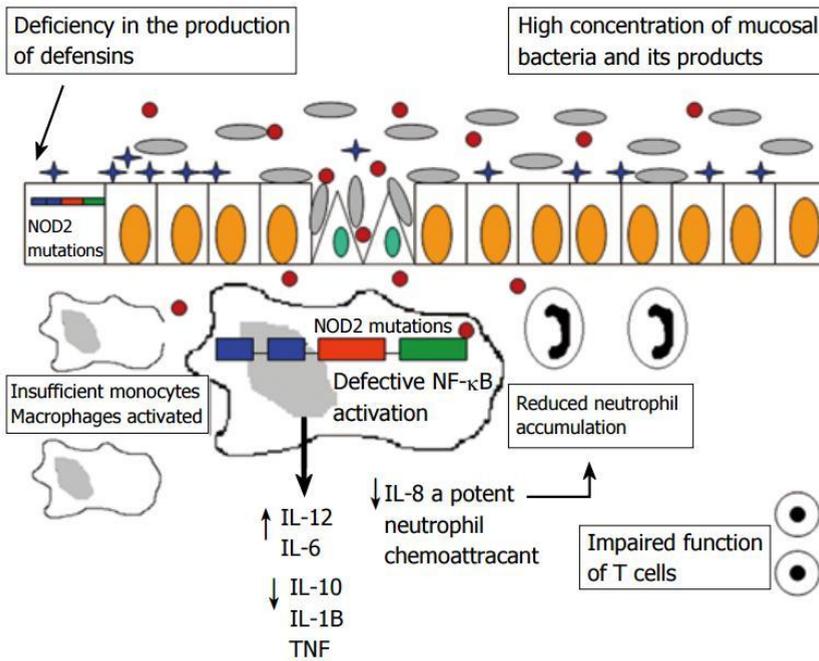


**Figura 7.** Componentes de la respuesta inmunitaria innata <sup>15</sup>.

Dentro de esta respuesta inmune innata alterada en la EII, se han descrito:

- Trastornos en la barrera intestinal
- Disfunción de las células de Paneth
- Estrés del retículo endoplasmático
- Autofagia y respuesta proteica deficiente
- Reconocimiento alterado de microbios por los receptores de reconocimiento de patrones, como los receptores tipo Toll de células dendríticas y macrófagos <sup>6</sup>.

- Composición del moco intestinal alterada<sup>70</sup>
- Deficiencia de  $\alpha$ -defensina en la EC de intestino delgado
- Deficiencia de  $\beta$ -defensina en la EC de colon<sup>70</sup>
- Deficiencia de linfocitos T  $\gamma\delta$ <sup>117</sup>
- Deficiente respuesta a la infección por los macrófagos<sup>120</sup>.



**Figura 8.** Alteraciones en la inmunidad innata en EC<sup>45</sup>.

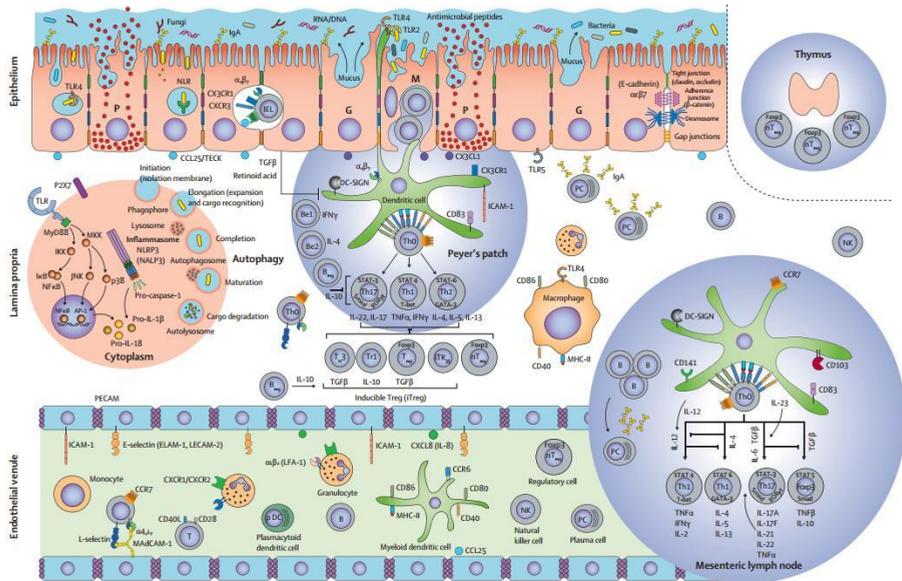


Figura 9. Sistema inmune de intestino delgado sano<sup>6</sup>.

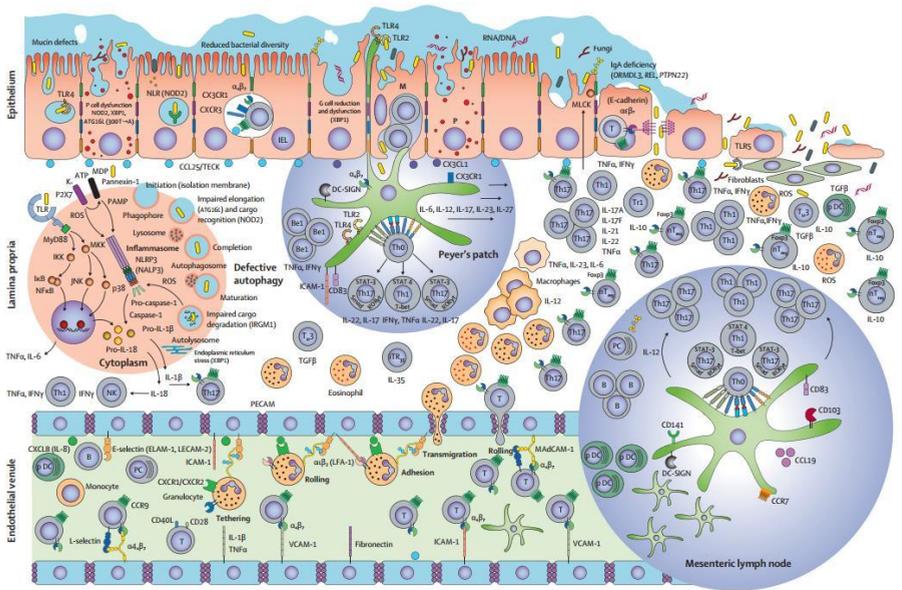


Figura 10. Sistema inmune intestinal en la EC<sup>6</sup>.

### 1.10.1.- ALTERACIONES EN LA BARRERA MUCOSA INTESTINAL

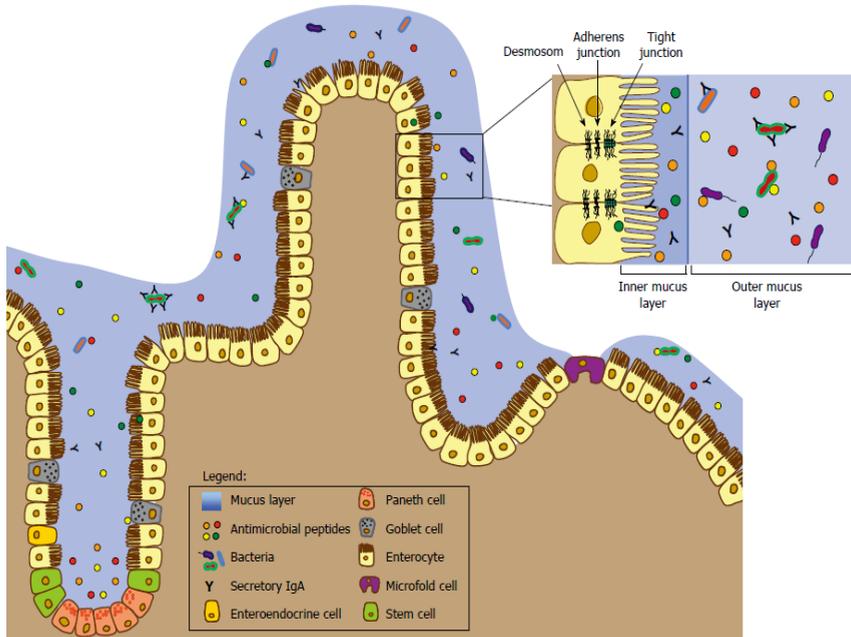


Figura 11. Mecanismos de defensa de la barrera mucosa intestinal sana<sup>14</sup>.

Existen métodos específicos e inespecíficos que en conjunto constituyen una compleja defensa, conocida como la barrera mucosa intestinal. Simplificando, está compuesta por dos componentes: la membrana celular del epitelio intestinal, lipídica, que impide el paso de sustancias hidrosolubles; y el espacio intercelular, controlado por las uniones estrechas, zónulas ocludens o "tight junctions"<sup>121</sup>. Estas estructuras permiten intermitentemente el paso de fluidos, nutrientes e incluso microorganismos desde la luz intestinal a la lámina propia<sup>122</sup>. Se abren y cierran en respuesta a múltiples estímulos, como estado nutricional, señales humorales o

neuronales, mediadores inflamatorios y diferentes reacciones celulares que pueden ser interferidas por patógenos<sup>123</sup>.

En la EC de intestino delgado se ha objetivado un **aumento de la permeabilidad intestinal**<sup>123</sup>. Hay estudios que demuestran que la permeabilidad intestinal anormal está presente meses o años previos a la expresión de la EII, precediendo en meses al brote de la misma<sup>124-5</sup>. Esto podría explicar que la permeabilidad tendría un papel patogénico en la enfermedad. No obstante, no está del todo claro si estas alteraciones son la causa o la consecuencia de la inflamación crónica<sup>15</sup>. Estudios recientes de asociación de genoma sugieren que estos defectos en la barrera epitelial podrían ser un mecanismo patogénico primario<sup>126</sup>.

En la EC las **uniones estrechas** se transforman en porosas, probablemente por cambios en la expresión de sus proteínas, lo que resulta en un aumento de la permeabilidad intestinal y un acceso de antígenos lumbinales a la lamina propia, que está densamente poblada con células inmunes<sup>127</sup>.

Otros componentes de la barrera intestinal son los péptidos antimicrobianos, como las defensinas y las catelicidinas (parte de la inmunidad innata), y la capa de moco intestinal<sup>14</sup>.

Existen **defectos** en la función de la **barrera epitelial intestinal** que son **característicos de la EC**:

- Alteraciones de los receptores tipo Toll
- Producción alterada de adenosín monofosfato (AMP)
- Deficiente capa mucosa
- Alteraciones en el proceso de autofagia

-Expresión disminuida de péptidos antimicrobianos

-Aumento de la permeabilidad intestinal.

Estos defectos en la barrera intestinal causan una protección inadecuada contra la adherencia e invasión microbiana<sup>4,14</sup>. Además, los fibroblastos y las células endoteliales de los capilares de la mucosa intestinal también expresan niveles elevados de citoquinas, selectinas (como la selectina E) y molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1 o CD54), que induce interacciones intermoleculares de los leucocitos de la sangre circulantes y provocan respuesta inflamatoria local<sup>107</sup>.

### **1.10.2.- ALTERACIONES EN LA CAPA DE MOCO**

La capa mucosa intestinal es parte de la barrera antibacteriana del intestino. Su función es la prevención de la adherencia e invasión bacteriana mediante un mecanismo físico. Está organizada como una **capa interna** y otra **externa**, consistentes en mucinas polimerizadas, que se secretan por las células caliciformes y cubren la superficie de la mucosa, expandiéndose en la luz, debido a su capacidad de ligar agua<sup>15,70</sup>.

La capa mucosa externa está parcialmente ocupada por bacterias comensales, que hallan importantes nutrientes en los glicanos de la mucina, mientras que la interna está libre de gérmenes<sup>70</sup>. La capa de moco y los péptidos antimicrobianos mantienen la barrera mucosa, y sus alteraciones han demostrado ser un mecanismo fisiopatológico central en la EII.

Se ha evidenciado una expresión disminuida del gen de la mucina MUC1 en el íleon terminal inflamado (enfermedad activa) de pacientes con EC, lo que sugiere que la cubierta de mucina se muestra insuficiente. Esta hipótesis se sustenta con estudios de asociación de genoma que unen los

genes MUC1, MUC 10 y PTGER4 a la enfermedad<sup>85</sup>. También se ha objetivado expresión reducida de ARN mensajero de MUC3, MUC4 y MUC5B en el íleon sin actividad de pacientes con EC<sup>15</sup>.

### 1.10.3.- ALTERACIONES EN LAS DEFENSINAS

Las defensinas son unos de los péptidos mucosos antimicrobianos secretados por los epitelios humanos. Se les llama también **antibióticos endógenos**, ya que tienen actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas y positivas, así como contra hongos, virus y protozoos<sup>70</sup>. La  $\alpha$ -defensina humana se expresa en las células de Paneth de las criptas del intestino delgado, y protege contra la invasión microbiana a través de nano-redes que engloban a los patógenos bacterianos<sup>128</sup>. Las  $\beta$ -defensinas se producen por la mayoría de células epiteliales<sup>15</sup>.

Las defensinas parecen formar parte de un arsenal de armas para combatir los patógenos microbianos y regular la simbiosis entre las bacterias comensales y la mucosa del huésped, a través de un sistema de regulación complejo<sup>70</sup>. Esta regulación entre los microbios patógenos y los comensales es, como ya se ha comentado, una de las claves en la patogenia de la EII.

Las defensinas y otros agentes bactericidas pueden producirse constitutivamente o inducidos por el reconocimiento de componentes bacterianos por receptores de reconocimiento de patrones (PRR), expresados en las células epiteliales tanto extra como intracelularmente<sup>15</sup>.

Algunos de estos PRR son los receptores tipo Toll (TLR), que se encuentran en la superficie celular, y las moléculas con dominios de oligomerización de nucleótidos (NODs), que se encuentran en el citoplasma<sup>79</sup>. Las mutaciones del gen NOD2 se asocian con la EC ileal,

teniendo un papel central en las alteraciones de las funciones de la inmunidad innata en el desarrollo de la EII, como se ha descrito en el punto 1.3.3.

Estudios recientes demuestran que el comportamiento de las células mediado por la inmunidad innata y la expresión y función de los TLR y las proteínas tipo NOD están alterados significativamente en los individuos con EC<sup>4</sup>. En los pacientes con EC ileal se ha demostrado una expresión disminuida de las  $\alpha$ -defensinas y de las células de Paneth<sup>129</sup>.

#### 1.10.4.- DEFICIENCIA DE $\beta$ -DEFENSINA EN LA EC DE COLON

La  $\beta$ -defensina 1 fue la primera identificada en el colon. Se ha demostrado que su expresión está reducida en el colon en la EII. Así mismo, la expresión del mRNA de la  $\beta$ -defensina 2 también está disminuida, cosa que parece mediada por la activación de NOD2<sup>70</sup>.

En la EC se ha demostrado además una inducción reducida de las  $\beta$  defensinas HBD2, HBD3 y HBD4 en el colon inflamado (activo) de los pacientes con EC comparados con los de CU<sup>130</sup>.

Así pues, parece demostrado que en los pacientes con EC colónico existe una **capacidad antibacteriana disminuida**, relacionada con la **fisiología alterada** de la secreción de los péptidos antimicrobianos, en concreto de las  **$\beta$ -defensinas**.

#### 1.10.5.- ALTERACIONES EN LAS CÉLULAS DE PANETH

Las células de Paneth son unas células epiteliales del intestino altamente especializadas. Defienden la barrera mucosa secretando gránulos

peptídicos antimicrobianos, como las  $\alpha$ -defensinas, la lisozima y la fosfolipasa A2; y regulan la tolerancia de la microbiota comensal<sup>131</sup>.

Las células de Paneth de pacientes con EC portadores de la variante 300T→A del gen de autofagia ATG16L1 tienen menos gránulos, que son además dismórficos y funcionalmente alterados, comparados con los de los pacientes con otras variantes. La conexión entre la alteración genética en ATG16L1 y la EC sería esta alteración de la secreción de péptidos antimicrobianos<sup>132</sup>.

También hay evidencia que asocia la disfunción de las células de Paneth y la inflamación ileal con polimorfismos en los genes XBP1 y NOD2<sup>133</sup>. Las células de Paneth expresan NOD2, especialmente en íleon terminal. Las mutaciones de NOD2 se correlacionan con disminución de la expresión de  $\alpha$ -defensina en la EC ileal<sup>129</sup>.

Así mismo, se ha asociado con la EC la función alterada del canal de potasio activado por Calcio (KCNN4). Este canal es importante para la secreción de péptidos antimicrobianos por las células de Paneth. La inhibición de este canal tiene como resultado la secreción disminuida de estos péptidos, con la consecuente reducción de la actividad antimicrobiana. Un polimorfismo de nucleótido de este canal de potasio (r2306801) se ha asociado con la EC, especialmente con la localización ileal<sup>70</sup>.

Así pues, las alteraciones en las funciones de las **células de Paneth**, especialmente las relacionadas con la **secreción reducida de los péptidos antimicrobianos**, parecen tener un papel central en la EC de intestino delgado.

### 1.10.6.- RECEPTORES TIPO TOLL

Los **patrones moleculares de los microorganismos**, como los lipopolisacáridos, el muramil dipéptido derivado de los peptidoglicanos, el ácido lipoteicoico, ARN de cadena simple o doble, ADN metilado, y componentes lumbinales de la dieta; **son reconocidos** por diferentes poblaciones de células del sistema inmune innato, **a través de receptores con patrones de reconocimiento** intraepiteliales y en la lamina propia, como los receptores tipo Toll (**TLR**), que son transmembrana, y los tipo **NOD** (dominio de oligomerización por unión de nucleótidos), citosólicos<sup>79</sup>.

Las **células dendríticas** expresan un amplio rango de receptores con patrones de reconocimiento e interpretan los patrones microbianos para dirigir otras células inmunes hacia la inmunidad o la tolerancia. Forman dendritas transepiteliales que son capaces de tomar muestras de antígenos lumbinales. Su distribución y su fenotipo se correlaciona con la actividad en la EC. En esta enfermedad se ha evidenciado un aumento de la expresión de los TLR tipos 2 y 4, y una respuesta exagerada a los lipopolisacáridos<sup>6,134</sup>.

Las células dendríticas sirven como **unión entre la inmunidad innata y la adaptativa**, presentando los antígenos a los linfocitos vírgenes de las placas de Peyer e induciendo su diferenciación<sup>135</sup>. Estos linfocitos son las células efectoras principales de la respuesta inmune adaptativa, y son activados a nivel intestinal para eliminar antígenos patógenos. Una vez los antígenos han sido eliminados, los linfocitos disminuyen mediante regulación negativa para así mantener la homeostasis intestinal<sup>11</sup>. Estas células son responsables de la organización de la relación entre los productos microbianos y las células del sistema inmune, y así provocar inmunidad o tolerancia de estos productos<sup>43</sup>.

La habilidad de las células dendríticas para inducir regulación hacia la tolerancia a los linfocitos T podría haberse perdido en la EC<sup>136</sup>.

### 1.10.7.- NOD2

**Tres polimorfismos** infrecuentes de un **único nucleótido de NOD2** (también llamado CARD15, dominio de reclutamiento de caspasa 15) se han **asociado con susceptibilidad de EC ileal**, con una odds ratio de 2,4 en individuos heterocigotos y 17,1 en homocigotos, siendo la mayor asociación con EII hasta la fecha<sup>137</sup>. Es además, el **defecto genético más frecuentemente asociado con la EC**<sup>79</sup>.

Los polimorfismos del **NOD2** están fuertemente relacionados con la EC y hay evidencia experimental que los une a una débil respuesta inflamatoria frente al muramil dipéptido de las citoquinas, a una autofagia inefectiva y a la transcripción de la IL-10<sup>138-9</sup>.

Como ya se ha comentado en esta introducción, existe una fuerte asociación entre los polimorfismos del gen **NOD2** y la EC. NOD2 codifica un receptor intracelular que está expresado fundamentalmente en los monocitos y las células de Paneth<sup>24</sup>.

Los receptores tipo NOD1 y NOD2 son estimulados por diferentes componentes de los peptidoglicanos bacterianos, y a través de varias vías provocan la activación del factor nuclear kB (NF-kB). Otros receptores tipo NOD contribuyen a la formación del inflamasoma (complejo multiproteico que incluye la caspasa), que conduce a la activación de la caspasa y a la secreción de la IL-1<sup>140</sup>. La estimulación de NLPR3, caspasa-1 y la pro-interleuquina-1 causa un aumento significativo de citoquinas

proinflamatorias, incluyendo TNF- $\alpha$ , e IL-6. La IL-17, IL-23 e IL-27, que son cruciales en las alteraciones inflamatorias de la enfermedad<sup>43</sup>.

Aunque el papel funcional de las mutaciones de NOD2 aún está en controversia, la evidencia sugiere que conducen a una activación reducida del NF-kB y de las defensinas  $\alpha$ , importantes en la barrera intestinal antibacteriana, y expresadas fundamentalmente en las células de Paneth del íleon<sup>129</sup>. Esta respuesta inadecuada podría tener como resultado una producción reducida del agente antibacteriano y una invasión microbiana patógena. Otros estudios sugieren que la pérdida de función de NOD2 podría tener como consecuencia la falta de inhibición de la estimulación de los TLR, llevando a una activación de la cascada inflamatoria y una respuesta excesiva Th1<sup>4</sup>.

#### **1.10.8.- ALTERACIONES DE LA FUNCIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS EN LA EC**

Los neutrófilos actúan como la **primera línea de defensa** en la interacción mucosa-microbio, matando y digiriendo las bacterias con vacuolas fagocíticas. El aclaramiento mediado por los neutrófilos de los microbios de la mucosa prevendría la activación y el reclutamiento de los monocitos y macrófagos.

Se han descrito varios defectos en los pacientes con EC, incluyendo una **migración de neutrófilos deficiente**, una disfunción del complemento que produce también alteración en el reclutamiento de neutrófilos, una **disminución de la función fagocítica y bactericida** de los neutrófilos; y una generación deficiente de superóxido en los mismos<sup>45</sup>.

