



Universidad de Valladolid

TRABAJO FIN DE MÁSTER

“Migración de monocitos al intestino humano en la enfermedad inflamatoria intestinal”

Autor: Alejandro del Hierro González

Tutores: David Bernardo Ordiz, Eduardo Arranz Sanz

Máster en Investigación Biomédica

Curso 2021-2022



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Agradecimientos

A mi familia, por su imprescindibleidad.

A David, pues es un gran mentor y su tutorización magistral.

A Aida, por ser una gran tutora de este trabajo y más que mi guía en estos meses.

Y a Elisa, Paloma, Juan, Ángel, Sara, Cándido y Marina, por crear un ambiente idílico.

Índice

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1- | Abreviaturas | 1 |
| 2- | Resumen..... | 2 |
| 3- | Introducción..... | 3 |
| | 3.1- Mucosa intestinal y tolerancia oral..... | 3 |
| | 3.2- Enfermedad inflamatoria intestinal | 4 |
| | 3.3- Macrófagos residentes de la mucosa intestinal | 6 |
| | 3.4- Hipótesis y objetivos | 8 |
| 4- | Materiales y métodos..... | 9 |
| | 4.1- Demografía y pacientes a estudio..... | 9 |
| | 4.2- Reactivos y medios de cultivo | 9 |
| | 4.3- Soluciones tamponadas | 9 |
| | 4.4- Equipos..... | 10 |
| | 4.5- Obtención de monocitos CD14 ⁺ de sangre periférica..... | 10 |
| | 4.6- Cultivo y recolección de sobrenadantes de lámina propia..... | 10 |
| | 4.7- Ensayos de migración <i>transwell</i> y tinción de monocitos..... | 10 |
| | 4.8- Análisis multiplex de analitos por inmunoensayo | 11 |
| | 4.9- Tratamiento de datos..... | 12 |
| 5- | Resultados | 13 |
| | 5.1- Identificación de los monocitos CD14 ⁺ en los sobrenadantes tras migración..... | 13 |
| | 5.2- Perfil migratorio de los monocitos CD14 ⁺ | 13 |
| | 5.3- Identificación y cuantificación de quimiocinas | 15 |
| | 5.4- Perfil de quimiocinas de los sobrenadantes de lámina propia..... | 15 |
| | 5.5- Correlación entre severidad, perfil migratorio y concentración de quimiocinas | 20 |
| 6- | Discusión | 24 |
| 7- | Conclusiones | 27 |
| 8- | Bibliografía | 28 |

1- Abreviaturas

- 5-ASA, ácido 5-aminosalicílico.
- ACP, análisis de componentes principales.
- AEDT, Ácido etilendiaminotetraacético.
- ANOVA, análisis de la varianza.
- CP, componente principal.
- CS, controles sanos.
- CU, colitis ulcerosa.
- DTT, ditioneitol.
- DTT/AEDT, medio HBSS con DTT y AEDT.
- EC, enfermedad de Crohn.
- EII, enfermedad inflamatoria intestinal.
- HBSS, *Hanks' Balanced Salt Solution*.
- iCU, tejido inflamado de colitis ulcerosa activa.
- iEC, tejido inflamado de enfermedad de Crohn activa.
- niCU, tejido no inflamado de colitis ulcerosa activa.
- niEC, tejido no inflamado de enfermedad de Crohn activa.
- NOD, *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*.
- PBS, tampón fosfato salino o *phosphate buffered saline*.
- qCU, tejido quiescente de colitis ulcerosa.
- qEC, tejido quiescente de enfermedad de Crohn.
- PRR, receptor de reconocimiento de patrones o *pattern recognition receptor*.
- RPMI, *Roswell Park Memorial Institute*.
- SA-PE, estreptavidina conjugada con el fluoróforo PE.

2- Resumen

La homeostasis intestinal se consigue, en parte, gracias a monocitos que tras recibir las señales pertinentes se diferencian en macrófagos reguladores residentes en este tejido. Este proceso sufre un desbalance en los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (que incluye a la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa), donde su fenotipo es mayoritariamente proinflamatorio. Se conoce que la migración de los monocitos desde la sangre al intestino humano es dependiente de CCR2, pero son desconocidas las quimiocinas que provocan su extravasación. En este trabajo se ha puesto de manifiesto la migración diferencial de monocitos que existe entre controles sanos y pacientes (activos y quiescentes) de enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, donde esta se ve anulada hacia los tejidos quiescentes de enfermedad de Crohn y los activos de colitis ulcerosa. Además, se analizó la concentración de trece quimiocinas en la mucosa intestinal, resultando que los niveles de CCL2 correlacionaron con la tasa de migración de los monocitos. Por otro lado, existió una gran correlación entre la concentración de quimiocinas y la migración de monocitos con la severidad de la enfermedad de Crohn, a pesar de no ser encontrada para la colitis ulcerosa. Nuestros resultados confirman, por tanto, la distinta fisiopatología existente entre ambas enfermedades.

Abstract

Intestinal homeostasis is partially achieved thanks to tissue-resident tolerogenic macrophages, whose monocyte precursors receive appropriate signals that achieve its differentiation. This process is imbalanced in patients with inflammatory bowel disease (including Crohn's disease and ulcerative colitis), where their phenotype is mainly proinflammatory. It is known that monocyte migration from the blood to the human intestine is CCR2-dependent, but the chemokines mediating their extravasation remain unclear. This work has shown the differential monocyte migration between healthy controls and patients (active and quiescent) of Crohn's disease and ulcerative colitis, which is nullified in Crohn's disease quiescent and active ulcerative colitis tissues. Moreover, the concentration of thirteen chemokines was measured in the intestinal mucosa, revealing that CCL2 levels correlated with the migration rate of the monocytes. Also, there was a strong correlation between the chemokine's concentration and the monocyte migration with the severity of Crohn's disease which was however not found in patients with ulcerative colitis. Our results confirm therefore the different physiopathology between both diseases.

3- Introducción

3.1- Mucosa intestinal y tolerancia oral

El intestino delgado y grueso forman un tubo continuo compuesto por una única capa de células epiteliales que separa el interior del exterior del organismo. El intestino delgado posee una superficie epitelial más amplia y mayor extensión de vellosidades, especializada en la absorción de nutrientes y metabolitos. A medida que se avanza en el aparato digestivo, el intestino grueso ve reducida su cantidad de vellosidades, y por lo tanto la capacidad de absorción; sin embargo, aumenta la presencia de células caliciformes, productoras de mucus, que actúan de barrera frente a la microbiota comensal, encargada de procesar los nutrientes que las enzimas humanas no pueden¹ (Figura 1).

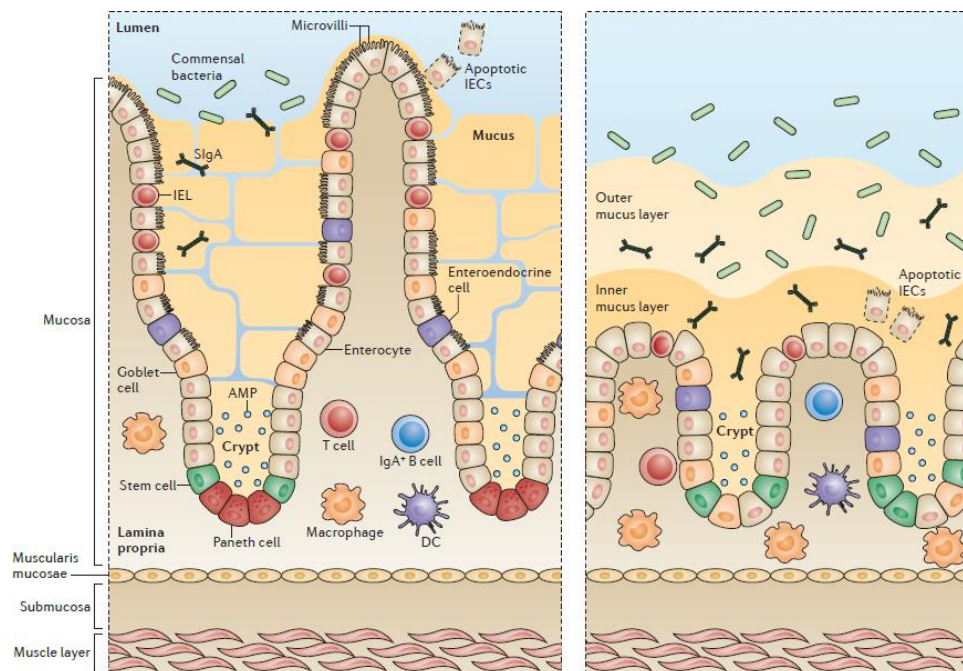


Figura 1. Estructura del intestino delgado (izquierda) y grueso (derecha). Se aprecian las células madre que originan las células caliciformes (productoras de mucus), las células epiteliales (función barrera) y las células de Paneth (generan péptidos antimicrobianos para controlar la microbiota comensal). En la lámina propia residen una gran variedad de células inmunes¹.

El intestino posee la mayor cantidad de células inmunes del organismo, expuestas a un gran abanico de antígenos y potenciales estímulos¹. Gran parte de estos procesos ocurren en la mucosa, que comprende el epitelio, la lámina propia y la muscularis mucosae (el revestimiento muscular subyacente). Estas capas son muy delgadas y susceptibles a sufrir una infección patológica, lo que implica que el sistema inmune de este órgano debe ser capaz de discriminar entre generar una respuesta inmune contra antígenos peligrosos y tolerancia frente aquellos inocuos e imprescindibles para la supervivencia, que adquirimos junto a la dieta².

Esto se conoce como tolerancia oral y hay una clara diferencia entre la tolerancia a los metabolitos de la dieta y la tolerancia bacteriana: mientras que la primera, inducida por el intestino delgado, extiende su efecto a nivel sistémico, la tolerancia bacteriana ejercida por el intestino grueso mantiene su efecto a nivel local, sin atenuar las respuestas sistémicas y por lo tanto es exclusiva de la mucosa intestinal².

Esta tolerancia selectiva a la microbiota es biológicamente coherente, pues el sistema inmune debe ser capaz de responder en el caso de que puedan escapar del lumen

intestinal. Determinados mecanismos se encargan de impedir el acceso de la microbiota al sistema inmune del organismo, como son las barreras físicas de la capa de mucus y las células epiteliales, así como las defensas inmunes innatas que las protegen³.

La microbiota intestinal varía longitudinal y transversalmente a lo largo del tubo digestivo de un individuo, tanto en cantidad como en diversidad, existiendo claras diferencias en las comunidades bacterianas que habitan en dos sujetos. Las simbiosis que mantienen con su microbiota comensal explican cómo responde cada uno a infecciones, cambios en la dieta, ingesta de medicamentos y exposición a xenobióticos. Su composición depende tanto de los factores ambientales como los del propio huésped (aproximadamente un tercio de las bacterias fecales son hereditarias), y tiene un papel crucial tanto en el mantenimiento de la homeostasis como en la respuesta frente a la enfermedad⁴.

Cuando se altera este delicado balance, aparecen trastornos autoinmunes conocidos como enfermedades inflamatorias intestinales (EII).

3.2- Enfermedad inflamatoria intestinal

Bajo la denominación de la EII se engloban dos enfermedades principales: la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), que afectan al aparato digestivo y se caracterizan por una inflamación crónica del mismo. A pesar de que la etiología de estas condiciones es desconocida, hay numerosos factores que aumentan el riesgo de sufrirla. Por ejemplo, aquellos recién nacidos que necesitaron una cesárea tienen una mayor incidencia de EII. Esto se debe a que no estuvieron en contacto con la flora vaginal de sus madres, imprescindible para poseer una correcta microbiota comensal. La EII es también más frecuente en países con mayor nivel socioeconómico que en aquellos en vías de desarrollo⁴ (Figura 2).

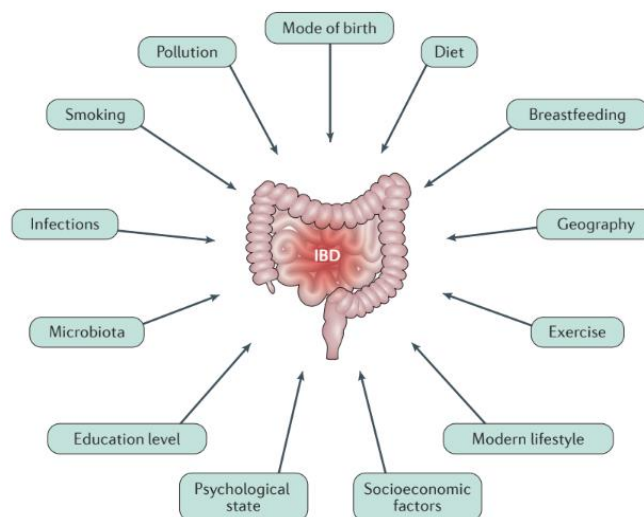


Figura 2. Agentes que predisponen a sufrir las EII. Por ejemplo, fumar supone un desencadenante de un brote en el caso de la EC. Por el contrario, en el caso de la CU, es un factor protector que ayuda a mantener la remisión^{4,5}.