También se ha objetivado una producción significativamente

disminuida de IL-8 y IL-1 $\beta$  en los macrófagos de los pacientes con EC. Los macrófagos de los pacientes con EC producen menos IL-8 en respuesta a agonistas proinflamatorios, sugiriendo que estas células pueden influir en la respuesta inflamatoria aguda. Los autores concluyen que en la EC el reclutamiento de neutrófilos reducido o retrasado en los lugares donde las bacterias penetran la barrera mucosa puede resultar en la **persistencia de las bacterias** y otros mecanismos que pueden conducir a la **inflamación crónica** típica de esta enfermedad<sup>80</sup>.

Estos datos sugieren que los pacientes con EC presentan una alteración generalizada de la respuesta inmune innata, como se demuestra por la respuesta disminuida a la inyección intradérmica de bacterias muertas, así como al trauma de la piel o del intestino<sup>45</sup>. Cuando se inyectan bacterias muertas en los antebrazos de pacientes con EC, se objetiva menos flujo sanguíneo que en los pacientes sanos. También se demostró disminución de la acumulación de neutrófilos y de IL-8 en los lugares del trauma<sup>80</sup>.

### **1.10.9.- ALTERACIONES EN LOS LINFOCITOS T $\gamma\delta$**

Hasta hace poco más de dos décadas se consideraba que todas las respuestas inmunes específicas eran realizadas por linfocitos T que expresaban en su superficie un heterodímero con dos cadenas proteínicas que se denominaban  $\alpha$  y  $\beta$ , que formaban parte del receptor de superficie TCR- $\alpha\beta$ . En 1984 se descubrió un nuevo tipo de receptor del linfocito T con homología a las inmunoglobulinas y cuyos genes se reordenaban en algunos de estos linfocitos T, al que se denominó **linfocito T gammadelta (LT $\gamma\delta$ )**<sup>141</sup>. Así pues, actualmente se conocen dos poblaciones distintas de linfocitos T dependiendo del tipo de receptor para antígeno que expresan en su membrana:

- **linfocitos T  $\alpha\beta$** , que expresan el receptor para antígeno TCR- $\alpha\beta$ .
- **linfocitos T  $\gamma\delta$**  que expresan el receptor para antígeno TCR- $\gamma\delta$ <sup>142-3</sup>.

Los linfocitos T  $\alpha\beta$ , son los más frecuentes en sangre periférica (90-95%), bazo y ganglios linfáticos, mediando respuestas inmunes específicas. Los linfocitos T  $\gamma\delta$ , sólo se encuentran un 5-10% en sangre periférica, y aparecen principalmente en epitelios, donde constituyen el 70 % en los linfocitos intraepiteliales de las mucosas<sup>144</sup>.

Hay dos características fundamentales que diferencian a los linfocitos T $\gamma\delta$  de los  $\alpha\beta$ . La primera es que los linfocitos T $\gamma\delta$  **reconocen proteínas directamente sin el procesamiento antigénico** previo por las *moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)*<sup>145-8</sup>. La segunda es que no reconocen (o sólo raramente) péptidos procesados por las células presentadoras de antígeno, más bien reconocen metabolitos microbianos fosforilados y péptidos lipídicos. Así, los residuos de fosfato fueron de los primeros ligandos relacionados con el reconocimiento antigénico de los TCR  $\gamma\delta$ <sup>149-50</sup>. Además del reconocimiento, anteriormente mencionado, de antígenos proteicos no procesados, otra propiedad de los LT $\gamma\delta$  es la de reconocer ligandos no peptídicos<sup>151</sup>, superantígenos bacterianos, como la enterotoxina A del *estafilococo*<sup>152</sup> y proteínas del shock térmico<sup>153</sup>.

Así pues, la falta de necesidad de procesamiento del antígeno permite a los linfocitos T  $\gamma\delta$  una respuesta rápida, y por su variedad en los modos de reconocimiento, una respuesta amplia; por lo que se le atribuye un importante papel en la inmunidad innata o inespecífica.

**El grupo de investigación liderado por el Dr. Andreu-Ballester** ha descrito recientemente un **déficit de linfocitos T  $\gamma\delta$  en pacientes con**

**EC**<sup>117</sup>. Además, ha demostrado en este grupo de pacientes una **deficiencia de IL-7 en sangre periférica**<sup>102</sup>.

Posteriormente demostramos la presencia de un aumento de anticuerpos específicos Ig E anti-*Encephalitozoon* en el suero de pacientes con EC, identificando microsporidios en el 30% de los tejidos, frente a su ausencia en controles, como ya se ha comentado previamente en este trabajo<sup>31</sup>. Los pacientes con Ig E anti-*Encephalitozoon* positiva mostraban niveles bajos de IL-7 con respecto a los pacientes Ig E anti-*Encephalitozoon* negativos. Más aún, los pacientes con PCR positiva para microsporidios se relacionaban con niveles bajos de IL-7 comparados con los niveles en pacientes con PCR negativos para microsporidios. Esto sugiere que la **EC es un factor de riesgo para la microsporidiasis, una infección oportunista** en pacientes inmunodeprimidos<sup>32-3</sup>.

#### **1.10.10.-LOS MACRÓFAGOS ACTIVADOS ALTERNATIVAMENTE**

El tracto gastrointestinal contiene el *pool* de macrófagos más grande del cuerpo humano. Están derivados de los monocitos de la sangre y pueden diferenciarse a varios tipos en respuesta a diferentes estímulos medioambientales. Sus funciones son la fagocitosis de células dañadas y apoptóticas, y restos celulares. También tienen actividad antimicrobiana y capacidad de secretar citoquinas proinflamatorias.

La **EC** se asocia con un **número de macrófagos aumentado** en la lámina propia. Además los macrófagos en la EC tienen un fenotipo diferente y están funcionalmente **alterados**. Producen mayores cantidades de IL-12, IL-23, TNF- $\alpha$  e IL-6. Sin embargo, aún es incierto si en la EC los macrófagos están hiperactivados o hipoactivados<sup>97</sup>.

Un nuevo estudio en EC ha demostrado una respuesta deficiente a la infección por *E.coli* de los macrófagos, independientemente del fenotipo y genotipo de la EC y de la patogenicidad de la *E. coli*. Los autores concluyen en la línea de nuestra investigación, sugiriendo que una inmunodeficiencia del huésped es la clave para la persistencia de *E. coli* intramacrófago en la EC<sup>120</sup>.

Recientemente descritos, los **macrófagos activados alternativamente tienen función antiinflamatoria**, y hay evidencia de que podrían regular la inflamación intestinal. Están activados por la IL-4 ó la IL-13<sup>118</sup>.

Inhiben la proliferación de linfocitos T y suprimen las infecciones protozoarias mediante la producción de citoquinas reguladoras, como la IL-10 o el TGF- $\beta$ <sup>154</sup>.

El papel regulador y antiinflamatorio se hace patente en estudios sobre el interesante fenómeno por el que las **infecciones por helmintos mejoran la gravedad de colitis** en ratones y en humanos. Ensayos clínicos han demostrado la eficacia del helminto intestinal *Trichuris suis* en el tratamiento de EC activa en pacientes<sup>155</sup>.

Estudios recientes han mostrado que pacientes con EC activa tienen bajos niveles de macrófagos alternativamente activados (CD68+ CD206+), mientras que las biopsias colónicas de pacientes con EC inactivas tienen aumentado el número de estas células<sup>156</sup>.

De igual manera, se ha demostrado que el tratamiento con anti-TNF aumenta el infiltrado de macrófagos activados alternativamente en pacientes con EC activa<sup>157</sup>.

### 1.10.11.- LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS REGULADORAS

Como se ha explicado en la presente introducción previamente, las células dendríticas son uno de los componentes más importantes del sistema inmune innato. Son las **células presentadoras de antígeno más efectivas** y tienen capacidad para unir la inmunidad innata y la adaptativa.

En los últimos años, se ha asentado el conocimiento sobre el papel central de las células dendríticas en inducir respuesta inflamatoria contra los patógenos y tolerancia a la microflora comensal<sup>118</sup>.

Según la expresión del marcador de superficie CD103, las células dendríticas intestinales se han dividido en 2 tipos fundamentales<sup>158</sup>:

-Las CD11c<sup>high</sup> **CD103-**, que tienen propiedades **proinflamatorias** y están aumentadas en colitis murrina. Inducen los linfocitos Th1 y el desarrollo de los Th17<sup>159</sup>.

-Las CD11c<sup>high</sup> **CD103+**, que tienen función **reguladora** en el intestino.

Estas últimas han demostrado en la lámina propia del intestino delgado facilitar la diferenciación de los linfocitos T reguladores, así como inhibir la proliferación de linfocitos T CD4+ y prevenir la inflamación intestinal<sup>160</sup>.

### 1.10.12.- PAPEL DE LOS LINFOCITOS B REGULADORES (Breg)

Clásicamente el papel conocido de los linfocitos B era la producción de anticuerpos. También presentan antígenos a las células T y secretan

citoquinas, como **reguladores positivos de la respuesta inmune**. Además, los linfocitos B son una fuente de citoquinas inhibitorias como la IL-10 y el TGF- $\beta$ <sup>107</sup>. Según las señales que reciben, los **linfocitos B pueden producir citoquinas pro o antiinflamatorias**<sup>161</sup>.

Estudios en enfermedades autoinmunes han descrito un tipo de células B, los **Breg, que suprimen las respuestas inmunes**, con función descrita en trasplante, cáncer e inflamación, fundamentalmente mediada con la IL-10<sup>119</sup>. Los Breg fueron descritos por primera vez en 2002. Se definieron como linfocitos B productores de IL-10 que mantenían la homeostasis inmune<sup>162</sup>.

Los Breg regulan el **balance de Th1, Th17 y Treg**. Además, pueden convertir linfocitos T efectoras en linfocitos T reguladores tipo 1, productores de IL-10, con función anti-inflamatoria<sup>118</sup>.

Los linfocitos B CD19+ CD25+ fueron los primeros en describirse con función reguladora. Son los encargados de producir grandes cantidades de TGF- $\beta$ . Sin embargo, aún se desconoce completamente como identificar los Breg con marcadores de membrana o factores de transcripción. Podrían usarse los receptores de células B, CD40 o receptores tipo Toll<sup>107</sup>.

En 2010 se describieron un nuevo **tipo de Bregs, CD19+,CD5+ y Foxp3+**, pero su papel inmunológico es desconocido. Sería un subtipo de linfocito B1, que son los que estudiamos en nuestra investigación<sup>163</sup>.

Los linfocitos B protectores son **CD5+ CD1d**, activados vía TLR2/4 por antígenos bacterianos de la flora intestinal. Éstos formarían parte de los linfocitos B1, que son los que analizamos en el presente estudio. El equilibrio

entre linfocitos B efectores y reguladores está influenciado por la microbiota intestinal<sup>164</sup>.

En 2014, un estudio en ratones ha descrito que la IL-33 era capaz de inducir linfocitos T productores de IL-10<sup>165</sup>.

También en 2014, un estudio publicado en *Nature*, en ratones, ha demostrado que un tipo de linfocitos B activados, las células plasmáticas CD138+, producen IL-35 y podrían prevenir la inflamación intestinal tras una infección por *Salmonella*<sup>166</sup>. Todo esto hace pensar que los Breg pueden ejercer su función supresora también con otros factores además de la IL-10.

### 1.10.13.- CÉLULAS LINFOIDES INNATAS

Recientemente se han caracterizado las células linfoides innatas, unos nuevos miembros del sistema inmune innato, hasta ahora desconocidos, con ausencia de marcadores de superficie diferentes de otras células inmunes<sup>118</sup>. Se encuentran actualmente **en investigación**, pero según las citoquinas que producen se han clasificado en 3 grupos<sup>167</sup>:

-Células linfoides innatas tipo 1:

Son las células linfoides innatas 1 y las células Natural Killer.

Expresan T-bet (factor regulador de transcripción de linfocitos T), IFN- $\gamma$  y TNF.

-Células linfoides innatas tipo 2:

Son similares a los linfocitos Th2, y producen las citoquinas propias de los linfocitos Th2. Son células natural helper, nuocitos y células progenitoras multipotentes tipo 2.

-Células linfoides innatas tipo 3:

Son similares a los linfocitos Th17.

Producen IL-22, IL-17A e IL-17F.

Las células linfoides innatas, especialmente las tipo 1, han sido descritas con papel en la regulación de la respuesta inmune del intestino, pero sus mecanismos subyacentes permanecen desconocidos<sup>118</sup>.

Recientemente se han objetivado varias de sus funciones. Un artículo de 2013 en *Nature*, describe que las tipo 3 tienen papel como células presentadoras de antígeno, pero sin provocar la proliferación de células T, sino frenando la respuesta de linfocitos T CD4+ contra las bacterias comensales<sup>168</sup>. También se ha objetivado que las células linfoides tipo 3 están implicadas en la protección y restablecimiento del daño epitelial y colitis<sup>169</sup>, siendo además células efectoras del sistema inmune innato y facilitando la resistencia a los patógenos intestinales<sup>170</sup>.

## 1.11.- LINFOCITOS B1

Clásicamente se consideraba a los linfocitos B como parte de la inmunidad adaptativa, ya que su principal característica es la producción de anticuerpos específicos o inmunoglobulinas<sup>83</sup>.

Sin embargo, actualmente, una de las **subpoblaciones linfocitarias** consideradas como elementos del **sistema inmune innato** son los linfocitos B1.

Se conocen actualmente tres **poblaciones de linfocitos B** maduros con capacidad para producir anticuerpos:

- los **linfocitos B convencionales o linfocitos B2** (LB2) también conocidos como linfocitos B foliculares;
- los **linfocitos B de la zona marginal esplénica**
- y los **linfocitos B1** (LB1)<sup>171</sup>.

Mientras que los LB2 deben diferenciarse a células plasmáticas para poder secretar inmunoglobulinas específicas, los LB1 liberan espontáneamente anticuerpos Ig M al medio extracelular y se localizan fundamentalmente en peritoneo y pleura<sup>172</sup>. Estas células presentan características de células activadas y son de mayor tamaño y complejidad citoplasmática que las células B2<sup>174-5</sup>. Los LB1 no sólo producen Ig M natural sino que también son importantes en la producción de Ig A en el tejido linfoide asociado a las mucosas o sistema MALT<sup>176</sup>. Los anticuerpos producidos por los linfocitos B1 tendrían un papel protector, ya que están implicados en la remodelación de células envejecidas y apoptóticas, en mecanismos de inmunomodulación y en resistencia a infecciones. Sin embargo, su participación en procesos autoinmunes también ha sido sugerida<sup>173</sup>.

Dentro de las células B1 se distinguen **dos subpoblaciones**:

-**Linfocitos B1a** (LB1a) que son más numerosos y que expresan el marcador común a todos los linfocitos T, **CD5**. Son los que analizaremos en profundidad en nuestra investigación.

-**Linfocitos B1b** (LB1b), aquella subpoblación que no lo expresa<sup>177</sup>.

Los linfocitos B1a son numéricamente superiores a los B1b, y es por ello que la mayoría de la información disponible sobre los linfocitos B1 se refiere a la población B1a<sup>173</sup>.

Los LB2 que se diferenciarán en células plasmáticas son los encargados de desarrollar una respuesta adaptativa que, aunque de forma lenta, es específica para un patógeno concreto. A esta respuesta, que requiere de la interacción de las células B2 y las células T cooperadoras, se la denomina Timo dependiente o T-dependiente<sup>178</sup>.

Sin embargo, los LB1 sobre todo y las células B de la zona marginal en menor proporción, producen anticuerpos naturales, de baja afinidad y alta reactividad, que contribuyen a la primera línea de defensa contra agentes infecciosos extracelulares, y son la única protección frente a bacterias encapsuladas<sup>179</sup>. Son por tanto, parte de la inmunidad innata, como hemos explicado previamente.

Uno de los aspectos más relevantes de las células B1 peritoneales murinas es quizás su capacidad de autorrenovación, ya que producen y liberan IL-10, factor autocrino que media la proliferación y supervivencia de las mismas<sup>173</sup>.

Tienen un papel crítico en la autoinmunidad (enfermedades autoinmunes no específicas de órgano, como artritis reumatoide, lupus y síndrome de Sjögren), infección, inflamación y enfermedades malignas<sup>173,180</sup>, pero se sabe poco al respecto de su papel en la EC.

El **presente estudio** de investigación sigue en nuestra línea de estudiar el papel de la **inmunidad innata** en la **patogénesis de la EC**. Casi nada ha sido publicado sobre el papel de los **linfocitos B1 en la EC**. Tan sólo un trabajo evidenció que en la periferia de los granulomas de los pacientes con EC los linfocitos B1 pueden estar presentes<sup>181</sup>. *Defendenti et al*<sup>182</sup> demostraron que únicamente el 20% de los pacientes con EC presentan infiltración de linfocitos B1 en sus tejidos, mientras que este porcentaje llega al 70% en la colitis ulcerosa. A partir de aquí hemos diseñado la tesis que ahora presentamos.



## 1.12.- CONSECUENCIAS DE LOS ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS EN EL TRATAMIENTO DE LA EC

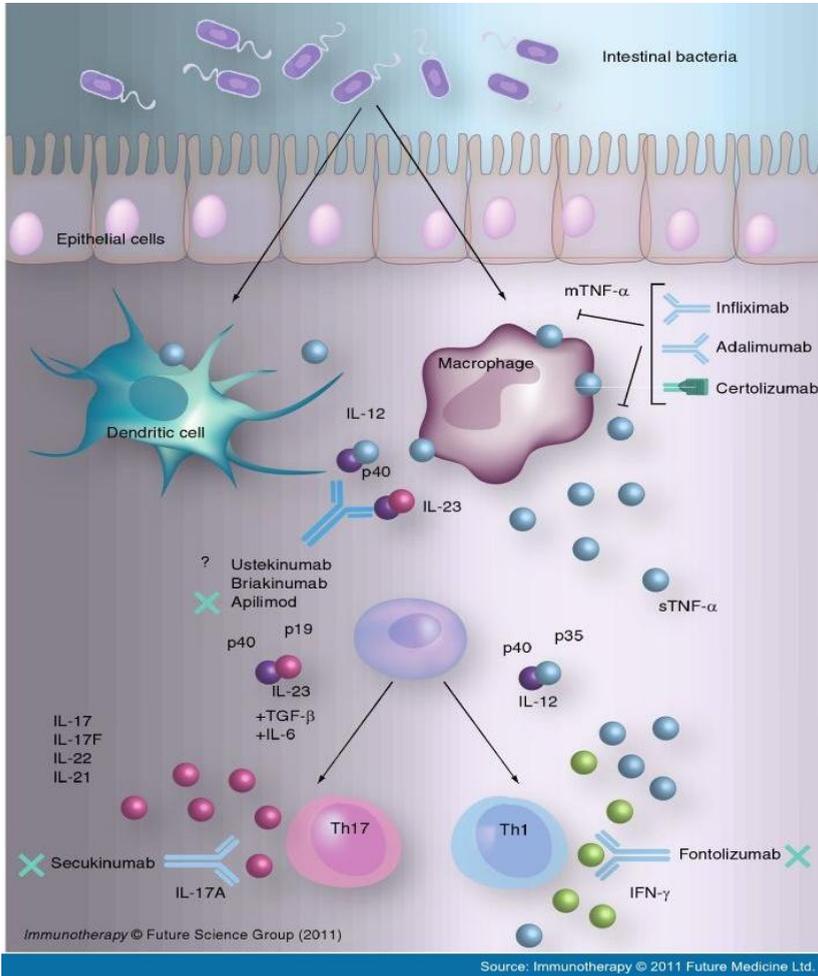


Figura 12. Bloqueo de citoquinas en EII<sup>183</sup>.

A pesar de que la introducción en 1998 de los fármacos anti-TNF ha supuesto una mejoría notable en el tratamiento de la EC, aún hay muchos pacientes difíciles de tratar. Aproximadamente un tercio de los pacientes con

EC no responden a los anti-TNF<sup>184</sup>, y un 10% de todos los enfermos con EC no toleran o son no respondedores primarios a todos los fármacos usados para la enfermedad<sup>185</sup>. Además, el número de cirugías en EC permanece estable<sup>186</sup>. Todo esto hace necesaria la investigación sobre nuevos tratamientos para estos pacientes.

Se han propuesto numerosas dianas terapéuticas para la EC: interleuquinas 6, 10, 11, 12, 17 y 23; TNF- $\alpha$ , interferón  $\gamma$ , células CD3 y CD4, la migración y expansión leucocitaria, la presentación de antígenos por monocitos, macrófagos y células dendríticas, el crecimiento de células epiteliales, el metabolismo y composición microbiana.

También se han diseñado diferentes componentes para atacar estas dianas: anticuerpos monoclonales, proteínas de fusión, moléculas pequeñas, factores de crecimiento recombinantes y oligonucleótidos.

La predicción de cuál funcionará con pacientes es extremadamente difícil. Deberían incorporarse a la selección de enfermos para los estudios futuros, las características genéticas individuales y los factores medioambientales de cada paciente, derivados de los datos de los estudios de asociación del genoma<sup>6</sup>.

### 1.12.1.- BLOQUEO DE CITOQUINAS CLAVE

La IL-12 afecta vías compartidas por enfermedades inflamatorias crónicas genéticamente relacionadas, pero fenotípicamente diferentes, como la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide y la psoriasis. Los anticuerpos contra la subunidad p40 de las interleuquinas 12 y 23, **Briakinumab y Ustekinumab**, han mostrado eficacia en estudios de fase 2 y se están realizando en fase 3<sup>187-8</sup>. Sin embargo, fueron sólo mínimamente superiores a placebo en inducir la remisión clínica<sup>189-90</sup>. Ustekinumab fue más efectivo que placebo en reducir la actividad clínica de pacientes con EC resistentes a anti-TNF<sup>187</sup>.