La disbiosis que sufren los pacientes con EII en su intestino es un elemento clave en dichos trastornos, aunque esté por dilucidar si como causa o consecuencia: la desregulación de la composición bacteriana puede desencadenar cambios en la microbiota o, por otro lado, la pared intestinal es la que conduce a una serie de cambios que desembocan en una microbiota anormal⁴.

Estos trastornos son cada vez más frecuentes, viendo aumentada su prevalencia de manera global de 79,5/100.000 habitantes en 1990 a 84,3/100.000 habitantes en 2017⁶. Ambas enfermedades pasan por períodos de actividad (momento en el cual se manifiestan los síntomas) y remisión (cuando estos desaparecen). Sin embargo, el cuadro clínico de cada una es muy distinto, lo que obliga a tratarlas de manera independiente:

- **Colitis ulcerosa**: la afectación está restringida al colon, siendo esta continua y limitada a la mucosa y la submucosa. Los síntomas abarcan la formación de úlceras, abscesos crípticos abiertos, dolor abdominal, diarrea sanguinolenta, y un riesgo mayor de sufrir cáncer de colon⁵.
- **Enfermedad de Crohn**: suele involucrar el ciego, el colon, el íleon terminal y la zona perianal, pero al contrario que la CU puede afectar a cualquier zona que abarque desde la boca hasta el ano. Además, esta afectación es discontinua y segmentaria (es decir, parcheada), atravesando la mucosa y submucosa y produciendo una lesión transmural. Los síntomas también incluyen granulomas, úlceras penetrantes y formación de fístulas⁵.

Los factores genéticos suponen una parte considerable de la patogénesis de la EII. Se conocen 240 genes de riesgo en la EII, aunque 30 de ellos compartidos entre la EC y la CU. Entre estos genes se incluyen algunos responsables de la homeostasis intestinal, la función barrera, la regulación inmune, etc. El más característico es el NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*), asociado con la EC. NOD2 es un receptor tipo NOD citosólico y es uno de los sistemas de detección de invasores bacterianos. Ciertas mutaciones están relacionadas con un fenotipo más agresivo, mientras que otras incrementan las respuestas de citoquinas proinflamatorias⁵.

Actualmente, no hay cura para estas enfermedades. Los tratamientos disponibles tienen como objetivo mantener la remisión⁷. La farmacoterapia convencional se basa en:

- **Aminosalicilatos**: medicamentos como la sulfasalazina, que interfieren con el metabolismo del ácido araquidónico, molécula precursora de prostaglandinas y leucotrienos, importantes mediadores inflamatorios; interfiere en la función de los glóbulos blancos y en la producción de citoquinas. Está destinado a pacientes con CU, ya que para EC su efectividad no está clara⁷.
- **Inmunomoduladores**: tiopurinas (inhiben la proliferación y activación de linfocitos T), metotrexato (disminuye los niveles de citoquinas proinflamatorias), etc⁷.
- **Biológicos**: los fármacos más modernos, que abarcan desde inhibidores de citoquinas proinflamatorias (anti-TNF α , anti-IL22/IL23) a antagonistas de integrinas ($\alpha4\beta7$), entre otros⁷.
- **Moléculas pequeñas**: útiles por su cómoda administración oral, como los inhibidores de JAK quininas⁷.

Si las estrategias anteriores no surten efecto, la cirugía es el recurso empleado en los casos más severos, extirpando la zona afectada por la enfermedad⁷.

La hipótesis en base a la que nacen estos tratamientos es la respuesta inmune desmesurada que se proyecta contra el microbioma intestinal. Ciertos datos apoyan que individuos con EC ven inducida la curación de la mucosa afectada al someterlos a un desvío fecal, y su inyección reactiva la enfermedad. Además, los pacientes con CU consiguen una reducción de la inflamación cuando se les trata con antibióticos de gran

espectro. En conjunto, es probable que la pérdida de tolerancia sea fruto de una susceptibilidad genética que genera una respuesta excesiva por parte del sistema inmune de las mucosas y un desbalance de la microbiota intestinal, lo que despierta una reacción patológica inmune⁸.

3.3- Macrófagos residentes de la mucosa intestinal

Los macrófagos residentes en el intestino son parcialmente los que se encargan de mantener la homeostasis al detectar sustancias extrañas en el lumen intestinal. Son capaces de eliminar patógenos invasores sin inducir una respuesta inflamatoria por parte de los linfocitos de la lámina propia. Los macrófagos extienden proyecciones a través de las células epiteliales para encargarse del reconocimiento de los antígenos. Si detectan antígenos provenientes de la dieta no sucederá una co-estimulación por parte de sus receptores de reconocimiento de patrones (PRR), impidiendo una respuesta proinflamatoria. Sin embargo, cuando reconocen antígenos derivados de organismos patógenos sí se produce una estimulación vía PRR y por tanto se secretan citocinas y sustancias bactericidas con el fin de mantener la integridad intestinal⁹.

Los monocitos derivados de la médula ósea circulantes por la sangre son los precursores de estos macrófagos, que son reclutados hacia el intestino. Si bien poseen un fenotipo inflamatorio al llegar al intestino, el microambiente intestinal (incluyendo señales como el TFG- β que inhibe la activación de NF- $\kappa\beta$) los polarizan hacia macrófagos anérgicos⁹ (Figura 3).

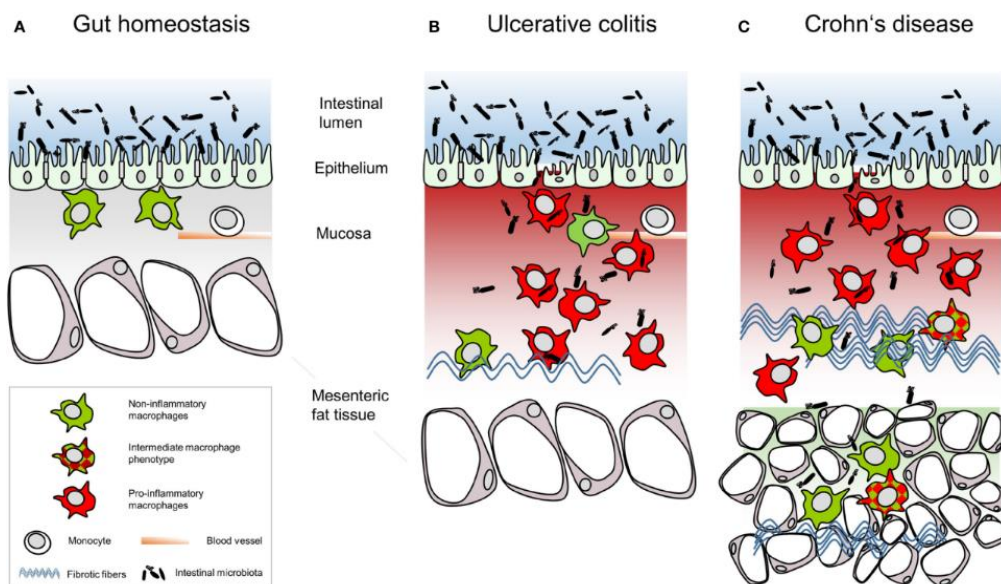


Figura 3. Distribución de los macrófagos en la mucosa intestinal. Se aprecia la infiltración de antígenos bacterianos en los pacientes con EII, salvo que en CU dicha intrusión alcanza la mucosa, mientras que en EC consiste en una invasión transmural⁹.

Resultados previos del laboratorio han demostrado una distribución específica de los macrófagos residentes del tracto gastrointestinal. Estos se identifican como CD14⁺CD64⁺HLA-DR⁺ y su presencia es mayor en el colon (tanto distal como proximal) respecto al intestino delgado (íleon terminal y duodeno). A su vez, estos macrófagos poseen una expresión diferencial de CD11c que permite clasificarlos en tres subgrupos: CD11c^{high}, CD11c^{dim} y CD11c⁻. Aquellos CD11c^{high} predominan en el colon mientras que los CD11c⁻ en el intestino delgado. Por otro lado, los monocitos circulantes en sangre se clasifican como clásicos (CD14⁺CD16⁻), intermedios (CD14⁺CD16⁺) y no clásicos (CD14⁻CD16⁺)¹⁰.

Los macrófagos CD11c^{high} poseen una gran expresión de los marcadores CCR2 y CX3CR1 en comparación con el resto de los subgrupos de macrófagos en función de CD11c. Los monocitos, paralelamente, muestran una indiscriminada expresión de CX3CR1 entre los grupos descritos anteriormente, pero la expresión de CCR2 es específica de aquellos CD14⁺. Se deduce, por tanto, que hay una clara correlación en la expresión de CD11c, CCR2 y CX3CR1, existiendo en la mucosa intestinal macrófagos fenotípicamente comparables a los monocitos circulantes CD14⁺ identificables como CD11c^{high}CCR2⁺CX3CR1⁺, mientras que los macrófagos residentes son distinguibles como CD11c⁻CCR2⁻CX3CR1⁻. Además, el nivel de expresión de CD11c revela el patrón de maduración de los monocitos en la mucosa intestinal, progresando desde un tipo proinflamatorio (a mayor expresión de CD11c cuando se infiltran en la mucosa) a uno tolerogénico (con pérdida de expresión de este cuando han sido condicionados por el microambiente intestinal)¹⁰.

Aquellas células con un perfil fenotípicamente de monocito (CD11c^{high}) poseen un comportamiento proinflamatorio al ser secretoras de IL-1 β , mientras que los macrófagos (CD11c⁻) mantienen la homeostasis al producir IL-10. Son además los monocitos/macrófagos que expresan CD11c, y que exhiben un patrón inflamatorio, los que se encuentran expandidos en los tejidos inflamados tanto de CU como EC, opuesto a lo que se encuentra en tejidos no inflamados o quiescentes respecto a los sanos¹⁰.

Utilizando los sobrenadantes de cultivos de biopsias de controles y pacientes de EII como estímulo, los ensayos de migración muestran que aquellos monocitos clásicos CD14⁺ son reclutados en mayor cantidad hacia los tejidos inflamados tanto de CU como EC. Esto explica el hecho de que se produzca acumulación de macrófagos CD11c^{high} que promueven la inflamación del tejido. Esta migración es dependiente de CCR2 ya que al bloquear dicho receptor se anula completamente (Figura 4)¹⁰.

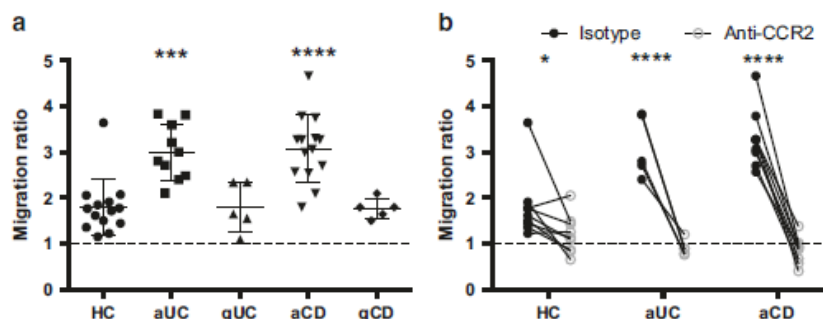


Figura 4. Ensayos de migración que revelan un reclutamiento aumentado de monocitos clásicos CD14⁺ en los pacientes de EII con la enfermedad activa, medido con la ratio de migración o *migration ratio*. Esta migración es dependiente de CCR2, pues al bloquear dicho receptor la ratio de migración cae a los niveles basales (señalado en la gráfica con el valor de 1)¹⁰. La leyenda en el eje X corresponde a: HC, controles sanos; aUC, pacientes con CU activa; qUC, pacientes con CU quiescente; aCD, pacientes con EC activa y qCD, pacientes EC quiescente.

No obstante, aun sabiendo que la migración depende de CCR2, se desconoce qué quimiocinas median los mecanismos que dirigen el reclutamiento de los monocitos al tracto gastrointestinal, pudiendo ser las mismas que en los controles sanos, pero en distintas dosis, o bien existir moléculas completamente diferentes. Esto es crucial pues conocer qué citoquinas gobiernan la migración de estas células podría revelar posibles dianas terapéuticas. Además, es necesario analizar la existencia de diferencias regionales en el intestino para dicha migración.

3.4- Hipótesis y objetivos

De acuerdo con lo anteriormente expuesto:

- Nuestra hipótesis es que existe una migración de monocitos CD14⁺ aumentada hacia los sobrenadantes producto de tejidos inflamados de pacientes de EC y CU, siendo igual a la encontrada en los controles sanos en el caso de los tejidos no inflamados o quiescentes de ambas enfermedades. Esto sería producto de una mayor cantidad de quimiocinas proinflamatorias en los sobrenadantes anteriores, en concreto de aquellas que dependan del receptor CCR2.

Partiendo de esta base, los objetivos principales son:

- Determinar la ratio de migración hacia los sobrenadantes con ensayos de migración *transwell* de tejidos de pacientes sanos, activos inflamados de EC (iEC), activos no inflamados de EC (niEC), quiescentes de EC (qEC), activos inflamados de CU (iCU), activos no inflamados de CU (niCU) y quiescentes de CU (qCU).
- Determinar la concentración, en los sobrenadantes anteriores, de las siguientes quimiocinas mediante la tecnología de análisis múltiple de analitos por inmunoensayo (multiplex): CXCL5 (ENA-78), CCL11 (eotaxina-1), CXCL1 (GRO α), CXCL8 (IL-8), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC), CCL2 (MCP-1), CXCL9 (MIG), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL20 (MIP-3 α), CCL5 (RANTES) y CCL17 (TARC) y analizar si existe correlación entre la concentración de las mencionadas y la ratio de migración.
- Determinar la correlación entre la severidad de la EC, medida con el índice endoscópico simple para EC (o *Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease*, SES-CD) y la CU, medida con el índice endoscópico de Mayo, con la ratio de migración y la concentración de quimiocinas proinflamatorias encontradas.

Profundizando, los objetivos específicos del trabajo se resumen en:

- Recolectar los sobrenadantes provenientes del cultivo de la lámina propia de las biopsias de intestino de estos pacientes (a nivel de colon ascendente, colon descendente e íleon terminal).
- Realizar ensayos de migración utilizando los sobrenadantes de estas biopsias para reclutar monocitos CD14⁺.
- Investigar la existencia de diferencias regionales en el intestino, tanto en la ratio de migración como en la concentración de las quimiocinas, en los grupos de controles sanos, EC y CU.
- Averiguar si hay diferencias significativas en las ratios de migración y la concentración de quimiocinas en los diferentes grupos respecto a los controles sanos.
- Comparar los datos entre los tejidos inflamados de EC y CU, con el fin de revelar algún patrón diferencial entre ambas enfermedades.
- Identificar qué quimiocina o grupo de quimiocinas son responsables de la migración de monocitos CD14⁺.
- Estudiar la posible correlación de la gravedad de ambas enfermedades con la ratio de migración y la concentración de cada quimiocina.

4- Materiales y métodos

4.1- Demografía y pacientes a estudio

La obtención de biopsias fue consentida por cada uno de los pacientes de acuerdo con lo dictaminado por el Comité Ético de Investigación con medicamentos del Área de Salud de Valladolid Este (PI_19-1352). Estas biopsias de colon ascendente, colon descendente e íleon terminal fueron tomadas mediante colonoscopia por los Servicios de Aparato Digestivo del Hospital Clínico Universitario y del Hospital Universitario Río Hortega (ambos en Valladolid), en el transcurso de la práctica rutinaria de diagnóstico y seguimiento de enfermedades.

Las biopsias se preservaron en medio RPMI a 4°C en su llegada al laboratorio, momento en el que se congelan a -80°C en medio de congelación hasta su posterior utilización. Estas biopsias provienen de un total de 83 pacientes pertenecientes a siete grupos de estudio: 14 controles sanos (CS), 17 pacientes con EC activa -de los que se obtuvo muestra tanto del tejido inflamado (iEC) como del no inflamado (niEC)-, 15 pacientes quiescentes de EC (qEC), 22 pacientes con CU activa -de los que se obtuvo muestra tanto del tejido inflamado (iCU) como del no inflamado (niCU)- y 15 pacientes quiescentes de CU (qCU).

4.2- Reactivos y medios de cultivo

Tabla 1. Lista de reactivos y medios de cultivo, conjunto a su casa comercial.

| Reactivo | Casa Comercial |
|---|----------------|
| Dilitreititol (DTT) | Sigma-Aldrich |
| Ácido etilendiaminotetraacético disódico (AEDT) | Sigma-Aldrich |
| <i>Human BD Fc Block™</i> 0,5 mg/mL | BD Biosciences |
| <i>LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit (viability)</i> | Invitrogen |
| CD45 (PerCP) 25 mg/mL | BD Biosciences |
| Paraformaldehído 10% | Protocol |
| DMSO 99% | MP Biomedicals |
| Azida de sodio | Sigma-Aldrich |
| L-glutamina 200 mM | Gibco |
| Penicilina-Streptomina (P/S) 10.000 U/mL | Gibco |
| Gentamicina 50 mg/mL | Gibco |
| AIM-V®: <i>Serum Free Medium</i> | Gibco |
| <i>Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 1X (RPMI)</i> | Gibco |
| <i>Hanks' Balanced Salt Solution 1X (HBSS)</i> | Gibco |
| Suero fetal bovino (FBS) | Gibco |
| <i>Phosphate Buffered Saline 1X 0,0067 M (PBS)</i> | Cytiva Hyclone |
| <i>Ficoll-Paque™ PLUS endotoxin tested (<0.12 EU/mL)</i> | Cytiva Hyclone |
| <i>Trian Blue Stain (0,4%)</i> | Gibco |

4.3- Soluciones tamponadas

Tabla 2. Lista de soluciones tamponadas (*buffers*) utilizada.

| Tampón | Composición |
|------------------------------|---|
| Medio de congelación | 90% FBS filtrado + 10% DMSO |
| FACS Buffer | 500 mL PBS + 10 mL FBS Filtrado + 0,1 g NaN ₃ + 2,5 mL AEDT |
| HBSS con DTT/AEDT (DTT/AEDT) | 50 mL HBSS + 500 µL AEDT filtrado + 500 µL DTT |
| TFM | 45 mL RPMI + 5 mL FBS + 500 µL L-glutamina + 500 µL P/S + 50 µL gentamicina |
| Solución AEDT | 1,86 g AEDT en 100 mL Agua mili-Q y filtración |

4.4- Equipos

Tabla 3. Equipos de laboratorio usados en el trabajo.

| Equipo | Casa comercial |
|---|-------------------|
| Citómetro analítico Gallios | Beckman Coulter |
| Centrífuga 5424 R | Eppendorf |
| Agitador tipo vórtex | Heidolph Reax Top |
| Agitador-Incubador Shaker MaxQ 4450 | Thermo Scientific |
| <i>LEGENDplex™ Multi-Analyte Flow Assay Kit</i> | Biolegend |
| Centrífuga GT 2R | Fisher Brand |
| Baño térmico | Wendigen w6 |
| <i>Corning® HTS Transwell® 96 Well Plate</i> | Corning Inc. |
| <i>MaxQ™ 4000 Benchtop Orbital Shakers</i> | Thermo Fisher |
| <i>RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail</i> | STEMCELL™ |

4.5- Obtención de monocitos CD14⁺ de sangre periférica

Los monocitos CD14⁺ se obtienen de sangre periférica (en bolsas de sangre denominadas *buffy coats*) de donantes provenientes del Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León (Valladolid), procesándose con el kit *RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail*. Las bolsas de sangre se vacían en Falcon 50 y se añade 50 µL de la solución del kit por cada mililitro de sangre periférica, incubándose 20 min a temperatura ambiente. Esta sangre se diluye 1:2 con PBS y a continuación, en Falcon 15, se añade Ficoll (relación 1/3 con dicha sangre diluida) y posteriormente la sangre. Esta debe ser depositada como un flujo laminar muy lentamente con pipetas Pasteur, para que no precipite al fondo del tubo. Una vez llenos, se centrifugan los Falcon 15 (800 g, 30 min, 4°C, sin freno) y con pipetas Pasteur se recogen los monocitos en Falcon 50 con RPMI, que ahora forman una interfase entre el Ficoll y el PBS en forma de nube. Estos Falcon 50 se centrifugan (300 g, 5 min, 4°C), se desecha el sobrenadante y se resuspenden las células en medio de congelación, repartiendo en crioviales de 1 mL a una concentración de 10⁶ células/mL para posteriormente conservarlas a -80°C.

4.6- Cultivo y recolección de sobrenadantes de lámina propia

Las biopsias se descongelan en un baño a 37°C y se añaden sobre placas de Petri con RPMI. Se homogeniza con pipetas Pasteur, se recogen y añaden en Falcon 15 con 5 mL DTT/AEDT y se incuban 30 min 37°C 250 rpm. El DTT elimina el mucus del tejido, mientras que el AEDT rompe las uniones de calcio liberando a los linfocitos intraepiteliales. Estos quedan en la fase líquida mientras que la lámina propia resta en el tejido. Al acabar la incubación, se agitan con el vórtex, se retira el sobrenadante y se vuelven a incubar las biopsias con 5 mL DTT/AEDT.

Después de separar los sobrenadantes nuevamente, las biopsias se colocan en una placa de cultivo de 48 pocillos usando la pipeta Pasteur y se añaden 500 µL AIM-V, incubándolas durante 24 h a 37°C. Estos sobrenadantes se recogen en crioviales y se congelan a -80°C hasta su posterior utilización.

4.7- Ensayos de migración *transwell* y tinción de monocitos

Los monocitos CD14⁺ se descongelan en un baño a 37°C y se transfieren a un Falcon 15 con 5 mL TFM. Se centrifuga (300 g, 5 min, 4°C) y se elimina el sobrenadante, resuspendiendo el pellet con 1 mL TFM en el vórtex. A continuación, se utiliza una alícuota de 36 µL *Trypan Blue* a la cual se añaden 4 µL de la suspensión de células, se

homogeniza y se introducen 10 μL en la cámara Neubauer para realizar el conteo de las células vivas.

Para realizar el ensayo de migración *transwell*, es necesario que en el pocillo superior se coloquen 200.000 células/mL con un volumen de 75 μL . En el pocillo inferior, se colocan 200 μL de los sobrenadantes que actuarán como estímulo, que se descongelan utilizando el baño a 37°C. En aquellos pocillos que van a ser utilizados como control basal para evaluar la migración espontánea se sustituye el sobrenadante por 200 μL de medio de cultivo sin condicionar. La placa se incuba durante 4 h a 37°C, y pasado ese periodo se retira la membrana y se transfieren los sobrenadantes a tubos de citometría.

El volumen se completa con 800 μL de FACS Buffer y se añaden 0,5 μL de marcador de viabilidad para identificar las células muertas, se centrifugan (400 g, 5 min, 4°C) y se descarta el sobrenadante. Se añaden 2 μL *Fc Block* para bloquear las uniones inespecíficas antígeno-anticuerpo y se incuban en la oscuridad 10 min a temperatura ambiente. Acabada la incubación, se añade 1 mL *FACS Buffer*, se agitan los tubos en el vórtex y se centrifugan (mismas condiciones) para retirar el exceso de *Fc Block*. El sobrenadante se elimina como en el paso anterior y se añaden 100 μL de una mezcla de CD45 con *FACS Buffer* (1:100), incubándose 20 min a 4°C.

Se lava de nuevo añadiendo 1 mL *FACS Buffer*, agitando con el vórtex y centrifugando para posteriormente eliminar el sobrenadante. Se añaden 250 μL paraformaldehído 4% y se incuba 10 min a 4°C. Después de realizar un último lavado, tras eliminar el sobrenadante se añaden 500 mL *FACS Buffer* y se conservan a 4°C hasta la adquisición de los tubos en el citómetro. La lectura del marcador de viabilidad en el citómetro se realiza con el láser rojo con un filtro 755 *long-pass* y la de CD45 con un láser azul con un filtro 695 *band-pass/30*.

4.8- Análisis multiplex de analitos por inmunoensayo

Para la determinación de la concentración de quimiocinas mencionadas en los sobrenadantes se utilizó un *LEGENDplex™ Multi-Analyte Flow Assay Kit*, el panel predefinido como *Human Proinflammatory Chemokine Panel 1*.

El fundamento del ensayo consiste en la utilización de bolas que poseen anticuerpos en su superficie específicos contra los analitos a estudiar. Estas bolas se diferencian en su tamaño y complejidad, separándolas en dos grupos A y B, y cada una cuenta con una intensidad de fluorescencia específica. La clasificación de estas se realiza con el láser rojo con filtro 695 *band-pass/30*. Cuando los analitos son capturados por las bolas, el siguiente paso es la adición de anticuerpos biotinilados y posteriormente estreptavidina conjugada con PE (SA-PE), ya que su intensidad de fluorescencia se mide con el canal de este fluoróforo (láser azul con filtro 575 *band-pass/30*)¹¹.