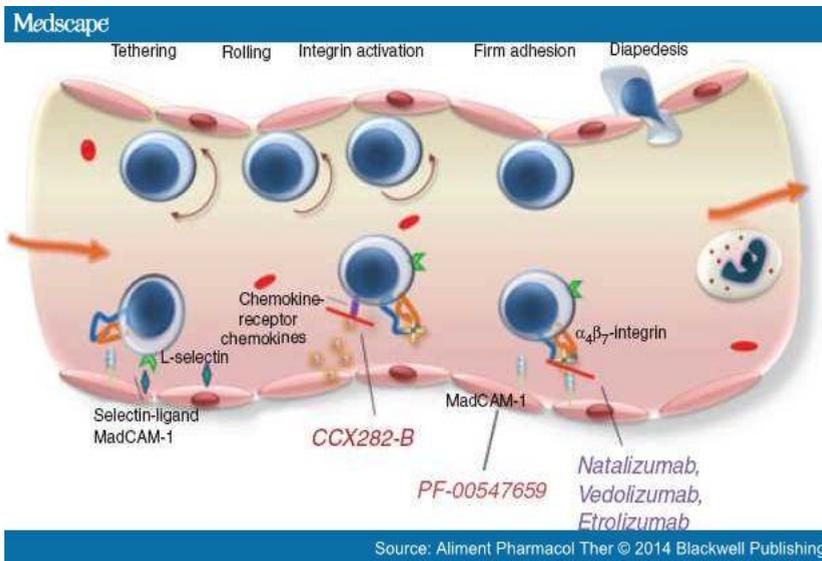
Tres estudios diferentes probando la eficacia de **Fontolizumab**, un anticuerpo anti-IFN $\gamma$ , mostraron que no era beneficioso en la EC activa<sup>191-3</sup>.

**Secukinumab**, un anticuerpo neutralizante de la IL-17A, no ha sido eficaz en EC activa<sup>106</sup>. Así, la pregunta clave es por qué los fármacos neutralizantes de la acción de los linfocitos Th1 y Th17 no son eficaces. Una de las respuestas es la demostración reciente de que la producción de citoquinas de los linfocitos Th1 y Th17 cambia a lo largo de la enfermedad<sup>5</sup>.

Hay que tener en cuenta también que las citoquinas de los linfocitos Th1 y Th17 son antagonistas. Así, la inhibición del IFN- $\gamma$  supondría además de suprimir las vías inflamatorias dependientes de éste, activar las inducidas por los Th17. Esto explicaría también porqué secukinumab no es eficaz, debido a una posible producción de IFN- $\gamma$ <sup>5</sup>.

### 1.12.2.- BLOQUEO DE LA MIGRACIÓN, ADHESIÓN Y DIAPÉDESIS LEUCOCITARIA

El **Vedolizumab**, un anticuerpo Ig G1 monoclonal contra la **integrina  $\alpha 4\beta 7$** , tiene una actividad enfocada a la unión  $\alpha 4\beta 7$  de los linfocitos T con la molécula de adhesión MAdCaM-1. Como MAdCAM-1 se expresa casi exclusivamente en el tracto gastrointestinal (intestino delgado y colon) podría tener ventajas. Podría considerarse un inmunosupresor específico del intestino, lo que lo hace especialmente atractivo<sup>194-5</sup>. Ha sido aprobado en 2014 tanto en Estados Unidos como en Europa, y en los ensayos es eficaz con pocos efectos secundarios<sup>196</sup>.



**Figura 13.** Efecto de vedolizumab y diferentes nuevos fármacos<sup>197</sup>.

El fármaco **PF-00547659** es una Ig G2 dirigida contra el MAdCAM, que tiene la misma diana que el Vedolizumab<sup>195</sup>.

**AJM300** es un fármaco oral anti integrina  $\alpha 4$ , consistente en una pequeña molécula que ha demostrado eficacia en animales y en un estudio randomizado y controlado con placebo en pacientes con EC<sup>198</sup>.

**Etrolizumab** es un anticuerpo humanizado monoclonal, Ig G1, contra la subunidad  $\beta 7$  de las integrinas  $\alpha 4\beta 7$  Y  $\alpha E\beta 7$ <sup>195</sup>. Se ha mostrado eficaz en un ensayo en fase 2<sup>199</sup>.

El receptor de citoquinas **CCR9**, juega un importante papel en la diapédesis leucocitaria. GSK-1605786A y CCX282-B (o **Vercirnon o Traficet-EN**) son pequeñas moléculas administradas oralmente que bloquean selectivamente este receptor CCR9 que también se han estudiado en pacientes con EC, con resultados dispares<sup>195</sup>.

El **Alicaforsen** es un nucleótido que inhibe ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1), y que está aún en evaluación<sup>56</sup>.

### 1.12.3.- INHIBIDORES DE LA JANUS QUINASA (JAK)

Se están desarrollando nuevas pequeñas moléculas, que tienen ventajas respecto a los anticuerpos que usamos actualmente, como que son más baratas y se administran vía oral. Las más avanzadas son los inhibidores de la janus quinasa. Esta quinasa tiene un papel clave en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación y las funciones de las células inmunes. Puede convertir señales extracelulares como las citoquinas o los factores de crecimiento en respuestas genómicas<sup>195</sup>.

El **Tofacitinib** inhibe la JAK1 y la JAK3, cuyas señales resultan en reducir la síntesis de citoquinas proinflamatorias. Un estudio en pacientes con EC activa moderada y severa alcanzó una respuesta de hasta el 58%, aunque

frente a un placebo del 47%. Se está realizando un estudio en fase dos con criterios de inclusión más estrictos<sup>200</sup>.

#### 1.12.4.- LAQUINIMOD

El Laquinimod es un inmunomodulador que tiene efectos antiinflamatorios modulando las células inmunes, con reducción de la síntesis de varias citoquinas. Está en desarrollo en la EC, pero requiere más estudios.

Todos estos datos nos sugieren que la eficacia de los tratamientos podría deberse más a la muerte de los linfocitos T patogénicos más que a la inhibición de una citoquina soluble única<sup>5</sup>.

#### 1.12.5.- BLOQUEO DE MOLÉCULAS CONTRA-REGULADORAS

Se han descrito varios defectos en los mecanismos contrareguladores en la EII, que se supone que contribuyen al mantenimiento y amplificación de la respuesta mucosa perjudicial.

Así, se ha descrito una actividad defectuosa del **factor de crecimiento transformante  $\beta$  1**, una citoquina producida por células inmunes y no inmunes que es capaz de suprimir las respuestas de las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T patogénicos<sup>201</sup>. Tanto en EC como en CU, la actividad disminuida de este factor de crecimiento se debe a unos niveles elevados de Smad7, un Smad inhibidor que se une al receptor del factor de crecimiento transformante  $\beta$  1 y bloquea su señal intracelular. Un estudio en fase I y otro en fase II han mostrado que **Mongersen**, un oligonucleótido antisentido Smad7 oral, es seguro y se asocia con un beneficio clínico<sup>202-4</sup>.

Otra citoquina a la que ya hemos hecho referencia en la presente introducción, y que está involucrada en la contra-regulación del intestino es la **IL-10**. Sin embargo la IL-10 recombinante humana no ha sido beneficiosa en pacientes con EC corticodependiente activa<sup>205</sup>.

También son moléculas contra-reguladoras que pueden tener un papel terapéutico la **IL-25** y la linfopoyetina estromal tímica, que se producen por las células epiteliales intestinales. Se sintetizan en niveles bajos en la EII. Estudios pre-clínicos han demostrado que la IL-25 tiene efectos preventivos y curativos en modelos murinos de colitis<sup>206</sup>.

Por último está la **IL-22**, una citoquina producida por múltiples células inmunes e involucrada en la regulación de la barrera intestinal. En ratones los ligandos de este receptor revierten colitis experimentales a través de un mecanismo dependiente de la IL-22<sup>207</sup>.

#### **1.12.6.- TERAPIAS CELULARES**

Aunque el bloqueo global de las células inmunes claves, como las células T, a través de anti-CD3, no ha sido exitoso en EC, parecen prometedores los tratamientos de células madre derivadas de tejido hematopoyético, mesenquimal y adiposo.

La idea más estudiada es el **trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas no mieloablativo**. Se controla el proceso inflamatorio, pero no se actúa contra el origen de la enfermedad. El objetivo terapéutico es restaurar el sistema inmune primario del paciente (algo así como resetearlo o volver a los parámetros iniciales) después de usar quimioterapia para eliminar los linfocitos T auto-reactivos y las células de memoria, que constituirían los efectores de la disregulación inmune observada en la EC, induciendo así una

tolerancia antigénica a largo plazo<sup>11</sup>.

Sin embargo los factores genéticos son cruciales en la enfermedad, como ya se ha explicado, y éstos no son modificados por el trasplante autólogo. La EII reaparecerá después de la exposición a antígenos desencadenantes y el organismo probablemente responderá de la misma manera. El trasplante alogénico (tomado de donante) podría corregir estos defectos genéticos, pero no se acepta debido a su alta mortalidad y complicaciones<sup>11</sup>.

En la serie más larga publicada hasta la fecha de 24 pacientes, todos llegaron a la remisión de la enfermedad. El porcentaje de supervivencia libre de recaída tras el trasplante fue de 91% el primer año, 63% el segundo año, 57% el tercer año, 39% el 4º y 19% el 5º. El porcentaje de pacientes en remisión, libres de esteroides o libres de fármacos los 5 años después del trasplante ha permanecido igual o mayor al 70%, 80% y 60% respectivamente<sup>208</sup>.

También se ha investigado en **trasplante de células madre estromales mesenquimales** y en células madre de tejido adiposo o médula ósea aplicadas localmente para fístulas perianales complejas. Su uso está basado en el potencial de estas células de reparar tejidos dañados e inhibir la inflamación y la fibrosis. Además, tanto las de origen autólogo como alogénico, no requieren fase de condicionamiento, ya que estas células no son inmunogénicas. Se han usado en EII tanto sistémicamente como localmente en la EC fistulizante perianal<sup>11</sup>.

El **uso local de células estromales mesenquimales** se ha ensayado en la EC fistulizante perianal, con bastantes estudios en la última década. No se sabe exactamente el mecanismo de acción, pero parece ser un

procedimiento seguro y relativamente eficaz, con cierre de las fístulas entre el 38 y el 75% de los casos<sup>209-11</sup>.

### **1.12.7.- MEJORÍA DE LA INMUNIDAD INNATA COMO TRATAMIENTO**

En la línea de la presente investigación, sobre defectos de la inmunidad innata de la EC, el objetivo de las nuevas líneas terapéuticas sería el fortalecimiento del sistema inmune innato protector. En este sentido, la **1,25-dihidroxitamina D3**, aumentaría la expresión de la  $\beta$ -defensina2 en enfermos con EC, y podría ser un tratamiento. También los efectos clínicos de los **huevos de Trichuris suis**, en estudio en EC, podrían inducir los péptidos antimicrobianos, aunque se requieren más estudios<sup>70</sup>.

Para mejorar la función de la capa de moco se podría administrar **fosfatidilcolina**, lo que ha demostrado tener buenos resultados en CU<sup>212</sup>.

Se ha sugerido que la administración enteral o mediante síntesis por células intestinales modificadas de **IL-8** podría tener valor terapéutico. También se ha propuesto agentes que mejoren el reclutamiento de neutrófilos, como los **inhibidores de la fosfodiesterasa-5**, que aumentan el flujo sanguíneo. Para documentar esta propuesta, estos autores muestran que la administración oral de Sildenafil aumenta marcadamente el flujo sanguíneo a los lugares de inyección bacteriana en los pacientes con EC<sup>80</sup>.

Dentro de esta línea están los agentes que aumentan las defensas inmunes innatas. El **factor de crecimiento estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos** aumenta las funciones tanto de los fagocitos como de los componentes epiteliales del sistema inmune innato del intestino<sup>213</sup>.

Estas observaciones han sido la base para estudios con factor estimulante de colonias de granulocitos (**Filgastrim**) y de granulocitos-macrófagos (**Sargramostim**)<sup>214-5</sup>. Ambos estudios pilotos sugirieron un beneficio, aunque Sargramostim parecía más efectivo. El mismo grupo ha realizado un estudio controlado con 124 pacientes que mostró una disminución de 100 puntos del CDAI y un aumento de la remisión, que se mantenía una media de 8-10 semanas tras la finalización de la terapia<sup>216</sup>.

La persistencia del estímulo derivado de los microbios conlleva una activación de los linfocitos T, que se observa en la enfermedad establecida. Estos conceptos proporcionan los mecanismos por los que la **inmunosupresión** es efectiva, porque **limita la respuesta crónica de linfocitos T**, que se produce de forma secundaria, mientras que la estimulación inmune, posiblemente con los factores de estimulación de colonias de macrófagos y granulocitos, puede también ser efectiva, especialmente en las fases agudas y tempranas de la enfermedad. **Necesitamos un mejor conocimiento de los eventos iniciáticos** en la EC para manejar mejor estas nuevas aproximaciones terapéuticas que mejoran la inmunidad innata<sup>45</sup>.

Sin embargo, desafortunadamente, la mayoría de los nuevos agentes en estudio van en la línea de frenar las respuestas inflamatorias más que en mejorar la barrera intestinal, por lo que se necesita investigación clínica, como el presente estudio, para conocer mejor los mecanismos de la inmunidad innata en la EII.

Excepto los agentes anti-TNF $\alpha$ , los fármacos contra moléculas derivadas de los linfocitos T han fallado como tratamiento. Esto ha sido interpretado como el resultado de una redundancia en la red de citoquinas a nivel mucoso, aunque también puede deberse que no se ha identificado las dianas críticas o la combinación de las mismas<sup>217</sup>.

En las últimas décadas se ha realizado un enorme trabajo para identificar factores y vías que orquestan la respuesta inmune en la EC. Estos avances han supuesto el desarrollo y uso de varios fármacos contra estas señales inflamatorias. Desafortunadamente, la mayoría de los ensayos con estas drogas han fallado en la EC en humanos. Aunque no sabemos por qué han fallado estos tratamientos, la evidencia parece indicar que la EII está dirigida por múltiples vías inflamatorias, quizás desconectadas. Por tanto, podría ser más efectivo el actuar sobre varios mecanismos simultáneamente que sobre uno sólo. El uso de los anti-TNF $\alpha$  sugiere que las acciones que conllevan la muerte de los linfocitos T podrían ser beneficiosas. También podrían realizarse aproximaciones que corrigieran las alteraciones en distintas hormonas contra-reguladoras relacionadas con la enfermedad<sup>5</sup>.



## 2.- METODOLOGÍA

### 2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Debido a que los linfocitos B1 forman parte de la inmunidad innata relacionada, como antes se ha expuesto, con la patogénesis de la EC, nos planteamos la hipótesis de una **relación de la población de linfocitos B1 con esta enfermedad**, en concreto una deficiencia de los mismos, por lo que proponemos los siguientes objetivos:

### 2.2.-OBJETIVOS

**Objetivo principal:** medir los niveles de linfocitos B1 (CD19+CD5+) en sangre periférica en pacientes con EC y compararlos con controles sanos. Interpretar los resultados de su relación con la EC, incluyendo gravedad y evolución de la misma.

**Objetivos secundarios:**

- Valorar los niveles de Ig M e Ig A en pacientes con EC.
- Correlacionar los niveles de Ig M e Ig A en suero de pacientes con EC con los niveles de Linfocitos B1.
- Correlacionar los niveles de linfocitos  $T\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  con los linfocitos B1.



## 2.3.-MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.3.1.-TIPO DE ESTUDIO

Estudio prospectivo y observacional de casos y controles.

### 2.3.2.-CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se reclutaron un total de 128 sujetos, 64 pacientes con EC y 64 sujetos sanos control, apareados por sexo y grupo de edad.

- Los **pacientes** se obtuvieron de entre los hospitalizados y los que acudieron a consulta externa del Servicio de Digestivo del Hospital Arnau de Vilanova de València.

Los **critérios de inclusión** para los pacientes fueron:

-Diagnóstico firme de EC. Se utilizaron los **critérios de Lennard-Jones** para el diagnóstico de EC<sup>218</sup>.

-No presentar complicación infecciosa de la EC ni otra enfermedad infecciosa en el momento de la inclusión.

-No haber sido vacunados en los 6 meses previos a la inclusión.

- Las **definiciones** de los **escenarios clínicos** fueron:

**Paciente nuevo (Debut):** EC activa incluido justo o poco después del diagnóstico, sin tratamiento previo para la EC.

**Remisión:** paciente con CDAI (Crohn's disease activity index) menor a 150 en últimos 3 meses.

**Enfermedad activa:** paciente con CDAI mayor a 150 y signos y síntomas de la enfermedad<sup>219-20</sup>.

- Los **sujetos control** se obtuvieron de familiares del personal del Hospital o de acompañantes de pacientes no emparentados con los afectados de EC.

Los **controles** cumplieron los siguientes **criterios de inclusión**:

- No presentar enfermedad infecciosa actual
- No tener una inmunodeficiencia conocida
- No padecer enfermedad autoinmunitaria
- No haber sido vacunados en los 6 meses previos a la inclusión
- No recibir tratamiento inmunosupresor, y
- No estar recibiendo tratamiento antibiótico.

### 2.3.3.- VARIABLES ESTUDIADAS:

**1.- Demográficas:** Sexo y Edad

**2.- Clínicas:**

- Se objetivaron como índices de gravedad de la enfermedad el **Crohn's disease activity index (CDAI)**<sup>221</sup> y el **índice de Harvey y Bradshaw**<sup>222</sup> en el momento de la extracción sanguínea.

- **Fármacos** pautados en este mismo punto, para objetivar posibles modificaciones inmunitarias provocadas por los mismos.

- Se recogieron las **colonoscopias** realizadas en los 6 meses antes y después de la inclusión de los pacientes, calculando como **índice endoscópico** de gravedad el SES-CD (Simplified Endoscopic Activity Score for Crohn's Disease)<sup>223</sup> y objetivando las características histológicas en esta endoscopia.

- Como **factores pronósticos** de la EC se incluyeron prospectivamente a partir de la extracción de sangre: hospitalizaciones, brotes de la enfermedad, visitas urgentes a la consulta de digestivo, visitas al servicio de urgencias por la EC,

intervenciones quirúrgicas, aumento de dosis de fármacos, adición de nuevos fármacos y tabaquismo.

### **3.- Analíticas.**

#### **\*Hemograma.**

#### **\*Proteína C reactiva, Velocidad de Sedimentación Globular**

#### **\*Poblaciones Linfocitarias:**

-CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3+CD56+, CD19+,  
CD19+CD5+ (linfocitos B1).

- $\alpha\beta$ CD3+,  $\alpha\beta$  CD3+CD4+,  $\alpha\beta$ CD3+CD8+,  $\alpha\beta$  CD3+CD56+.

- $\gamma\delta$ CD3+,  $\gamma\delta$ CD3+CD4+,  $\gamma\delta$ CD3+CD8+,  $\gamma\delta$  CD3+CD56+.

### **2.3.4.- POBLACIÓN DE ESTUDIO: TAMAÑO DE LA MUESTRA:**

Se llevó a cabo un emparejamiento por frecuencias, teniendo en cuenta las variables sexo y grupo de edad, y las medias de edad y la proporción por sexo en las poblaciones emparejadas.

El cálculo de la muestra se realizó con el programa Epidat 4.0. Para una diferencia de medias a detectar de linfocitos T  $\gamma\delta = 0,020 \times 10^9/L$ , y ya que no se dispone de estudios previos con linfocitos B1, y basándonos en nuestro anterior estudio<sup>117</sup>, con una desviación estándar esperada en los LT  $\gamma\delta$  de los pacientes de Crohn=  $0,025 \times 10^9/L$ , con una desviación estándar esperada en los LT  $\gamma\delta$  de los controles sanos= $0,067 \times 10^9/L$ , y con un coeficiente de correlación de Spearman de 0,517; teniendo en cuenta una potencia del 80%, con un nivel de confianza del 95%, el tamaño de la muestra es de 64 en cada grupo.

### 2.3.5.- MÉTODO DE ANÁLISIS EN SANGRE PERIFÉRICA

#### - Hemograma.

El recuento de células sanguíneas se realizó con el analizador hematológico automático Coulter LH750 (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

#### - Determinación de las poblaciones linfocitarias.

Se determinaron mediante **Citometría de flujo**.

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron por punción venosa usando como anticoagulante K3-EDTA. La sangre total se tiñó usando inmunofluorescencia directa y marcado quintuple simultáneo con los siguientes anticuerpos monoclonales: CD19, CD5, CD45, CD3 y CD56.

Los anticuerpos monoclonales se conjugaron:

-CD5 con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)

-CD56 con Ficoeritrina (PE)

-CD45 con Ficoeritrina/Rojo Texas (ECD)

-CD3 con R-Ficoeritrina/Cianina 5 (PC5)

-CD19 con Ficoeritrina/Cianina 7 (PC7).

Para los análisis de fluorescencia se usó un Analizador Multiparamétrico de Citometría de Flujo de Beckman-Coulter, Cytomics FC 500, Florida (USA) con software CXP que presenta los resultados en gráficos biparamétricos denominados histogramas. Se midieron en cada muestra analizada 50.000 eventos como mínimo.

La selección de los **linfocitos** se realizó combinando en un histograma el antígeno panleucocitario CD45 con la complejidad celular ("side scatter"). Los **linfocitos T** se midieron con la combinación CD45/CD3.

Los **linfocitos B** combinando CD45/CD19. Los linfocitos NK seleccionando los linfocitos CD3 negativos y CD56 positivos. Finalmente, los **linfocitos B1** se midieron combinando en un histograma los linfocitos B (CD19+) con la subpoblación de linfocitos T CD5+.

**-Linfocitos gamma-delta (LT $\gamma\delta$ ):**

Se determinaron mediante IOTest<sup>®</sup> Pan  $\gamma/\delta$ -PC5 Beckman Coulter. Este es un anticuerpo conjugado (IgG1 de ratón) a un fluorocromo (Ficoeritrina-Cianina 5.1-PC5) que permite la identificación y la numeración de las poblaciones celulares que expresan el antígeno TCR PAN  $\gamma\delta$  (clon: IMMU 510) presentes en muestras biológicas humanas por citometría de flujo. IMMU 510 reconoce a todas las células T  $\gamma\delta$ , independientemente de los genes variables o de las regiones de intersección que expresan cuando son analizadas con estudios de inmunofluorescencia de flujo sobre líneas de células T  $\gamma\delta$  policlonales y clones de células T  $\gamma\delta$ <sup>224-6</sup>.

**-Linfocitos T alfa-beta (LT $\alpha\beta$ ):**

Se determinaron mediante IOTest<sup>®</sup> Anti-TCR Pan  $\alpha/\beta$ -PC5. El anticuerpo monoclonal BMA031 es el anticuerpo de referencia para el estudio de la población  $\alpha\beta$  en citometría de flujo y ensayos funcionales. Reconoce un determinante monomórfico del complejo del receptor  $\alpha\beta$  de la célula T. Tiñe del 89,4% a 98,4% de células EC3 positivas en sangre normal.

### **2.3.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los datos recogidos se introdujeron en una base de datos y se analizaron mediante el programa estadístico, SPSS versión 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Los estadísticos descriptivos se expresaron como frecuencias absolutas y relativas para las variables categóricas y como medias, mediana, desviación típica, mínimo y máximo en el caso de las variables continuas. Se comprobó la asunción de distribución normal para las variables continuas mediante pruebas gráficas y la prueba de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de la significación de Lilliefors. Cuando se asumió normalidad se utilizó el t-test para comparar las medias de las variables cuantitativas y se utilizó el test de  $\chi^2$  para el contraste de proporciones entre categorías. En caso de no aceptarse la hipótesis de normalidad de la variable cuantitativa se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Se construyeron tablas de contingencias para las variables cualitativas. Como medida de asociación se calculó la Odds Ratio (OR) y su intervalo de confianza al 95% (IC 95%). El nivel de significación asumido fue de  $p < 0,05$ .

### **2.3.7.- CONSENTIMIENTO INFORMADO, CONFIDENCIALIDAD Y PROTECCIÓN DE DATOS**

A todos los sujetos del estudio se les presentó para leer y firmar la hoja de consentimiento informado. Se adjunta al final de la tesis este consentimiento.

Todas las muestras y la información de los pacientes durante el estudio se mantuvieron estrictamente confidenciales. El estudio fue aprobado por la Comisión de Investigación y Ética del Hospital.

Todos los datos estuvieron protegidos de acuerdo con las leyes de Protección de Datos Europea y la Ley Española de Protección de Datos (Ley Orgánica 15/1999 de 13 de Diciembre).

La identidad de los pacientes siempre permaneció confidencial, se identificó sólo por las iniciales y por un código numérico individual. El nombre y la dirección no figuraron en ninguna información que salió del hospital para preservar su anonimato.



### **3.- RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL**

#### **3.1.- RESULTADOS**

##### **3.1.1.- CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS**

Se han estudiado un total de 128 sujetos, 64 pacientes con EC y 64 controles sanos.

De los 64 pacientes con EC, 35 (54,7%) fueron hombres y 29 (45,3%) mujeres, con el mismo número de hombres y mujeres en los controles.

La **edad media** de los pacientes con EC fue de  $38,9 \pm 13,8$  vs  $42,9 \pm 16,8$ , en los controles,  $p = 0,144$ . No existen tampoco diferencias entre hombres y mujeres en cuanto a la edad, cosa esperable, ya que había un emparejamiento por sexo y edad.

### 3.1.2.- CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES CON EC

Las características clínicas de los pacientes se definen en la **Tabla 2**, tanto los escenarios clínicos (debut de EC, EC en remisión o EC activa o en brote), como todas las características de la clasificación de Montreal (edad, localización de la enfermedad y patrón de la misma).

<b>Tabla 2. Características Clínicas de los pacientes con EC</b>			
		<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Escenarios Clínicos</b>	Debut	17	26,6
	Remisión	24	37,5
	Actividad	23	35,9
<b>Montreal Edad</b>	A1 (< 16 a)	5	7,8
	A2 (17-40)	39	60,9
	A3 (> 40 a)	20	31,3
<b>Montreal Localización</b>	L1 (ileal)	29	45,3
	L2 (colónica)	7	10,9
	L3 (ileocolónica)	28	43,8
<b>Montreal Patrón</b>	B1 (inflamatorio)	34	53,1
	B2 (estenosante)	19	29,7
	B3 (fistulizante)	11	17,2

De los 64 pacientes, 37 estaban sin tratamiento en el momento de la extracción sanguínea, un 62,7%. El resto, un 37,3% estaba en tratamiento. En la **Tabla 3** se definen los porcentajes de pacientes en tratamiento respecto al total de pacientes.

<b>Tabla 3. Tratamiento de los pacientes con EC</b>		
	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Tratamiento</b>	<b>37</b>	<b>62,7</b>
- Mesalazina	13	24,1
- Antibiótico	13	24,1
- Azatioprina	12	21,8
- Anti-TNF	9	16,4
- Corticoides	7	13,0
- Salazopirina	2	3,7

En la **Tabla 4** describimos las variables continuas dentro de las características de los pacientes con EC de nuestro estudio.

<b>Tabla 4. Variables continuas</b>				
	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>
<b>Edad</b>	16	80	38,9	13,8
<b>Evolución</b>	0	160	31,2	40,8
<b>Harvey</b>	1,43	17,50	6,7	3,7
<b>CDAI</b>	16	429	193,6	117,2
<b>VSG</b>	2	120	33,0	32,4
<b>PCR</b>	5	133	20,8	25,7
<b>IgA</b>	121	509	244,5	89,5
<b>IgG</b>	410	1954	994,4	322,8
<b>IgM</b>	3	481	104,4	73,1

### 3.1.3.- HEMOGRAMA Y SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS CONVENCIONALES, $\alpha\beta$ Y $\gamma\delta$

#### 3.1.3.1- Hemograma

Se analizaron las características del hemograma de los pacientes con EC y controles, objetivándose **diferencias significativas en:**

-Niveles de linfocitos (menores en EC)

-Plaquetas (mayores en EC)

-Hemoglobina (menores en EC).

No se objetivaron diferencias significativas en los niveles de leucocitos totales, neutrófilos, monocitos, eosinófilos ni basófilos.

<b>Tabla 5. Diferencias en el hemograma entre EC y Controles</b>			
	<b>CROHN</b>	<b>Control</b>	<b>Significación (p)</b>
	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	
<b>Leucocitos</b>	7,5 $\pm$ 3,0	7,4 $\pm$ 2,0	NS
<b>Neutrófilos</b>	5,1 $\pm$ 2,4	4,7 $\pm$ 1,9	NS
<b>Linfocitos</b>	1,7 $\pm$ 0,8	2,0 $\pm$ 0,6	<b>0,006</b>
<b>Monocitos</b>	0,6 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,2	NS
<b>Eosinófilos</b>	0,2 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,1	NS
<b>Basófilos</b>	0,0 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	NS
<b>Trombocitos</b>	288 $\pm$ 107	227 $\pm$ 49	<b>0,001</b>
<b>Hemoglobina</b>	12,6 $\pm$ 2,5	14,4 $\pm$ 1,4	<b>&lt; 0,001</b>

NS: No significativo.

### 3.1.3.2- Subpoblaciones linfocitarias convencionales, $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$

Se analizaron las poblaciones linfocitarias y se compararon las de los pacientes con EC con los controles, como se observó en la **Tabla 6**.

Se hallaron diferencias significativas en:

-Linfocitos CD3+

-Linfocitos CD8+

-Linfocitos CD56+

-Linfocitos CD3+  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$

-Linfocitos CD4+  $\alpha\beta$

-Linfocitos CD8+  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$

Todos ellos menores en pacientes con EC.

<b>Tabla 6. Diferencias en las subpoblaciones linfocitarias (EC-Control)</b>			
	<b>CROHN</b>	<b>Control</b>	<b>Significación (p)</b>
	<b>Media ± DE</b>	<b>Media ± DE</b>	
<b>CD3+</b>	1,3363 ± 0,6490	1,5028 ± 0,4182	<b>0,020</b>
<b>CD4+</b>	0,8880 ± 0,4653	0,9415 ± 0,2990	NS
<b>CD8+</b>	0,4242 ± 0,2577	0,5045 ± 0,2292	<b>0,024</b>
<b>CD56+</b>	0,1751 ± 0,1384	0,2796 ± 0,1930	<b>&lt; 0,001</b>
<b>CD3+αβ</b>	1,2207 ± 0,6555	1,4136 ± 0,3856	<b>0,003</b>
<b>CD4+αβ</b>	0,8738 ± 0,4666	0,9400 ± 0,2966	<b>0,045</b>
<b>CD8+αβ</b>	0,3852 ± 0,2500	0,4841 ± 0,2180	<b>0,003</b>
<b>CD56+αβ</b>	0,0229 ± 0,0258	0,0224 ± 0,0340	NS
<b>CD3+αβ</b>	0,0371 ± 0,0533	0,0688 ± 0,0654	<b>&lt; 0,001</b>
<b>CD4+αβ</b>	0,0005 ± 0,0007	0,0008 ± 0,0025	NS
<b>CD8+αβ</b>	0,0126 ± 0,0174	0,0219 ± 0,0385	<b>0,006</b>
<b>CD56+αβ</b>	0,0096 ± 0,0188	0,0180 ± 0,0340	NS
<b>CD19+</b>	0,2000 ± 0,1303	0,2227 ± 0,1156	NS

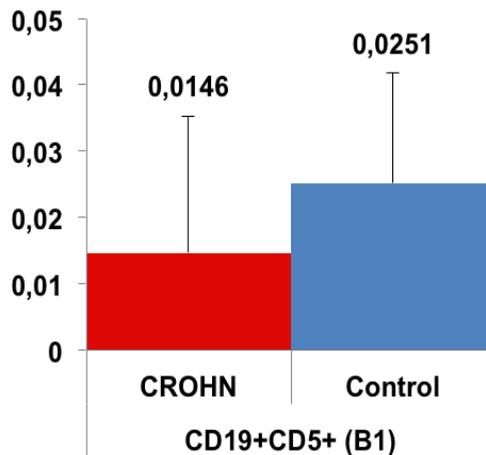
Valores células expresados  $\times 10^9/L$ . DE: desviación estándar.

### 3.1.4.- FRECUENCIA MEDIA DE CD19+ (LINFOCITOS B) EN PACIENTES CON EC VS CONTROLES

Los valores de linfocitos B en pacientes de Crohn fueron de  $0,1999 \pm 0,1303 \times 10^9/L$ , mientras que fueron  $0,2226 \pm 0,1156$  en los controles,  $p=0,299$ . Es decir, **no hubo diferencias significativas en los linfocitos B en pacientes con EC frente a los controles.**

### 3.1.5.- FRECUENCIA MEDIA DE CD19+CD5+ (LINFOCITOS B1) EN PACIENTES CON EC VS CONTROLES

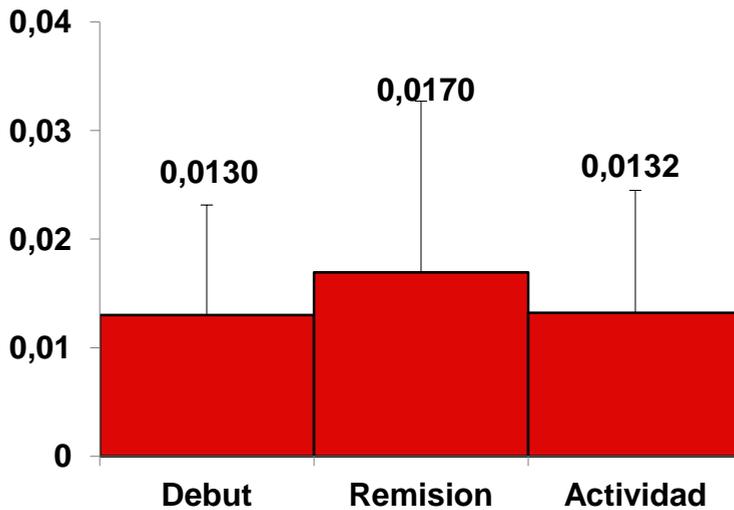
Se objetivó un **número menor de linfocitos B1 en pacientes con EC respecto a controles.** La media de linfocitos B1 en los pacientes con EC fue  $0,0146 \pm 0,0207 \times 10^9/L$ , frente a  $0,0251 \pm 0,0168$  de los controles sanos. La diferencia fue estadísticamente significativa, con  $p = 0,002$ .



**Gráfica 1.** Frecuencia media de Linfocitos B1 pacientes con EC y Controles. Valores de B1 medidos  $\times 10^9/L$ , diferencia significativa,  $p = 0,002$ . Barras T indican la desviación estándar.

### 3.1.6.- FRECUENCIA MEDIA CD19+CD5+ (LINFOCITOS B1) EN PACIENTES CON EC SEGÚN ESCENARIOS CLÍNICOS

Se estudió el valor de linfocitos B1 en relación al escenario clínico de la EC. **No hubo significación entre los distintos escenarios de la enfermedad** entre sí.



**Gráfica 2.** Frecuencia media de Linfocitos B1 en sangre periférica de pacientes con EC según estadios de la enfermedad.

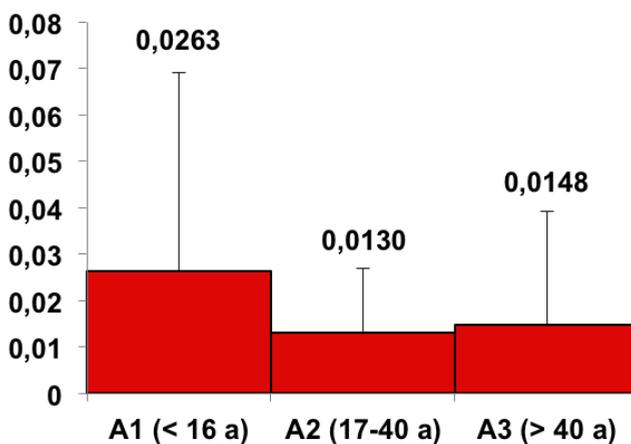
Valores de B1 medidos x10<sup>9</sup>/L. Debut (N=17), Remisión (N=24), Actividad (N=23). Barras T indican la desviación estándar.

No hay diferencias entre los escenarios de EC entre sí.

### 3.1.7.- FRECUENCIA MEDIA DE CD19+CD5+ (LINFOCITOS B1) EN PACIENTES CON EC SEGÚN CLASIFICACIÓN DE MONTREAL.

#### 3.1.7.1.-Edad

No se hallaron diferencias significativas en los niveles de linfocitos B1 en los grupos de edad de la clasificación de Montreal.

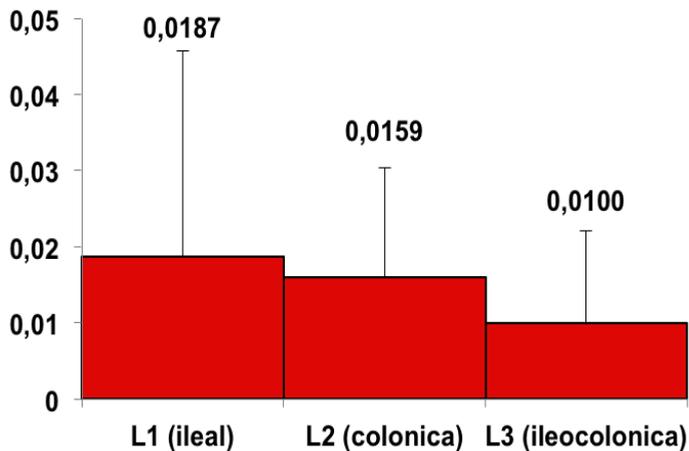


**Gráfica 3.** Frecuencia media de Linfocitos B1 en sangre periférica de pacientes con EC según Clasificación de Montreal (Edad).

Valores de B1 medidos x10<sup>9</sup>/L. A1 (N=5), A2 (N=39), A3 (N=20). Barras T indican la desviación estándar.

### 3.1.7.2.- Localización

No se hallaron diferencias significativas en los niveles de linfocitos B1 entre las localizaciones de la enfermedad: ileal, colónica e ileocolónica.

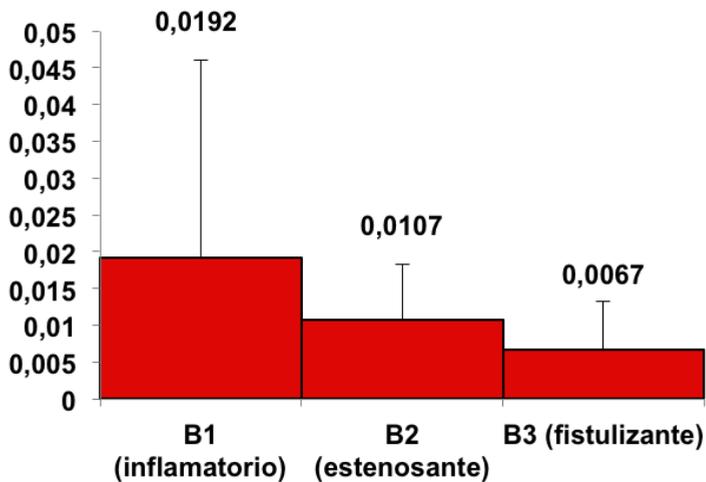


**Gráfica 4.** Frecuencia media de Linfocitos B1 en sangre periférica de pacientes con EC según Clasificación de Montreal (Localización).

Valores de B1 medidos  $\times 10^9/L$ . L1 (N=29), L2 (N=7), L3 (N=28). Barras T indican la desviación estándar.

### 3.1.7.3.- Patrón

Se hallaron niveles de linfocitos B1 superiores en el patrón inflamatorio frente al patrón fistulizante, sin hallar diferencias significativas entre el resto de combinaciones entre los patrones, aunque los niveles eran menores conforme progresaba el patrón en gravedad: inflamatorio→estenosante→fistulizante.



**Gráfica 5.** Frecuencia media de Linfocitos B1 en sangre periférica de pacientes con EC según Clasificación de Montreal (Patrón).

Valores de B1 medidos  $\times 10^9/L$ . B1 (N=34), B2 (N=19), B3 (N=11). Barras T indican la desviación estándar. Diferencia significativa entre B1 y B3 ( $p=0,017$ )

### 3.1.8.- FRECUENCIA MEDIA DE LINFOCITOS B1 EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON Y SIN TRATAMIENTO

No hay diferencias significativas en los niveles de linfocitos B1 entre los pacientes según lleven o no tratamiento ( $p = 0,867$ ).

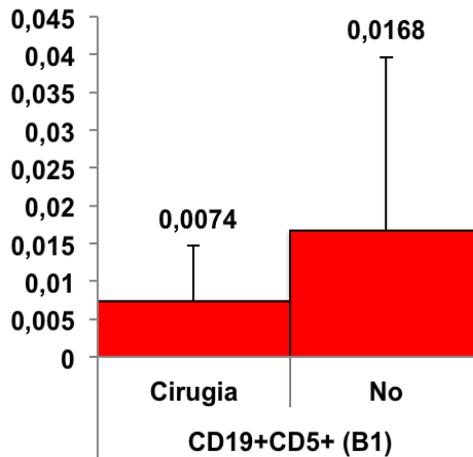
Analizando cada uno de los tratamientos por separado, tampoco se hallaron diferencias significativas en el número de linfocitos B1 comparando los pacientes que llevaban un tratamiento y los que no, como se puede ver en la **Tabla 6**. Sólo hay que destacar que la significación estadística estaba próxima en los pacientes que llevaban antibiótico ( $p=0,0068$ ) frente a los que no los llevaban.

<b>Tabla 7. Diferencia medias linfocitos B1 según tratamiento</b>				
	<b>N</b>	<b>No</b>	<b>Si</b>	<b>Sig. (p)</b>
<b>Tratamiento</b>	43	0,0138 ± 0,0133	0,0148 ± 0,0235	NS
<b>-Azatioprina</b>	15	0,0150 ± 0,0219	0,0131 ± 0,0172	NS
<b>-Anti TNF</b>	12	0,0160 ± 0,0224	0,0083 ± 0,0087	NS
<b>-Mesalazina</b>	21	0,0128 ± 0,0144	0,0181 ± 0,0300	NS
<b>-Salazopirina</b>	2	0,0144 ± 0,0211	0,0182 ± 0,0021	NS
<b>-Antibiótico</b>	15	0,0162 ± 0,0232	0,0092 ± 0,0068	NS
<b>-Corticoides</b>	8	0,0153 ± 0,0219	0,0091 ± 0,0075	NS

### 3.1.9.- FRECUENCIA MEDIA DE LINFOCITOS B1 EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES SEGÚN PRESENCIA DE CIRUGÍA

#### 3.1.9.1.- Cirugía previa, durante o posterior a la extracción de sangre en el estudio.

Hallamos un **número menor de linfocitos B1 en los pacientes que a lo largo de la historia de su enfermedad han sido operados** en relación a su enfermedad (EC), bien fuera antes o después de la inclusión en la investigación, o incluidos en el momento de la cirugía.

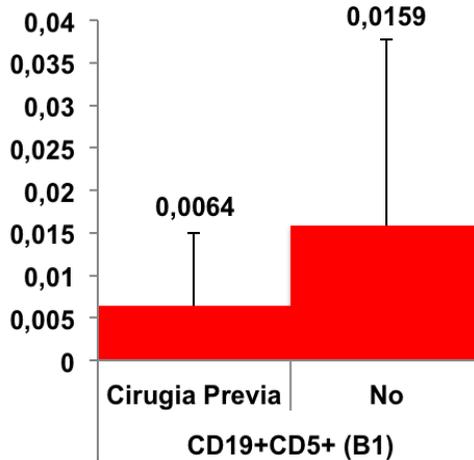


**Gráfica 6.** Frecuencia media de Linfocitos B1 en sangre periférica de pacientes con EC según presencia de cirugía previa durante o posterior a la extracción de sangre en el estudio.