En primer lugar, la placa con filtro se acondiciona con 100 μL *buffer* de lavado durante 1 min a temperatura ambiente, y se aplica vacío para eliminarlo (5-10 s). La placa posee 96 pocillos, de los cuales 16 de ellos poseen los estándares para construir las curvas de calibrado (ocho por duplicado) con concentraciones que escalan de la siguiente manera (en pg/mL): 0, 2.4, 9.8, 39.1, 156.3, 625, 2500 y 10000. En cada pocillo se añaden 25 μL *Assay Buffer*, 25 μL , ya sea de sobrenadante o patrón, y finalmente 25 μL de las bolas mezcladas mediante vórtex. La placa se sella y se incuba 2 h a 500 rpm a temperatura ambiente.

Finalizada la incubación se aplica vacío y se lava con 200 μL de *buffer* de lavado, eliminándose de nuevo con el vacío (este paso se repite una vez más). Después, se

añaden 25 μL de los anticuerpos de detección a cada pocillo, se sella la placa y se vuelve a incubar en las mismas condiciones durante 1 h. Tras esto, se adicionan 25 μL de SA-PE y se incuba por última vez durante 30 min. Se realiza un último lavado como el descrito y se añaden 150 μL de *buffer* de lavado con el fin de resuspender las bolas en el agitador durante 1 min. Este volumen se transfiere a un tubo de citometría y se completa hasta 300 μL con *buffer* de lavado (Figura 5).

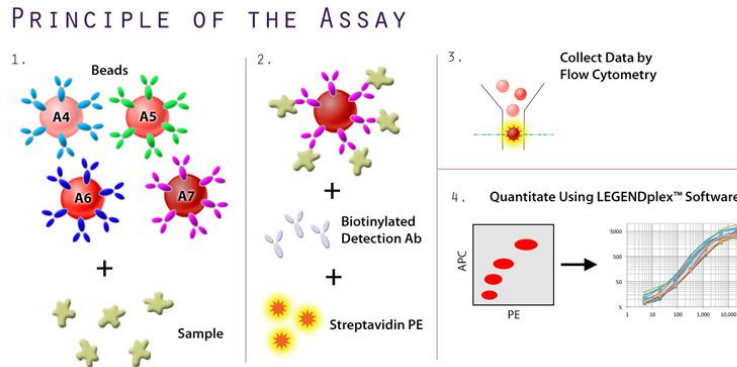


Figura 5. Representación de la estrategia de valoración de quimiocinas¹¹.

Completado el proceso, las muestras están preparadas para ser leídas en el citómetro.

4.9- Tratamiento de datos

Los resultados obtenidos mediante la citometría de flujo para la migración fueron analizados mediante el software FlowJo 10.6.2, mientras que los diagramas de flujo, las curvas patrón y las concentraciones de las quimiocinas fueron estudiados utilizando el software *LEGENDplex™ Data Analysis Software Suite*. Aquellas muestras que se encontraban tanto por debajo del límite de detección de la técnica multiplex como saturadas, se les otorgó el valor mínimo y máximo, respectivamente, con el fin de realizar el análisis correspondiente. El análisis estadístico fue llevado a cabo utilizando el programa GraphPad Prism 9.0.0.121, utilizando el análisis de la varianza (ANOVA) para hallar diferencias entre grupos, indicando con el símbolo correspondiente aquellas diferencias significativas encontradas que cumplen $p < 0,05$, o bien indicando el valor específico del p-valor cuando $0,05 < p < 0,10$, hablando de tendencia en esos datos.

5- Resultados

5.1- Identificación de los monocitos CD14⁺ en los sobrenadantes tras migración

Tras realizar el ensayo de migración y teñir los monocitos, se procede a identificar las células vivas en los sobrenadantes. La tinción con el marcador de muerte-viabilidad nos permite excluir las células muertas, mientras que la tinción con CD45 permite identificar a los monocitos presentes en la muestra (Figura 6). Estos leucocitos son monocitos CD14⁺, las únicas células presentes en la muestra gracias al método específico de extracción (definido en el apartado 4.5).

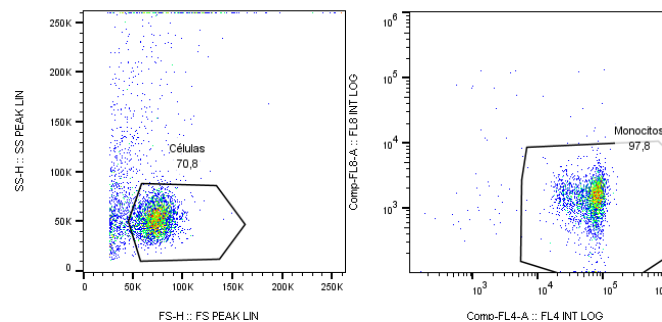


Figura 6. Estrategia de análisis para identificar a las células vivas en los sobrenadantes. En primer lugar, se escoge la fracción singlete (no mostrado) que recoge la adecuada relación área-altura que guardan los eventos recogidos que son las células no dobles. Después, se elige la región que contiene a las células vivas (imagen izquierda) separándolas del *debris*. En el siguiente paso se seleccionan los monocitos CD45⁺ para el canal FL4 (con el que se identifica CD45) y negativos para el marcador de muerte-viabilidad (que se reporta con el canal FL8, imagen izquierda), notificando a las células vivas respecto a las muertas excluidas de la sección “monocitos”.

Como se aprecia en la Figura 6 (imagen izquierda), los eventos recogidos a la izquierda de la fracción titulada como “células” corresponden al *debris* celular. Dentro de la fracción celular, se identifican los monocitos en la parte inferior derecha (gráfico derecho), correspondiente a las células vivas positivas para CD45, puesto que las células ocupantes del cuadrante superior derecho son positivas para el marcador de muerte-viabilidad, y por lo tanto muertas.

5.2- Perfil migratorio de los monocitos CD14⁺

En primer lugar, se realizó una comparación para hallar la existencia de diferencias regionales en la ratio de migración atendiendo a los grupos control, EC y CU (Figura 7).

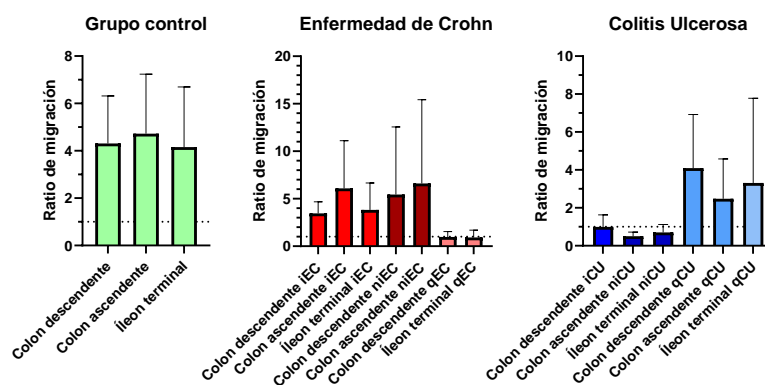


Figura 7. Comparación de la ratio de migración entre el colon descendente, colon ascendente e íleon terminal en los grupos: iEC, tejido inflamado de pacientes con EC activa; niEC, tejido no inflamado de pacientes con EC activa; qEC, tejido quiescente de pacientes con EC; iCU, tejido inflamado de pacientes con CU activa; niCU, tejido no inflamado de pacientes con CU activa; qCU, tejido quiescente de pacientes con CU. Se aprecia la línea discontinua indicando la ratio migración de valor 1, la migración espontánea, tomada como control hacia el medio de cultivo sin condicionar en lugar de los sobrenadantes muestra. Las barras de error indican el intervalo de confianza del 95%.

No se aprecian diferencias regionales significativas en la ratio de migración dentro de los diferentes grupos estudiados. Sin embargo, se aprecia que la migración hacia los sobrenadantes de pacientes qEC, iCU y niCU no se diferencia de la espontánea, concluyendo que no existe migración de monocitos CD14⁺ hacia dichas muestras.

Dado que no existían diferencias en la ratio de migración hacia los tres tejidos a estudio, a continuación, se procedió a comparar el colon (agrupando ascendente y descendente) y el íleon terminal entre los distintos grupos de muestra (Figura 8). La separación entre colon e íleon se realizó debido a que la CU activa se restringe al colon, mientras que la EC activa puede presentar inflamación en el colon y/o en el íleon.

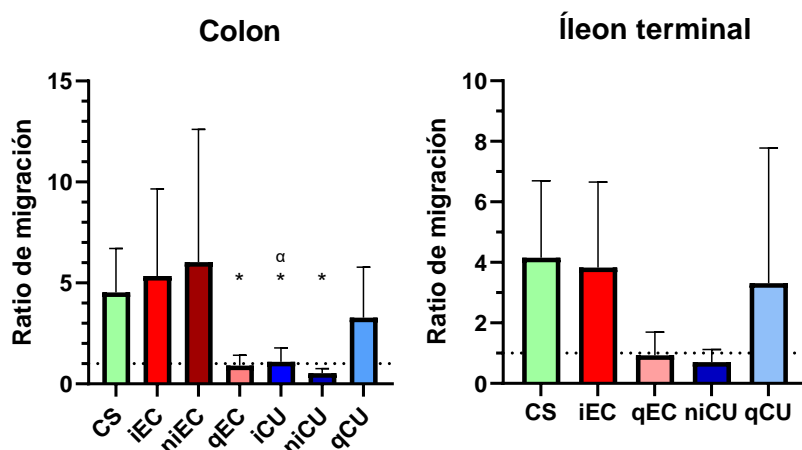


Figura 8. Ratio de migración mostrado por el colon y el íleon terminal de los diferentes grupos: CS, controles sanos; iEC, tejido inflamado de pacientes con EC activa; niEC, tejido no inflamado de pacientes con EC activa; qEC, tejido quiescente de pacientes con EC; iCU, tejido inflamado de pacientes con CU activa; niCU, tejido no inflamado de pacientes con CU activa; qCU, tejido quiescente de pacientes con CU. Se marca la migración basal o espontánea mediante línea discontinua en $y = 1$. El estudio comparado se realizó ejecutando un análisis ANOVA. El símbolo * indica diferencias significativas respecto al CS ($*p < 0,05$) y el α respecto al grupo iEC ($\alpha p < 0,05$). En el colon se observa que los pacientes con qEC, iCU y niCU poseen una ratio de migración significativamente menor respecto a los CS e igual a la migración basal. Además, los pacientes con iEC poseen una ratio de migración significativamente mayor que los pacientes con iCU. Por otro lado, en el íleon terminal, no se observan diferencias significativas, pero al igual que en el colon los pacientes con qEC y niCU poseen una ratio de migración igual a la migración espontánea.

Como se observa en la Figura 8, la migración es significativamente menor en los pacientes con qEC, iCU y niCU referido a los CS. Además, los pacientes iEC atrajeron más monocitos que los pacientes con iCU. Por otro lado, no se encontraron diferencias cuando se estudió el íleon terminal de estos pacientes, aunque se volvió a encontrar una tendencia a menor migración (igual a la espontánea) en los pacientes qEC y niCU, no existiendo muestras de iCU en este tejido porque la CU únicamente afecta al colon.

El hecho de no existir diferencias regionales dentro de los distintos grupos nos permitió agrupar todos los segmentos intestinales estudiados para compararlos entre sí. Nuestros resultados confirman la nula capacidad atrayente sobre los monocitos circulantes de la mucosa intestinal de pacientes con qEC, iCU y niCU al coincidir la ratio de migración con el de la migración basal o espontánea. Además, se confirma que el tejido de los iEC tiene mayor capacidad atrayente que el de los iCU (Figura 9).

Compendio

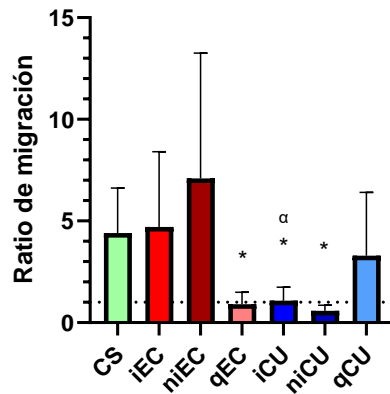


Figura 9. Estudio comparado de la ratio de migración agrupando el colon ascendente, descendente y el íleon terminal entre los distintos grupos: CS, controles sanos; iEC, tejido inflamado de pacientes con EC activa; niEC, tejido no inflamado de pacientes con EC activa; qEC, tejido quiescente de pacientes con EC; iCU, tejido inflamado de pacientes con CU activa; niCU, tejido no inflamado de pacientes con CU activa; qCU, tejido quiescente de pacientes con CU. Se marca la migración basal o espontánea mediante línea discontinua en $y = 1$. El estudio comparado se realizó ejecutando un análisis ANOVA. El símbolo * indica diferencias significativas respecto al CS ($*p < 0,05$) y el α respecto al grupo iEC ($\alpha p < 0,05$). De nuevo, los pacientes con qEC, iCU y niCU poseen una ratio de migración menor respecto a los CS e igual a la migración espontánea. Además, la migración presente en los pacientes con iEC es significativamente mayor respecto a los pacientes con iCU.