Valores de B1 medidos  $\times 10^9/L$ . Cirugía (N=15), sin cirugía (N=49). Barras T indican la desviación estándar. Diferencia significativa ( $p = 0,016$ )

### 3.1.9.2.- Cirugía previa al estudio (51,5 ± 51,6 meses)

No se hallaron diferencias significativas en los niveles de linfocitos B1 entre los pacientes con EC que previamente a la inclusión habían sufrido una intervención quirúrgica y los que no. La diferencia es marcada, pero no es significativa por el número bajo de pacientes con cirugía previa: 9.



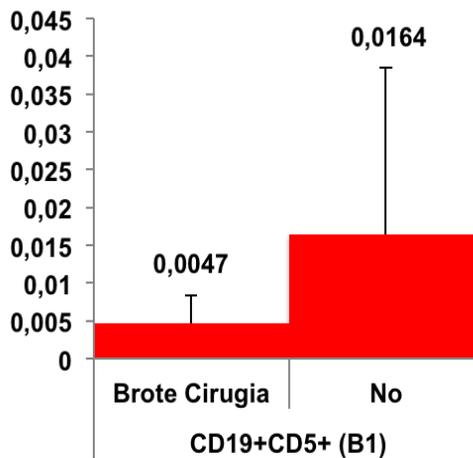
**Gráfica 7.** Frecuencia media de Linfocitos B1 en sangre periférica de pacientes con EC según presencia de cirugía previa a la extracción de sangre en el estudio.

Valores de B1 medidos x10<sup>9</sup>/L. Cirugía (N=9), sin cirugía (N=55). Barras T indican la desviación estándar.

Diferencia no significativa (p = 0,058) aunque es por la N tan baja

### 3.1.9.3.- Cirugía posterior al estudio (Brote) ( $13,2 \pm 12,1$ meses)

Se objetivó una clara **diferencia entre los pacientes que tras la inclusión presentaban un empeoramiento y precisaban de cirugía, con un número de linfocitos mucho menor**, y diferencia estadísticamente significativa, respecto a los pacientes que no precisaban de cirugía tras la inclusión. El tiempo medio tras la inclusión en el estudio en que se realizó la cirugía fue  $13,2 \pm 12,1$  meses.



**Gráfica 8.** Frecuencia media de Linfocitos B1 en sangre periférica de pacientes con EC según aparición de brote quirúrgico posterior a la extracción de sangre en el estudio.

Valores de B1 medidos  $\times 10^9/L$ . Cirugía (N=10), sin cirugía (N=54). Barras T indican la desviación estándar. Diferencia significativa ( $p = 0,026$ )

### 3.1.10.- CORRELACIONES DE LOS LINFOCITOS B1 CON LAS POBLACIONES T

Tabla 8. Correlaciones linfocitos B1-Linfocitos T y B2				
	Controles		Crohn	
	B1	Significación (p)	B1	Significación (p)
CD3+	0,536	< 0,001	0,549	< 0,001
CD4+	0,235	NS	0,477	< 0,001
CD8+	0,460	< 0,001	0,522	< 0,001
CD56+	-0,170	NS	0,533	< 0,001
CD3+ $\alpha\beta$	0,413	<b>0,001</b>	0,543	< 0,001
CD4+ $\alpha\beta$	0,205	NS	0,477	< 0,001
CD8+ $\alpha\beta$	0,403	<b>0,001</b>	0,545	< 0,001
CD56+ $\alpha\beta$	-0,513	<b>0,006</b>	-0,082	NS
CD3+ $\gamma\delta$	0,193	NS	0,435	< 0,001
CD4+ $\gamma\delta$	-0,052	NS	0,307	<b>0,014</b>
CD8+ $\gamma\delta$	0,151	NS	0,368	<b>0,003</b>
CD56+ $\gamma\delta$	-0,373	<b>0,046</b>	-0,105	NS
CD19+ (B2)	0,716	< 0,001	0,765	< 0,001

Test de correlación de Rho de Spearman.

### 3.1.11.- INMUNOGLOBULINAS EN PACIENTES CON EC Y CONTROLES

Se analizaron los **niveles de inmunoglobulinas**, (Ig A, Ig G e Ig M) en los pacientes con EC y los controles, **sin hallar diferencias significativas**.

No se ha encontrado una correlación entre la frecuencia de linfocitos B1 y las Igs M, G, y A.

<b>Tabla 9. Inmunoglobulinas EC-Controles</b>				
	<b>CROHN</b>		<b>Control</b>	
	<b>Media</b>	<b>DE</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>
<b>IgA</b>	245	90	230	102
<b>IgG</b>	994	323	1039	253
<b>IgM</b>	104	73	121	63

No hay diferencias significativas.

### 3.1.12.- DEFICIENCIA DE LINFOCITOS B1

Para calcular la deficiencia de linfocitos B1 se ha calculado en valor por debajo del percentil 10 en los pacientes control: deficiencia B1:  $CD19+CD5+ < 0,0057 \times 10^9/L$ .

Se han encontrado 28/64 (43,8%) pacientes con deficiencia B1 entre los pacientes con EC vs 6/64 (9,4%) en los sujetos control sanos, OR: 4,7 (ICOR 95%: 2,1-10,5),  $p < 0,001$ . No hemos encontrado diferencias según sexo y edad.

#### 3.1.12.1.- Deficiencia de B1 según Escenarios Clínicos

No se objetivó relación estadísticamente significativa entre el déficit de B1 (percentil 10) y los distintos escenarios clínicos de la EC (debut, remisión o brote en actividad).

<b>Tabla 10. Deficiencia B1 en relación a los Escenarios Clínicos</b>			
	<b>Debut</b>	<b>Remisión</b>	<b>Actividad</b>
<b>No</b>	13 36,1%	11 30,6%	12 33,3%
<b>Déficit B1</b>	4 14,3%	13 46,4%	11 39,3%

No hay diferencias significativas intergrupos  $p = 0,135$

### 3.1.12.2.- Deficiencia de B1 según clasificación de Montreal

#### A.- Edad

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre la deficiencia de linfocitos B1 (percentil 10) y los grupos de edad de la clasificación de Montreal.

Tabla 11. Deficiencia B1 según Clasificación Montreal (Edad)			
	A1 (< 16 a)	A2 (17-40 a)	A3 (> 40 a)
No	3 8,3%	23 63,9%	10 27,8%
Déficit B1	2 7,1%	16 57,1%	10 35,7%

No hay diferencias significativas intergrupos  $p = 0,793$

#### B.- Localización

No se objetivó relación estadísticamente significativa entre el déficit de B1 (percentil 10) y la localización de la EC.

Tabla 12. Deficiencia B1 según Clasificación Montreal (Localización)			
	L1 (ileal)	L2 (colónica)	L3 (ileocólica)
No	17 47,2%	4 11,1%	15 41,7%
Déficit B1	12 42,9%	3 10,7%	13 46,4%

No hay diferencias significativas intergrupos  $p = 0,928$

### C.- Patrón

No existe relación estadísticamente significativa entre el déficit de linfocitos B1 (percentil 10) y el patrón de la EC (inflamatorio, estenosante o fistulizante).

<b>Tabla 13. Deficiencia B1 según Clasificación Montreal (Patrón)</b>			
	<b>B1</b>	<b>B2 (estenosante)</b>	<b>B3 (fistulizante)</b>
<b>No</b>	20 55,6%	11 30,6%	5 13,9%
<b>Déficit B1</b>	14 50,0%	8 28,6%	6 21,4%

No hay diferencias significativas intergrupos  $p = 0,729$

### 3.1.13.- DEFICIENCIA DE B1 SEGÚN CIRUGÍA

Se analizó la relación entre la deficiencia de linfocitos B1 (percentil 10) y el antecedente de cirugía de la EC. Los pacientes con EC y **deficiencia de linfocitos B1 presentan una probabilidad 6 veces mayor de antecedentes de Cirugía previa** relacionada con su enfermedad.

Tabla 14. Deficiencia B1 y su relación con la Cirugía previa en la EC		
	No déficit B1	Déficit B1
No cirugía previa	34 61,8%	21 38,2%
Cirugía previa	2 22,2%	7 77,8%

OR: 5,7 (ICOR95%: 1,1 – 29,9) p = 0,035

Se analizó la relación entre la presencia de déficit de linfocitos B1 y la presencia futura de un brote quirúrgico, hallándose que la probabilidad de que un paciente con EC y **deficiencia de linfocitos B1 presente una complicación quirúrgica es de casi 7 veces más que el paciente con EC sin deficiencia** de B1. Es decir, la deficiencia en los pacientes con EC aumenta la posibilidad de complicación quirúrgica en más del 700 %.

<b>Tabla 15.</b> Deficiencia B1 y su relación con el brote quirúrgico en la EC		
	<b>No déficit B1</b>	<b>Déficit B1</b>
<b>No brote quirúrgico</b>	34	20
	63,0%	37,0%
<b>Brote quirúrgico</b>	2	8
	22,0%	80,0%

OR: 6,8 (ICOR95%: 1,3 – 35,2), p = 0,016

### **3.1.14.- RELACIÓN DE LINFOCITOS B1 CON PRESENCIA O NO DE GRANULOMAS EN ANATOMÍA PATOLÓGICA**

Se analizó la relación de la presencia de granulomas en la anatomía patológica de la biopsia intestinal con la frecuencia de linfocitos B1 en sangre periférica, sin hallar diferencias estadísticamente significativas.

<b>Tabla 16.</b> Relación entre linfocitos B1 y la presencia de granulomas en Anatomía patológica				
	<b>Granulomas</b>	<b>N</b>	<b>Media Linf. B1</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>B1</b>	<b>Sí granulomas</b>	8	0,0266	0,0363
	<b>No granulomas</b>	56	0,0128	0,0173

No hay diferencias significativas p = 0,324

### 3.1.15.- RELACIÓN DE LINFOCITOS B1 CON PRESENCIA DE BROTE

Se objetivó la relación entre los niveles de linfocitos B1 con la posibilidad de presentar brote en el seguimiento, **sin hallar diferencias** estadísticamente significativas. El único **brote que se asocia** a los linfocitos B1 es el **quirúrgico** que ya se ha analizado previamente.

<b>Tabla 17.</b> Relación entre linfocitos B1 y presencia de brote posteriormente				
		<b>N</b>	<b>Media linf. B1</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>B1</b>	<b>Brote</b>	26	0,0131	0,0197
	<b>No brote</b>	31	0,0161	0,0231

No hay diferencias significativas  $p = 0,595$

### 3.1.16.- RELACIÓN ENTRE ESTADO GENERAL Y LINFOCITOS B1

Se analizó si existía relación entre el estado general, medido mediante el parámetro del **CDAI** (muy bueno, bueno, regular, malo, muy malo) y los valores de linfocitos B1. **No hay relación** significativa, pero hay una **tendencia negativa**. Es decir a más linfocitos B1, menor puntuación de estado general, es decir, mejor estado general.

<b>Tabla 18.</b> Relación estado general y linfocitos B1			
		<b>Estado General</b>	<b>Linfocitos B1 totales</b>
<b>Estado General</b>	<b>Correlación de Pearson</b>	1	-0,231
	<b>Sig. (bilateral)</b>		0,083
	<b>N</b>	57	57
<b>LINFOCITOS B1 TOTALES</b>	<b>Correlación de Pearson</b>	-0,231	1
	<b>Sig. (bilateral)</b>	0,083	
	<b>N</b>	57	129

### 3.1.17.- RELACIÓN LINFOCITOS B1 Y NECESIDAD DE AUMENTAR TRATAMIENTO EN SEGUIMIENTO

Se objetivó la relación entre los valores de linfocitos B1 y la necesidad de escalar tratamiento para la enfermedad. No se pudieron realizar estudios ya que sólo a 3 pacientes se les escaló el tratamiento en el seguimiento.

### 3.1.18.- RELACIÓN LINFOCITOS B1 Y ENFERMEDAD PERIANAL

Se analizó la relación entre el **déficit de linfocitos B1** medido como percentil 10, con la presencia o no de **enfermedad perianal, sin hallar relación** significativa. Sin embargo, hay un mayor porcentaje de pacientes deficientes en linfocitos B1 entre los que tienen afectación perianal, y las frecuencias de linfocitos B1 son menores. Esto es por la N, que es pequeña. Sólo 7 pacientes tenían enfermedad perianal.

<b>Tabla 19. Relación enfermedad perianal y déficit linfocitos B1</b>					
			<b>B1_Deficit_1 (B1&lt;0.0057_Perc 10)</b>		<b>Total</b>
			<b>No</b>	<b>Déficit B1</b>	
<b>Perianal</b>	<b>No</b>	<b>Recuento</b>	34	23	57
		<b>% dentro de Perianal</b>	59,6%	40,4%	100,0%
	<b>Perianal</b>	<b>Recuento</b>	2	5	7
		<b>% dentro de Perianal</b>	28,6%	71,4%	100,0%
<b>Total</b>		<b>Recuento</b>	36	28	64
		<b>% dentro de Perianal</b>	56,3%	43,8%	100,0%

OR: 3,696 (ICOR95%: 0,660-20,702) p = 0,225

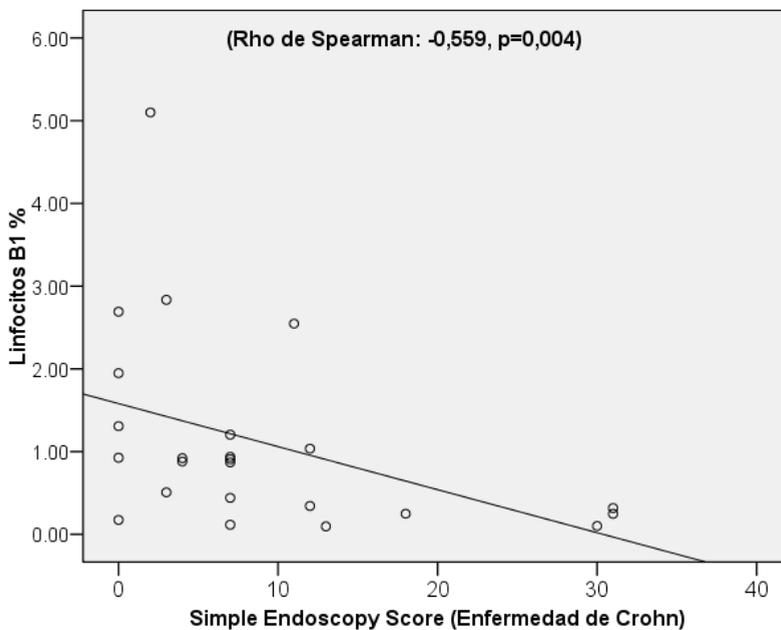
<b>Tabla 20.</b> Frecuencias medias de linfocitos B1 en pacientes con y sin enfermedad perianal				
		<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>LINFOCITOS B1</b>	<b>Perianal</b>	7	0,0097	0,0141
	<b>No</b>	57	0,0152	0,0214

p = 0,243

### 3.1.19.- RELACIÓN ILEOCOLONOSCOPIA (Simple Endoscopy Score: SES-CD) Y LINFOCITOS B1

Se realizó ileo-colonoscopia a 24 pacientes coincidiendo con la extracción de sangre para el estudio, encontrando una relación inversa entre los niveles de linfocitos B1 y el índice endoscópico de gravedad utilizado: Simple Endoscopy Score (SES-CD)<sup>223</sup>.

Así, la relación del porcentaje de B1 y SES-CD fue de -0,559 (Rho de Spearman,  $p = 0,004$ ), la relación de B1 con SES-CD fue de -0,443 (Rho de Spearman,  $p = 0,030$ ). Lo que indica que a menor B1 mayor gravedad endoscópica y viceversa.



**Gráfica 9.** Relación índice endoscópico (SES-CD) y linfocitos B1.

<b>Tabla 21. Relación de los linfocitos B1 con ileo-colonoscopía en EC</b>			
	<b>Rho de Spearman (RS)</b>	<b>B1 %</b>	<b>B1 Totales</b>
<b>Simple Endoscopy Score (SES-CD)</b>	RS	-0,559	-0,443
	Significación (p)	0,004	0,030
<b>SES-CD Recto</b>	RS	-0,328	-0,244
	Significación (p)	0,117	0,251
<b>SES-CD Colon Izquierdo</b>	RS	-0,368	-0,242
	Significación (p)	0,077	0,254
<b>SES-CD Transverso</b>	RS	-0,534	-0,433
	Significación (p)	0,007	0,035
<b>SES-CD Colon Derecho</b>	RS	-0,430	-0,305
	Significación (p)	0,036	0,147
<b>SES-CD Íleon</b>	RS	-0,247	-0,198
	Significación (p)	0,244	0,354

<b>Tabla 22. Valores descriptivos de SES CD</b>				
	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Media</b>	<b>D.E.</b>
<b>Simple Endoscopy Score ( SES)</b>	0	31	9.0	9.6
<b>SES Recto</b>	0	8	1.3	2.5
<b>SES Colon Izquierdo</b>	0	8	2.0	2.9
<b>SES Transverso</b>	0	8	1.5	2.8
<b>SES Colon Derecho</b>	0	7	1.3	2.4
<b>SES Íleon</b>	0	7	2.9	2.6

### **3.1.20.- RELACIÓN LINFOCITOS B1 Y TABAQUISMO**

No se halló relación entre el nivel de linfocitos B1 en sangre periférica en los pacientes con EC y la presencia o no de tabaquismo.

### **3.1.21.-RELACIÓN LINFOCITOS B1 Y PÉRDIDA DE PESO**

No se objetivó relación entre los valores de linfocitos B1 y la pérdida de peso, medida al calcular el CDAI.

### 3.2.- DESARROLLO ARGUMENTAL (DISCUSIÓN)

Los resultados del presente trabajo indican que **existe un déficit de los linfocitos B1 en sangre periférica en pacientes con EC.**

Los **linfocitos B1 han sido estudiados fundamentalmente en ratones**, y se sabe que en humanos hay un tipo de linfocitos B CD5+ que parecen compartir las propiedades fenotípicas de los linfocitos B1a murinos<sup>227</sup>. Tienen un papel fundamental en la secreción de IL-10, interleuquina anti-inflamatoria que está claramente involucrada en la inflamación intestinal de la EII, como hemos descrito en la introducción del presente estudio. Sin embargo, un estudio de Septiembre de 2015 del prestigioso grupo de Leuven, afirma que el **papel de los linfocitos B en la patogenia de la EII es desconocido**<sup>228</sup>.

Estudios cultivando linfocitos B1 y macrófagos de ratones han demostrado que los linfocitos B1 disminuyen la actividad de los macrófagos a través de la secreción de IL-10, lo que confirma su papel en la regulación inmune<sup>229</sup>. Sin embargo, hay estudios que demuestran que los linfocitos B productores de IL-10 son diferentes de los linfocitos B1<sup>230</sup>. Estas evidencias confirman la falta de profundidad en el conocimiento de estos linfocitos.

También hay un estudio en ratones que a través de una colitis inducida, investiga el papel de los linfocitos B1<sup>231</sup>. Estudiaron ratones sin TCR $\alpha$ , criándolos durante más de 5 generaciones, y comparando la colitis en un ambiente libre de gérmenes y en otro con ambiente convencional. Objetivaron que la supresión de la colitis en estos ratones bajo un medioambiente convencional no ocurría en la ausencia de linfocitos B. Estudiaron las características fenotípicas y funcionales de las células B de varios tejidos (bazo, colon y tejido linfoide asociado a mucosa del colon), objetivando un aumento de linfocitos B1 en la cavidad peritoneal de los

ratones criados en ambiente normal comparado con los criados en ambiente sin gérmenes. Sin embargo no hallaron diferencias entre el número de linfocitos B1-a (los que estudiamos en nuestra investigación, CD5+) de la cavidad peritoneal de los dos tipos de ratones, sugiriendo un aumento de los linfocitos B1-b.

Estos mismos autores<sup>231</sup>, estudiaron también los niveles de inmunoglobulinas, objetivando un aumento de Ig M en el suero de los ratones criados en ambiente convencional respecto a los libres de gérmenes. No hallaron diferencias en los niveles de IgA. Estos hallazgos indican que los linfocitos B1 regulan la colitis y producen Ig M natural bajo condiciones de gérmenes habituales. Concluyen que los linfocitos B1-b están involucrados en la producción de anticuerpos naturales y participan en la fase inicial, independiente de los linfocitos T, de la respuesta inmune antimicrobiana. Los linfocitos B1 previenen el desarrollo de colitis. La producción de linfocitos B1 que generan IL-10 e IL-12 está provocada durante la inflamación crónica intestinal, mientras que los linfocitos B1 reguladores se inducen sin inflamación intestinal bajo condiciones no higiénicas.

Un estudio japonés de 2014<sup>232</sup>, estudió la producción de IL-10 en células de pacientes con EC y en un modelo experimental de colitis murina. Como marcadores de superficie celular de los linfocitos B reguladores, usaron CD19 y CD1d. Obtuvieron que la producción de IL-10 en los linfocitos B de los pacientes con EC fue significativamente menor que la de los controles sanos. Concluyen que la deficiencia o disminución de la función de los Bregs exagera la inflamación intestinal, lo que podría estar asociado con la patogénesis de la EC.

Garraud *et al*<sup>233</sup>, publicaron una revisión del papel de los linfocitos B tanto en ratones como en humanos. Explican su implicación en la respuesta

inmune y la secreción de IL-10. También los estudios realizados en enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencia común variable o pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. Concluyen que los papeles complejos de los linfocitos B aún no están totalmente caracterizados. Dentro de estas nuevas funciones estarían los linfocitos B1 de nuestra investigación en EC. **No hay prácticamente estudios del papel de los linfocitos B1 en EC.** En esta amplia revisión ni se menciona<sup>233</sup>.

Sí se ha estudiado el **papel de los linfocitos B1 en distintas enfermedades autoinmunes** no específicas de órgano, como artritis reumatoide, lupus y síndrome de Sjögren. Estas enfermedades están caracterizadas por la presencia de autoanticuerpos que podrían tener un papel importante en el daño tisular. Se cree que la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades autoinmunes podría resultar de una regulación negativa disminuida de las células B1<sup>234</sup>. Tras nuestros resultados, con la disminución de los linfocitos B1 en EC, y especialmente en los más graves, este podría ser el mismo mecanismo en la EC, aunque se necesitan más investigaciones al respecto.

Además de autoanticuerpos patogénicos, los linfocitos B1 contribuirían a las enfermedades autoinmunes al actuar como células presentadoras de antígenos propios a células T auto-reactivas<sup>175</sup>.

Defendeti realizó el **primer estudio en humanos**<sup>182</sup> sobre la **relación de los linfocitos B1 y la EII**. Su objetivo era investigar la localización de las células productoras de inmunoglobulinas, tanto en EC como CU. Demostró que había menos linfocitos B, que parecían B1, en las biopsias de pacientes con EII. Este estudio italiano recogió 96 pacientes con EII a los que se iba a realizar una colonoscopia, tomando muestras de la mucosa inflamada (enfermedad activa), tanto de íleon, colon como de recto,

sin separar resultados. Para identificar linfocitos B utilizaron los marcadores CD79+, CD20-, CD21-, CD23- y CD5±. Para identificar los linfocitos B1 utilizaron CD5+, que es el mismo marcador que hemos utilizado en nuestra investigación.

En este estudio de Defendeti<sup>182</sup> la ausencia de B1 (definidos por los marcadores descritos arriba) estuvo estadísticamente asociado con EC, frente a CU. La presencia de células B1 tenía un valor predictivo negativo de 82,9% para EC, con una sensibilidad de 0,781 y una especificidad de 0,531.

En la presente tesis se han encontrado **diferencias significativas entre el número total de linfocitos entre los pacientes con EC y los controles**,  $1,7 \pm 0,8$ , vs  $2,0 \pm 0,6$ , con una p de 0,006. Esto podría tener importancia en los resultados de linfocitos B1, pero no es así, ya que no existen diferencias significativas entre los valores de linfocitos B entre los pacientes y los controles, aunque sí había una tendencia a mayor cantidad de los mismos en los pacientes.

La disminución de los linfocitos en general en los pacientes con EC podría tener dos justificaciones. Una, que los pacientes con EC tienen un peor estado nutricional, dado que está demostrado que los linfocitos disminuyen en estados carenciales y de desnutrición, (varios estudios<sup>235-7</sup> han demostrado un número disminuido de linfocitos B en pacientes desnutridos). La otra es que la disminución de linfocitos B1 influya en los niveles totales de linfocitos, pero esto parece improbable, ya que como se ha mencionado antes, los valores de linfocitos B no son diferentes entre pacientes y controles en nuestros resultados.

Podría pensarse que los **fármacos** potentes empleados en la EC pueden modificar los niveles de linfocitos B1 en nuestra investigación, pero analizamos todos ellos en conjunto, y salicilatos, azatioprina, 6-

mercaptopurina, corticoides, antibióticos y anti-TNF en particular, y **no hay diferencias significativas**. Sólo los antibióticos tenían una p próxima a la significación estadística, 0,068. Una explicación a este resultado sería que los pacientes que llevan antibióticos son los más graves, muchos de ellos ingresados por un brote. Sin embargo, esto también justificaría una disminución de los B1 en los pacientes con corticoides, cosa que no sucede en nuestra investigación.

También sería lógico pensar que los pacientes que están tratados con anti-TNF son más graves y deberían tener unos linfocitos B1 inferiores, pero hoy en día, con la instauración y asentamiento de la **Unidad de enfermedad inflamatoria intestinal** en nuestro centro, cada vez introducimos los anti-TNF más tempranamente y tenemos muchos pacientes con buena evolución de la enfermedad, que no cumplen criterios de gravedad, y llevan estos fármacos en mantenimiento. No se hallaron niveles de linfocitos B1 menores en pacientes que llevaban anti-TNF frente a los que no los llevaban. Probablemente todas estas tendencias se resolverán con la progresiva introducción de pacientes en esta línea de investigación.

Tampoco se pueden justificar estos datos por la leucopenia que provoca el tratamiento con azatioprina<sup>238</sup>, ya que no hallamos diferencias en los valores de leucocitos entre los pacientes con EC y los controles.

Sí se ha descrito<sup>239</sup>, la disminución de los linfocitos B totales y los CD5+ en pacientes con lupus eritematoso sistémico y metotrexate. También<sup>240</sup>, la disminución de estos mismos linfocitos B1 en pacientes con EII tratados con corticoesteroides, cosa que no sucede en nuestro estudio. Sí coincidimos en este último estudio<sup>240</sup> en la no modificación de sus niveles en los pacientes tratados con 5-ASA..

En el estudio de Defendeti y colaboradores<sup>182</sup>, el tratamiento tampoco no influyó en la presencia de linfocitos B1, aunque no estudiaron la influencia de los distintos tratamientos por separado, como nuestro grupo ha realizado.

Un estudio reciente, publicado en Septiembre de 2015 por el grupo de Leuven<sup>228</sup>, estudia la **influencia del tratamiento con fármacos anti-TNF en los linfocitos B de sangre** periférica. Las muestras son de 52 controles sanos y de pacientes con EII antes (46 pacientes) y/o durante el tratamiento con anti-TNF (55 pacientes).

En los enfermos con EC, antes del tratamiento con anti-TNF, hallan un número menor de linfocitos B (CD19+) en sangre periférica, un estado de activación menor (medido mediante la expresión de CD40) y menores proporciones de linfocitos B1 (CD5+, como en nuestro estudio) comparado con los controles. El tratamiento con anti-TNF aumentó el número de linfocitos B (CD19+), así como los tipos de éstos, en respondedores, pero no en no respondedores. La restauración de los linfocitos B se correlacionó con la respuesta biológica al tratamiento, medido mediante la proteína C reactiva. Los niveles de anti-TNF se correlacionaron con los linfocitos B durante la terapia. Estos autores concluyen que el mecanismo de este efecto en los linfocitos B debe ser más explorado<sup>228</sup>.

La existencia de diferencias en nuestro trabajo entre los niveles de B1 entre los patrones inflamatorio y fistulizante, mayores en el primero, hablan a favor de un papel de los linfocitos B1 en la gravedad de la enfermedad. Es más, los linfocitos B1 disminuyen conforme progresa el patrón en gravedad, aunque sin diferencias significativas, más que las descritas previamente. Es decir, existe una **disminución progresiva del**

**número de linfocitos B1 entre los patrones inflamatorio, estenosante y fistulizante.**

Este hecho nos hace pensar en los **linfocitos B1** como una **célula central en la etiología y patogenia de la EC**, ya que el patrón inflamatorio es el más indolente y el fistulizante (también conocido como penetrante) el más grave<sup>241</sup>. Estos datos demuestran que la disminución de los niveles de B1 están relacionados con la EC.

En el estudio de Defendeti *et al.* objetivaron un aumento de linfocitos B en el 42,7% de las biopsias de pacientes con EII, pero su ausencia estuvo relacionado con la EC, pero no con la gravedad de la enfermedad ni el tratamiento. Estos autores piensan que las células B1 pueden tomar parte activa en la inflamación intestinal, pero su reclutamiento masivo podría tener menos importancia que su ausencia. Tampoco se halló relación entre la presencia de linfocitos B en las biopsias y la gravedad de la enfermedad, medido con el CDAI, como ha sucedido en la presente tesis<sup>182</sup>.

Cabe también destacar la **relación entre los niveles de linfocitos B1 con el índice endoscópico SES-CD. No hay ningún estudio que relacione actividad endoscópica y linfocitos B1**. En el estudio de septiembre de 2015 de Leuven<sup>228</sup> relacionan niveles bajos de linfocitos B con EC activa, tanto EC como CU. Sus 46 pacientes con EII activa tenían niveles de linfocitos B (CD19+) menores comparados con los controles sanos. Relacionaron además negativamente los niveles de proteína C reactiva con el número de linfocitos B circulantes. Nuestro equipo de investigación considera que la EC y la CU son enfermedades diferentes inmunológicamente, como se ha explicado en la introducción. Por esto, hemos relacionado únicamente pacientes con EC con la gravedad endoscópica, demostrando **alta correlación tanto con el índice endoscópico de la enfermedad** (Crohn's Disease Endoscopic Index of

Severity) como con el índice habitual para medir actividad clínica: CDAI (Crohn's Disease Activity Index)<sup>223</sup>.

Pese a que los linfocitos B1 están encargados de la secreción de Ig M natural e IL-10<sup>180</sup>, en nuestro estudio **no se observó disminución de Ig M en relación a la disminución de linfocitos B1**. Esto se puede deber a que la Ig natural se secrete más en intestino y peritoneo y no en suero, ya que los linfocitos B1 están estratégicamente localizados en peritoneo y pleura<sup>182</sup>. Sin embargo, los linfocitos B1 han demostrado ser los mayores productores de Ig M natural (anticuerpo con baja afinidad, con diversidad limitada en ausencia de infección). Se ha objetivado que más del 80% de la IgM natural del suero está derivada de los linfocitos B1<sup>242</sup>.

Para completar este aspecto de nuestra investigación, ya hemos iniciado la inclusión de pacientes con EC y controles a los que se ha realizado estudio de **linfocitos B1 en suero y en tejido ileal obtenido mediante ileo-colonoscopia**.

Uno de los hallazgos más sorprendentes de esta investigación es el **valor del déficit de linfocitos B1 para pronosticar la necesidad de cirugía en el seguimiento**.

Era significativa la disminución de linfocitos B1 en los pacientes que en algún momento de su enfermedad requerían cirugía, tanto antes de la inclusión como posteriormente a la misma. Los pacientes con EC y deficiencia de linfocitos B1 presentan una probabilidad 6 veces mayor de antecedentes de Cirugía previa relacionada con su enfermedad. Además, la probabilidad de que un paciente con EC y deficiencia de linfocitos B1 presente una complicación quirúrgica es de casi 7 veces más que el paciente con EC sin deficiencia de B1. Es decir, la **deficiencia en los pacientes con EC aumenta la posibilidad de complicación quirúrgica en más del 700%**.

En el estudio de Defendeti<sup>182</sup>, sólo 1 de los 41 pacientes en los que detectaban linfocitos B1 había tenido previamente cirugía, frente a 13 de 55 en los que no se detectaba. Esto va en la línea de nuestros resultados, reincidiendo en la mayor gravedad de los pacientes con menores linfocitos B1.

Se han analizado las variables predictivas en la EC para la necesidad de nueva cirugía<sup>243</sup>, objetivándose que existe un nivel alto de intervenciones quirúrgicas en la EC pese a la introducción de los anti-TNF. Los factores que se han asociado con una reintervención han sido la juventud en la primera intervención, el comportamiento penetrante y el permanecer sin tratamiento con azatioprina. Otro estudio<sup>244</sup>, ha encontrado como factores de riesgo independientes para cirugía abdominal en la EC, la edad al diagnóstico, la localización ileal y los patrones estenosante y fistulizante.

En cualquier caso, los hallazgos de esta tesis, siguen corroborando la hipótesis de la inmunodeficiencia como factor etiopatogénico fundamental en la EC. Estos resultados abren nuevas líneas de investigación que aclararan mas las incógnitas que aun suscita esta enfermedad: **¿Son los linfocitos B1 la inmunodeficiencia inicial que precipita la invasión de patógenos que producirían una respuesta inflamatoria crónica que hoy en día conocemos, o por el contrario el déficit de linfocitos B1 forma parte de una respuesta inmune alterada?** Nuestro equipo defiende la primera hipótesis, pues nuestros trabajos van en este sentido, aunque se requieren más investigaciones. Como hemos comentado, la inclusión de más pacientes, a los que estamos estudiando los linfocitos B1 en suero y tejido ileal aportarán más datos a esta novedad en la etiopatogenia de la EC, abriendo nuevas perspectivas terapéuticas en la misma.



#### **4.- CONCLUSIONES FINALES**

1.- La frecuencia de linfocitos B1 (CD19+CD5+) en los pacientes de Crohn es significativamente más baja que en los sujetos sanos, y la deficiencia de B1 alcanza casi al 50 % de los pacientes de EC. Esto confirma la hipótesis inicial del presente trabajo.

2.- La frecuencia de linfocitos B1 (CD19+CD5+) en el patrón estenosante y fistulizante es progresivamente más baja que en el inflamatorio, siendo significativo en el fistulizante.

3.- Los pacientes con EC que sufren cirugía previa, durante o en brote posterior al estudio presentan frecuencia de linfocitos B1 más baja que los que no sufren cirugía. Además, la deficiencia de B1 en los pacientes con EC aumenta más de 7 veces la posibilidad de complicación quirúrgica.

4.- La actividad endoscópica medida con el índice SES-CD se correlaciona con el nivel de linfocitos B1.

5.- Estos datos sugieren que la deficiencia de linfocitos B1 (inmunidad innata) está relacionada con la EC.

6.- Se abren líneas de investigación en la inmunidad innata en la EC, y líneas de tratamientos encaminados a mejorar esta inmunidad y en concreto los linfocitos B1.



## 5.- RESUMEN DE LA TESIS

### 5.1.-INTRODUCCIÓN GENERAL

La EC es un proceso inflamatorio crónico y recidivante, sin tendencia a la curación, que puede afectar a todo el tracto gastrointestinal. Se piensa que resulta de una respuesta inmune aberrante y continua contra la microbiota intestinal, catalizada por una susceptibilidad genética individual y múltiples factores medioambientales. Aunque hay múltiples conocimientos sobre su fisiopatología, su **etiología permanece desconocida**.

Hay varias teorías que se han descrito en las últimas décadas para hipotetizar sobre la etiología de la EC: la teoría infecciosa, la autoinmune, la genética, la de la higiene y la autoinflamatoria. En los **últimos años, se está definiendo la EC como una inmunodeficiencia**, sin conocerse aún el mecanismo inicial exactamente. En la presente tesis aportamos el papel de los linfocitos B1 (un tipo de linfocitos que se localizan fundamentalmente en peritoneo y pleura, que liberan Ig M al medio extracelular, y producen también Ig A) en la fisiopatología de la enfermedad.

### 5.2.-METODOLOGÍA

El proyecto nació de la hipótesis de una relación de la población de linfocitos B1 con la EC, en concreto una deficiencia de los mismos, proponiendo los siguientes objetivos:

**Objetivo principal:** medir los niveles de linfocitos B1 (CD19+CD5+) en sangre periférica en pacientes con EC y compararlos con controles sanos, e interpretar los resultados de su relación con la EC, incluyendo gravedad y evolución de la misma.

**Objetivos secundarios:**

-Valorar los niveles de Ig M e Ig A en pacientes con EC.

-Correlacionar los niveles de Ig M e Ig A en suero de pacientes con EC con los niveles de Linfocitos B1.

-Correlacionar los niveles de linfocitos  $T\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  con los linfocitos B1.

Se realizó un estudio **prospectivo y observacional de casos y controles**. Se reclutaron un total de **128 sujetos**, 64 pacientes con EC y 64 sanos control, apareados por sexo y grupo de edad. Se definieron 3 escenarios clínicos: paciente nuevo, paciente en remisión y paciente en brote. Se estudiaron en los pacientes múltiples variables: sexo, edad, índices de gravedad (Crohn's disease activity index (CDAI) e índice de Harvey y Bradshaw), fármacos, índice de gravedad endoscópica (SES-EC) y como factores pronósticos: hospitalizaciones, brotes de la enfermedad, visitas urgentes a la consulta de digestivo, visitas al servicio de urgencias por la EC, intervenciones quirúrgicas, aumento de dosis de fármacos, adición de nuevos fármacos y tabaquismo. Tanto en pacientes como en controles se analizó: hemograma, PCR, VSG y poblaciones linfocitarias.

Todos los datos recogidos se introdujeron en una base de datos y se analizaron mediante el programa estadístico SPSS. Se comprobó la asunción de distribución normal para las variables continuas mediante pruebas gráficas y la prueba de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de la significación de Lilliefors. Cuando se asumió normalidad se utilizó el t-test para comparar las medias de las variables cuantitativas y se utilizó el test de  $\chi^2$  para el contraste de proporciones entre categorías. En caso de no aceptarse la hipótesis de normalidad de la variable cuantitativa se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. El nivel de significación asumido fue de  $p < 0,05$ .

### 5.3.- RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

De los 64 pacientes con EC, 35 (54,7%) fueron hombres y 29 (45,3%) mujeres, con el mismo número de hombres y mujeres en los

controles. La edad media de los pacientes con EC fue de  $38,9 \pm 13,8$  vs  $42,9 \pm 16,8$ , en los controles,  $p = 0,144$ , sin existir diferencias.

Se analizaron las características del hemograma de los pacientes con EC y controles, objetivándose diferencias significativas en: niveles de linfocitos (menores en EC), plaquetas (mayores en EC) y hemoglobina (menores en EC).

Se estudiaron las poblaciones linfocitarias y se compararon las de los pacientes con EC con los controles, hallándose diferencias significativas en linfocitos CD3+, linfocitos CD8+, linfocitos CD56+, linfocitos CD3+  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ , linfocitos CD4+  $\alpha\beta$ , linfocitos CD8+  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ , todos ellos menores en pacientes con EC.

**No hubo diferencias significativas en los linfocitos B en pacientes con EC frente a los controles**, sin embargo sí se objetivó **un número menor de linfocitos B1 en pacientes con EC**. La media de linfocitos B1 en los pacientes con EC fue  $0,0146 \pm 0,0207 \times 10^9/L$ , frente a  $0,251 \pm 0,0168$  de los controles sanos. La diferencia fue estadísticamente significativa, con  $p = 0,002$ .

Analizando los niveles de linfocitos B1, no hubo significación entre los distintos escenarios de la enfermedad entre sí (debut, remisión y actividad). Tampoco en los niveles de linfocitos B1 en los grupos de edad de la clasificación de Montreal, ni entre las localizaciones de la enfermedad: ileal, colónica e ileocolónica.

Se obtuvieron niveles de linfocitos B1 superiores en el patrón inflamatorio frente al patrón fistulizante, sin hallar diferencias significativas entre el resto de combinaciones de los patrones, aunque los niveles eran menores conforme progresaba el patrón en gravedad: inflamatorio → estenosante → fistulizante.

No hay diferencias significativas en los niveles de linfocitos B1 entre los pacientes según lleven o no tratamiento ( $p = 0,867$ ). Analizando cada uno de los tratamientos por separado, tampoco se hallaron diferencias significativas en el número de linfocitos B1.

**Hallamos un número menor de linfocitos B1 en los pacientes que a lo largo de la historia de su enfermedad han sido operados** en relación a su enfermedad (EC), bien fuera antes o después de la inclusión en la investigación, o incluidos en el momento de la cirugía.

No se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de linfocitos B1 entre los pacientes con EC que previamente a la inclusión habían sufrido una intervención quirúrgica y los que no. La diferencia es marcada, pero no es significativa por el número bajo de pacientes con cirugía previa, 9.

Se objetivó una **clara diferencia entre los pacientes que tras la inclusión presentaban un empeoramiento y precisaban de cirugía, con un número de linfocitos mucho menor**, y diferencia estadísticamente significativa, respecto a los pacientes que no precisaban de cirugía tras la inclusión.

Se analizaron los niveles de inmunoglobulinas (Ig A, Ig G e Ig M) en los pacientes con EC y los controles, sin hallar diferencias significativas.

No se ha encontrado una correlación entre la frecuencia de linfocitos B1 y las Igs M, G, y A.

Para calcular la **deficiencia de linfocitos B1** se ha calculado en valor por debajo del percentil 10 en los pacientes control: deficiencia B1:  $CD19+CD5+ < 0,0057 \times 10^9/L$ . No se objetivó relación estadísticamente significativa entre el déficit de B1 (percentil 10) y los distintos escenarios

clínicos de la EC (debut, remisión o brote en actividad). Tampoco entre los grupos de edad de la clasificación de Montreal, la localización de la EC, ni el patrón de la EC (inflamatorio, estenosante o fistulizante).

Se analizó la relación entre la deficiencia de linfocitos B1 (percentil 10) y el antecedente de cirugía de la EC. Los pacientes con **EC y deficiencia de linfocitos B1 presentan una probabilidad 6 veces mayor de antecedentes de cirugía previa** relacionada con su enfermedad.

Se objetivó la relación entre la presencia de déficit de linfocitos B1 y la presencia futura de un brote quirúrgico, hallándose que la probabilidad de que un paciente con EC y deficiencia de linfocitos B1 presente una complicación quirúrgica es de casi 7 veces más que el paciente con EC sin deficiencia de B1. Es decir, la **deficiencia en los pacientes con EC aumenta la posibilidad de complicación quirúrgica en más del 700 %**.

No hubo relación entre los niveles de linfocitos B1 con la posibilidad de presentar brote en el seguimiento.

Se calculó la relación entre los valores de linfocitos B1 y la necesidad de escalar tratamiento para la enfermedad, sin poderse realizar estudios ya que sólo a 3 pacientes se les escaló el tratamiento en el seguimiento.

Se analizó la relación entre el déficit de linfocitos B1 medido como percentil 10, con la presencia o no de enfermedad perianal, sin hallar relación significativa. Sin embargo, hay un mayor porcentaje de pacientes deficientes en linfocitos B1 entre los que tienen afectación perianal, y las frecuencias de linfocitos B1 son menores. Esto es por la N, que es pequeña. Sólo 7 pacientes tenían enfermedad perianal.

Se realizó ileo-colonoscopia a 24 pacientes coincidiendo con la extracción de sangre para el estudio, encontrando una **relación inversa entre**

**los niveles de linfocitos B1 y el índice endoscópico de gravedad utilizado:** Simple Endoscopy Score (SES-CD). Así, la relación del porcentaje de B1 y SES-CD fue de -0,559 (Rho de Spearman,  $p = 0,004$ ), la relación de B1 con SES-CD fue de -0,443 (Rho de Spearman,  $p = 0,030$ ). Lo que indica que a menor B1 mayor gravedad endoscópica y viceversa.