5.3- Identificación y cuantificación de quimiocinas

Los sobrenadantes, tras el tratamiento con el ensayo multiplex, fueron analizados mediante citometría de flujo, siguiendo las indicaciones del distribuidor (Figura 10). Las bolas se clasifican en dos grupos A y B, diferenciables mediante su tamaño (*forward scatter*, FS) y complejidad (*side scatter*, SS). Dentro de cada una, la intensidad de fluorescencia de cada tipo de bola se clasificó y cuantificó utilizando la configuración de láseres y filtros descrita en el apartado 4.8. Las bolas A corresponden a CXCL8 (A4), CXCL10 (A5), CCL11 (A6), CCL17 (A7), CCL2 (A8) y CCL5 (A10), mientras que las B son CCL3 (B2), CXCL9 (B3), CXCL5 (B4), CCL20 (B5), CXCL1 (B6), CXCL11 (B7) y CCL4 (B9).

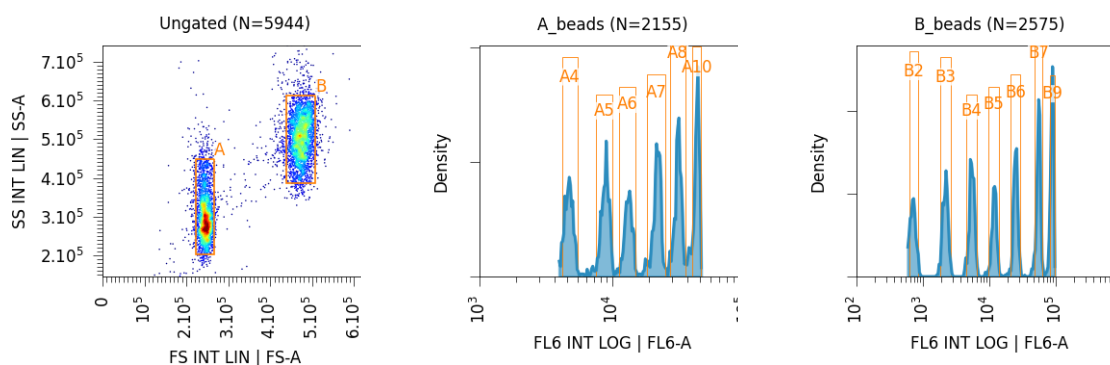


Figura 10. Ejemplo de estrategia de análisis de las bolas para clasificación y cuantificación de quimiocinas. En primer lugar, se clasifican en los grupos A y B (imagen izquierda) según su tamaño y complejidad, para posteriormente cuantificarlas utilizando su histograma de fluorescencia.

5.4- Perfil de quimiocinas de los sobrenadantes de lámina propia

La estrategia de análisis para estudiar la concentración de las diferentes quimiocinas en cada tipo de sobrenadante generado por la mucosa intestinal de estos pacientes fue la misma seguida para la migración de monocitos. En primer lugar, se realizó la

comparativa dentro de los grupos sanos y enfermos para cada una de las quimiocinas con el fin de examinar la existencia de diferencias regionales (Figura 11).

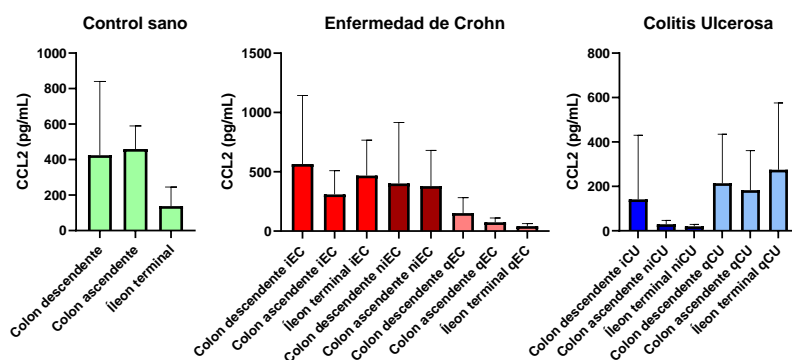


Figura 11. Ejemplo de la comparación de la concentración de, en este caso, CCL2 dentro de cada uno de los grupos de estudio: iEC, tejido inflamado de pacientes con EC activa; niEC, tejido no inflamado de pacientes con EC activa; qEC, tejido quiescente de pacientes con EC; iCU, tejido inflamado de pacientes con CU activa; niCU, tejido no inflamado de pacientes con CU activa; qCU, tejido quiescente de pacientes con CU. No se observan diferencias regionales entre el colon descendente, ascendente e íleon terminal de estos pacientes en la concentración de dicha quimiocina.

Ninguna de las quimiocinas estudiadas mostró diferencias significativas entre las distintas regiones sometidas a examen tanto en los sobrenadantes procedentes de la EC como de la CU. Sin embargo, en los CS, CCL4 mostró una concentración de esta quimiocina significativamente mayor en el colon ascendente respecto al íleon terminal de estos pacientes (datos no mostrados).

Por lo tanto, el siguiente estudio ejecutado fue la agrupación del colon ascendente y descendente con el fin de compararlo entre los distintos grupos (Tabla 4):

Tabla 4. Concentración de las trece quimiocinas analizadas en el colon de cada uno de los grupos: CS, controles sanos; iEC, tejido inflamado de pacientes con EC activa; niEC, tejido no inflamado de pacientes con EC activa; qEC, tejido quiescente de pacientes con EC; iCU, tejido inflamado de pacientes con CU activa; niCU, tejido no inflamado de pacientes con CU activa; qCU, tejido quiescente de pacientes con CU. Se representa la media \pm desviación estándar.

| Quimiocina | Concentración (pg/mol) de quimiocinas en el colon | | | | | | |
|------------|---|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------|
| | CS | iEC | niEC | qEC | iCU | niCU | qCU |
| CXCL5 | 85,48 \pm 82,74 | 393,6 \pm 240,7 | 108 \pm 108,4 | 16,01 \pm 5,393 | 46,04 \pm 60,01 | 18,49 \pm 10,36 | 61,07 \pm 74,13 |
| CCL11 | 4,39 \pm 1,959 | 9,852 \pm 5,297 | 4,15 \pm 2,257 | 1,25 \pm 0,5705 | 3,359 \pm 2,072 | 1,507 \pm 1,038 | 2,918 \pm 3,626 |
| CXCL1 | 3296 \pm 4614 | 8374 \pm 3983 | 4156 \pm 5340 | 79,39 \pm 73,58 | 233,3 \pm 415,9 | 59,34 \pm 108 | 262,9 \pm 308,4 |
| CXCL8 | 6740 \pm 4046 | 8749 \pm 3063 | 5829 \pm 3940 | 1522 \pm 974 | 3188 \pm 3536 | 1446 \pm 1693 | 1903 \pm 1517 |
| CXCL10 | 44,69 \pm 21,68 | 88,17 \pm 52,05 | 49,48 \pm 20,66 | 21,49 \pm 7,958 | 27,88 \pm 19,1 | 20,17 \pm 12,22 | 26,83 \pm 12,09 |
| CXCL11 | 2,653 \pm 1,307 | 8,058 \pm 4,672 | 1,83 \pm 1,462 | 0,414 \pm 0,2298 | 1,194 \pm 0,8678 | 0,4171 \pm 0,3541 | 2,391 \pm 5,431 |
| CCL2 | 444,4 \pm 257,8 | 437,6 \pm 411 | 387,9 \pm 334,3 | 113,4 \pm 98,36 | 147,8 \pm 274,5 | 29,49 \pm 17,39 | 198,6 \pm 189,9 |
| CXCL9 | 114,8 \pm 100,2 | 4342 \pm 4525 | 100,6 \pm 124,8 | 9,59 \pm 10,97 | 100,6 \pm 153,4 | 12,89 \pm 14,97 | 55,24 \pm 125,4 |
| CCL3 | 55,19 \pm 29,94 | 186 \pm 127,8 | 30,13 \pm 13,79 | 18 \pm 9,021 | 16,12 \pm 9,088 | 18,22 \pm 2,71 | 20,9 \pm 11,74 |
| CCL4 | 92,74 \pm 53,26 | 811,9 \pm 975 | 39,22 \pm 36,74 | 8,389 \pm 11,83 | 4,16 \pm 2,845 | 2,853 \pm 0,7593 | 7,168 \pm 6,46 |
| CCL20 | 402,6 \pm 513,7 | 1289 \pm 732,5 | 143,7 \pm 134,3 | 59,94 \pm 72,9 | 14,51 \pm 11,67 | 9,696 \pm 5,74 | 89,15 \pm 116,3 |
| CCL5 | 42,19 \pm 20,69 | 106,5 \pm 67,4 | 34,24 \pm 5,043 | 26,21 \pm 10,21 | 47,75 \pm 35,84 | 34,08 \pm 13,05 | 23,36 \pm 13,32 |
| CCL17 | 2,911 \pm 1,638 | 9,783 \pm 6,662 | 3,638 \pm 3,586 | 0,777 \pm 0,4008 | 1,283 \pm 1,104 | 0,7757 \pm 0,458 | 1,818 \pm 2,132 |

Lo que se observa en primera instancia es la variación de concentraciones que existen entre las distintas quimiocinas en cada uno de los grupos. Además, dentro de cada quimiocina, se abarca un amplio abanico de concentraciones, representado por la desviación estándar, lo que indica una gran diferencia en la concentración de cada una

de un paciente a otro. A continuación, se realizó un ANOVA con el fin de estudiar si existen diferencias significativas en la concentración de estas moléculas frente a los CS (Tabla 5):

Tabla 5. P-valores obtenidos mediante ANOVA comparando cada grupo con los controles sanos de colon: CS, controles sanos; iEC, tejido inflamado de pacientes con EC activa; niEC, tejido no inflamado de pacientes con EC activa; qEC, tejido quiescente de pacientes con EC; iCU, tejido inflamado de pacientes con CU activa; niCU, tejido no inflamado de pacientes con CU activa; qCU, tejido quiescente de pacientes con CU (ns indica no significativo, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. Aquellos p-valores que no cumplen el nivel de significación, pero son *p<0,10 se muestran en la tabla de forma numérica).

| Quimiocina | p-valor (vs CS) | | | | | |
|---------------|-----------------|------|--------|--------|--------|-----|
| | iEC | niEC | qEC | iCU | niCU | qCU |
| CXCL5 | **** | ns | ns | ns | ns | ns |
| CCL11 | ** | ns | ns | ns | ns | ns |
| CXCL1 | ns | ns | ns | ns | * | ns |
| CXCL8 | ns | ns | ** | 0,0507 | ** | ** |
| CXCL10 | ** | ns | ns | ns | ns | ns |
| CXCL11 | ** | ns | ns | ns | ns | ns |
| CCL2 | ns | ns | * | 0,0645 | * | ns |
| CXCL9 | ns | ns | 0,0645 | ns | ns | ns |
| CCL3 | **** | ns | ns | ns | ns | ns |
| CCL4 | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| CCL20 | **** | ns | ns | 0,0503 | 0,0842 | ns |
| CCL5 | ** | ns | ns | ns | ns | ns |
| CCL17 | *** | ns | ns | ns | ns | ns |

Atendiendo al nivel de significación obtenido y a las concentraciones mostradas en la Tabla 4, se observa que, para gran parte de las quimiocinas, en los tejidos de colon iEC se encuentran en mayor concentración respecto a los sanos. Por otro lado, la concentración de estos compuestos en los sobrenadantes niEC no se diferencian respecto a los CS. CXCL8 tiende a estar en menor concentración en aquellos tejidos qEC, niCU, iCU y qCU; CCL2 se comporta de manera parecida, estando disminuida principalmente en el colon de los tejidos qEC, niCU y iCU; CXCL9 muestra dicha tendencia en los sobrenadantes qEC, mientras que CCL20 lo hace en iCU y niCU.

Tabla 6. P-valor obtenido para cada quimiocina, comparando los resultados obtenidos para el colon entre el grupo de pacientes con tejido inflamado de EC activa (iEC) y el grupo de pacientes con tejido inflamado de CU activa (iCU) (ns indica no significativo, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. Aquellos p-valores que no cumplen el nivel de significación, pero son *p<0,10 se muestran en la tabla de forma numérica).

| Quimiocina | p-valor (iEC vs iCU) |
|---------------|----------------------|
| CXCL5 | **** |
| CCL11 | *** |
| CXCL1 | * |
| CXCL8 | ** |
| CXCL10 | **** |
| CXCL11 | *** |
| CCL2 | 0,0918 |
| CXCL9 | 0,0597 |
| CCL3 | **** |
| CCL4 | **** |
| CCL20 | **** |
| CCL5 | ** |
| CCL17 | **** |

A continuación, examinamos si existen diferencias entre los tejidos iEC y los iCU (Tabla 6).

Resulta interesante encontrar que el nivel de quimiocinas en el colon iEC se encuentra significativamente elevado respecto al iCU (siendo dicha tendencia menor en CCL2 y CXCL9), lo cual marca dos pautas distintas entre estas enfermedades a nivel colónico.

Este mismo análisis se realizó para el íleon terminal (Tabla 7).

Tabla 7. Concentración de las quimiocinas encontradas en el íleon terminal (representando media \pm desviación estándar) para cada uno de los grupos: CS, controles sanos; iEC, tejido inflamado de pacientes con EC activa; qEC, tejido quiescente de pacientes con EC; niCU, tejido no inflamado de pacientes con CU activa; qCU, tejido quiescente de pacientes con CU. El hecho de que CXCL8 posea una desviación estándar igual a 0 se debe a la saturación instrumental, otorgando a esta quimiocina el valor máximo de la curva de calibración.

| Quimiocina | Concentración (pg/mol) de quimiocinas en el íleon terminal | | | | |
|---------------|--|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | CS | iEC | qEC | niCU | qCU |
| CXCL5 | 47,88 \pm 30,26 | 392,4 \pm 225 | 14,61 \pm 7,888 | 11,55 \pm 3,545 | 47,8 \pm 46,02 |
| CCL11 | 5,71 \pm 1,121 | 8,642 \pm 2,737 | 1,47 \pm 0,9272 | 1,27 \pm 0,5023 | 2,134 \pm 1,609 |
| CXCL1 | 330 \pm 286,2 | 6842 \pm 4440 | 41,47 \pm 31,74 | 20,27 \pm 18,14 | 294,5 \pm 350,1 |
| CXCL8 | 5561 \pm 4518 | 10000 \pm 0 | 858,9 \pm 499,7 | 444,8 \pm 370 | 2851 \pm 3434 |
| CXCL10 | 34,37 \pm 22,14 | 61,29 \pm 7,402 | 17,55 \pm 4,829 | 14,7 \pm 5,596 | 27,98 \pm 17,19 |
| CXCL11 | 4,12 \pm 2,2 | 7,15 \pm 4,176 | 0,45 \pm 0,4249 | 0,28 \pm 0,03464 | 1,064 \pm 0,7612 |
| CCL2 | 138,2 \pm 107,5 | 467,9 \pm 298,7 | 42,43 \pm 20,28 | 20,03 \pm 9,189 | 274,8 \pm 301,1 |
| CXCL9 | 163 \pm 185,1 | 1520 \pm 1712 | 13,93 \pm 11,14 | 21,98 \pm 24,65 | 22,17 \pm 14,69 |
| CCL3 | 30,41 \pm 5,502 | 100,7 \pm 74,41 | 10,93 \pm 7,264 | 13,42 \pm 11,45 | 22,68 \pm 11,85 |
| CCL4 | 16,68 \pm 3,168 | 143,6 \pm 137,5 | 3,398 \pm 2,374 | 3,727 \pm 3,372 | 4,034 \pm 1,39 |
| CCL20 | 699,9 \pm 678 | 626,1 \pm 498,9 | 128 \pm 170,4 | 7,713 \pm 6,23 | 167,9 \pm 103 |
| CCL5 | 63,48 \pm 31,88 | 75,52 \pm 59,74 | 28,96 \pm 6,53 | 46,97 \pm 26,77 | 31,09 \pm 11,73 |
| CCL17 | 7,71 \pm 9,969 | 7,258 \pm 2,089 | 0,648 \pm 0,1863 | 0,6967 \pm 0,254 | 1,152 \pm 1,077 |

De la misma manera que lo encontrado para el colon, la variabilidad de concentraciones se repite entre las distintas quimiocinas, así como en las concentraciones que pueden abarcar individualmente.

El ANOVA realizado expuso lo siguiente (Tabla 8). Al igual que lo he encontrado en el colon, la concentración de quimiocinas en el íleon terminal está de manera genérica aumentada para los tejidos iEC. Respecto a los qEC, esta se ve disminuida para CCL11, CXCL8, CXCL11 y CCL17. Por otro lado, para el grupo niCU esta tendencia se ve reflejada en CCL11, CXCL8 y CCL20, mientras que para qCU únicamente se presenta en CCL11.

Dado que no existen diferencias significativas en la concentración de las quimiocinas entre el colon y el íleon terminal (excepto para CCL4), se procedió a su agrupación para conocer la concentración global de estos compuestos en los distintos tipos de tejidos (Tabla 9):

Tabla 8. P-valor obtenido para cada quimiocina mediante ANOVA en el íleon terminal: CS, controles sanos; iEC, tejido inflamado de pacientes con EC activa; qEC, tejido quiescente de pacientes con EC; niCU, tejido no inflamado de pacientes con CU activa; qCU, tejido quiescente de pacientes con CU (ns indica no significativo, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. Aquellos p-valores que no cumplen el nivel de significación, pero son *p<0,10 se muestran en la tabla de forma numérica).

| Quimiocina | p-valor (vs CS) | | | |
|---------------|-----------------|--------|--------|-----|
| | iEC | qEC | niCU | qCU |
| CXCL5 | *** | ns | ns | ns |
| CCL11 | 0,0589 | ** | * | * |
| CXCL1 | ** | ns | ns | ns |
| CXCL8 | 0,0583 | * | 0,0547 | ns |
| CXCL10 | * | ns | ns | ns |
| CXCL11 | ns | 0,0842 | ns | ns |
| CCL2 | 0,0985 | ns | ns | ns |
| CXCL9 | 0,0825 | ns | ns | ns |
| CCL3 | * | ns | ns | ns |
| CCL4 | * | ns | ns | ns |
| CCL20 | ns | ns | 0,0953 | ns |
| CCL5 | ns | ns | ns | ns |
| CCL17 | ns | 0,0825 | ns | ns |

Tabla 9. Concentración de quimiocinas conteniendo los datos agrupados de colon e íleon terminal: CS, controles sanos; iEC, tejido inflamado de pacientes con EC activa; niEC, tejido no inflamado de pacientes con EC activa; qEC, tejido quiescente de pacientes con EC; iCU, tejido inflamado de pacientes con CU activa; niCU, tejido no inflamado de pacientes con CU activa; qCU, tejido quiescente de pacientes con CU. Se representa la media ± desviación estándar.

| Quimiocina | Concentración (pg/mol) de quimiocinas global | | | | | | |
|---------------|--|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| | CS | iEC | niEC | qEC | iCU | niCU | qCU |
| CXCL5 | 71,8 ±68,86 | 393±221,9 | 164,6±169,2 | 15,54 ±6,078 | 44,24±57,56 | 16,41±9,249 | 56,65±64,65 |
| CCL11 | 4,87±1,767 | 9,302±4,174 | 4,812±2,589 | 1,323±0,6829 | 3,295±1,988 | 1,436±0,8874 | 2,657±3,056 |
| CXCL1 | 2218±3878 | 7677±4057 | 5130±5339 | 66,75±64,11 | 368,1±415,8 | 47,62±90,56 | 219,1±399,6 |
| CXCL8 | 6311±4037 | 9318±2262 | 6524±3914 | 1301±886,6 | 3024±3419 | 1146±1475 | 2219±2250 |
| CXCL10 | 40,94±21,36 | 75,95±39,66 | 55,12±23,08 | 20,18±7,147 | 27,35±18,3 | 18,53±10,66 | 27,21±13,37 |
| CXCL11 | 3,186±1,74 | 7,645±4,256 | 2,523±2,144 | 0,426±0,293 | 1,142±0,8468 | 0,376±0,297 | 1,949±4,421 |
| CCL2 | 333,1±259,3 | 451,4±347 | 490,6±390,7 | 89,75±86,82 | 139,5±263,3 | 26,65±15,53 | 224±224,7 |
| CXCL9 | 132,3±130 | 3059±3686 | 261,6±409,8 | 11,02±10,83 | 97,09±146,7 | 15,62±17,43 | 44,22±102,2 |
| CCL3 | 46,18±26,52 | 15,64±8,904 | 21,49±11,38 | 58,13±69,72 | 16,78±6,277 | 147,2±111,2 | 15,76±8,755 |
| CCL20 | 510,7±564,6 | 987,8±698,4 | 614,6±1160 | 79,3±113,9 | 13,87±11,35 | 9,073±5,61 | 115,4±114,9 |
| CCL5 | 49,93±26,02 | 92,42±62,94 | 40,46±15,9 | 27,12±8,997 | 52,44±37,83 | 37,95±17,65 | 25,94±12,95 |
| CCL17 | 4,656±6,106 | 8,635±5,067 | 5,33±5,241 | 0,734±0,3423 | 1,228±1,07 | 0,752±0,3945 | 1,729±1,809 |

Una vez más, se repitió el patrón en las concentraciones observadas, habiendo una gran variación entre los valores de cada una de las citoquinas quimiotácticas, así como los valores que puede adoptar cada una. Mediante un ANOVA, examinamos las diferencias significativas respecto a los grupos CS e iEC (Tabla 10, Tabla 11).

Tabla 10. P-valor obtenido para cada quimiocina mediante ANOVA para la totalidad de los datos: CS, controles sanos; iEC, tejido inflamado de pacientes con EC activa; niEC, tejido no inflamado de pacientes con EC activa; qEC, tejido quiescente de pacientes con EC; iCU, tejido inflamado de pacientes con CU activa; niCU, tejido no inflamado de pacientes con CU activa; qCU, tejido quiescente de pacientes con CU (ns indica no significativo, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. Aquellos p-valores que no cumplen el nivel de significación, pero son *p<0,10 se muestran en la tabla de forma numérica).

| Quimiocina | p-valor (vs CS) | | | | | |
|---------------|-----------------|------|--------|-------|--------|-----|
| | iEC | niEC | qEC | iCU | niCU | qCU |
| CXCL5 | **** | ns | ns | ns | ns | ns |
| CCL11 | *** | ns | ** | ns | ** | ns |
| CXCL1 | ns | ns | * | ns | ** | ns |
| CXCL8 | * | ns | **** | * | *** | ** |
| CXCL10 | *** | ns | 0,0616 | ns | 0,0693 | ns |
| CXCL11 | ** | ns | 0,0522 | ns | 0,0834 | ns |
| CCL2 | ns | ns | 0,0604 | ns | * | ns |
| CXCL9 | ns | ns | ** | ns | * | ns |
| CCL3 | **** | ns | ns | ns | ns | ns |
| CCL20 | 0,0759 | ns | 0,0893 | 0,052 | 0,0652 | ns |
| CCL5 | ** | ns | ns | ns | ns | ns |
| CCL17 | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

Tabla 11. P-valor obtenido comparando los resultados obtenidos para la globalidad de los valores entre pacientes con tejido inflamado de EC activa (iEC) y pacientes con tejido inflamado de CU activa (iCU) (ns indica no significativo, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. Aquellos p-valores que no cumplen el nivel de significación, pero son *p<0,10 se muestran en la tabla de forma numérica).

| Quimiocina | p-valor (iEC vs iCU) |
|---------------|----------------------|
| CXCL5 | **** |
| CCL11 | **** |
| CXCL1 | ** |
| CXCL8 | **** |
| CXCL10 | **** |
| CXCL11 | **** |
| CCL2 | * |
| CXCL9 | * |
| CCL3 | **** |
| CCL20 | **** |
| CCL5 | * |
| CCL17 | **** |

Los resultados de las Tablas 10 y 11 se asemejan a los obtenidos para las anteriores: las quimiocinas tienden a poseer una concentración mayor en el iEC y disminuidas en los quiescentes de esta enfermedad y niUC. Por otro lado, CXCL8 se ve disminuida en los pacientes con iUC (como tiende a exhibir CCL20) y aquellos quiescentes.

5.5- Correlación entre severidad, perfil migratorio y concentración de quimiocinas

El nivel de severidad de la EII puede ser clasificado atendiendo a una serie de índices que los clínicos utilizan en función de biomarcadores, como puede ser la proteína C-reactiva o la calprotectina fecal. En el caso de la EC, el índice de clasificación endoscópica utilizado es el SES-CD, mientras que para la CU se usa el índice endoscópico de Mayo^{12,13}. Por lo tanto, y a la vista de los datos obtenidos, nos resultó

interesante correlacionar la gravedad de la enfermedad con las quimiocinas encontradas, así como la migración encontrada hacia los sobrenadantes analizados (Tabla 12).

Tabla 12. Correlación (r) encontrada entre la concentración de quimiocinas y los índices endoscópicos para cada enfermedad que marcan su severidad. Para la EC se utilizó el índice endoscópico simple para EC (o *Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease*, SES-CD) y para la CU el índice endoscópico de Mayo (ns indica no significativo, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).

| Quimiocina | SES-CD | | Índice endoscópico de Mayo | |
|------------|--------|---------|----------------------------|---------|
| | r | p-valor | r | p-valor |
| CXCL5 | 0,7471 | **** | -0,3027 | 0,0869 |
| CCL11 | 0,7425 | **** | -0,009821 | ns |
| CXCL1 | 0,8358 | **** | -0,2398 | ns |
| CXCL8 | 0,9058 | **** | -0,1042 | ns |
| CXCL10 | 0,6372 | *** | -0,2085 | ns |
| CXCL11 | 0,6429 | **** | -0,1509 | ns |
| CCL2 | 0,6675 | **** | -0,2558 | ns |
| CXCL9 | 0,3644 | * | 0,0138 | ns |
| CCL3 | 0,4797 | ** | -0,3356 | 0,0562 |
| CCL4 | 0,2782 | ns | -0,2599 | ns |
| CCL20 | 0,3925 | * | -0,4815 | ** |
| CCL5 | 0,5592 | ** | 0,2144 | ns |
| CCL17 | 0,6435 | **** | -0,2480 | ns |

Como se aprecia en la Tabla 12, salvo CCL4, todas las quimiocinas poseen una concentración mayor a medida que aumenta la gravedad de la sintomatología en la EC. Este alto grado de correlación también se encontró respecto al ratio de migración de los monocitos CD14⁺ (r = 0,6543, ****p<0,0001). Por otro lado, para la CU, esta correlación fue negativa, además de no ser significativa la severidad de la enfermedad, medida con el índice endoscópico de Mayo, con la concentración de las quimiocinas (salvo CCL20). Sumado a esto, la ratio de migración presenta un resultado similar (r = -0,4287, *p<0,05), que no parece relacionarse con el empeoramiento de la enfermedad en estos pacientes.

Debido al gran conjunto de datos, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con el fin de reducir la dimensión del problema y el número de variables para recoger la máxima variabilidad posible (Figura 14). Este análisis reveló que el componente principal 1 (CP1) separa a los tejidos iEC y niEC del resto, estando estos últimos más cerca de los CS. A su vez, ciertos valores pertenecientes a los CS parecen estar desplazados respecto a la gran concentración de datos que comprende los qCU, qEC, iCU y niCU en su mayoría. Esto concordaría con lo encontrado en la ratio de migración y la concentración de quimiocinas de manera genérica. El componente principal 2 (CP2), sin embargo, no es capaz de realizar ninguna separación satisfactoria que distinga a los grupos entre sí.

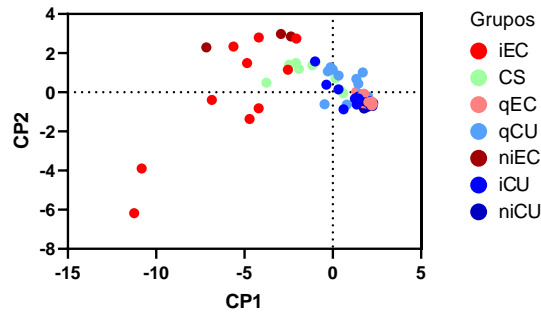


Figura 14. Análisis de componentes principales donde se muestran las dos componentes que recogen la máxima variabilidad de los datos (75,13%), incluyendo ratio de migración y concentración de quimiocinas. CS, controles sanos; iEC, tejido inflamado de pacientes con EC activa; niEC, tejido no inflamado de pacientes con EC activa; qEC, tejido quiescente de pacientes con EC; iCU, tejido inflamado de pacientes con CU activa; niCU, tejido no inflamado de pacientes con CU activa; qCU, tejido quiescente de pacientes con CU.

Es de especial interés el estudio del peso que tiene cada variable a la hora de formar las componentes principales mediante combinación lineal (denominadas cargas) (Tabla 13, Figura 15).

Tabla 13. Valor de las cargas de cada variable para las componentes principales que registran la mayor variabilidad, CP1 y CP2. Se observa que los valores obtenidos para la ratio de migración y CCL2 son muy similares y distintos del resto, que tienden a mostrar datos parecidos dos a dos.

| Variable | CP1 | CP2 |
|---------------------------|------------|------------|
| CXCL5 | -0,8558619 | 0,20015348 |
| Ratio de migración | -0,4651609 | 0,64124171 |
| CCL11 | -0,8527457 | 0,0142163 |
| CXCL1 | -0,849249 | 0,18713605 |
| CXCL8 | -0,8343809 | 0,39052937 |
| CXCL10 | -0,925648 | -0,0456023 |
| CXCL11 | -0,8124073 | -0,1228608 |
| CCL2 | -0,5669065 | 0,64831798 |
| CXCL9 | -0,7826926 | -0,5599689 |
| CCL3 | -0,8703049 | -0,2977519 |
| CCL4 | -0,7467049 | -0,5424282 |
| CCL20 | -0,8429399 | 0,01506764 |
| CCL5 | -0,6202441 | -0,0934839 |
| CCL17 | -0,882688 | -0,0501417 |

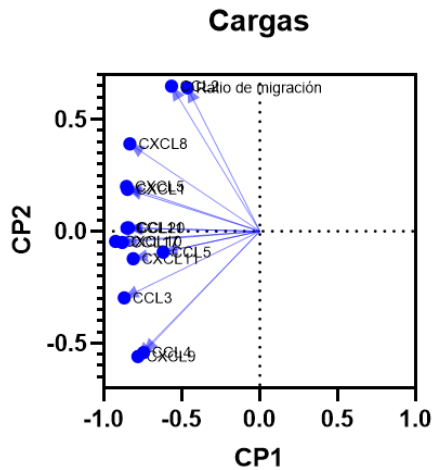


Figura 15. Representación vectorial de cada una de las cargas producto del ACP, indicando su valor para el componente principal 1 (CP1) y el componente principal 2 (CP2) con origen en el (0,0).

Se observa que las distintas quimiocinas se separan a través del CP2, siendo que algunas de ellas poseen valores muy parecidos, como CCL4 con CXCL9 o CXCL5 con CXCL1, indicando que estas poseen información muy similar al construir las componentes principales. Atendiendo al análisis ACP, se observa que la ratio de migración y CCL2 permanecen al margen del resto de las quimiocinas, y que estas dos variables poseen coordenadas similares atendiendo a las cargas. Esto encaja con el aspecto de las distintas gráficas analizadas anteriormente, siendo bastante parejas la forma encontrada para CCL2 y la ratio de migración y muy distintas respecto a las encontradas para el resto de las quimiocinas.

6- Discusión

En este trabajo se ha descrito la migración de monocitos CD14⁺ a los distintos sobrenadantes generados de biopsias (en concreto, de la lámina propia) de pacientes con EII, incluyendo tejidos inflamados, no inflamados y quiescentes de colon ascendente, colon descendente e íleon terminal. Además, se ha medido la concentración de las trece quimiocinas distintas en estos sobrenadantes, con el fin de descubrir cuál o cuáles contribuían mayoritariamente a la migración de los monocitos a estas muestras, simulando el tejido intestinal de los pacientes a partir del microambiente generado por los sobrenadantes. Cabe destacar que, debido a la limitación muestral, algunas regiones intestinales no pudieron ser recolectadas, o se disponía de poco tamaño muestral de las mismas (íleon terminal niEC y colon descendente e íleon terminal de iCU), y que por lo tanto sería idóneo aumentar el número de datos de dichas regiones para poder realizar un análisis apropiado.

Podemos afirmar que los objetivos planteados al principio del trabajo han sido completados con éxito. En primer lugar, la determinación de la ratio de migración CD14⁺ del colon descendente, ascendente e íleon terminal en los CS, de EC y CU revela que existe la misma tasa migratoria diferenciando tejido activo afectado, no afectado y quiescente (Figura 7). Sin embargo, destaca que no existe migración, al no diferenciarse de la espontánea fruto de la naturaleza del ensayo *transwell*, en los tejidos iCU, niUC y qEC. Esto se mantiene al examinar el colon (ascendente y descendente), el íleon terminal y juntando ambos segmentos intestinales, existiendo diferencias significativas en la ratio de migración respecto a los CS en estos tres grupos en el colon y en el compendio de datos, además de una mayor ratio de migración en el tejido iEC frente al iUC (Figuras 8 y 9).

Los resultados del ACP (Tabla 13, Figura 15) sugieren que CCL2 es la principal quimiocina responsable de la migración de los monocitos. Esto coincide con lo estudiado anteriormente en el laboratorio, ya que al bloquear CCR2 la migración caía a niveles basales¹⁰, aunque son necesarios ensayos de migración que requieran como estímulo las quimiocinas usadas en este trabajo para confirmar este hecho. En los controles, la migración de monocitos es necesaria para su posterior diferenciación a macrófagos reguladores que se encargan de mantener la homeostasis intestinal. Por otro lado, que no exista migración hacia aquellos tejidos qEC sería concordante con la resolución de la inflamación, donde se produce la supresión de citoquinas proinflamatorias¹⁴.

Las quimiocinas analizadas se encuentran en una concentración aumentada, de manera genérica, en los tejidos iEC de estos pacientes. Por el contrario, aquellos tejidos qEC, iUC y niUC poseen niveles significativamente menores que los CS (Tablas 5, 8 y 10). Esto se explica por la gravedad de la enfermedad al correlacionar el valor obtenido por el índice de Mayo (para CU) y el SES-CD (para EC). En el caso de la CU, la correlación existente con su índice es negativo, y no es significativa, lo que implica que la gravedad de la enfermedad encontrada para estos pacientes, desde la quiescencia hasta el grado máximo de actividad de la patología, no se relaciona con la concentración de las quimiocinas analizadas en este estudio. Sin embargo, sí es significativa la correlación (también negativa) encontrada con la ratio de migración, de lo que se deduce que, a medida que se suavizan los síntomas de la enfermedad, la migración de monocitos CD14⁺ aumenta. Este comportamiento es totalmente opuesto en EC, ya que hay una fuerte correlación que muestra la tendencia de dichas quimiocinas a estar más presentes en estos tejidos conforme la severidad de la enfermedad aumenta. Asimismo, la ratio de migración varía en la misma dirección, existiendo una correlación positiva muy significativa (Tabla 12). Esto se ve apoyado también por el ACP (Figura 14), donde

se ve una clara separación gracias a CP1 de los pacientes iEC y niEC, diferenciando un pequeño grupo de CS y existiendo una agrupación del resto de grupos (iCU, niCU y qCU), siendo un reflejo de la conducta encontrada para la concentración de quimiocinas y la ratio de migración.

El hecho de que los procesos inflamatorios en estas muestras sean muy distintos entre ambas enfermedades puede deberse al alcance de las heridas de cada una, siendo que la CU sólo alcanza a las primeras capas intestinales mientras que la EC consiste en una lesión transmural^{6,9}. Además, se ha descrito que estas enfermedades poseen una diferente respuesta inmune: mientras que la CU está caracterizada por una respuesta tipo Th2, donde hay una mayor producción de IL-5 e IL-13 con una normal secreción de INF- γ pero sin IL-4, la EC posee una respuesta Th1/Th17 donde predominan INF- γ , IL-17 e IL-22¹⁵. Por lo tanto, respuestas celulares características de un perfil inmune Th1/Th17 requerirán mayor presencia de células y provocarán un aumento de las quimiocinas proinflamatorias (CXCL8 es un importante quimioatrayente de neutrófilos¹⁶), al contrario que respuestas humorales tipo Th2.

No obstante, resultados obtenidos por otros laboratorios muestran que ciertas quimiocinas como CCL2, CXCL5, CXCL10 y CXCL11 se encuentran aumentadas en el suero sanguíneo de pacientes con EII¹⁷. En esta línea, otro estudio muestra que CCL2 y CCL11 están en una concentración significativamente mayor en aquellos pacientes con EC, pero los pacientes con CU no se diferencian de los controles sanos¹⁸. Por otro lado, un ensayo donde se utilizaron biopsias colónicas para estudiar la secreción de citoquinas expone que CCL2 se encuentra aumentada en tejidos CU, pero los EC no se diferencian de los tejidos sanos, mientras que CCL5 y CXCL8 sí¹⁹. Datos similares se encuentran para el resto de las quimiocinas^{20,21}, lo que indica que hay una gran cantidad de variables en juego como podría ser el estado inmune del paciente a la hora de ser tomada la muestra.