#### 5.4.-CONCLUSIONES FINALES

**La frecuencia de linfocitos B1 (CD19+CD5+) en los pacientes de Crohn es significativamente más baja que en los sujetos sanos, y la deficiencia de B1 alcanza casi al 50 % de los pacientes de EC.**

**La frecuencia de linfocitos B1 (CD19+CD5+) en el patrón estenosante y fistulizante es progresivamente más baja que en el inflamatorio, siendo significativo en el fistulizante.**

**Los pacientes con EC que sufren cirugía previa, durante o en brote posterior al estudio presentan frecuencia de linfocitos B1 más baja que los que no sufren cirugía. Además, la deficiencia de B1 en los pacientes con EC aumenta más de 7 veces la posibilidad de complicación quirúrgica.**

**La actividad endoscópica medida con el índice SES-CD se correlaciona con el nivel de linfocitos B1.**

Estos datos sugieren que la deficiencia de linfocitos B1 (inmunidad innata) está relacionada con la EC.

## **6.-BIBLIOGRAFIA**

- 1.- Dignass A, Eliakim R, Magro, F, Maaser C, Chowers Y, Geboes K, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 1: definitions and diagnosis. J Crohns Colitis. 2012; 6: 965-90.
- 2.- Van Assche G, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, et al. European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). The Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. J Crohns Colitis. 2010; 4:7-27.
- 3.- Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. N Engl J Med. 2009; 361: 2066-78.
- 4.- Zhang Y, Yong-Yu L. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. World J Gastroenterol 2014; 20(1): 91-9.
- 5.- Monteleone G, Caruso R, Pallone F. Targets for new immunomodulation strategies in inflammatory bowel disease. Autoimmunity Reviews 2014; 13: 11-4.
- 6.- Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. Lancet 2012; 380: 1590-605.
- 7.- Rocchi A, Benchimol E, Bernstein Ch, Bitton A, Feagan B. Panaccione R, et al. Inflammatory bowel disease : A Canadian burden of illness review. Can J Gastroenterol. 2012 ; 26 : 811-7.
- 8.- Burisch J, Vardi H, Pederson N, Briner M Cukovic-Cavka S, Kaimaklotis I et al. Costs and resource utilization for diagnosis and treatment during the initial year in a european inflammatory bowel disease inception cohort: an ECCO-EpiCom study. Inflamm Bowel Dis 2015; 21: 121-131.

- 9.- López-Serrano P, Pérez-Calle JL, Carrera-Alonso E, Pérez-Fernández T, Rodríguez-Caravaca G, Boixeda-de-Miguel D et al. Epidemiologic study on the current incidence of inflammatory bowel disease in Madrid. *Rev Esp Enferm Dig.* 2009; 101:768-72.
- 10.- Hovde O, Moum BA. Epidemiology and clinical course of Crohn's disease: results from observational studies. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 1723-31.
- 11.- Martínez-Montiel MdP, Gómez-Gómez GJ, Flores AI. Therapy with stem cells in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 1211-27.
- 12.- Durban L, Herrera L, Martín L, Catalán I, Gil-Borrás R, Bixquert M, et al. Estudio de la incidencia de la Enfermedad Inflamatoria en el Departamento de Salud 6 de Valencia. *Rev Esp Enf Digest* 2010;102 (Supl I): 19-172.
- 13.- Esmaily H, Sanei Y, Abdollahi M. Autoantibodies and an immune-based rat model of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2013; 21: 7569-76.
- 14.- Antoni L, Nuding S, Wehkamp J, Stange EF. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20(5):1165-79.
- 15.- Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptative immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmunity Reviews* 2014; 13: 3-10.
- 16.- Quin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464:59-65.

- 17.- Izcue A, Coombes JL, Powrie R. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Rev* 2006; 212: 256-71.
- 18.- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308: 1635-8.
- 19.- Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* 2011; 60: 631-7.
- 20.- Wallace KL, Zheng L, Kanazawa Y, Shih DQ. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 6-21.
- 21.- Moussata D, Goetz M, Gloeckner A, Kerner M, Campbell B, Hoffman A et al. Confocal laser endomicroscopy is a new imaging modality for recognition of intramucosal bacteria in inflammatory bowel disease in vivo. *Gut* 2011; 60: 26-33.
- 22.- Martínez-Medina M, Aldeguer X, Gonzalez-Huix F, Acero D, Garcia-Gil LJ. Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Inflamm Bowel Diss* 2006; 12: 1136-45.
- 23.- Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 16731-6.
- 24.- Yazisiz V. Similarities and differences between Behçet's disease and Crohn's disease. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2014; 5: 228-38.

- 25.- Johansson ME, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 104: 15064-9.
- 26.- Di Sabatino A, Paccagnini D, Vidali F, Rosu V, Biancheri P, Cossu A et al. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)-specific IS900 DNA and antibodies against MAP peptides and lysate in the blood of Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 1254-5.
- 27.- Lee A, Griffiths TA, Parab RS, King RK, Dubinsky MC, Urbanski SJ et al. Association of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* with Crohn disease in pediatric patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011; 52: 170-4.
- 28.- Martínez-Medina M, Aldeguer X, Lopez-Siles M, González-Huix F, López-Oliu C, Dahbi G, et al. Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 872-82.
- 29.- Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 2687-92.
- 30.- Geary RB, Dodgshun AJ. The hygiene hypothesis in IBD. *J Crohns Colitis*. 2012; 6: 869.
- 31.- Andreu-Ballester JC, Garcia-Ballesteros C, Amigo V, Ballester F, Gil-Borrás R, Catalán-Serra I et al. Microsporidia and its relation to Crohn's disease. A retrospective study. *PLoS One*. 2013 Apr 18;8(4): e62107.
- 32.- Eeftinck Schattenkerk JK, van Gool T, van Ketel RJ, Bartelsman JF, Kuiken CL, Terpstra WJ, Reiss P. Clinical significance of small-intestinal microsporidiosis in HIV-1-infected individuals. *Lancet*. 1991; 337:895-8.

- 33.- Blanshard C, Gazzard BG. Microsporidiosis in HIV-1-infected individuals. *Lancet*. 1991; 337:1488–9.
- 34.- Graham DB, Xavier RJ. From genetics of inflammatory bowel disease towards mechanistic insights. *Trends Immunol* 2013; 34(8): 371-8.
- 35.-Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, Lepage P, Raedler A, Schreiber S. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflam Bowel Dis* 2008; 14: 968-76.
- 36.- Ng SC, Woodrow S, Patel N, Subhani J, Hardbord M. Role of genetic and environmental factors in British twins with inflammatory bowel disease. *Inflam Bowel Dis* 2012;18: 725-36.
- 37.- Adler J, Rangwalla SC, Dwamena BA, Higgins PD. The prognostic power of the NOD2 genotype for complicated Crohn's disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 699-712.
- 38.- Arijis I, Li K, Toedter G, Quintens R, Van Lommel L, Van Steen K et al. Mucosal gene signatures to predict response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *Gut* 2009; 58: 1612-19.
- 39.- Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012;490: 119-24.
- 40.-Zhang F, Liu H, Chen S, Low H, Sun L, Cui Y, et al. Identification of two new loci at IL23R and RAB32 that influence susceptibility to leprosy. *Nat Genet* 2011; 43: 1247-51.
- 41.- Ventham, NT, Kennedy NA, Nimmo ER, Satsangi J. Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: the emerging role of epigenetics. *Gastroenterology* 2013; 145: 293-308.

- 42.- Georges M. The long and winding road from correlation to causation. *Nat Genet* 2011; 43: 180-1.
- 43.- Knights D, Lassen KG, Xavier RJ. Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. *Gut* 2013; 62: 1505-10.
- 44.- Parkes M. The genetics universe of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dig Dis* 2012; 30: 78-81.
- 45.- Yamamoto-Furusho JK, Korzenik JR. Crohn's disease: innate immunodeficiency? *World J Gastroenterol.* 2006; 12:6751-5.
- 46.- Ogura Y, Lala S, Xin W, Smith E, Dowds TA, Chen FE et al. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 2003; 52: 1591-7.
- 47.- Müzes G, Tulassay Z, Sipos F. Interplay of autophagy and innate immunity in Crohn's disease: a key immunobiologic feature. *World J Gastroenterol.* 2013; 19: 4447-54.
- 48.- Boukercha A, Mesbah-Amroun H, Bouzidi A, Saoula H, Nakkemouche M, Roy M, et al. NOD2/CARD15 gene mutations in North Algerian patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 7786-94.
- 49.- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603-6.
- 50.- Hugot JP, Chamarillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603.

- 51.- Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 867-74.
- 52.- Van Heel DA, Ghosh S, Butler M, Hunt KA, Lundberg AM, Ahmad T, et al. Muramyl dipeptide and Toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet* 2005; 365: 1794-866.
- 53.- Netea-Maier RT, Plantinga TS, Van de Veerdonk FL, Smit JW, Netea MG. Modulation of inflammation by autophagy: consequences for human disease. *Autophagy* 2015; 29: 0. Publicado online, pendiente de impresión.
- 54.- Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim YG, Magalhaes JG et al. Nod1 and NOD2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* 2010; 11: 55-62.
- 55.- Rufini S, Ciccacci C, Di Fusco D, Ruffa A, Pallone F, Novelli G et al. Autophagy and inflammatory bowel disease: Association between variants of the autophagy-related IRGM gene and susceptibility to Crohn's disease. *Dig Liver Dis* 2015. 47: 744-50.
- 56.- de Mattos BR, Garcia MP, Nogueira JB, Paiatto LN, Albuquerque CG, Souza CL, et al. Inflammatory bowel disease: an overview of immune mechanisms and biological treatments. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 493012. Publicada on line, pendiente de impresión.
- 57.- Zuk O, Hechter E, Sunyaev ST, Lander ES. The mystery of missing heritability: genetic interactions create phantom heritability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012; 109: 1193-8.
- 58.- De Santis M, Selmi C. The therapeutic potential of epigenetics in autoimmune disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2013; 42: 92-101.

- 59.- Petronis A. Epigenetics as a unifying principle in the aetiology of complex traits and diseases. *Nature* 2010; 465: 721-7.
- 60.- Declercq C, Gower-Rousseau C, Vernier-Massouille G, Salleron J, Baldé M, Poirier G et al. Mapping of inflammatory bowel disease in northern France: spatial variations and relation to affluence. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 807-12.
- 61.- Lakatos PL, Szamosi T, Lakatos L. Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6134-9.
- 62.- Hou JK, El-Serag H, Thirumurthi S. Distribution and manifestations of inflammatory bowel disease in Asians, Hispanics and African Americans: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 2100-09.
- 63.- Leslie WD, Miller N, Rogala L, Bernstein CN. Vitamin D status and bone density in recently diagnosed inflammatory bowel disease: the Manitoba IBD Cohort Study. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1451-9.
- 64.- Ananthakrishnan AN, Higuchi LM, Huang ES, Khalili H, Richter JM, Fuchs CS et al. Aspirin, nonsteroidal antiinflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Ann Intern Med* 2012; 156: 350-9.
- 65.- Camara RJ, Schoepfer AM, Pittet V, Begré S, von Känel R. Mood and nonmood components of perceived stress and exacerbation of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 2358-65.
- 66.-Timmer A, Preiss JC, Motschall E, Rucker G, Jantschek G, Moser G. Psychological interventions for treatment of inflammatory bowel disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; (2): CD006913.

- 67.- Kaplan GG, Hubbard J, Korzenik J, Sands BE, Panaccione R, Ghosh S et al. The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution: a novel association. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 2412-9.
- 68.- Ananthkrishnan AN, McGinley EL, Binion DG, Saeian K. Ambient air pollution correlates with hospitalizations for inflammatory bowel disease: an ecologic analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 1138-45.
- 69.- Smith AM, Rahman FZ, Hayee B, Graham SJ, Marks DJ, Sewell GW et al . Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *J Exp Med* 2009; 206 (9): 1883-97.
- 70.- Klag T, Stange EF, Wehkamp J. Defective antibacterial barrier in inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 2013; 31: 310-6.
- 71.- Geremia A, Jewell DP. The IL-23/IL-17 pathway in inflammatory bowel disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 6: 223-37.
- 72.- Christophi GP, Rong R, Holtzaple PG, Massa PT, Landas SK. Immune markers and differential signaling networks in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18: 2342-56.
- 73.- Behr MA, Divangahi M, Lalande JD. What's in a name? The (mis)labelling of Crohn's as an autoimmune disease. *Lancet*. 2010; 376: 202-3.
- 74.- Stange EF. Another paradigm shift: defective innate--not specific--immune system in Crohn's disease? *Z Gastroenterol*. 2004; 42:301–2.
- 75.- Marks DJ, Segal AW. Innate immunity in inflammatory bowel disease: a disease hypothesis. *J Pathol*. 2008; 214:260–6.

- 76.- Coulombe F, Behr MA. Crohn's disease as an immune deficiency? *Lancet*. 2009; 374:769–70.
- 77.- Marks DJ, Rahman FZ, Sewell GW, Segal AW. Crohn's disease: an immune deficiency state. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2010; 38:20–31.
- 78.- Marks DJ. Defective innate immunity in inflammatory bowel disease: a Crohn's disease exclusivity? *Curr Opin Gastroenterol*. 2011;27:328–34.
- 79.- Elia PP, Tolentino YF, Bernardazzi C, de Souza HS. The role of innate immunity receptors in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Mediators Inflamm*. 2015; 2015: 936193. Publicado on line. Pendiente de impresión.
- 80.- Marks DJ, Harbord MW, MacAllister R, Rahman FZ, Young J, Al-Lazikani B et al. Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation. *Lancet* 2006; 367: 668-78.
- 81.- Masters SL, Simon A, Aksentijevich I, Kastner DL. Horror aut inflammatoricus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 621-68.
- 82.- Grigg EL, Kane S, Katz S. Mimicry and deception in inflammatory bowel disease and intestinal beçhet disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2012; 8: 103-12.
- 83.- Regueiro JR, Lopez C, González S, Martínez E. Introducción a la inmunología. En: *Inmunología. Biología y patología del sistema inmunitario*. 4ª ed. Madrid. Ed. Médica Panamericana.2013: 1-15.
- 84.- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:485-517.

- 85.- Franke N, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 2010; 42: 1118-25.
- 86.- Di Sabatino A, Biancheri P, Rovedatti L, MacDonald TT, Corazza GR. New pathogenic paradigms in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18: 368-71.
- 87.- Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T et al. IL-6 programs T(h)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007; 8: 967-74.
- 88.- Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B et al. Phenotypic and functional features of human Th 17 cells. *J Exp Med* 2007; 204: 1849-61.
- 89.- Sugihara T, Kobori A, Imaeda H, Tsujikawa T, Amagase K, Takeuchi K et al. The increased mucosal mRNA expressions of complement C3 and interleukin-17 in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2010, 160: 386-93.
- 90.- Rovedatti L, Kudo, T, Biancheri P, Sarra M, Knowles CH, Rampton DS et al. Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut* 2009; 58: 1629-36.
- 91.- Sarra M, Pallone F, Macdonald TT, Monteleone G. IL-23/IL-17 axis in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 1808-13.
- 92.- Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4 + CD25hi T-regulatory cells. *Blood* 2006; 108: 253-61.

- 93.- Chamouard P, Monneaux F, Richert Z, Voegeli AC, Lavaux T, Gaub MP et al. Diminution of circulating CD4+ CD25 high T cells in naïve Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 2084-93.
- 94.- Eastaff-Leung N, Mabarrack N, Barbour A, Cummins A, Barry S. Foxp3+ regulatory T cells Th 17 effector cells and cytokine environment in inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 2010; 30: 80-9.
- 95.- Fantini MC, Rizzo A, Fina D, Caruso R, Sarra M, Stolfi C et al. Smad7 controls resistance of colitogenic T cells to regulatory T cell-mediated supresión. *Gastroenterology* 2009; 136: 1308-16.
- 96.- Di Sabatino A, Battista N, Biancheri P, Rapino C, Rovedatti L, Astarita G et al. The endogenous cannabinoid system in the gut of patients with inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol* 2011; 4: 574-83.
- 97.- Roberts-Thomson IC, Fon J, Uylaki W, Cummins AG, Barry S. Cells, cytokines and inflammatory bowel disease: a clinical perspective. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011; 5: 703-15.
- 98.- Biancheri P, Di Sabatino A, Corazza GR, Macdonald TT. Proteases and the gut barrier. *Cell Tissue Res* 2013; 351: 269-80.
- 99.- Macdonald TT, Biancheri P, Sarra M, Monteleone G. What's the next best cytokine target in IBD? *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18: 2180-9.
- 100.- Mudter J, Neurath MF. IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis*. 2007; 13; 1015-23.
- 101.- Kader HA, Tchernev VT, Satyaraj E, Lejnine S, Kotler G, Kingsmore SF et al. Protein microarray analysis of disease activity in pediatric inflammatory bowel disease demonstrates elevated serum PLGF, IL-7, TGF-

beta1, and IL-12p40 levels in Crohn's disease and ulcerative colitis patients in remission versus active disease. *Am J Gastroenterol.* 2005; 100: 414-23.

102.- Andreu-Ballester JC, Pérez-Griera J, Garcia-Ballesteros C, Amigo V, Catalán-Serra I, Monforte-Albalat A et al. Deficit of interleukin-7 in serum of patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2013; 19: 30-31.

103.- Barnes MJ, Powrie F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity* 2009; 31: 401-11.

104.- Prasad S, Mingrino R, Kaukinen K, Hayes KL, Powell RM, MacDonald TT et al. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab Invest* 2005; 85: 1139-62.

105.- Kolls JK, Linden A. IL-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21: 467-76.

106.- Hueber C, Sands BE, Lewitzky S, Vandemeulebroecke M, Reinisch W, Higgins PD, et al. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* 2012; 61: 1693-700.

107.- Xu XR, Liu CQ, Feng BS, Liu ZJ. Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 3255-64.

108.- Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human Th-17 cells. *Nature* 2008; 454: 350-2.

109.- Kuchen S, Robbins R, Sims GP, Sheng C, Phillips TM, Lipsky PE, et al. Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell

generation during CD4+ T cell-B cell collaboration. *J Immunol* 2007; 179: 5886-96.

110.- Sarra M, Monteleone I, Stolfi C, Fantini MC, Sileri P, Sica G et al. Interferon-gamma-expressing cells are a major source of interleukin-21 in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 2010; 16: 1332-9.

111.- Liu C, Xia X, Wu W, Wu R, Tang M, Chen T, et al. Anti-tumor necrosis factor therapy enhances mucosal healing through down-regulation of interleukin-21 expression and T helper type 17 cell infiltration in Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 2013; 173: 102-11.

112.- Croxford AL, Mair F, Becher B. IL-23: one cytokine in control of autoimmunity. *Eur J Immunol* 2012; 42: 2263-73.

113.- Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 479-89.

114.- Saenz SA, Siracusa MC, Perrigoue JG, Spencer SP, Urban JF, Tocker JE, et al. IL25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes T(H)2 cytokine responses. *Nature* 2010; 464: 1362-6.

115.- Su J, Chen T, Ji XY, Liu C, Yadav PK, Wu R, et al. IL-25 downregulates Th1/Th17 immune response in an IL-10-dependent manner in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19: 720-8.

116.- Cox JH, Kljavin NM, Ramamoorthi N, Diehl L, Batten M, Ghilardi N. IL-27 promotes T cell-dependent colitis through multiple mechanisms. *J Exp Med* 2011; 208: 115-23.

117.- Andreu-Ballester JC, Amigó-García V, Catalán-Serra I, Gil-Borrás R, Ballester F, Almela-Quilis A et al. Deficit of Gammadelta T Lymphocytes in

the Peripheral Blood of Patients with Crohn's Disease. *Dig Dis Sci.* 2011; 56:2613–22.

118.- Sun M, He C, Cong Y, Liu Z. Regulatory immune cells in regulation of intestinal inflammatory response to microbiota. *Mucosal Immunol.* 2015; 8: 969-78.

119.- Ding T, Yan F, Cao S, Ren X. Regulatory B cell: new member of immunosuppressive cell club. *Human Immunology.* 2015; In press.

120.- Elliott TR, Hudspith BN, Rayment NB, Prescott NJ, Petrovska L, Hermon-Taylor J, et al. Defective macrophage handling of *Escherichia coli* in Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2015. doi: 10.1111/jgh. 12955. Publicado on line. Pendiente de impresión.

121.- Shen L, Su L, Turner JR. Mechanisms and functional implications of intestinal barrier defects. *Dig Dis* 2009; 27:443-9.

122.- Al-Sadi R, Khatib K, Guo S, Ye D, Youssef M, Ma T. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011; 300:1054-64.

123.- Salim SY, Soderhom JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 362-81.

124.- Benjamin J, Makharia GK, Ahuja V, Kalaivani M, Hoshi HK. Intestinal permeability and its association with the patient and disease characteristics in Crohn's disease. *World J Gastroenterology*, 2008; 14(9): 1399-1405.

125.- D'Incà R, Annese V, Di Leo V, Latiano A, Quaino V, Abazia C y cols. Increased intestinal permeability and NOD2 variants in familial and sporadic Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1455-61.

- 126.- Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* 2011; 43: 246-52.
- 127.- Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 2007; 56: 61-72.
- 128.- Chu H, Pazgier M, Jung G, Nuccio SP, Castillo PA, de Jong MF et al. Human  $\alpha$ -defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets. *Science* 2012; 337: 477-81.
- 129.- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004; 53:1658-64.
- 130.- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K et al. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9: 215-23.
- 131.- Salzman NH, Hung K, Haribhai D, Chu H, Karlsson-Sjöberg J, Amir E. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol* 2010; 11: 76-83.
- 132.- Caldwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16I1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 2008; 456: 259-63.