Un estudio²² revela que infliximab, un anticuerpo monoclonal recombinante contra el TNF- α que se usa como tratamiento para pacientes con EII, es capaz de reducir los niveles séricos de CCL2 y CXCL10 en aquellos pacientes que responden a él, indicando que son importantes para el control de la inflamación intestinal. Consecuentemente, esto reduciría *a priori* la migración de monocitos tal y como arrojan nuestros datos (Figura 16), lo cual ayudaría a entender por qué aquellos pacientes qEC poseen una migración reducida a sus tejidos intestinales (suponiendo que responden al tratamiento), aunque se requieren más estudios para terminar de confirmarlo. Por otro lado, infliximab se administra junto a una gran variedad de fármacos entre los que se incluyen corticoesteroides, tiopurinas y 5-ASA. Sería interesante conocer el efecto de cada uno de los medicamentos por separado en la concentración de las quimiocinas analizadas en este trabajo. También ayudaría estudiar cómo afectarían las terapias combinadas a reestablecer los niveles basales de estos compuestos, tanto a nivel sérico como tisular, ya que son las opciones terapéuticas más comunes para estos pacientes.

No fue sin embargo posible realizar un estudio completo referente a la farmacoterapia aplicada para cada paciente debido a la limitación muestral de cada cohorte, así como a la gran heterogeneidad de tratamientos aplicados, tanto medicamentos individuales como la combinación de estos, además del desconocimiento de qué pacientes responden al tratamiento y cuáles no (datos no mostrados). Es necesario por tanto aumentar el tamaño muestral para obtener valores que cobren relevancia a la hora de analizar el efecto de los tratamientos, separar ambas enfermedades a la hora de realizar

el análisis e incluso someter a examen los segmentos intestinales evaluados en este trabajo.

Como se aprecia en la Figura 4, los resultados previos del laboratorio¹⁰ muestran una migración de monocitos aumentada hacia aquellos tejidos activos de CU y EC, mientras que los quiescentes de ambas patologías no se diferenciaban de los CS. El hecho de que los resultados discrepen de los expuestos en este trabajo puede deberse al tratamiento diferencial aplicado a las biopsias. Las biopsias que condujeron a esos resultados iniciales conservaban el mucus y la barrera epitelial, capas que fueron eliminadas en este trabajo mediante el tratamiento con DTT/EDTA (apartado 4.6). El objetivo de eliminar estas capas es estudiar un modelo de estudio de migración de monocitos y producción de quimiocinas que sólo involucrara a la lámina propia, ya que es el lugar donde sucede la inflamación, eliminando así el ruido generado por las quimiocinas producidas por la barrera epitelial. Por consiguiente, lo observado en la eliminación de la monocapa de enterocitos es que la lámina propia es la causante de la migración de monocitos hacia la mucosa intestinal de forma constitutiva pero no en los procesos inflamatorios. Esto explicaría los datos obtenidos para los CS, ya que el tejido sano requiere del reclutamiento de macrófagos residentes en el intestino para conservar la homeostasis. Se aprecia también en los tejidos iEC, niEC y qUC.

Se deduce, por tanto, que el no haber encontrado una migración aumentada de monocitos hacia los tejidos inflamados de los pacientes de EII se debe a que la capa de células epitelial es la principal encargada de la producción de quimiocinas responsables de dicha migración en los procesos inflamatorios. En concreto, un estudio²³ demostró que la producción de CCL2 por las células epiteliales es mayor que la encontrada para las células inmunes inflamatorias de la mucosa, además de distintos patrones de expresión en otras quimiocinas.

La CU, al contrario que lo encontrado para la EC, no presenta migración constitutiva en aquellos tejidos iCU y niCU, lo cual señala que la principal fuente de quimiocinas que recluten monocitos en estos pacientes son las células epiteliales y no la lámina propia. También se observa que la lámina propia es capaz de generar una mayor concentración de las quimiocinas proinflamatorias estudiadas en este trabajo en la EC, pero no en la CU, lo que concordaría con la correlación encontrada con la severidad para cada enfermedad, remarcando por tanto la diferente fisiopatología entre ambas.

7- Conclusiones

- Se ha caracterizado la ratio de migración de monocitos CD14⁺ que existe en el colon ascendente, colon descendente e íleon terminal entre los distintos grupos de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, comprobando que no existen diferencias regionales.
- La ratio de migración es menor para aquellos pacientes de enfermedad de Crohn en fase quiescente y para los pacientes de colitis ulcerosa con la enfermedad activa que presentan o no inflamación.
- Se ha cuantificado la concentración de las quimiocinas CXCL8, CXCL10, CCL11, CCL17, CCL2, CCL5, CCL3, CXCL9, CXCL5, CCL20, CXCL1, CXCL11 y CCL4. De manera genérica, no hay diferencias en su expresión entre el colon y el íleon, y se encuentran aumentadas en los tejidos inflamados de pacientes con enfermedad de Crohn, mientras que se ven inhibidas en aquellos quiescentes de Crohn y activos inflamados y no inflamados de colitis ulcerosa.
- La inflamación de la enfermedad de Crohn es diferente a la de colitis ulcerosa, tanto a nivel migratorio como a su concentración de quimiocinas. La severidad correlaciona una mayor concentración de quimiocinas y migración de monocitos CD14⁺ en la enfermedad de Crohn, pero no en la colitis ulcerosa, lo que acentúa la diferencia existente entre ambas enfermedades.
- Se revela la necesidad de investigar el efecto de los tratamientos de estos pacientes en la evaluación de su nivel de quimiocinas y su ratio de migración.
- Se propone a la lámina propia como modelo de generación basal de quimiocinas. Estas aumentan su concentración en procesos inflamatorios para la enfermedad de Crohn, pero no para la colitis ulcerosa, donde la barrera epitelial intestinal sería la encargada de la producción de quimiocinas tanto de manera constitutiva como en estadios proinflamatorios.
- La lámina propia provocaría la migración basal de monocitos al intestino humano, condición que cumple la enfermedad de Crohn, pero no la colitis ulcerosa, en cuyo caso la responsable sería la barrera epitelial.

8- Bibliográfia

- 1- Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, 14(10), 667–685. DOI: 10.1038/nri3738
- 2- Pabst, O., & Mowat, A. M. (2012). Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunology*, 5(3), 232–239. DOI: 10.1038/mi.2012.4
- 3- Mowat, A. M. (2018). To respond or not to respond — a personal perspective of intestinal tolerance. *Nature Reviews Immunology*, 18(6), 405–415. DOI: 10.1038/s41577-018-0002-x
- 4- Ananthakrishnan, A. N., Bernstein, C. N., Iliopoulos, D., Macpherson, A., Neurath, M. F., Ali, R. A. R., Vavricka, S. R., & Fiocchi, C. (2018). Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 15(1), 39–49. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.136
- 5- Guan, Q. (2019). A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Immunology Research*, 2019, 1–16. DOI: 10.1155/2019/7247238
- 6- Alatab, S., Sepanlou, S. G., Ikuta, K., Vahedi, H., Bisignano, C., Safiri, S., Sadeghi, A., Nixon, M. R., Abdoli, A., Abolhassani, H., Alipour, V., Almadi, M. A. H., Almasi-Hashiani, A., Anushiravani, A., Arabloo, J., Atique, S., Awasthi, A., Badawi, A., Baig, A. A. A., ... Naghavi, M. (2020). The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 5(1), 17–30. DOI: 10.1016/s2468-1253(19)30333-4
- 7- Cai, Z., Wang, S., & Li, J. (2021). Treatment of Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review. *Frontiers in Medicine*, 8. DOI: 10.3389/fmed.2021.765474
- 8- Wallace, K. L. (2014). Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 20(1), 6. DOI: 10.3748/wjg.v20.i1.6
- 9- Kühn, A. A., Erben, U., Kredel, L. I., & Siegmund, B. (2015). Diversity of Intestinal Macrophages in Inflammatory Bowel Diseases. *Frontiers in Immunology*, 6. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00613
- 10- Bernardo, D., Marin, A. C., Fernández-Tomé, S., Montalban-Arques, A., Carrasco, A., Tristán, E., Ortega-Moreno, L., Mora-Gutiérrez, I., Díaz-Guerra, A., Caminero-Fernández, R., Miranda, P., Casals, F., Caldas, M., Jiménez, M., Casabona, S., de la Morena, F., Esteve, M., Santander, C., Chaparro, M., & Gisbert, J. P. (2018). Human intestinal pro-inflammatory CD11c^{high}CCR2⁺CX3CR1⁺ macrophages, but not their tolerogenic CD11c⁻CCR2⁻CX3CR1⁻ counterparts, are expanded in inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunology*, 11(4), 1114–1126. DOI: 10.1038/s41385-018-0030-7
- 11- LEGENDplex™ Multiplex Assays.
- 12- Schoepfer, A. M., Beglinger, C., Straumann, A., Trummel, M., Vavricka, S. R., Bruegger, L. E., & Seibold, F. (2010). Fecal Calprotectin Correlates More Closely With the Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease (SES-CD) than CRP, Blood Leukocytes, and the CDAI. *American Journal of Gastroenterology*, 105(1), 162–169. DOI: 10.1038/s41385-018-0030-7
- 13- Dave, M., & Loftus, E. v. (2012). Mucosal healing in inflammatory bowel disease—a true paradigm of success? *Gastroenterology & Hepatology*, 8(1), 29–38. PMID: 22347830
- 14- Ho, G., Cartwright, J. A., Thompson, E. J., Bain, C. C., & Rossi, A. G. (2020). Resolution of Inflammation and Gut Repair in IBD: Translational Steps Towards Complete Mucosal Healing. *Inflammatory Bowel Diseases*, 26(8), 1131–1143. DOI: 10.1093/ibd/izaa045

- 15- Strober, W., & Fuss, I. J. (2011). Proinflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, 140(6), 1756-1767.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.02.016
- 16- JONES, S. C., EVANS, S. W., LOBO, A. J., CESKA, M., AXON, A. T. R., & WHICHER, J. T. (1993). Serum interleukin-8 in inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 8(6), 508–512. DOI: 10.1111/j.1440-1746.1993.tb01643.x
- 17- Singh, U. P., Singh, N. P., Murphy, E. A., Price, R. L., Fayad, R., Nagarkatti, M., & Nagarkatti, P. S. (2016). Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients. *Cytokine*, 77, 44–49. DOI: 10.1016/j.cyto.2015.10.008
- 18- Martinez-Fierro, M. L., Garza-Veloz, I., Rocha-Pizaña, M. R., Cardenas-Vargas, E., Cid-Baez, M. A., Trejo-Vazquez, F., Flores-Morales, V., Villela-Ramirez, G. A., Delgado-Enciso, I., Rodriguez-Sanchez, I. P., & Ortiz-Castro, Y. (2019). Serum cytokine, chemokine, and growth factor profiles and their modulation in inflammatory bowel disease. *Medicine*, 98(38), e17208. DOI: 10.1097/md.00000000000017208
- 19- Banks, C., Bateman, A., Payne, R., Johnson, P., & Sheron, N. (2003). Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *The Journal of Pathology*, 199(1), 28–35. DOI: 10.1002/path.1245
- 20- Kaser, A., Ludwiczek, O., Holzmann, S., Moschen, A. R., Weiss, G., Enrich, B., Graziadei, I., Dunzendorfer, S., Wiedermann, C. J., Mürtl, E., Grasl, E., Jasarevic, Z., Romani, N., Offner, F. A., & Tilg, H. (2004). Increased Expression of CCL20 in Human Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Clinical Immunology*, 24(1), 74–85. DOI: 10.1023/b:joci.0000018066.46279.6b
- 21- Tatsuki, M., Hatori, R., Nakazawa, T., Ishige, T., Hara, T., Kagimoto, S., Tomomasa, T., Arakawa, H., & Takizawa, T. (2020). Serological cytokine signature in paediatric patients with inflammatory bowel disease impacts diagnosis. *Scientific Reports*, 10(1), 14638. DOI: 10.1038/s41598-020-71503-y
- 22- Magnusson, M. K., Strid, H., Isaksson, S., Bajor, A., Lasson, A., Ung, K.-A., & Öhman, L. (2015). Response to Infliximab Therapy in Ulcerative Colitis is Associated With Decreased Monocyte Activation, Reduced CCL2 Expression and Downregulation of Tenascin C. *Journal of Crohn's and Colitis*, 9(1), 56–65. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jju008
- 23- Banks, C., Bateman, A., Payne, R., Johnson, P., & Sheron, N. (2003). Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *The Journal of Pathology*, 199(1), 28–35. <https://doi.org/10.1002/path.1245>