- 133.- Biswas A, Liu YJ, Hao L, Mizoguchi A, Salzman NH, Bevins CL et al. Induction and rescue of Nod2-dependent Th1-driven granulomatous inflammation of the ileum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 14739-44.
- 134.- Baumgart DC, Metzke D, Guckelberger O, Pascher A, Grötzinger C, Przesdzing I et al. Aberrant plasmacytoid dendritic cell distribution and function in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2011; 166: 46-54.
- 135.- Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2005; 129: 50-65.
- 136.- Iliev ID, Spadoni I, Mileti E, Matteoli G, Sonzogni A, Sampietro GM et al. Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut* 2009; 58: 1481-9.
- 137.- Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos E, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 2393-404.
- 138.- Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med* 2010; 16: 90-7.
- 139.- Noguchi E, Homma Y, Kang X, Netea MG, Ma X. A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of the nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1. *Nat Immunol* 2009; 10: 471-9.
- 140.- Clarke TB, Weiser JN. Intracellular sensors of extracellular bacteria. *Immunol Rev* 2011; 243: 9-25.

- 141.- Saito H, Kranz DM, Takagaki Y, Hayday A, Eisen H, Tonegawa S. Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from ECNA sequences. *Nature* 1984; 309: 757-62.
- 142.- Raulet DH. The structure, function, and molecular genetics of the gamma/delta T cell receptor. *Annu Rev Immunol.* 1989; 7: 175-207.
- 143.- Allison JP, Havran WL. The immunobiology of T cells with invariant gamma delta antigen receptors. *Annu Rev Immunol.* 1991; 9: 679-705.
- 144.- Goodman T, Lefrançois L. Expression of the gamma-delta T-cell receptor on intestinal EC8+ intraepithelial lymphocytes. *Nature.* 1988; 333: 855-8.
- 145.- Schild H, Mavaddat N, Litzenberger C, Ehrich EW, Davis MM, Bluestone JA et al. The nature of major histocompatibility complex recognition by  $\gamma\delta$  T-cells. *Cell.* 1994; 76: 29-37.
- 146.- Chien YH, Jores R, Crowley MP. Recognition by  $\gamma\delta$  T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 1996;14:511-32.
- 147.- Crowley MP, Reich Z, Mavaddat N, Altman JD, Chien Y. The recognition of the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule, T10, by the  $\gamma\delta$  T cell, G8. *J. Exp. Med.* 1997;185:1223-30.
- 148.- Sciammas R, Johnson RM, Sperling AI, Brady W, Linsley PS, Spear PG et al. Unique antigen recognition by a herpesvirus-specific TCR-  $\gamma\delta$  cell. *J. Immunol.* 1994;152: 5392-97.
- 149.- Pfeffer K, Schoel B, Gulle H, Kaufmann SHE, Wagner H. Primary responses of human T cells to mycobacteria: a frequent set of  $\gamma\delta$  T cells are

stimulated by protease resistant ligands. *Eur. J. Immunol.* 1990;20, 1175-1180.

150.- Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, Poquet Y, Puzo G, Bonneville M et al. Stimulation of human  $\gamma\delta$  T-cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* 1994; 264, 267–270.

151.- Tanaka Y, Sano S, Nieves E, De Libero G, Rosa D, Modlin RL et al. Nonpeptide ligands for human  $\gamma\delta$  T cells. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1994; 91: 8175-8179.

152.- Morita CT, Li H, Lamphear JG, Rich RR, Fraser JD, Mariuzza RA et al. Superantigen recognition by gammadelta T cells: SEA recognition site for human V $\gamma$ 2 T cell receptors. *Immunity.* 2001;14:331-44.

153.- Multhoff G, Botzler C, Issels R. The role of heat shock proteins in the stimulation of an immune response. *Biol Chem* 1998; 379: 295-300.

154.- Gordon S, Martínez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 2010; 32: 593-604.

155.- Summers R, Elliot D, Urban J, Thompson R, Weinstock J. *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut.* 2005; 54: 87-90.

156.- Hunter MM, Wang A, Parhar KS, Johnston MJ, Van Rooijen N, Beck PL, et al. In vitro-derived alternatively activated macrophages reduce colonic inflammation in mice. *Gastroenterology.* 2010; 138: 1395-405.

157.- Vos AC, Wildenberg ME, Duijvestein M, Verhaar AP, van den Brink GR, Hommes DW. Anti-tumor necrosis factor-alpha antibodies induce regulatory macrophages in an Fx region-dependent manner. *Gastroenterology.* 2011; 140: 221-30.

158.- Varol C, Vallon-Eberhard A, Elinav E, Aychek T, Shapira Y, Luche H,

et al. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity*. 2009; 31: 502-12.

159.- Niess JH, Adler G. Enteric flora expands gut lamina propria CX3CR1+ dendritic cells supporting inflammatory immune responses under normal and inflammatory conditions. *J Immunol*. 2010; 184: 2026-37.

160.- Kayama H, Ueda Y, Sawa Y, Jeon SG, Ma JS, Okumura R, et al. Intestinal CX3C chemokine receptor 1(high) (CX3CR1(high)) myeloid cells prevent T-cell-dependent colitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109:5010-5.

161.- Vadasz Z, Haj T, Kessel A, Toubi E. B-regulatory cells in autoimmunity and immune mediated inflammation. *FEBS Lett* 2013; 587: 2074-8.

162.- Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol*. 2002; 6: 944-50.

163.- Noh J, Choi WS, Noh G, Lee JH. Presence of Foxp3-expressing CD19(+)/CD5(+) B cells in human peripheral blood mononuclear cells: human CD19(+)/CD5(+)/Foxp3(+) regulatory B cell (Breg). *Immune Netw*. 2010; 10: 347-9.

164.- Berthelot JM, Jamin C, Amrouche K, Le Goff B, Maugars Y, Youinou P. Regulatory B cells play a key role in immune system balance. *Joint Bone Spine* 2013; 80: 18-22.

165.- Sattler, S, Ling GS, Xu D, Husaarts L, Romaine A, Zhao H, et al. IL-10-producing regulatory B cells induced by IL-33 (Breg(IL-33)) effectively attenuate mucosal inflammatory responses in the gut. *J Autoimmun* 2014; 50: 107-22.

- 166.- Shen P, Roch R, Lampropoulou V, O'Connor RA, Stervbo U, Hilgenberg E, et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature*. 2014; 20: 366-70.
- 167.- Walker JA, Barlow JL, McKenzie AN. Innate lymphoid cells-how did we miss them? *Nat Rev Immunol*. 2013; 13: 75-87.
- 168.- Hepworth, MR, Monticelli LA, Fung TC, Ziegler CG, Grunberg S, Sinha R, et al. Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature*. 2013. 498: 113-7.
- 169.- Sawa S, Lochner M, Sato-Takayama N, Dulauroy S, Bérard M, Kleinschek M, et al. ROR $\gamma$ t + innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nat. Immunol*. 2011. 12: 320-6.
- 170.- Spits, H, Di Santo JP. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol*. 2011; 12: 21-7.
- 171.- Hardy RR, Hayakawa K. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 595-621.
- 172.- Kroese FG, Ammerlaan WA, Deenen GJ. Location and function of B-cell lineages. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 651: 44-58.
- 173.- Merino MC, Gruppi A. Origen y desarrollo de linfocitos B1, una población celular involucrada en defensa y autoinmunidad. *Medicina (B Aires)*. 2006; 66: 165-72.

- 174.- Abrahao TB, Freymuller E, Mortara RA, Lopes JD, Mariano M. Morphological characterization of mouse B-1 cells. *Immunobiology* 2003; 208: 401-11.
- 175.- Berland R, Wortis HH. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 253-300.
- 176.- Kroese FG, Butcher EC, Stall AM, Lalor PA, Adams S, Herzenberg LA. Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing pre-cursors in the peritoneal cavity. *Int Immunol* 1989; 1: 75-84.
- 177.- Hardy RR, Hayakawa K. EC5 B cells, a fetal B cell lineage. *Adv Immunol* 1994; 55: 297-339.
- 178.- Fagarasan S, Honjo T. T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science* 2000; 290: 89-92.
- 179.- Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev* 2004; 197: 179-91.
- 180.- Zhang X. Regulatory functions of innate-like B cells. *Cell Mol Immunol*. 2013;10:113-21.
- 181.- Geboes K, van den Oord J, De Wolf-Peeters C, Desmet V, Rutgeerts P, Janssens J et al. The cellular composition of granulomas in mesenteric lymph nodes from patients with Crohn's disease. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1986; 409:679-92.
- 182.- Defendenti C, Sarzi-Puttini P, Grosso S, Croce A, Senesi O, Saibeni S et al. B lymphocyte intestinal homing in inflammatory bowel disease. *BMC Immunol*. 2011 Dec 30;12:71.

- 183.- Perrier C, Rutgeerts P. Cytokine blockade in inflammatory bowel diseases. *Immunotherapy* 2011; 3: 1341-52.
- 184.- Sandborn WJ, Feagan BG, Stoinov S, Honiball PJ, Rutgeerts P, Mason D et al. Certolizumab pegol for the treatment of Crohn's disease. *N Engl J Med* 2007; 357: 228-38.
- 185.- Yanai H, Hanauer SB. Assessing response and loss of response to biological therapies in IBD. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 685-98.
- 186.- Bernstein CN, Loftus EV Jr, Ng SC, Lakatos PL, Moum B. Epidemiology and natural history task force of the international organization for the study of inflammatory bowel disease (IOIBD). *Gut* 2012; 61: 622-9.
- 187.- Sandborn WJ, Gasink C, Gao L, Blank MA, Johans J, Guzzo C et al. Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease. *N Engl J Med* 2012; 367: 1519-28.
- 188.- Khanna R, Preiss JC, MacDonald JK, Timmer A. Anti-IL-12/23p40 antibodies for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015; 5: CD007572. doi: 10.1002/14651858.CD007572.pub2.
- 189.- Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D et al. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 2069-79.
- 190.- Sandborn WJ, Feagan BG, Fedorak RN, Scherl E, Fleischer MR, Katz S et al. A randomized trial of ustekinumab, a human interleukin 12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 2008; 135: 1130-41.

191.- Hommes DW, Mikhajlova TL, Stoinov S, Stimac D, Vucelic B, Lonovics J et al. Fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, demonstrates safety and clinical activity in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut* 2006; 55: 1131-7.

192.- Reinisch W, de Viliers W, Bene L, Simon L, Racz I, Katz S et al. Fontolizumab in moderate to severe Crohn's disease: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled, multiple-dose study. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 233-42.

193.- Reinisch W, Hommes DW, Van Assche G, Colombel JF, Gendre JP, Oldenburg B, et al. A dose escalating placebo controlled, double blind, single dose and multidose, safety and tolerability study of fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut* 2006; 55: 1138-44.

194.- Gisbert JP, Domenech E. Vedolizumab in the treatment of Crohn's disease. *Gastroenterol Hepatol* 2015; 38: 338-48.

195.- Löwenberg M, D'Haens G. Next-generation therapeutics for IBD. *Curr Gastroenterol Rep* 2015; 17: 21.

196.- Raine T. Vedolizumab for inflammatory bowel disease: Changing the game, or more of the same? *United European Gastroenterol J* 2014; 2: 333-44.

197.- Lobatón T, Vermiere S, Van Assche G, Rutgeerts P. Review article: anti-adhesion therapies for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 39: 579-94.

198.- Suqiura T, Kageyama S, Andou A, Miyazawa T, Ejima C, Nakayama A et al. Oral treatment with a novel small molecule alpha 4 integrin antagonist,

AJM300, prevents the development of experimental colitis in mice. *J Crohns Colitis* 2013; 7: 533-42.

199.- Vermeire S, O'Byrne S, Keir M, Williams M, Lu TT, Mansfield JC et al. Etrolizumab as induction therapy for ulcerative colitis: a randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet* 2014; 384: 309-18.

200.- Sandborn WJ, Ghosh S, Panes J, Vranic I, Wang W, Niezychowski W. A phase 2 study of tofacitinib, an oral Janus Kinase inhibitor, in patients with Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014; 12: 1485-93.

201.- Monteleone G, Boirivant M, Pallone F, MacDonald TT. TGF-beta 1 and Smad7 in the regulation of IBD. *Mucosal Immunol* 2008; 1: S50-3.

202.- Monteleone G, Fantini MC, Onali S, Zorzi F, Sancesario G, Bernardini S, et al. Phase I clinical trial of Smad7 knockdown using antisense oligonucleotide in patients with active Crohn's disease. *Mol Ther* 2012; 20: 870-6.

203.- Zorzi F, Calabrese E, Monteleone I, Fantini M, Onali S, Biancone L, et al. A phase I open-label trial shows that smad7 antisense oligonucleotide (GED0301) does not increase the risk of small bowel strictures in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36: 850-7.

204.- Monteleone G, Neurath MF, Ardizzone S, Di Sabatino A, Fantini MC, Castiglione F, et al. Mongersen, an oral SMAD7 antisense oligonucleotide, and Crohn's disease. *N Engl J Med* 2015; 372: 1104-13.

205.- Kotlarz D, Beier R, Murugan D, Diesterhorst J, Jensen O, Boztug K, et al. Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. *Gastroenterology* 2012; 143: 347-55.

- 206.- Caruso R, Sarra M, Stolfi C, Rizzo A, Fina D, Fantini MC, et al. Interleukin-25 inhibits interleukin-12 production and Th1 cell-driven inflammation in the gut. *Gastroenterology* 2009; 136: 2270-9
- 207.- Monteleone I, Rizzo A, Sarra M, Sica G, Sileri P, Biancone L, et al. Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2011; 141: 237-48.
- 208.- Burt RK, Craig RM, Milanetti F, Quigley K, Gozdzia P, Bucha J et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in patients with severe anti-TNF refractory Crohn disease: long-term follow-up. *Blood*. 2010 Dec 23;116(26):6123-32.
- 209.- García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodríguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1416-23.
- 210.- García-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum* 2009; 52: 79-86.
- 211.- Herreros MD, García-Arranz M, Guadalajara H, De-La-Quintana P, Garcia-Olmo D. Autologous expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex cryptoglandular perianal fistulas: a phase III randomized clinical trial (FATT 1) and long-term evaluation. *Dis Colon Rectum* 2012; 55: 762-772.
- 212.- Stremmel W, Hanemman A, Ehehalt R, Karner M, Braun A. Phosphatidylcholine (lecithin) and the mucus layer: evidence of therapeutic efficacy in ulcerative colitis? *Dig Dis* 2010; 28: 490-6.

- 213.- Ramsay RG, Micallef SJ, Williams B, Lightowler S, Vincan E, Heath JK, et al. Colony-stimulating factor-1 promotes clonogenic growth of normal murine colonic crypt epithelial cells in vitro. *J Interferon Cytokine Res* 2004; 24: 416-27.
- 214.- Dieckgraefe BK, Korzenik JR. Treatment of active Crohn's disease with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Lancet* 2002; 360: 1478-80.
- 215.- Korzenik JR, Dieckgraefe BK. An open-labelled study of granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 391-400.
- 216.- Korzenik JR, Dieckgraefe BK, Valentine JF, Hausman DF, Gilbert MJ. Sargramostim for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 2193-201
- 217.- Iborra M, Beltrán B, Nos P. New knowledge in genetics and inflammatory bowel disease. Are there any practical applications? *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 34: 591-8.
- 218.- Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24: 2-4.
- 219.- Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Beglinger C, Kupcinkas L, Geboes K et al. European Crohn's and Colitis Organisation. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* 2006; 55: 1-15.
- 220.- Travis SP, Stange EF, Lémann M, Oresland T, Chowers Y, Forbes A et al. European Crohn's and Colitis Organisation. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* 2006; 55: 16-35.

- 221.- Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*. 1976;70:439-44.
- 222.- Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's disease activity. *Lancet* 1980;1:514-5.
- 223.- Daperno M, D'Haens G, Assche GV, et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-EC. *Gastrointestinal Endoscopy* 2004; 60: 505–12.
- 224.- Davodeau F, Peyrat MA, Houde L, Hallet MM, De Libero G, Vié H et al. "Surface Expression of two distinct functional antigen receptors on human  $\gamma\delta$  T cells". *Science*. 1993; 260:1800-02.
- 225.- Peyrat MA, Davodeau F, Houde L, Romagné F, Necker A, Leget C et al. Repertoire analysis of human peripheral blood lymphocytes using a human V  $\delta$  3 region-specific monoclonal antibody. Characterization of dual T cell receptor  $\delta$  chain expressors and  $\alpha\beta$  T cells expressing V  $\delta$  3/J  $\alpha/C$   $\alpha$ -encoded TCR chains. *J. Immunol*. 1995; 155:3060-67.
- 226.- Thibault G, Bardos P. Compared TCR and EC3 $\epsilon$  expression on  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  cells. Evidence for the association of two TCR heterodimers with three EC3 $\epsilon$  chains in the TCR/EC3 complex. *J. Immunol*. 1995; 154:3814-20.
- 227.- Youinou P, Jamin C, Lydyard PM. CD5 expression in human B-cell population. *Immunol Today* 1999; 20; 312-6.
- 228.- Li Z, Vermeire S, Bullens D, Ferrante M, Van Steen K, Noman M, et al. Anti-tumor necrosis factor therapy restores peripheral blood B-cell subsets and CD40 expression in inflammatory bowel diseases. *Imflamm Bowel Dis*. 2015; Publicado on line, pendiente de impresión.

- 229.- Popi AF, Lopes JD, Mariano M. Interleukin-10 secreted by B-1 cells modulates the phagocytic activity of murine macrophages in vitro. *Immunology* 2004; 113: 348-54.
- 230.- Mizoguchi A, Bhan AK. A case for regulatory B cells. *J Immunol* 2006; 176: 705-10.
- 231.- Shimomura Y, Mizoguchi E, Sugimoto K, Kibe R, Benno Y, Mizoguchi A, et al. Regulatory role of B-1 B cells in chronic colitis. *International Immunology*. 2008; 20: 729-37
- 232.- Oka A, Ishihara S, Mishima Y, Tada Y, Kusunoki R, Fukuba N, et al. Role of regulatory B cells in chronic intestinal inflammation: association with pathogenesis of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2014; 20: 315-28.
- 233.- Garraud O, Borhis G, Badr G, Degrelle S, Pozzeto B, Cognasse F, et al. Revisiting the B-cell compartment in mouse and humans: more than one B-cell subset exists in the marginal zone and beyond. *BMC Immunology* 2012; 13: 63.
- 234.- Watanabe N, Ikuta K, Nisitani S, Chiba T, Honjo T. Activation and differentiation of autoreactive B-1 cells by interleukin 10 induce autoimmune hemolytic anemia in Fas-deficient antierythrocyte immunoglobulin transgenic mice. *J Exp Med* 2002; 196: 141-6.
- 235.- Nájera O, González C, Toledo G, López C, Ortiz R. Flow cytometry study of lymphocyte subsets in malnourished and well-nourished children with bacterial infections. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004; 11: 577-80.
- 236.- Hagel I, Lynch NR, Puccio F, Rodríguez O, Luzondo R, Rodríguez P, et al. Defective regulation of the protective Ig E response against intestinal helminth *Ascaris lumbricoides* in malnourished children. *J Trop Pediatr*. 2003; 49: 136-42.

- 237.- Rytter MJ, Kolte L, Briend A, Friis H, Christensen VB. The immune system in children with malnutrition. A systematic review. *Plos One*, 2014; 8: e105017
- 238.- Moran G, Dubeau M, Kaplan G, Yang H, Eksteen B, Ghosh S, et al. Clinical predictors of thiopurine-related adverse events in Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2015; 21: 7795-7804.
- 239.- Bohm I. Increased peripheral blood B-cells expressing the CD5 molecules in association to autoantibodies in patients with lupus erythematosus and evidence to selectively down-modulate them. *Biomed Pharmacother*. 2004; 58: 338-43.
- 240.- Mishima Y, Ishihara S, Amano Y, Alterations of peripheral blood CD5+ B cells in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2009; 44: 172-9.
- 241.- Pellino B, Sciaudone G, Selvaqqi F, Riegler G. Delayed diagnosis is influenced by the clinical pattern of Crohn's disease and affects treatment outcomes and quality of life in the long term: a cross-sectional study of 361 patients in Southern Italy. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2015; 27: 175-81.
- 242.- Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown L, Herzerberg LA. Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2250-5.
- 243.- Lee SM, Han EC, Ryoo S, Oh H, Choe E, Moon SH, et al. Long-term outcomes and risk factors for reoperation after surgical treatment for gastroeintestinal Crohn disease according to anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  antibody use: 35 years of experience at a single institute in Korea. *Ann Coloproctol* 2015; 31: 144-52.

244.- Pandey A, Salazar E, Kong CS, Lim WC, Ong J, Ong DE, et al. Risk of major abdominal surgery in an asian population-based Crohn's disease cohort. *Inflamm Bowel Dis*. 2015. Publicado on line actualmente.



## Hoja de Consentimiento Informado

Estudio: “Relación de los Linfocitos B1 (CD19+CD5+) con la Enfermedad de Crohn

Hospital Arnau de Vilanova de València

Estamos realizando un estudio de Investigación sobre:

“Relación de los Linfocitos B1 (CD19+CD5+) con la Enfermedad de Crohn”

La enfermedad de Crohn es de causa desconocida, y sigue afectando entre 4-7 personas por 100.000 habitantes /año. Es una enfermedad inflamatoria crónica y recidivante, sin tendencia a la curación, que puede afectar a todo el tracto gastrointestinal, y a nivel sistémico. Nosotros investigamos unas células inmunes, los linfocitos, que pensamos pueden estar relacionados con la etiopatogenia de la enfermedad. Por ello se le van a realizar determinaciones analíticas especiales con el fin de profundizar en el conocimiento de esta enfermedad de causa desconocida. Para este fin, precisamos de usted, una muestra de sangre.

Si usted no padece la enfermedad, sus datos nos serán de utilidad para compararlos con los pacientes que sí la padecen.

Sus datos personales serán confidenciales y solo los conocerán los investigadores principales. Su identificación no aparecerá en ningún informe ni publicación resultante del presente estudio.

Se le realizará una encuesta sobre antecedentes personales.

Muchas Gracias por su colaboración.

D/Dña.....

Con DNI : .....

Consiento en que se me realicen análisis de sangre para determinaciones analíticas especiales dentro del estudio que arriba se indica.

Firma del paciente

Firma del Médico

En Hospital Arnau de Vilanova de València

Fecha: