

VNIVERSIDAD D SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

---

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE  
AUTOFAGIA EN LA COLITIS ULCEROSA**

---

JESÚS MANUEL GONZÁLEZ SANTIAGO  
2023



TESIS DOCTORAL

---

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE  
AUTOFAGIA EN LA COLITIS ULCEROSA**

---

JESÚS MANUEL GONZÁLEZ SANTIAGO  
2023

DIRECTORES:

**PROF. DR. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO  
PROF. DR. FRANCISCO JAVIER MARTIN VALLEJO**

PROGRAMA DE DOCTORADO:

**BIOCIENCIAS: BIOLOGÍA Y CLÍNICA DEL CÁNCER Y  
MEDICINA TRASLACIONAL**

---

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**





# VNiVERSIDAD D SALAMANCA

## CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**DR. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

**DR. JAVIER MARTIN VALLEJO, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE ESTADISTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado: **“ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE AUTOFAGIA EN LA COLITIS ULCEROSA”**, que presenta el Licenciado en Medicina D. Jesús Manuel González Santiago, ha sido desarrollada bajo su dirección en el Departamento de Medicina y reúne, a nuestro juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Salamanca a 8 de noviembre de 2023.

Fdo.: Dr. D. Rogelio González Sarmiento

Fdo.: Dr. D. Javier Martín Vallejo





Este trabajo ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina y del Centro de Investigación del Cáncer (CIC) e Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC) de la Universidad de Salamanca. Ha sido financiado por un Proyecto de I+D+i en convocatoria competitiva por la Fundación Solórzano Barruso, (ref.FS/13-2014) y por el Instituto de Salud Carlos III (FIS PI13/01741).

*A mi familia*



## AGRADECIMIENTOS

Quiero mostrar mi más sincera gratitud a todas las personas que han hecho posible la consecución de este trabajo. En primer lugar, a quien me inició en la creación y desarrollo de este proyecto, el **Dr. Antonio Rodríguez Pérez**. Desde los comienzos en éste y otros proyectos siempre has sido un inestimable apoyo y el acicate para ayudarme a crecer en esta profesión. A mis directores de tesis por brindarme la oportunidad de formarme y aprender junto a ellos durante estos últimos años: Al **Dr. Rogelio González Sarmiento**, por trasmitirme su pasión por la investigación, por su dirección, guiándome de forma acertada en este arduo camino para sacar este trabajo adelante. Al **Dr. Javier Martín Vallejo**, por depositar su confianza en mi desde el primer día, por enseñarme con gran dedicación los detalles más minuciosos del análisis de este trabajo y por su permanente disponibilidad.

Mis palabras de agradecimiento también van dirigidas a todos y cada uno de las compañeras y compañeros del Servicio de Aparato Digestivo de nuestro Hospital Universitario de Salamanca, una gran familia, que participó en el protocolo de recogida de muestras de forma coordinada y con gran diligencia. Al equipo completo de enfermería de práctica más que avanzada, equipos de TCAEs y celadores, a todos muchísimas gracias.

Este agradecimiento también es para todos y cada uno de las compañeras y compañeros del Departamento de Medicina y del laboratorio 14 del Centro de Investigación del Cáncer, por sus enseñanzas, su incansable consejo al realizar los experimentos, pero también por su alegría diaria y las risas compartidas, que sin duda hacían que las tardes de experimentos infructuosos fueran menos malas. Sin duda, habéis sido muy importantes en esta andadura, siendo mi gran apoyo en tantos momentos vividos dentro del laboratorio. Ha sido un privilegio aprender junto a vosotros y, sobre todo, hacerlo de esta manera.

Por último, quisiera agradecer a mi familia, por la comprensión, paciencia y cariño, sin que faltaran las palabras de ánimo para desarrollar el trabajo.

Sin todos ellos, este trabajo no habría sido posible.

## INDICES

INDICES .....	- 10 -
ÍNDICE DE FIGURAS.....	- 13 -
ÍNDICE DE TABLAS.....	- 16 -
GLOSARIO DE ABREVIATURAS .....	- 17 -
INTRODUCCIÓN .....	- 20 -
1. COLITIS ULCEROSA .....	- 21 -
1.1. GENERALIDADES.....	- 21 -
1.2. EPIDEMIOLOGÍA .....	- 21 -
1.2.1. INCIDENCIA Y PREVALENCIA .....	- 21 -
1.2.2. MORTALIDAD.....	- 22 -
1.2.3. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS.....	- 23 -
1.3. ETIOPATOGENIA.....	- 24 -
1.3.1. Factores Ambientales .....	- 24 -
1.3.2. Microbiota intestinal.....	- 28 -
1.3.3. Factores Genéticos .....	- 32 -
1.3.4. Factores inmunológicos.....	- 37 -
1.3.4.1. RESPUESTA INMUNE INNATA .....	- 38 -
1.3.4.2. RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA.....	- 40 -
1.4. DIAGNÓSTICO.....	- 42 -
1.4.1. CRITERIOS CLÍNICOS. ....	- 43 -
1.4.2. CRITERIOS RADIOLÓGICOS .....	- 46 -
1.4.3. CRITERIOS ENDOSCÓPICOS .....	- 47 -
1.4.4. CRITERIOS HISTOLÓGICOS.....	- 48 -
1.4.5. CALPROTECTINA FECAL .....	- 49 -
1.5. CLASIFICACIÓN DE LA COLITIS ULCEROSA.....	- 50 -
1.6. VALORACIÓN DE LA GRAVEDAD CLÍNICA Y DE LA ACTIVIDAD INFLAMATORIA .....	- 52 -
1.6.1. ÍNDICES DE ACTIVIDAD: .....	- 52 -
1.7. OPCIONES TERAPÉUTICAS.....	- 58 -
1.7.1. SALICILATOS.....	- 59 -
1.7.2. CORTICOIDES .....	- 61 -
1.7.3. INMUNOMODULADORES .....	- 61 -
1.7.4. BIOLÓGICOS.....	- 63 -
1.7.5. NUEVAS MOLÉCULAS PEQUEÑAS .....	- 65 -
1.7.6. CIRUGÍA .....	- 66 -
1.8. PRONÓSTICO .....	- 67 -
2. AUTOFAGIA .....	- 69 -
2.1. BASES MOLECULARES DE LA AUTOFAGIA .....	- 70 -
2.2. EL PROCESO DE AUTOFAGIA: ETAPAS Y PROTEÍNAS QUE INTERVIENEN.....	- 71 -
2.2.1. INICIACIÓN DEL FAGOFORO.....	- 71 -
2.2.2. NUCLEACIÓN DEL FAGOFORO. COMPLEJO PI3K DE CLASE III.....	- 72 -
2.2.3. ELONGACIÓN DEL FAGÓFORO Y EXPANSIÓN DE LA MEMBRANA DEL AUTOFAGOSOMA .....	- 73 -
2.2.4. MADURACIÓN DEL AUTOFAGOSOMA, FUSIÓN Y DEGRADACIÓN LISOSOMAL .....	- 75 -
2.3. REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA Y EL ORIGEN DE LA MEMBRANA.....	- 76 -
2.4. AUTOFAGIA SELECTIVA.....	- 77 -
3. AUTOFAGIA Y RESPUESTA INMUNE .....	- 79 -
4. IMPLICACIÓN DE LA AUTOFAGIA EN LA COLITIS ULCEROSA.....	- 81 -
4.1. MODULACIÓN DE LA AUTOFAGIA Y FENOTIPO DE LA COLITIS ULCEROSA.....	- 81 -
4.2. OPCIONES TERAPÉUTICAS RELACIONADAS CON LA RUTA DE AUTOFAGIA. ....	- 83 -

<u>HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....</u>	<u>- 88 -</u>
<u>MATERIALES Y MÉTODOS .....</u>	<u>- 90 -</u>
1. DISEÑO DEL ESTUDIO .....	- 91 -
2. MÉTODOS .....	- 94 -
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	- 97 -
<u>RESULTADOS .....</u>	<u>- 99 -</u>
1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	- 100 -
2. OPCIONES FARMACOLÓGICAS Y TERAPÉUTICAS. ....	- 102 -
3. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS ASOCIACIONES ENTRE LAS VARIABLES A ESTUDIO ATENDIENDO A LA EXTENSIÓN DE LA ENFERMEDAD. ....	- 105 -
4. ANÁLISIS EXPLORATORIO DE LAS ASOCIACIONES ENTRE LAS VARIABLES A ESTUDIO ATENDIENDO A LA GRAVEDAD DE LA ENFERMEDAD Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO. ....	- 106 -
5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA RUTA DE AUTOFAGIA EN MUESTRAS TISULARES DE PACIENTES CON COLITIS ULCEROSA.....	- 109 -
5.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA P62.....	- 109 -
5.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA LC3B. ....	- 112 -
5.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA TRAF6. ....	- 115 -
5.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MTOR. ....	- 117 -
5.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA BECLIN1.....	- 120 -
5.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PIK3CA.....	- 122 -
5.7. CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA RUTA DE AUTOFAGIA SEGÚN EXTENSIÓN Y GRAVEDAD. ....	- 125 -
5.8. CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA RUTA DE AUTOFAGIA SEGÚN ACTIVIDAD INFLAMATORIA. ....	- 131 -
5.9. CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA RUTA DE AUTOFAGIA SEGÚN LA RESPUESTA TERAPÉUTICA.....	- 133 -
6. ESTADO DE LA AUTOFAGIA Y SU VALOR PRONÓSTICO: .....	- 134 -
6.1. RELACIÓN ENTRE LA EVOLUCIÓN EN EXTENSIÓN Y LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE AUTOFAGIA.....	- 134 -
6.2. RELACIÓN ENTRE LA EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD Y LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE AUTOFAGIA.....	- 135 -
6.3. RELACIÓN ENTRE LA EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD MEDIDA POR CALPROTECTINA FECAL Y LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE AUTOFAGIA. ....	- 139 -
6.4. RELACIÓN ENTRE LA NECESIDAD DE CAMBIO EN LA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA Y LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE AUTOFAGIA. ....	- 142 -
6.5. ANÁLISIS EXPLORATORIO DEL PERFIL DE ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA RUTA DE AUTOFAGIA Y SU CLASIFICACIÓN POR GRUPOS O CATEGORÍAS PRONÓSTICO. ....	- 144 -
<u>DISCUSIÓN.....</u>	<u>-145-</u>
1.1 ANALISIS EXPLORATORIO ATENDIENDO A LA EXTENSIÓN, LA GRAVEDAD DE LA ENFERMEDAD Y A LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....	-146-
1.2 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA RUTA DE AUTOFAGIA.....	-148-
1.2.1 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS.....	-148-
1.2.2 CORRELACIÓN.....	-154-
1.3 NUEVAS APROXIMACIONES CON VALOR PRONÓSTICO BASADAS EN LA AUTOFAGIA....	-155-
1.4 LIMITACIONES.....	-159-
<u>CONCLUSIONES.....</u>	<u>-160-</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA.....</u>	<u>-162-</u>
<u>ANEXOS.....</u>	<u>-172-</u>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> La microbiota intestinal, el huésped y los factores ambientales.....	- 25 -
<b>Figura 2.</b> Alteraciones en la microbiota y mecanismos en EII.....	- 30 -
<b>Figura 3.</b> Fisiopatología de la Colitis Ulcerosa .....	- 39 -
<b>Figura 4.</b> Hallazgos histológicos en el diagnóstico de Colitis Ulcerosa.....	- 49 -
<b>Figura 5.</b> Fenotipos de Colitis Ulcerosa según la clasificación de Montreal.....	- 51 -
<b>Figura 6.</b> Subíndice endoscópico de Mayo.....	- 55 -
<b>Figura 7.</b> Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS).....	- 56 -
<b>Figura 8.</b> Imágenes endoscópicas que comparan subíndice de Mayo y UCEIS.....	- 57 -
<b>Figura 9.</b> Estrategias terapéuticas en EII.....	- 58 -
<b>Figura 10.</b> Dianas terapéuticas probadas o prometedoras en la Colitis Ulcerosa.....	- 66 -
<b>Figura 11.</b> Esquema de los distintos tipos de autofagia según su mecanismo.....	- 69 -
<b>Figura 12.</b> Moléculas claves en la iniciación del proceso de autofagia.....	- 72 -
<b>Figura 13.</b> Moléculas claves en la nucleación del fagoforo.....	- 73 -
<b>Figura 14.</b> Sistemas de conjugación en la expansión de la membrana.....	- 74 -
<b>Figura 15.</b> Sistemas de conjugación en la elongación del autofagosoma. ....	- 75 -
<b>Figura 16.</b> Principales mecanismos moleculares de la autofagia.....	- 76 -
<b>Figura 17.</b> Proteínas de interacción con p62 y sus funciones.....	- 79 -
<b>Figura 18.</b> Vías de presentación de antígenos a través del MHC.....	- 81 -
<b>Figura 19.</b> Fármacos actuales que modulan la vía de la autofagia .....	- 86 -
<b>Figura 20.</b> Fundamento teórico de la detección de proteínas.....	- 97 -
<b>Figura 21.</b> Distribución de grupos de edad al diagnóstico (n (%)).....	- 100 -
<b>Figura 22.</b> Respuesta a corticoides.....	- 103 -
<b>Figura 23.</b> Porcentaje de pacientes que recibieron tratamiento con AZA.....	- 103 -
<b>Figura 24.</b> Porcentaje de pacientes con respuesta y remisión clínica a anti-TNF $\alpha$ ....	- 104 -
<b>Figura 25.</b> Presencia de complicaciones según extensión.....	- 106 -
<b>Figura 26.</b> Porcentaje de respuesta a tratamientos biológicos recibidos).....	- 108 -
<b>Figura 27.</b> Imágenes representativas de western blot de la expresión de p62.....	- 109 -
<b>Figura 28.</b> Representación gráfica de la expresión de la proteína p62 .....	- 110 -
<b>Figura 29.</b> Representación en Box-Plot de la distribución de los valores de la expresión de la proteína p62 atendiendo a la extensión de la enfermedad.....	- 110 -
<b>Figura 30.</b> Representación en Box-Plot de la distribución de los valores de la expresión de la proteína p62 atendiendo a la gravedad de la enfermedad.....	- 111 -
<b>Figura 31.</b> Imágenes representativas de western blot de la expresión de LC3B.....	- 112 -
<b>Figura 32.</b> Representación gráfica de la expresión de la proteína LC3B.....	- 112 -
<b>Figura 33.</b> Representación en Box-Plot de la distribución de los valores de la expresión de la proteína LC3B atendiendo a la extensión de la enfermedad.....	- 113 -
<b>Figura 34.</b> Representación en Box-Plot de la distribución de los valores de la expresión de la proteína LC3B atendiendo a la gravedad de la enfermedad.....	- 114 -
<b>Figura 35.</b> Imágenes representativas de western blot de la expresión de TRAF6.....	- 115 -
<b>Figura 36.</b> Representación gráfica de la expresión de la proteína TRAF6. ....	- 115 -

<b>Figura 37.</b> Representación en Box-Plot de la distribución de los valores de la expresión de la proteína TRAF6 atendiendo a la extensión de la enfermedad.....	- 116-
<b>Figura 38.</b> Representación en Box-Plot de la distribución de los valores de la expresión de la proteína TRAF6 atendiendo a la gravedad de la enfermedad.....	- 116-
<b>Figura 39.</b> Imágenes representativas de western blot de la expresión de mTOR.....	- 117-
<b>Figura 40.</b> Representación gráfica de la expresión de la proteína mTOR.....	- 118-
<b>Figura 41.</b> Representación en Box-Plot de la distribución de los valores de la expresión de la proteína mTOR atendiendo a la extensión de la enfermedad.....	- 118-
<b>Figura 42.</b> Representación en Box-Plot de la distribución de los valores de la expresión de la proteína mTOR atendiendo a la gravedad de la enfermedad.....	- 119-
<b>Figura 43.</b> Imágenes representativas de western blot de la expresión de Beclin1.....	- 120-
<b>Figura 44.</b> Representación gráfica de la expresión de la proteína Beclin1.....	- 120-
<b>Figura 45.</b> Representación en Box-Plot de la distribución de los valores de la expresión de la proteína Beclin1 atendiendo a la extensión de la enfermedad.....	- 121-
<b>Figura 46.</b> Representación en Box-Plot de la distribución de los valores de la expresión de la proteína Beclin1 atendiendo a la gravedad de la enfermedad.....	- 121-
<b>Figura 47.</b> Imágenes representativas de western blot de la expresión de PIK3CA.....	- 122-
<b>Figura 48.</b> Representación gráfica de la expresión de la proteína PIK3CA.....	- 123-
<b>Figura 49.</b> Representación en Box-Plot de la distribución de los valores de la expresión de la proteína PIK3CA atendiendo a la extensión de la enfermedad.....	- 123-
<b>Figura 50.</b> Representación en Box-Plot de la distribución de los valores de la expresión de la proteína PIK3CA atendiendo a la gravedad de la enfermedad.....	- 124-
<b>Figura 51.</b> Diagrama de correlaciones entre la expresión de las proteínas de la ruta de autofagia en muestras tisulares de mucosa de colon con proctitis (E1).....	- 126-
<b>Figura 52.</b> Diagrama de correlaciones entre la expresión de las proteínas de la ruta de autofagia en muestras tisulares de mucosa de colon con colitis Izquierda(E2).....	- 126-
<b>Figura 53.</b> Diagrama de correlaciones entre la expresión de las proteínas de la ruta de autofagia en muestras tisulares de mucosa de colon con pancolitis (E3).....	- 127-
<b>Figura 54.</b> Diagrama de correlaciones entre la expresión de las proteínas de la ruta de autofagia en muestras tisulares de mucosa de colon del grupo control.....	- 127-

<b>Figura 55.</b> Diagrama de correlaciones entre la expresión de las proteínas de la ruta de autofagia en muestras tisulares de mucosa de colon en remisión (S0).....	128-
<b>Figura 56.</b> Diagrama de correlaciones entre la expresión de las proteínas de la ruta de autofagia en muestras tisulares de mucosa de colon con actividad leve (S1).....	128-
<b>Figura 57.</b> Diagrama de correlaciones entre la expresión de las proteínas de la ruta de autofagia en mucosa de colon con actividad moderada-grave (S2-3).....	129-
<b>Figura 58.</b> Diagrama de correlaciones entre la expresión de las proteínas de la ruta de autofagia en mucosa de colon del grupo control.....	129-
<b>Figura 59.</b> Representación en nube de puntos con la distribución de los valores de expresión de las proteínas en muestras tisulares de mucosa de colon atendiendo a la actividad de la enfermedad medida por UCDAI.....	132-
<b>Figura 60.</b> Representación en Histograma y Box-plot de las diferencias entre la expresión de TRAF6 en mucosa de colon y el patrón de progresión a pancolitis.....	134-
<b>Figura 61.</b> Representación en Histograma y Box-plot de las diferencias entre la expresión de LC3 en mucosa de colon y el patrón de progresión a pancolitis.....	135-
<b>Figura 62.</b> Representación en Box-Plot de la distribución de los grupos de cambio de actividad en función de la expresión de la proteína TRAF6.....	136-
<b>Figura 63.</b> Representación en Box-Plot de la distribución de los grupos de cambio de actividad en función de la expresión de la proteína mTOR.....	136-
<b>Figura 64.</b> Representación en Box-Plot de la distribución de los grupos de cambio de actividad en función de la expresión de la proteína LC3B.....	137-
<b>Figura 65.</b> Representación en diagrama de puntos de la distribución de los valores de expresión de las proteínas en muestras tisulares de mucosa de colon atendiendo a la evolución de la actividad de la enfermedad medida por UCDAI.....	138-
<b>Figura 66.</b> Diagrama de puntos con valores CF basal respecto puntuación UCDAI....	139-
<b>Figura 67.</b> Diagrama de puntos de LC3 frente a los valores basales de CF.....	140-
<b>Figura 68.</b> Evolución de las determinaciones de CF durante el seguimiento.....	140-
<b>Figura 69.</b> Diagrama de puntos de la expresión de proteínas frente a CF basal.....	141-
<b>Figura 70.</b> Representación en Box-Plot de la distribución de los grupos de cambio de tratamiento en función de la expresión de la proteína p62 .....	142-
<b>Figura 71.</b> Representación en Box-Plot de la distribución de los grupos de cambio de tratamiento en función de la expresión de la proteína TRAF6.....	143-
<b>Figura 72.</b> Representación en Box-Plot de la distribución de los grupos de cambio de tratamiento en función de la expresión de la proteína LC3 .....	143-

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Principales mecanismos genéticos alterados.....	- 32 -
<b>Tabla 2.</b> Diferencias diagnósticas entre CU y EC.....	- 42 -
<b>Tabla 3.</b> Criterios diagnósticos de Lennard-Jones.....	- 44 -
<b>Tabla 4.</b> Índice de Truelove-Witts modificado .....	- 53 -
<b>Tabla 5.</b> Índice de Mayo.....	- 55 -
<b>Tabla 6.</b> Subíndice endoscópico de Mayo.....	- 53 -
<b>Tabla 7.</b> Formulaciones y presentaciones de 5-ASA orales y tópicas.....	- 53 -
<b>Tabla 8.</b> Monitorización de tiopurinas .....	- 63 -
<b>Tabla 9.</b> Genes relacionados con la autofagia (Atg).....	- 70 -
<b>Tabla 10.</b> Fármacos y mecanismos de modulación relacionados con Autofagia.....	- 83 -
<b>Tabla 11.</b> Anticuerpos usados en los experimentos de Western Blot.....	- 95 -
<b>Tabla 12.</b> Variables clínicas de pacientes y controles.....	- 101 -
<b>Tabla 13.</b> Tipos y modalidades de tratamientos.....	- 102 -
<b>Tabla 14.</b> Distribución entre extensión y variables clínicas.....	- 105 -
<b>Tabla 15.</b> Asociación entre gravedad y variables clínicas.....	- 107 -
<b>Tabla 16.</b> Asociación entre tratamientos recibidos y respuesta.....	- 108 -
<b>Tabla 17.</b> Porcentajes de pacientes según la expresión de p62.....	- 111 -
<b>Tabla 18.</b> Porcentajes de pacientes según la expresión de LC3B-II.....	- 114 -
<b>Tabla 19.</b> Porcentajes de pacientes según la expresión de TRAF6.....	- 117 -
<b>Tabla 20.</b> Porcentajes de pacientes según la expresión de mTOR.....	- 119 -
<b>Tabla 21.</b> Porcentajes de pacientes según la expresión de Beclin1.....	- 122 -
<b>Tabla 22.</b> Porcentajes de pacientes según la expresión de PIK3CA.....	- 124 -
<b>Tabla 23.</b> Porcentajes de pacientes según la respuesta y p62.....	- 133 -
<b>Tabla 24.</b> Porcentajes de pacientes según la respuesta y LC3B-II.....	- 133 -
<b>Tabla 25.</b> Porcentajes de pacientes según la respuesta y TRAF6.....	- 133 -
<b>Tabla 26.</b> Correlación de la expresión de proteínas y los valores basales de CF.....	- 140 -
<b>Tabla 27.</b> Porcentajes de pacientes considerando la expresión conjunta de LC3B-II y p62 respecto a la actividad.....	- 144 -
<b>Tabla 28.</b> Porcentajes de pacientes considerando la expresión conjunta de LC3B-II y p62 respecto a la respuesta terapéutica.....	- 144 -



## Glosario de abreviaturas

**AKT:** *Protein Kinase B*  
**AMBRA1:** *Activating Molecule in BECN1- Regulated Autophagy*  
**AMC:** *Autofagia mediada por chaperonas*  
**AMPK:** *AMP-activated Protein Kinase*  
**AMPS:** *Ammonium Persulfate*  
**APC:** *Adenomatous Polyposis Coli*  
**ATG:** *Autophagy related Gene*  
**ATG16L1,** *proteína relacionada con la autofagia 16 similar a 1*  
**ATP:** *Adenosin Triphosphate*  
**Barkor:** *Beclin-1-associated autophagy-related key regulator (ATG14)*  
**BCL-2:** *B-Cell CLL/Lymphoma 2*  
**BECN1:** *Beclin1, autophagy related*  
**BSA:** *Bovine Serum Albumin*  
**CBTRUS:** *Central Brain Tumor Registry of the United States*  
**CDK1:** *Cyclin-dependent Kinase 1*  
**CDKN2A:** *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A*  
**CMV:** *Citomegalovirus*  
**DNA:** *Desoxyribonucleic Acid*  
**DNMT:** *DNA metiltransferasa*  
**dNTP:** *Deoxynucleotide Triphosphate*  
**EDTA:** *Ethylenediaminetetraacetic Acid*  
**EGFR (ERBB1):** *Epidermal Growth Factor Receptor*  
**ERK1:** *Extracellular-signal-regulated kinase 1*  
**ESCRT:** *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*  
**FBS:** *Fetal Bovine Serum*  
**FDA:** *Food and Drug Administration*  
**FGFR2:** *Fibroblast growth factor receptor 2*  
**GABARAP:** *GABA(A) Receptor-Associated Protein*  
**HER2 (ERBB2):** *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*  
**Hsp90:** *Heat Shock Protein 90*  
**IC:** *Intervalo de Confianza*  
**IDH1/2:** *Isocitrato deshidrogenasa 1/2*  
**IL-8:** *Interleucina-8*  
**IL-IR:** *Interleukin-1 Receptor*  
**IQR:** *Rango intercuartílico*  
**JNK:** *JUN N-terminal Kinase*  
**KD:** *Kinase Domain*  
**KIR:** *KEAP1 Interacting Region*  
**KRAS:** *Kirsten Rat Sarcome*  
**LAMP-2:** *Lysosomal-Associated Membrane Protein 2*  
**LC3B:** *Microtubule-Associated Protein 1B-light Chain 3*  
**LIR:** *LC3-interacting Region*  
**MAPK:** *Mitogen-activated Protein Kinase*

**MDM2:** *Murine Double Minute 2*  
**Met:** Metformina  
**MGMT:** O6- metil guanina metil transferasa  
**MMR:** *Mismatch Repair System*  
**mTOR:** *Mammalian Target Of Rapamycin*  
**mTORC1/2:** *mTOR Complex 1/2*  
**MTT:** Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio  
**NAD:** *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*  
**NOD2:** *Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*  
**NF-κB:** *Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells*  
**Nrf2:** *NF-E2-related Factor 2*  
**OR:** *Odd Ratio*  
**PBS:** *Phosphate Buffered Saline*  
**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*  
**PK1:** *Pyruvate Dehydrogenase Kinase, Isozyme 1*  
**PDGFR:** *Platelet-derived growth factor receptor*  
**PE:** Fosfatidiletanolamida  
**PI:** *Phosphatidylinositol*  
**PI(3)P:** *Phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate*  
**PI3K:** *Phosphatidylinositol 3-kinase*  
**PIK3CA:** *Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*  
**PKCζ:** *Protein Kinase C ζ*  
**PTEN:** *Phosphatase and Tensin homolog*  
**PVDF:** *Polyvinylidene Difluoride*  
**Rab7:** *RAS-associated protein 7*  
**RANK:** *Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B*  
**Raptor:** *Regulatory Associated Protein of mTORC1*  
**RAS:** *Rat Sarcoma*  
**RB1:** *Retinoblastoma 1*  
**Rictor:** *Raptor Independent (Rapamycin Insensitive) Companion of mTORC2*  
**RIPA:** *Radioimmunoprecipitation assay*  
**RNA:** *Ribonucleic Acid*  
**ROS:** *Reactive Oxygen Species*  
**r.p.m.:** *Revoluciones por minuto*  
**Rubicon:** *RUN domain- and cysteine-rich domain-containing*  
**SAHA:** *Suberoylanilide Hydroxamic Acid*  
**SDH:** *Succinato deshidrogenasa*  
**SDS:** *Sodium Dodecyl Sulphate*  
**SDS-PAGE:** *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*  
**SNARE:** *SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) Receptor*  
**SNC:** *Sistema Nervioso Central*  
**SNP:** *Single Nucleotide Polymorphism*  
**SQSTM1 (p62):** *Sequestosome 1*  
**TB:** *TRAF6-binding*  
**TBE:** *Tris Borato, EDTA*  
**TBS:** *Tris Buffered Saline*  
**TBS-T:** *Tris Buffered Saline + Tween20*

**TCGA:** *The Cancer Genome Atlas*  
**TEMED:** *Tetramethylethylenediamine*  
**TERT:** *telomerasa transcriptasa inversa*  
**TLR:** *Toll-like Receptor*  
**TMZ:** *Temozolamida*  
**TNF:** *Tumor Necrosis Factor*  
**TNFR:** *Tumor Necrosis Factor Receptor*  
**TP53:** *Tumor Protein 53*  
**TRAF6:** *TNF Receptor-Associated Factor 6*  
**TSC1/2:** *Tuberous Sclerosis 1/2*  
**UBA:** *Ubiquitin-associated domain*  
**UBD:** *Ubiquitin Domain*  
**Ubl:** *Ubiquitin-like*  
**ULK1/2:** *Unc-51-like Kinase 1/2*  
**UV:** *Ultravioleta*  
**UVRAG:** *Ultraviolet irradiation Resistance-associated Gene*  
**VAMP-3:** *Vesicle-associated membrane protein 3*  
**VEGF-A:** *Vascular Endothelial Growth Factor A*  
**VHL:** *Von Hippel-Lindau*  
**VPS34:** *Phosphatidylinositol 3-kinase, Catalytic Subunit Type 3*  
**WIPI1/2:** *WD Repeat Domain, Phosphoinositide Interacting 1/2*  
**WT:** *Wild Type*

# Introducción

---



## **1. COLITIS ULCEROSA**

---

### **1.1. GENERALIDADES**

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad crónica que se caracteriza por la inflamación de la mucosa intestinal. Afecta fundamentalmente al recto en el 95% de los casos, pudiendo alcanzar una extensión variable de forma continua y circunferencial hasta segmentos proximales del colon<sup>1</sup>. Generalmente se desarrolla con un curso clínico fluctuante, con períodos de remisión y brotes de actividad, no siendo previsible ni la periodicidad ni la gravedad de los mismos. Su presentación comúnmente ocurre entre la tercera y cuarta década de la vida<sup>2</sup>, con síntomas limitantes o complicaciones, que condicionan un marcado deterioro en la calidad de vida de quienes la padecen y sustanciales costes para el sistema sanitario.

Fue descrita por vez primera en el año 1859 por el Dr. Samuel Wilks como una diarrea no contagiosa que denominó colitis idiopática. En 1909, la colitis ulcerosa se hizo más conocida, coincidiendo con el simposio británico de la *Royal Society of Medicine*, donde se presentaron unos 300 casos de CU recogidos en los distintos hospitales de Londres durante los 30 años previos, ayudando así a definir sus características<sup>3</sup>.

La CU pertenece al espectro de trastornos inflamatorios crónicos que afectan al tracto gastrointestinal y conforman la Enfermedad inflamatoria intestinal (EII) junto con la Enfermedad de Crohn (EC)<sup>1,4</sup>. Ambas patologías pueden tener en común algunos síntomas similares; pero difieren, principalmente, en el lugar donde se produce la inflamación. En la CU la lesión inflamatoria afecta únicamente a la mucosa del intestino grueso; mientras que la EC puede afectar a cualquier parte de tracto digestivo, provocando un daño transmural de la pared intestinal. Por otra parte, colitis indeterminada (CI) es el término que emplean los anatomopatólogos para describir los hallazgos histológicos que solapan características de ambas entidades. También se emplea el término EII no clasificada, que encajaría en esa minoría de casos en los que hacer una distinción definitiva entre CU, EC u otras causas de colitis no puede realizarse tras considerar la historia clínica, apariencia endoscópica, radiológica e histológica tras la toma de múltiples biopsias.

### **1.2. EPIDEMIOLOGÍA**

#### **1.2.1. Incidencia y prevalencia**

La CU es la enfermedad inflamatoria intestinal más común en el mundo. En los últimos años se ha observado un incremento de su incidencia a nivel mundial, lo cual

sugiere que será necesario reevaluar el impacto de esta enfermedad en los sistemas sanitarios<sup>5,6</sup>. Europa Occidental y Norte América son las zonas con mayores tasas de prevalencia y en los que la incidencia se ha ralentizado, mientras que en Latino América, Asia y Europa Oriental la incidencia se ha incrementado<sup>7</sup>. A pesar de ello hay aún diferencias en la incidencia y prevalencia de la CU en las distintas regiones del mundo<sup>8</sup>. La incidencia de CU varía desde 0,5 a 31,5 por 100.000 habitantes/año, según la población estudiada. Se estima una incidencia anual de CU entre 0,5 a 19,2 por 100.000 habitantes/año en Norte América y de 0,6 a 24,3 por 100.000 habitantes/año en Europa, y una prevalencia entre 37,5 y 248,6 por 100.000 habitantes/año y entre 4,9 y 505 por 100.000 habitantes/año, respectivamente<sup>9</sup>. Además parece existir un gradiente nortesur, identificando mayores tasas de incidencia en regiones del norte respecto a las regiones del sur<sup>10</sup>.

En España, las tasas de prevalencia e incidencia también han aumentado en los últimos años, aunque siguen siendo inferiores a las recogidas en Estados Unidos o en el norte de Europa. Algunos estudios más recientes arrojan que no hay diferencias entre la prevalencia de la enfermedad de Crohn, con un 0,39%, y la de la colitis ulcerosa, también 0,39%, pero estas cantidades son casi el doble de las publicadas anteriormente<sup>11</sup>. Respecto a la incidencia, en el estudio *EpidemIBD*, se incluyeron más de 3.600 pacientes recién diagnosticados de EI a lo largo del año 2017, permitiendo estimar una incidencia de 7,5 por 100.000 habitantes/año para la EC y 8 por 100.000 habitantes/año para la CU. Estas cifras nuevamente son superiores a lo descrito previamente en nuestro país y similares a lo observado en países del norte de Europa<sup>12</sup>.

### **1.2.2. Mortalidad**

Estudios clásicos demuestran que la mortalidad en CU era mayor que en la población general<sup>13</sup>. El advenimiento del uso de corticoides, mesalacina en sus diferentes presentaciones, la optimización de las técnicas quirúrgicas y el incremento del empleo de terapias con fármacos biológicos, ha cambiado este hecho. En la actualidad, los pacientes con CU tienen tasas de mortalidad muy similares a la población general, aunque a este respecto haya que considerar algunos subgrupos con mayor riesgo, concretamente aquellos de reciente diagnóstico y con afectación extensa<sup>14</sup>.

En un metaanálisis en el que se recogió la mortalidad relacionada con CU en 5 de los 10 estudios, los autores concluyen que entre los pacientes con CU, el porcentaje medio de fallecimientos atribuidos a la propia enfermedad era del 17%<sup>15</sup>. En este subgrupo, las causas más frecuentes de muerte fueron el cáncer colorectal (CCR), con una mediana del 37% (intervalo del 24% al 44%) y complicaciones perioperatorias con mediana del 44% (intervalo del 17% al 100%). Las causas restantes se relacionaron con enfermedad grave que cursa con megacolon tóxico, perforación intestinal, isquemia

intestinal o infarto de miocardio secundario a anemia o enfermedad hepática crónica avanzada debida a colangitis esclerosante primaria. De forma complementaria, se recoge el incremento del riesgo de muerte en los pacientes con CU asociado a otras enfermedades gastrointestinales (OR = 2.5; IC95%:1.9-3.2;  $p < 0.001$ ), enfermedad hepática metabólica (OR = 4.0; IC 95%: 2.5-6.5;  $p < 0.001$ ) o tromboembolismo pulmonar (OR = 4.0; IC95%: 1.5-8.7). Sobre la tasa de mortalidad global debida a cáncer no estaba incrementada en CU, sin embargo se describió una mayor frecuencia de CCR (Tasa de mortalidad estandarizada = 1.9; IC95%: 1.0-3.8;  $p = 0.07$ )<sup>15,16</sup>. Estos hallazgos fueron similares a los descritos posteriormente en una cohorte danesa en la que se recogieron 36.080 pacientes con CU, en la que el riesgo de muerte, comparado con el riesgo en la población general, fue discretamente mayor en el primer año después del diagnóstico de CU, con un HR = 2.43 (IC95%: 2.31-2.57), pero que descendía a niveles similares después de 2 años del diagnóstico. Nuevamente se confirmó que el riesgo de muerte por CCR permanecía incrementado, con HR = 1.47 (IC95%: 1.23-1.76)<sup>17</sup>.

### **1.2.3. Características demográficas.**

Los factores demográficos que incluyen la edad, género, etnicidad y raza, se han descrito en estudios poblacionales<sup>18</sup>. Respecto a la edad, se ha descrito un incremento de incidencia entre los 30-40 años, aunque la CU puede presentarse a cualquier edad. Algunos estudios sugieren un perfil bimodal en la distribución por edad con un segundo pico entre los 50-70 años<sup>19</sup>, aunque no parece claro si este segundo pico se debe a una mayor susceptibilidad a la enfermedad en aquellos individuos de edad más avanzada, la expresión tardía de una exposición ambiental precoz o a la mayor frecuentación a los servicios sanitarios de las personas con edad avanzada.

Si revisamos la influencia del género, se han comunicado algunas diferencias en incidencia<sup>7</sup>. Los estudios poblacionales más amplios y recientes describen una incidencia de CU predominantemente mayor en mujeres con un RR= 1.35; (IC 95%: 1.32-1.39)<sup>20,21</sup>.

Respecto a la influencia de la etnicidad y raza, se ha descrito una menor incidencia en la población hispánica y africana comparada con la caucásica. No obstante, estas diferencias podrían estar relacionadas con factores ambientales o de estilo de vida así como con causas genéticas subyacentes<sup>22,23</sup>. De manera particular, un estudio poblacional amplio ha mostrado que el riesgo de EII en la primera generación de inmigrantes es menor comparado con los no inmigrantes. Estas diferencias en el riesgo para EII desaparecen en la segunda generación de la población inmigrante, lo que pone de manifiesto la importancia de los factores ambientales<sup>24</sup>.

### **1.3. ETIOPATOGENIA**

Son múltiples las hipótesis propuestas para tratar de explicar el origen de la CU y, aunque existen algunas controversias, se postula como el resultado de la interacción entre factores ambientales y aspectos relacionados con el estilo de vida, determinados factores genéticos, así como el propio sistema inmune de los pacientes. Todas estas hipótesis comparten mecanismos y tienen un fondo común en la disregulación de la homeostasis entre elementos ambientales, como la microflora intestinal, y la capacidad de respuesta inmune innata, siendo probable que describan fenómenos que pueden coexistir en el desarrollo de la EII<sup>25</sup>.

Clásicamente, la EII se ha considerado una enfermedad idiopática de la que no son bien conocidas las causas, cuyo mecanismo fundamental era inmunidad adquirida mediada por linfocitos T y es hacia donde se dirigen los esfuerzos terapéuticos. Sin embargo, más recientemente, se ha evidenciado que la inmunidad innata está alterada desde el inicio en los pacientes y parece ser la responsable de que la inmunidad adquirida perpetúe el proceso inflamatorio<sup>26,27</sup>.

Este cambio conceptual ha llevado a concluir que la enfermedad se origina como consecuencia de una respuesta inmune innata aberrante a nivel de la mucosa intestinal en un huésped genéticamente susceptible, dando lugar a un desequilibrio hacia la activación crónica y exacerbada de dicho proceso inflamatorio<sup>28</sup>. Estos distintos elementos patogénicos son los que se desarrollan a continuación.

#### **1.3.1. Factores Ambientales**

Aunque la evidencia es limitada por el largo periodo de latencia de los factores de riesgo y la propia historia natural de la enfermedad, se consideran de relevancia el tabaco, la dieta, determinados fármacos, el nivel socioeconómico, antecedentes de apendicectomía, el estado psicológico o la microbiota. Es destacable el hecho de que su influencia, en ocasiones, puede llegar a tener un efecto totalmente diferente para el caso de la CU y de la EC<sup>29</sup>. Otra observación se obtuvo al evaluar las tasas de incidencia en la segunda generación de inmigrantes provenientes de países de baja prevalencia, que precisamente aumentan cuando llegan estos a países occidentales, siendo probablemente los factores ambientales en relación con la industrialización la principal causa para ello<sup>30</sup>. Si bien, estos factores ambientales no pueden considerarse de forma aislada causantes de la EII, parecen guardar una estrecha relación, ya que inciden en la aparición de la EII así como en su evolución posterior<sup>31</sup>.



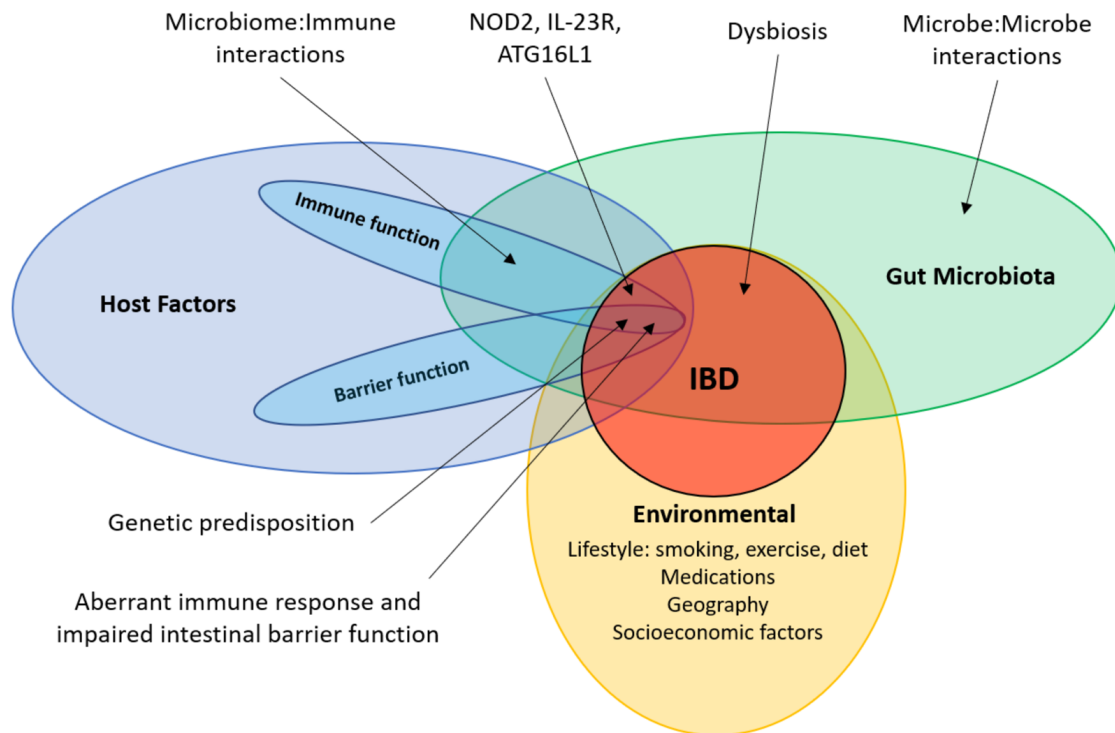


Figura 1. La microbiota intestinal, el huésped y los factores ambientales se modulan y afectan entre sí para formar un equilibrio fisiológico. Modificado de Hold et al.<sup>32,33</sup>.

#### - Dieta

Si consideramos los macronutrientes de la dieta, algunos estudios han demostrado que las fibras vegetales son protectoras para la EII, sobre todo las frutas. En cuanto a las verduras, hubo asociación para CU, pero no en EC. En el estudio EpiCom sobre factores ambientales, los pacientes de Europa del este consumían más azúcares y productos con carbohidratos refinados, y menos fibra que los del Oeste, determinando que existe una asociación inversa entre la ingesta de fibra y la EII<sup>34</sup>. Varios mecanismos podrían explicar esta asociación. La fibra soluble presente en las frutas y verduras, es metabolizada por las bacterias colónicas a ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que inhiben la transcripción de mediadores proinflamatorios. Además, la fibra ayuda a mantener la integridad de la barrera epitelial<sup>35,36</sup>.

Por otra parte, la dieta grasa, particularmente la grasa saturada podría tener un papel perjudicial en la EII. La ingesta dietética de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (PUFA-3), que se encuentra en las grasas de los pescados, ha sido inversamente asociada al riesgo de CU, mientras que el alto consumo de ácidos grasos poliinsaturados omega-6 (PUFA-6), por ejemplo, la grasa de origen vacuno y la yema de huevo, se asocia con un mayor riesgo de CU<sup>37</sup>. Sin embargo, el consumo moderado de aceite de oliva virgen extra provee beneficios protectores contra la CU ya que sus compuestos fenólicos que ayudan a prevenir el daño oxidativo en las células del colon. Un ensayo demostró una reducción de los niveles de citoquinas proinflamatorias en ratones con colitis inducida,

expuestos a ingestas moderadas de aceite de oliva virgen extra en comparación con el aceite de girasol, o el aceite de canola, que son los que más abundan en la industria alimentaria<sup>38</sup>.

Respecto a los micronutrientes, algunos de ellos, como el zinc, desempeñan papeles importantes como coenzimas de metaloproteasas implicadas en el mantenimiento de la barrera epitelial intestinal. La vitamina D podría tener un papel en la patogénesis y el curso de EI. Se ha identificado que un déficit de 1,25-dihidroxi vitamina D3 o déficit del receptor de la vitamina D se asocia con un mayor riesgo de colitis. La administración de 1,25-dihidroxi vitamina D3 para alcanzar niveles normales, aminora esta inflamación al suprimir la expresión y transcripción de mediadores proinflamatorios<sup>39</sup>.

#### - Tabaco

Aunque no están claros los mecanismos de acción que median estos efectos del tabaco en la EI, se ha propuesto que podría afectar desde la microbiota a la modulación del sistema inmunológico y causar un deterioro de la capacidad de vasodilatación de la microvasculatura y la integridad del epitelio intestinal. Además, el tabaco podría alterar el tono del músculo liso e influir sobre la función endotelial a través de la producción de óxido nítrico o afectar la integridad de la barrera mucosa. También desencadenaría una respuesta inmune, innata y adquirida alterada, lo que podría explicar el efecto del abandono del tabaquismo en la CU<sup>40</sup>. El abandono del hábito tabáquico ejerce un efecto en la microbiota intestinal que se asocia con un aumento en los géneros de *Firmicutes* y *Actinobacteria* y con una disminución de *Bacteroidetes*.

Un metanálisis cuantificó que el tabaco constituye un factor de riesgo para la EC (OR 1.76, IC95% 1.40-2.22) y por el contrario, sobre la CU, el tabaquismo activo tendría un efecto protector (OR 0.58, IC95%, 0.45-0.75). Esta influencia es paradójicamente beneficiosa en el curso de la CU ya establecida, disminuyendo su gravedad, además se asocia a un inicio tardío, curso leve, menor necesidad de inmunosupresión y cirugía, pero no parece tener impacto sobre la respuesta a inmunomoduladores o en la progresión de la enfermedad en pacientes corticodependientes<sup>41</sup>. El efecto del tabaquismo sobre la recaída en la colitis ulcerosa se ilustra mejor en un estudio prospectivo basado en la población de pacientes de siete países europeos e Israel, concluyendo que el abandono del tabaco aumenta el riesgo de desarrollar CU y este incremento puede ser observado tras el primer año hasta los 10 años posteriores<sup>42</sup>.

Con todo, cabe mencionar que el tabaco, duplica la probabilidad de contraer EC, mientras que sus efectos son relativamente menos negativos en el caso de la CU. Para aclarar cómo el tabaquismo juega este papel importante en la determinación de la susceptibilidad y el curso de la enfermedad inflamatoria intestinal, deberán abordarse en estudios prospectivos junto a otros puntos clave no resueltos<sup>43,44</sup>.

- Fármacos

Todos los antibióticos, excepto las penicilinas de espectro reducido, aumentaron el riesgo de EII; siendo la exposición a metronidazol (OR 5,01; IC 95 %: 1,65–15,25) o fluoroquinolonas (OR 1,79 IC 95 %: 1,03–3,12) las más fuertemente asociadas con el desarrollo de EC, no así para CU<sup>45</sup>. El momento de la introducción del antibiótico puede ser importante, especialmente en el primer año de vida, cuando el microbioma intestinal y el sistema inmunitario entérico de los bebés están madurando hacia un estado más permanente. Por otra parte, el uso de anticonceptivos orales está moderadamente asociado con mayor riesgo del comienzo de la CU (OR 1,35; IC 95%: 1,12–1,64) con una asociación modesta, pero no aumenta el riesgo de desarrollar EC (OR 1,09; IC 95%: 0,84–1,40)<sup>46</sup>. Estos hallazgos son consistentes con la hipótesis de que los estrógenos tienen propiedades inmunomediadoras<sup>47</sup>.

- Apendicectomía

Al igual que el tabaquismo, la apendicectomía tiene un claro efecto divergente sobre la EC y la CU. La apendicectomía puede estar asociada significativamente con un mayor riesgo de EC (OR 1,61; IC95% 1,28-2,2), principalmente durante el primer año posterior a la cirugía (OR 6,69; IC95% 5,42-8,25). Por el contrario, la presencia del apéndice favorecería el desarrollo de CU, atribuido a una presencia de mayor cantidad de linfocitos T. La apendicectomía temprana, antes de los 20 años, podría considerarse un factor protector de CU, ya que se asocia a una reducción hasta en el 69% el riesgo de desarrollo de la misma (OR 0.31; IC95% 0.261-0.373)<sup>48,49</sup>. Otros estudios también han sugerido que la apendicectomía podría influir en el curso clínico de la CU al reducir la tasa de recurrencia de la enfermedad y la necesidad de inmunosupresión y colectomía<sup>50</sup>. Sin embargo, los datos aún son contradictorios y la influencia de la apendicectomía en el curso clínico de la CU debe investigarse más a fondo en estudios prospectivos.

- Lactancia materna

Los antígenos microbianos e inmunoglobulinas que aporta la leche materna se considera que favorece la tolerancia inmune, transferencia de anticuerpos maternos y mayor diversidad de la microbiota, Un metaanálisis demostró que la lactancia materna, de cualquier duración, es un factor protector tanto en pacientes con EC (OR 0,45 IC95% 0,26-0,79), como en CU (OR 0,56; IC95% 0,38-0,8) apoyando dicha hipótesis<sup>51,52</sup>.

- Factores Psicológicos

En la misma línea, también se ha analizado si influyen en el riesgo de aparición de una EII, los factores neuroconductuales, como el estrés y la depresión<sup>53</sup>. Un estudio prospectivo europeos encontró que el estrés relacionado con el trabajo no es un factor de riesgo importante para el desarrollo de EC (HR 0,83 IC 95%: 0,48-1,43) o CU (HR 1,06 IC 95%: 0,76-1,48)<sup>54</sup>. Posteriormente, diferentes estudios informaron que los trastornos

psiquiátricos aumentaron significativamente en personas con EII durante al menos 5 años antes del diagnóstico de EII<sup>55</sup>. Estos datos sugieren factores de riesgo compartidos para los trastornos del estado de ánimo y la EII o que la presencia de los trastornos del estado de ánimo altera la respuesta inmunitaria sistémica.

#### - Actividad física

La actividad física parece ser otro factor protector al reducir la inflamación sistémica. Si bien el ejercicio físico de muy alta intensidad desencadena la inflamación sistémica, en ejercicio moderado tiene acciones antiinflamatorias. El estilo de vida sedentario conduce a la expresión reducida de PGC-1 $\alpha$  (coactivador del receptor gamma activado del proliferador de peroxisomas) que da como resultado un aumento de la respuesta inflamatoria sistémica. El PGC-1 $\alpha$  reduce la actividad del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que conduce a la producción de citoquinas proinflamatorias. Varios estudios han demostrado este efecto protector del ejercicio<sup>56</sup>. En un estudio prospectivo, el riesgo de desarrollar CU y EC en mujeres que realizaban actividad física fue de 8 y 6 eventos por 100.000 personas/año en comparación con 11 y 16 eventos por 100.000 personas/persona entre las mujeres sedentarias, respectivamente<sup>57</sup>.

Se desconoce el mecanismo exacto por el cual se desarrolla la EII; sin embargo, existe una interacción entre los factores ambientales que pueden incrementar el riesgo o actuar como protectores en su desarrollo. Parece ser que la apendicetomía, la lactancia materna y la vitamina D son factores protectores contra la enfermedad y, en el caso particular del tabaco, sus efectos son relativamente menos negativos en el caso de la CU de lo que cabría esperar. Nuevos estudios serán necesarios para identificar los desencadenantes ambientales de la EII, pero también deben definir el momento en el ciclo de vida en que estos factores de riesgo pueden estar presentes.

### **1.3.2. Microbiota intestinal**

La microbiota intestinal es un ecosistema complejo conformado principalmente por bacterias, virus y organismos eucarióticos, que habitan en todo el intestino. Se estima que alberga alrededor de  $10^{14}$  unidades formadoras colonias, con más de 3.000 especies diferentes de bacterias, algunas de ellas todavía desconocidas, conformando en su conjunto mayor número de células procariontas que el de las células somáticas y germinales que constituyen el cuerpo humano, superando el número de células humanas en diez veces<sup>58</sup>.

Entre sus funciones más destacadas está la síntesis de numerosos compuestos que el organismo humano no es capaz de producir por sí mismo y que se generan en la fermentación microbiana. Así, transforma los polisacáridos no asimilables de la dieta, como el almidón resistente o la fibra, en monosacáridos y ácidos grasos de cadena corta

(principalmente, acetato, propionato y butirato), pero también vitamina K, B12 y ácido fólico o algunos aminoácidos, además de propiciar la recirculación de ácidos biliares o la transformación de compuestos con potencial carcinogénico como las aminas heterocíclicas. Además, la microbiota es esencial para el mantenimiento de la estructura intestinal y el recambio celular, la protección frente a microorganismos externos patógenos y el correcto desarrollo del sistema inmunitario de la mucosa intestinal.

La población sana presenta una microbiota de gran diversidad, rica en especies comensales y con baja concentración de patógenos intestinales, que coexisten en un equilibrio entre la tolerancia a la flora comensal y una adecuada sensibilidad a los enteropatógenos. Sin embargo, cuando se rompe ese balance en el epitelio intestinal en respuesta a factores ambientales, la misma flora comensal puede actuar como un patógeno, afectando al equilibrio de las especies dentro de estas comunidades y dando lugar a un estado de disbiosis microbiana, lo que provoca una respuesta inmune aberrante contral las bacterias comensales no patogénicas<sup>59</sup>.

Hay múltiples evidencias que vinculan la implicación de la microbiota intestinal con la patología de la EII, presentando perfiles menos complejos de bacterias comensales y mayor número de bacterias asociadas a la mucosa que los sujetos sanos<sup>60</sup>. Se ha observado que la EII ocurre, sobre todo, en el íleon terminal y en el colon, donde la concentración de flora bacteriana alcanza su máximo<sup>61</sup>. Igualmente, los antibióticos han mostrado capacidad moduladora de la inflamación intestinal, sugiriendo que la modificación del contenido microbiano puede modificar el curso de la inflamación. Otros estudios sugieren que los pacientes con EII presentan una respuesta inmune exacerbada a los antígenos bacterianos, junto con una pérdida de tolerancia que desencadena el proceso patogénico<sup>62</sup>.

Su composición en la etapa adulta de sujetos sanos es relativamente estable. Los filos microbianos intestinales dominantes son *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* y *Verrucomicrobia*, siendo *Firmicutes* y *Bacteroidetes* el 90% de la microbiota intestinal<sup>63</sup>. El filo *Firmicutes* está esencialmente representado por especies pertenecientes a los *Clostridia* (*Ruminococcus* y *Faecalibacterium prausnitzii*), mientras que el filo *Bacteroidetes* está constituido principalmente por *Bacteroides fragilis*, *B. ovatus* o *B. caccae*<sup>64</sup>.

En la fase activa de la CU, estos pacientes presentan hasta un 25% menos de diversidad en la microbiota que controles sanos. El género *Bacteroides* y algunos pertenecientes al filo *Firmicutes*, como son *Lactobacillus*, *Roseburia*, *Clostridium*, *Faecalibacterium* o *Enterococcus* están reducidos<sup>65,66</sup>. En concreto varios productores de butirato, principal fuente de energía de las células epiteliales del colon, como *Roseburia hominis* y *F. prausnitzii* están disminuídos de forma significativa, aumentando de forma significativa el número de *F. prausnitzii* en los periodos de remisión<sup>67</sup>. Por contra, los

géneros *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Ruminococcus*, *Fusobacterium*, *Bacteroides* y *Veillonella*, entre otros del filo Proteobacteria, parecen aumentar, lo cual apoya, de nuevo, el concepto de disbiosis en la enfermedad activa<sup>68</sup>.

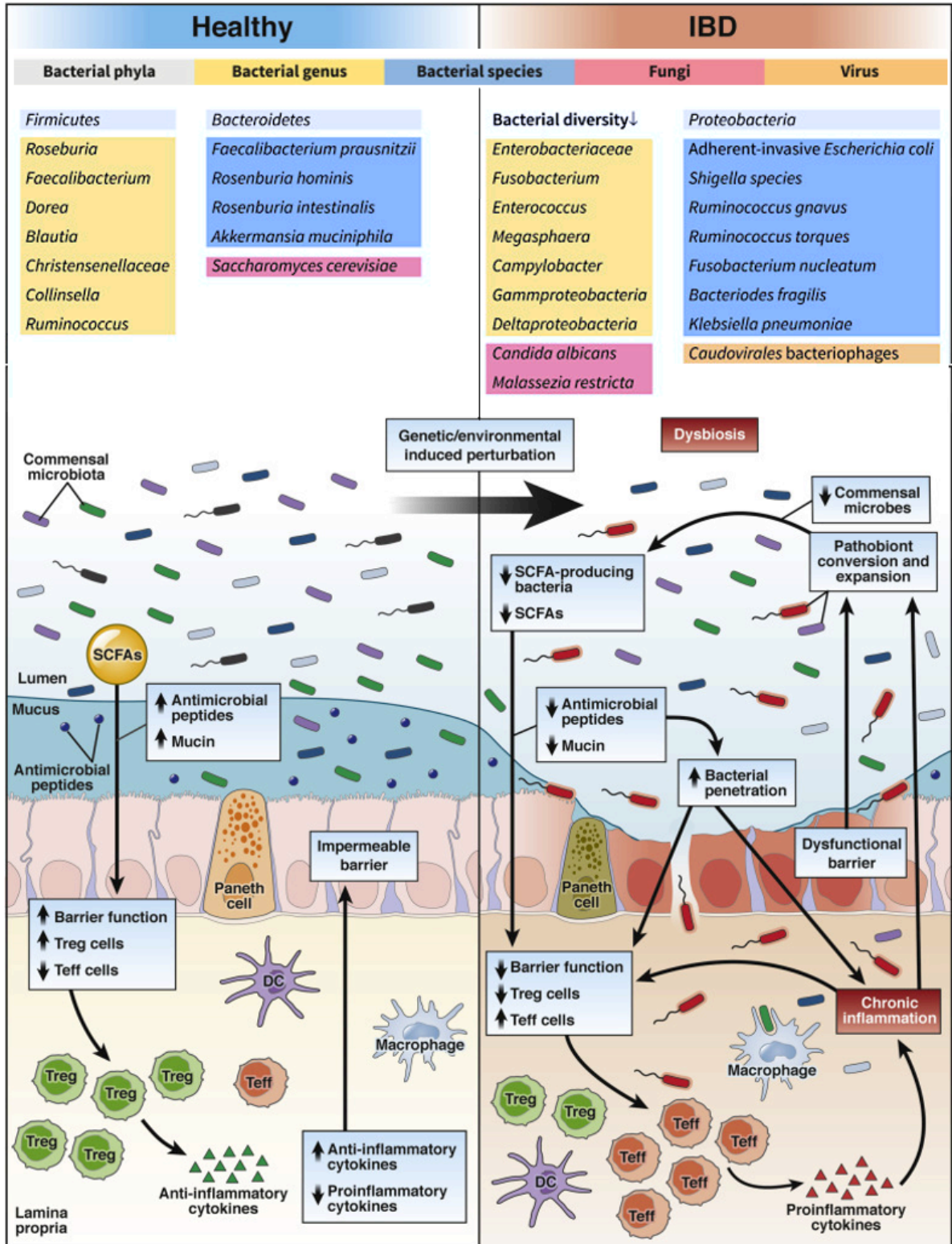


Figura 2. Alteraciones en la microbiota y mecanismos en EII (Adaptado de Lee et al y Zheng et al <sup>69,70</sup>).

Sin embargo aún no se ha identificado un solo potencial patógeno responsable, ya que la evidencia existente de patógenos asociados a la actividad de la EII sigue sin resolver si son los causantes o son oportunistas que anidan en una pared intestinal inflamada y más permeable que en condiciones de normalidad. Algunas infecciones bacterianas presentan mayor incidencia de EII, siendo más común la infección por *Clostridium difficile* y otros patógenos como el *Campylobacter spp.*, *Yersinia enterocolítica* o *Salmonella no-typhi*. Con frecuencia son causantes de los brotes en pacientes con EII ya establecida, o bien inician el proceso inflamatorio en la CU con un episodio de gastroenteritis aguda, tras debilitar la función de la barrera intestinal. Otros estudios han implicado a *Escherichia coli*, así como las hemaglutininas que producen, ya que son mucho más prevalentes en la EC (98% de las bacterias intramucosas eran *Escherichia coli*), y en la CU (45%) que en la población general (2%)<sup>71</sup>. Esta *Escherichia coli* adherente invasiva parece estimular la producción de IL-8 y TNF- $\alpha$ , así como aumentar la permeabilidad intestinal de las uniones estrechas, invadir el epitelio y persistir dentro de los macrófagos<sup>60</sup>.

El aumento de incidencia de enfermedades autoinmunes en países desarrollados se ha atribuido durante mucho tiempo a la “teoría de la higiene”, o también conocida actualmente como la “hipótesis de la microflora”. Estas hipótesis asocian de forma inversa al riesgo de padecer EII con el número de miembros de la familia, toma de leche no pasteurizada, vivir en granjas o la exposición a mascota; manejando la idea de que un ambiente excesivamente higiénico, ha disminuido la exposición de nuestro intestino a los antígenos bacterianos, de modo que nuestro sistema inmune sobrereactúa cuando se le expone a una disbiosis bacteriana<sup>72,73</sup>. Por contra las medidas de higiene adoptadas en los países en desarrollo, no han demostrado asociación inversa como en Occidente, y de hecho han sido asociados con un mayor riesgo de CU. Un estudio realizado en el norte de India no proporciona evidencia definitiva para apoyar la hipótesis de la higiene y más bien concluye que la creciente incidencia de CU en India puede ser atribuible a las medidas sanitarias inadecuadas u otros factores aún no identificados<sup>74</sup>.

Estas informaciones, en algunos casos contradictorias, y la falta de conocimiento en algunos aspectos llevan a la necesidad de identificar el papel de la microbiota intestinal en el inicio de la enfermedad, determinar si la composición microbiana puede predecir el riesgo subsecuente de brotes de actividad, o examinar si la flora luminal puede predecir la respuesta al tratamiento. En resumen, conocer en profundidad la relación causal de la microbiota intestinal en el huésped afecto de EII. El empleo de herramientas más precisas como técnicas de metagenómica, y de análisis de la funcionalidad de la microbiota, permitirán aplicar enfoques personalizados para prevenir y tratar esta enfermedad de forma más específica<sup>75</sup>.

### 1.3.3. Factores Genéticos

Varias observaciones, tanto en modelos animales como en humanos, sugieren que factores genéticamente determinados contribuyen a la susceptibilidad a la EII. Se estima que el riesgo de padecer una EII cuando un familiar de primer grado está afectado de EC es del 9,2% y del 6,2% cuando lo está de CU. La historia familiar apoya que el paciente tenga un debut más temprano y agresivo. Está demostrada la agregación familiar en estos pacientes, observando en los estudios de concordancia en gemelos han mostrado reiteradamente que la concordancia para CU en gemelos monocigotos llega a ser del 16% y del 3,6% en dicigotos<sup>76</sup>.

Los datos sugieren que el sustrato genético es responsable de, al menos, el 20% de la susceptibilidad para desarrollar CU, porcentaje que ha justificado la búsqueda de alteraciones genéticas. Sin embargo, los estudios también han demostrado que la alteración genética no se centra en un solo gen, sino en alteraciones poligénicas complejas y de penetrancia variable.

Tabla 1. Principales mecanismos genéticos alterados (*extraído de Abraham et al* <sup>77</sup>).

Genes asociados al reconocimiento de patrones moleculares de patógenos	<i>NOD2/CARD15, CARD9</i>	Activación de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias y regulación de la inflamación y apoptosis celular.
Genes asociados con la autofagia	<i>ATG16L1, IRGM, LRRK2</i>	Papel clave en la regulación de la interacción entre la microbiota intestinal y la inmunidad innata y adquirida, y en la defensa del huésped frente a patógenos intestinales.
Genes asociados con la diferenciación de linfocitos	<i>IL23R</i>	Activación y desarrollo del linaje Th17 y sus efectos sobre las células dendríticas y macrófagos que conducen a la producción de diversas moléculas proinflamatorias.
Genes que codifican interleucinas	<i>IL-10</i>	Una citocina antiinflamatoria que inhibe la producción de citocinas proinflamatorias.
Genes que codifican la proteína	<i>TNFSF15</i>	El producto del gen TNFSF15 (TL1A) es un factor similar al TNF que se expresa en células endoteliales, macrófagos y linfocitos de la lámina propia intestinal.

*TNFSF15* Ligando 1A similar a TNF y miembro 15 de la superfamilia Factor de Necrosis Tumoral.

Entre la variedad de enfoques propuestos para su detección, tienen particular interés los estudios de asociación de genoma completo (genome-wide association studies o GWAS). Se han implicado a más de 200 loci distintos relacionados con la EII,



pero estos sólo explicarían el 20-25% de los casos. Es probable que el efecto agregado en varios loci contribuya al fenotipo de la EII. Estudios similares en cohortes pediátricas han identificado muchos de los mismos genes asociados con el riesgo de EII en adultos. La resecuenciación profunda de genes identificados por GWAS en cohortes de pacientes ha identificado variantes raras dentro de estos loci que se suman a la variación genética general asociada con el riesgo de EII<sup>78</sup>. Tales estrategias de identificación de genes han definido varias vías de señalización críticas que se han asociado consistentemente con la susceptibilidad a la EII. El análisis de las propiedades funcionales de las proteínas codificadas por estos diversos genes ha ayudado aún más a identificar vías moleculares específicas que son importantes en la patogenia de esta enfermedad<sup>79,80</sup>.

Los mecanismos genéticos alterados en la respuesta inmune innata y adquirida frente a la microbiota se pueden agrupar de la siguiente forma<sup>81</sup>:

- **Vías intracelulares de reconocimiento de antígenos bacterianos en el citoplasma:** el primer locus de susceptibilidad significativa en una región del cromosoma 16 (conocido como IBD1), codifica la proteína NOD2 (CARD15). Las mutaciones en NOD2 confieren susceptibilidad a la EC ileal. En una cohorte prospectiva en edad pediátrica, la prevalencia de mutaciones en NOD2 fue del 42%, lo que sugiere que la EC de aparición temprana tiene un fuerte componente genético<sup>82</sup>. NOD2/CARD15 forma parte de los biosensores encargados de detectar microorganismos patógenos o sus productos en los diversos compartimentos celulares para inducir finalmente inflamación. Existen otros tipos de detectores de bacterias y/o virus que son conocidos como toll-like receptors (TLR), los cuales no tienen relación con el NOD2. Sin embargo, debemos conocer que los TLR sondan el exterior de la célula y el interior de las vesículas celulares, incluidos los fagosomas, mientras que los NOD sondan el citoplasma. Todos ellos están altamente implicados en la regulación de la inmunidad innata<sup>83</sup> desembocando en la activación de factores nucleares como el factor nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B), que inducen citocinas inflamatorias como el TNF- $\alpha$  que ayudan a resolver la causa infecciosa que las produjo. Es fácil imaginar que este sistema puede dar lugar a una excesiva inflamación asociada a la detección del microbioma en la EII.

La prueba de la implicación genética se consiguió cuando se descubrió que el gen NOD2/CARD15 es el gen de susceptibilidad más importante detectado en los caucásicos, ya que en los asiáticos el papel del gen NOD2 parece irrelevante. Entre el 20 y el 40% de los pacientes presenta variantes de este gen (44% de los gemelos monocigotos)<sup>84</sup>. En concreto, el NOD2/CARD15 reconoce el muramil dipéptido (MDP), un fragmento de peptidoglicano de la pared de las bacterias gram-positivas. La activación de NOD2/CARD15 por MDP induce la

activación del NF- $\kappa$ B como señal de transducción que conllevará una determinada expresión de defensinas y citoquinas. Las formas mutantes para NOD2 parecen ser deficientes en el reconocimiento del MDP y por ello, están también asociados a un defecto en la activación del NF- $\kappa$ B.

Ante tal hallazgo, se diseñaron estudios para determinar en qué células se expresaba un gen tan determinante para el desarrollo de la EC, asumiendo que dichas células serían trascendentes para la patogenia de la EC. Los resultados sorprendieron porque no se encontró la expresión del NOD2-CARD15 en las células que son objeto de los mejores tratamientos de los que disponemos, los linfocitos T. Por el contrario, son los macrófagos del intestino normal los que presentan la mayor expresión de proteína NOD2/CARD15. Del mismo modo, en la mucosa inflamada tampoco se detectan linfocitos que expresen NOD2/CARD15, pero se detecta en las células epiteliales intestinales (fundamentalmente las células de Paneth de las criptas) y en los macrófagos de las lesiones de EC. Estos hallazgos han contribuido a cambiar el concepto de la EI como una enfermedad de las células T, y evidencian que los cambios inmunitarios contra los que se dirigen las terapias que utilizamos en este momento son, probablemente, secundarios. Del mismo modo, no se ha encontrado asociación entre NOD2 y el comportamiento de la enfermedad o la respuesta al tratamiento por lo que no se puede recomendar, en estos momentos, el cribado sistemático de los pacientes con EC, aunque puede ayudar a individualizar el tratamiento en aquellos casos con EC de patrón estenosante<sup>85</sup>. Concretamente, son tres variantes del NOD2 (Arg-702Trp [rs2066844]; Gly908Arg [rs2066845] y Leu1007fsinsC [rs41450053]), las que explican un tercio de la susceptibilidad genética para la EC<sup>86</sup>. Estas variantes se asocian con enfermedad específicamente localizada en el íleon terminal, mayor riesgo de un patrón estenosante y una edad más temprana de diagnóstico.

- **Vía de la autofagia**, el proceso de reciclado de organelas o bacterias intracelulares. Varios genes asociados a la EC (ATG16L1, IRGM y LRRK) regulan la vía de la autofagia, un proceso homeostático innato que permite el reciclaje de los orgánulos intracelulares y contribuye a la eliminación de los microorganismos intracelulares. NOD2 también puede regular la autofagia, lo que sugiere que estas vías están integradas y son defectuosas en algunos pacientes con EC. Estudios GWAS mostraron una clara asociación de un polimorfismo (rs2241880) del gen de la autofagia ATG16L1 con la EC. Incluso se detectó una asociación estadísticamente significativa entre las variantes del ATG16L1 y las del NOD2/CARD15 para la EC<sup>87</sup>.

La autofagia, que se describirá en detalle más adelante, es un proceso intracelular para la eliminación de organelas dañadas, microorganismos (proceso

selectivo) o inanición celular (proceso no selectivo). Para la autofagia, la célula desarrolla un autofagosoma (con una doble membrana celular) que se fusionará con los lisosomas para conseguir una degradación lisosomal. Este proceso catabólico permite a la célula reciclar las proteínas y componentes macromoleculares para reutilizarlos en procesos anabólicos. La autofagia se desarrolla por un conjunto de proteínas (Atg) que trabaja en una cascada modular. El gen ATG16L1 codifica la proteína Atg16 implicada en el aislamiento de la membrana celular para la formación del autofagosoma y en otros procesos celulares inmunológicos, como la regulación del inflamosoma y la función de las células de Paneth, células con gran formación de gránulos para procesos secretores reguladores<sup>88</sup>. Adicionalmente, se ha demostrado que la autofagia se regula mediante la función sensora de bacterias intracelulares desarrollada por el NOD2<sup>87,89</sup>.

- **Vías que regulan la inmunidad adquirida:** los genes de la inmunidad adaptativa que regulan la vía del receptor de IL-17 e IL-23 se han implicado en el riesgo de EII<sup>90,91</sup> incluidos los genes asociados con el riesgo de CU y EC (p. ej., IL23R, IL12B, STAT3, JAK2, TNFSF15). Algunos de estos genes (IL-10, STAT3, JAK2) también desempeñan un papel en la vía inmunorreguladora de IL-10 que también se ha relacionado de forma independiente con la CU<sup>92</sup>.

Se han detectado diversas variaciones en el gen del receptor de interleucina-23 (IL23R) del cromosoma 1p31 que presentan una asociación con la EC. De todas ellas, el polimorfismo rs11209026 tiene la asociación más potente que, además, es protectora frente a la enfermedad. El receptor de IL-23 se expresa en la membrana celular de las células T y otras células de la inmunidad (monocitos, células natural killer y células dendríticas) y está muy implicado en la regulación de actividades proinflamatorias mediadas por IL-17, al producir la activación de los linfocitos Th17 y, por tanto, coordinando fundamentalmente la inmunidad adquirida. El gen MDR1 (multi-drug resistance 1) sintetiza una glicoproteína-P que está muy expresada en las células epiteliales intestinales y constituye una importante defensa contra los xenobióticos. Un polimorfismo de este gen, el cual causa poca expresión de la glicoproteína-P, se ha identificado como altamente asociado al riesgo de desarrollar CU<sup>93</sup>.

Los estudios de asociación GWAS confirmaron once asociaciones previamente descritas, como el NOD2, IL23R, ATG16L1, IRGM, TNFSF15 y PTPN2. En el momento actual, las variaciones genéticas identificadas explican solo una fracción del riesgo de la población a desarrollar EII, lo cual sugiere que otros factores, como los ambientales, deben ser también contribuidores mayores para conformar la susceptibilidad a la enfermedad<sup>94</sup>.

La interleucina 10 (IL-10) interactúa con los receptores de citocinas de tipo II y es una citocina con efectos antiinflamatorios. Se ha demostrado que modula tanto la inmunidad innata como la adquirida. Las mutaciones en IL-10 y su receptor IL10R se han identificado como variantes de susceptibilidad a la EII. IL10 inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias como interferón- $\gamma$ , IL-2, IL-3 y TNF- $\alpha$ . La pérdida de IL-10 promueve el desarrollo de EII debido a una respuesta inmune excesiva a la microbiota<sup>95</sup>. Un factor asociado con IL-10 es el transductor de señal y activador del polimorfismo de transcripción 3 (STAT3) (en loci rs744166). Este es un factor responsable de la regulación de la transcripción de genes que regulan la angiogénesis y la proliferación celular. En la EC activa se observa un aumento de la activación de STAT3 en las células epiteliales intestinales. Los polimorfismos de IL-10 pueden estar asociados con la aparición temprana de colitis. Se ha demostrado que los cambios en la secuencia de IL-10 aumentan la susceptibilidad a la EII<sup>96</sup>.

TNFSF15/TL1A (miembro 15 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral) que también codifica una citocina conocida como citocina 1A (TL1A) similar al factor de necrosis tumoral (TNF), está asociado con EC y CU. La proteína codificada por este gen es una citocina que pertenece a la familia de ligandos del TNF y se expresa en las células endoteliales. Su expresión es inducible por TNF e IL-1  $\alpha$  y está relacionada con los niveles de inflamación en la EII<sup>97</sup>.

- **Vías que regulan la función epitelial:** Varios genes de la barrera epitelial se han asociado con la EII (más comúnmente asociados con la CU en comparación con la EC (p. ej., OCTN2, ECM1, CDH1, HNF4A, LAMB1 y GNA12). Los genes que controlan la biología de las células de Paneth y el estrés del RE/respuesta de proteínas desplegadas también se han identificado en la EC (p. ej., XBP-1; NOD2, ATG16L1), y cuya alteración conduce a la formación excesiva de proteínas con plegamiento erróneo y a la apoptosis celular. ATG16L1 y NOD2 se han asociado con cambios en la morfología de las células de Paneth. Los pacientes con EC con una mayor proporción de células de Paneth anormales (>20 por ciento) tuvieron una recurrencia más temprana de la enfermedad después de la resección quirúrgica en comparación con los pacientes con una proporción más baja de células de Paneth anormales<sup>98</sup>.

Varios factores genéticos primarios, que determinan un riesgo para el desarrollo de la EII, afectan a un proceso celular denominado “respuesta a las proteínas desplegadas” (unfolded protein response: UPR). Se trata de un proceso que se desencadena por el estrés del retículo endoplasmático (RE), inducido por el acúmulo de proteínas mal plegadas dentro del mismo. Estas proteínas mal plegadas pueden generarse por un defecto primario genético o ambiental y conforman el UPR, proceso genéticamente relacionado con el desarrollo de

ambas formas de EII. El UPR y la autofagia son procesos con mecanismos muy relacionados, y ambos están muy implicados en la patogenia de la EC, sin embargo, es interesante conocer que solo los genes relacionados con el UPR se han asociado con la CU y no los de la autofagia<sup>99</sup>.

El primer gen descrito como implicado directamente en la regulación del UPR y la EII fue el XBP1, un locus genético localizado en el cromosoma 22. La disfunción hipomórfica de este gen conlleva dos consecuencias: una disfunción de la función de las células de Paneth y una hiperrespuesta al medio proinflamatorio y microbiano, probablemente desencadenando una inflamación espontánea. Así, los estudios con XBP1 también revelaron la posibilidad de que la EII podría provenir, primariamente, de anormalidades determinadas genéticamente en el epitelio intestinal. En el RE, las proteínas pueden acumularse por un defecto primario en su metabolización, como el que suponen las variantes del XBP1, o bien por defectos secundarios que generen un exceso de proteínas mal plegadas que superen las capacidades de un UPR que funcione correctamente. En este sentido, puede que contribuya la alteración de algunos factores secundarios, como la glicosilación de proteínas, la deprivación de calcio, la alteración redox o la hipoxia. Así pues, las alteraciones genéticas que afecten a este tipo de procesos pueden, también, contribuir al estrés del RE<sup>100</sup>.

#### **1.3.4. Factores inmunológicos.**

El sistema inmunitario intestinal constituye la parte más extensa y compleja del sistema inmune y parece ser el mediador principal de la patogenia de la EII. Recibe diariamente una enorme carga antigénica y es capaz de distinguir entre patógenos invasivos y antígenos inocuos procedentes de los alimentos y de bacterias comensales. Está encargado de la defensa a través de las respuestas secuenciales y coordinadas que se inicia de forma rápida y eficaz con la inmunidad innata en las primeras horas o días siguientes a la exposición, para que después se desarrolle la respuesta especializada y compleja de la inmunidad adaptativa.

Clásicamente, se ha considerado que la EII estaba mediada por una respuesta alterada de la inmunidad adquirida, fundamentalmente por una alteración de los linfocitos T, de modo que prevalecía una respuesta inmune de linfocitos Thelper (Th1) (más típica de autoinmunidad), en la EC y una respuesta tipo Th2 (más típica de procesos alérgicos) en la CU. Con las nuevas evidencias, actualmente se ha producido un cambio conceptual en la patogenia de la EII, observándose alteraciones relevantes en la inmunidad innata (macrófagos, neutrófilos, células natural killer y células epiteliales, células de Paneth y células dendríticas) que, probablemente, sean primarias y condicionen la respuesta de la inmunidad adquirida.

#### 1.3.4.1. Respuesta inmune innata

Contituye la primera línea de defensa contra agentes patógenos, proporcionando una respuesta rápida y eficaz mientras mantiene la tolerancia hacia antígenos de los alimentos y de bacterias comensales, mediante una eficiente barrera intestinal. Actualmente, se considera que la alteración de la permeabilidad de esta barrera intestinal es secundaria a elementos patogénicos primarios, como la predisposición genética, la interacción con la microbiota y una respuesta inflamatoria aberrante mantenida, que conduce a la inflamación intestinal crónica, como ocurre en la EII.

Durante la homeostasis, la barrera intestinal tiene la característica de ser semipermeable, por lo que permite el paso de sustancias beneficiosas, como nutrientes, a la sangre, y a su vez, impide que otras sustancias no deseadas. La microbiota intestinal en la capa mucosa modula la producción y secreción de mucina y la estratificación del moco para mantener la integridad de la barrera mucosa. A su vez, propicia la formación de ácidos grasos de cadena corta, en particular el butirato, uno de los AGCC más estudiados en relación a la regulación de la barrera intestinal, ya que posee un efecto antiinflamatorio, contribuye a la protección de la integridad del epitelio intestinal y promueve la respuesta inmune, reduciendo la inflamación intestinal<sup>101</sup>.

Sin embargo, esta permeabilidad selectiva, puede verse alterada debido a la disminución de la diversidad de microbiota intestinal o *disbiosis*, que acarrea un cambio en el perfil metabólico, con una disminución del butirato, que induce el deterioro de la barrera mucosa y, de forma conjunta, tiene lugar la disminución de síntesis de mucina que forma el moco que cubre la capa epitelial, provocando una mayor permeabilidad del epitelio intestinal y dando como resultado una absorción aumentada de antígenos lumbinales<sup>102</sup>.

En esta monocapa epitelial las células intestinales columnares polarizadas están conectadas por uniones intercelulares que se conocen como uniones estrechas. Estas uniones están formadas por un conjunto de proteínas, ocludinas, claudinas y tricelulinas, de entre las cuales las claudinas parecen tener un papel regulador fundamental. En la EII, tanto en la EC como en la CU, se ha evidenciado que hay una disminución de las uniones estrechas que, además, presentan una disminución de las claudinas que se encargan del sellado de las uniones, así como un aumento de las claudinas formadoras de poros o canales de paso. Se han detectado varios polimorfismos asociados al riesgo de desarrollar EII, como los genes PAR3 y MAG12, implicados en el ensamblaje de las uniones, y que se asocian al riesgo de desarrollar CU. El mismo polimorfismo del gen NOD2 resulta en una expresión alterada de defensinas, lo cual, a su vez, condiciona el aumento de permeabilidad, entre otros mecanismos, a través de una disrupción de las uniones. En definitiva, la comprensión de todo el proceso

patogénico de la EII, incluyendo la permeabilidad y regulación de las uniones, ofrece un área más para explorar intervenciones terapéuticas específicas<sup>103</sup>.

Adicionalmente, los pacientes con EII muestran una reducción de las bacterias comensales, incluidas las bacterias productoras de AGCC<sup>69,70</sup>. Esto conduce a una disminución de AGCC y sus efectos beneficiosos, incluida la capacidad de modular la diferenciación de linfocitos Treg y T efectoras (Figura 3). El desequilibrio de las células Treg y efectoras conduce a una mayor producción de citocinas proinflamatorias. Debido a las perturbaciones, la capa de la mucosa se daña, dando lugar a una barrera disfuncional. Esto permite la penetración bacteriana, desencadenando una cascada inflamatoria contra las bacterias invasoras. Además, las bacterias comensales que pueden mostrar propiedades patógenas si se les da la oportunidad adecuada, emergen y se expanden en las condiciones inflamatorias, y el desequilibrio de la regulación inmunitaria conduce a un estado inflamatorio crónico.

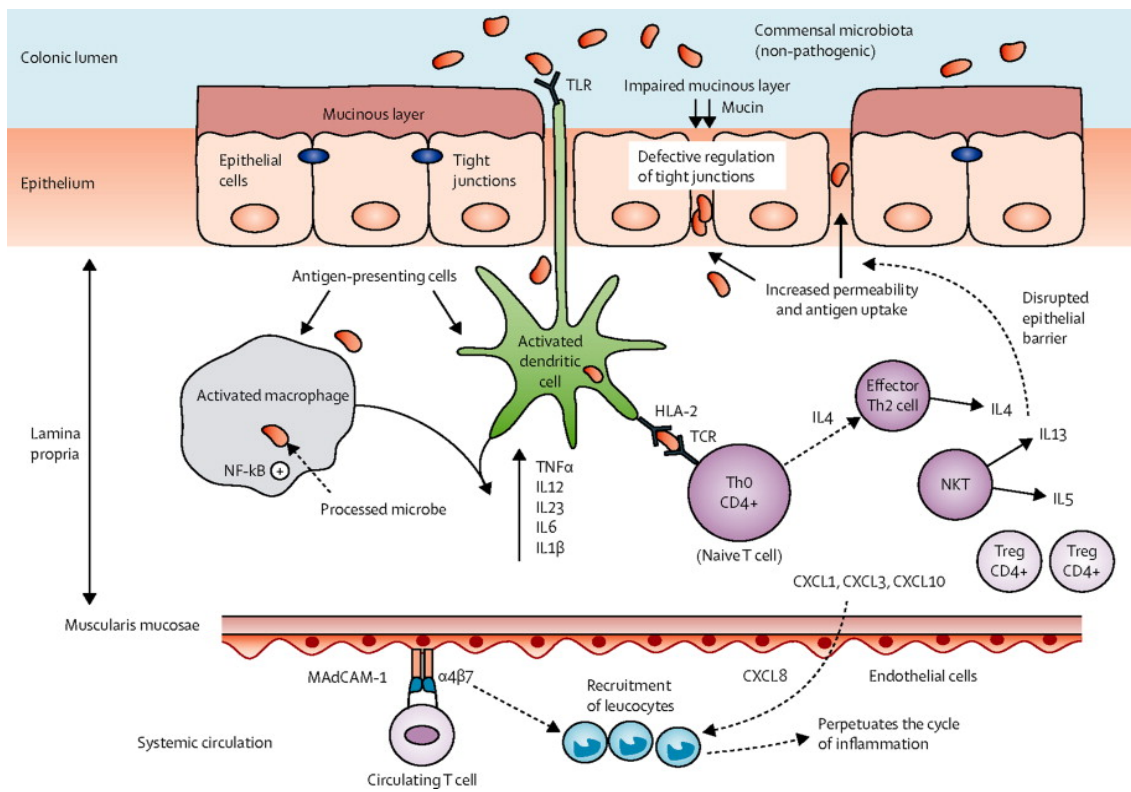


Figura 3. Fisiopatología de la Colitis Ulcerosa (Adaptado de Ordás et al<sup>61</sup>).

En la región subepitelial que contiene la lamina propia, los monocitos maduran a macrófagos y las células presentadoras de antígenos especializadas, como las células dendríticas, reconocen bacterias no patógenas de la microbiota comensal, a través de moléculas de reconocimiento de patrones, como los receptores de tipo Toll (TLR). El papel principal de la señalización TLR es proporcionar defensa contra distintos patógenos, lo que contribuye a la homeostasis intestinal y al mantenimiento de la barrera epitelial. Las células epiteliales intestinales normales expresan principalmente

TLR3 y TLR5, mientras que en pacientes con CU la expresión de TLR4 se incrementa sustancialmente en las células del epitelio y de la lámina propia intestinal, cambiando su estado funcional de tolerancia a un fenotipo activado. La activación de TLRs desencadena respuestas inmunitarias innatas y adaptativas que conducen a la activación de las vías NF- $\kappa$ B estimula la transcripción de los genes proinflamatorios, dando como resultado un aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias (factor de necrosis tumoral TNF- $\alpha$ , interleucinas 12, 23, 6 y 1 $\beta$ ). Tras el procesamiento de antígenos, los macrófagos y las células dendríticas migran para presentar los antígenos a los linfocitos T vírgenes, consiguiendo la respuesta más duradera, específica y dirigida contra los patógenos que va a constituir la respuesta adaptativa<sup>104</sup>.

#### **1.3.4.2. Respuesta inmune adaptativa**

La inmunidad adquirida incluye la activación de células inmunes específicas, como los linfocitos B y T, así como la producción de anticuerpos específicos que reconocen y se unen a los patógenos.

Los linfocitos T se subdividen en dos tipos: CD4+ y CD8+. Clásicamente, la EII se ha considerado una enfermedad relacionada con un aumento de linfocitos CD4+ que son reclutados intraepitelialmente en el intestino. Además, en la EC estos linfocitos parecen ser resistentes a la apoptosis, o muerte celular programada, lo que no sucede en la CU. El campo de la inmunología ha evolucionado ampliamente en la última década, habiéndose descubierto, recientemente, diversos subtipos de linfocitos T con producción de citoquinas específicas y funciones reguladoras implicadas en patologías autoinmunes. Entre los distintos subgrupos descritos, adquieren importancia los linfocitos Th17 y las células T reguladoras (Treg) por su implicación en la patogenia de la EII y por la interacción reguladora que se produce entre ellas<sup>105</sup>.

Los linfocitos CD4+ naïve pueden diferenciarse en Th1, Th2 o Th17, en función de las citoquinas que se secreten. Los linfocitos T CD4+ se activan al entrar en contacto con un antígeno a través de las células presentadoras, lo que promueve la diferenciación en linfocitos Th2, caracterizados por la producción de IL-4. Los linfocitos natural killer (NK) son la principal fuente secretora de interleucina 13, que se asocia con la disrupción de la barrera de las células epiteliales. En pacientes con CU se han encontrado grandes cantidades de IL-13 en la lámina propia, siendo esta citoquina uno de los principales mediadores en la CU. Esto se acompaña de un aumento en la expresión de la molécula de unión claudin-2, que conduce al desarrollo de la función de barrera deteriorada para los pequeños cationes que podría ser la responsable de la diarrea en la CU. Por tanto, el bloqueo de la IL-13 y el agotamiento de estos linfocitos NK podrían prevenir el desarrollo de CU<sup>106</sup>.



Las citoquinas IL-6 y TGF- $\beta$  parecen ser las responsables iniciales de un viraje hacia Th17, al activar la vía de transcripción mediada por STAT3. Esto hará que aumente la expresión del receptor de la IL-23, entre otros factores. Además, la IL-1 y la IL-3 producidas, fundamentalmente, por las células dendríticas determinan el desarrollo y expansión de las células Th17. A su vez, las células Th17 secretan las citoquinas IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-21 e IFN- $\gamma$ . Las IL-17A e IL-17B parecen activar elementos de la inmunidad innata. La IL-22 parece regular la permeabilidad intestinal y la IL-21 parece tener funciones reguladoras tanto sobre la inmunidad innata como sobre la adquirida. Estudios recientes demuestran que las células Th17 no son muy estables en su diferenciación y pueden, fácilmente, virar hacia otro tipo de subtipos Th, lo que se conoce como plasticidad, elemento clave en la homeostasis de la inmunidad. La mucosa inflamada de la EII tiene una infiltración masiva de células Th17 que se ubican en la mucosa y la submucosa en la CU y la EC, respectivamente. La interacción entre las vías del Th17 y Th1 está todavía en estudio. Datos recientes parecen indicar que la IL-17 está elevada, fundamentalmente, en la CU<sup>107</sup>.

Las células Treg representan otro tipo de células Th que desarrollan una labor inmunosupresora. Las células Treg secretan citoquinas antiinflamatorias, como la IL-10 y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). El bloqueo de la IL-10, en modelos experimentales animales, conlleva el desarrollo de inflamación intestinal, probablemente por desaparecer el efecto inhibitorio de la IL-10 sobre las células Th17. Por tanto, se requiere un fino balance entre las Th17 y las Treg, para así evitar una inflamación excesiva, por la pérdida de la regulación inmunitaria.

La caracterización de la función e interrelación entre las células Th17 y las Treg ayudará a entender el complejo balance entre la tolerancia y la autoinmunidad. Las Th17, dada su localización y su plasticidad, parecen tener una posición privilegiada para entender la inmunopatogénesis de la EII y, por tanto, para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, algunas de las cuales ya se están desarrollando. Cómo cambiar el balance inmunitario de la autoinmunidad hacia la tolerancia será la piedra angular de las nuevas estrategias terapéuticas de los próximos años<sup>108</sup>.

El transporte de células efectoras desde la circulación a la mucosa intestinal se lleva a cabo por un mecanismo altamente selectivo que involucra la interacción con el endotelio vascular, la diapédesis a través de la pared vascular y la migración a la lámina propia. La regulación de citoquinas inflamatorias, tales como CXCL1, CXCL3 y CXCL8, conduce al reclutamiento de leucocitos circulantes a la mucosa inflamada, importante para la amplificación de la respuesta inflamatoria<sup>109</sup>. Los linfocitos T circulantes que llevan en su membrana la integrina- $\alpha 4\beta 7$  se unen a las moléculas de adhesión celular presentes en el endotelio vascular de los vasos sanguíneos de la mucosa (MadCAM-1), dando lugar a la extravasación en el tejido y a una entrada aumentada de linfocitos T en la lámina propia, perpetuando así el ciclo de la inflamación<sup>110</sup>.

## 1.4. DIAGNÓSTICO

La EICI agrupa dos entidades clínicas, tanto a la CU como a la EC. Ambas asocian una respuesta inmune desmesurada que produce lesiones intestinales de profundidad y extensión variables, siendo necesario destacar las principales diferencias diagnósticas entre la CU y la EC que se resumen en la tabla 2. Cuando los aspectos son mixtos se denomina como colitis indeterminada.

Tabla 2. Diferencias diagnósticas entre CU y EC.

	<i>Colitis Ulcerosa</i>	<i>Enfermedad de Crohn</i>
<b>EXTENSIÓN</b>	Afectación de recto	Afectación recto con menos frecuencia
	Mayor o menor extensión de colon	Cualquier segmento de boca a ano
	Afectación continua y simétrica	Afectación segmentaria y asimétrica
<b>AFECTACIÓN DE LA PARED</b>	Mucosa	Transmural (todo el espesor de la pared)
	Engrosamiento capa muscular	“Envoltura grasa”
	No habitual estenosis, fístulas	Desarrollo de fístulas, estenosis
	Rara enfermedad perianal	Enfermedad perianal
	Raros abscesos	Abscesos intraabdominales
<b>ENDOSCOPIA</b>	Pérdida patrón vascular, edema, úlceras	Úlceras serpiginosas, “empedrado”

La CU es de curso crónico, no tiene tendencia a la curación y se caracteriza por presentar una evolución difícil de predecir, en la que alternan periodos de mayor y menor intensidad sintomática. Es importante unificar la terminología para lo que es preciso conocer algunas definiciones de uso común:

- Remisión: disminución (denominada remisión parcial o respuesta, en ensayos clínicos) o desaparición (remisión completa) de los síntomas y signos de la enfermedad.
- Respuesta: mejoría significativa de la situación clínica o endoscópica sin alcanzar la remisión.
- Curación mucosa: situación en la que, además de no existir actividad clínica, se constata desaparición de las lesiones intestinales mediante endoscopia.
- Curación histológica: desaparición de las lesiones histológicas que indican actividad de la enfermedad, pudiendo persistir ciertas lesiones crónicas.
- Enfermedad quiescente: aplicado a la remisión prolongada de la CU.

- Recidiva: reaparición de sintomatología después de un periodo de quiescencia o inactividad de la enfermedad, bien espontáneamente o tras el tratamiento médico.
- Recurrencia: reaparición de la enfermedad después de una resección quirúrgica teóricamente curativa en la EC. Se suele referir a la recidiva endoscópica (reaparición de las lesiones endoscópicas) o a la recidiva clínica (reaparición de los síntomas).
- Corticodependencia: son dependientes de corticoides los pacientes en los que el tratamiento esteroideo no puede reducirse por debajo de los 10 mg/día de prednisona o los 3 mg/día de budesonida en los tres primeros meses de inicio de corticoterapia, o aquellos en los que la actividad de la enfermedad reaparece antes de los tres meses de haber suspendido los corticoides.
- Corticorrefractariedad/corticorresistencia: enfermedad que se mantiene en actividad pese al tratamiento con dosis plenas de corticoides.

Para el diagnóstico de CU no existe ninguna prueba ni síntoma que de forma específica nos pueda garantizar que estamos frente a un caso. Ante la sospecha, se valorará la historia clínica y se procederá a la exploración física, que permitirán orientar el diagnóstico y establecer las exploraciones complementarias necesarias. Existen unos criterios, denominados de Lennard-Jones (Tabla 3), que son los más comúnmente utilizados para definir en un paciente concreto la presencia de CU en base una combinación de parámetros clínicos, de laboratorio, pruebas endoscópicas o radiológicas y de anatomía patológica.

Además, previo a establecer el diagnóstico de CU hay que descartar otras causas de inflamación aguda o crónica, como la colitis microscópica, colitis isquémica, malabsorción de sales biliares, sobrecrecimiento bacteriano, diarrea inducida por fármacos, por agentes físicos, causas metabólicas y hormonales, enfermedades sistémicas, diverticulosis o de origen neoplásico; pero también causas infecciosas producidas por parásitos como la amebiasis o la giardiasis, hongos, virus como el CMV o bacterias como *Yersinia spp.*, *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.*, o más raramente tuberculosis o colitis por *Aeromonas*. Por otra parte, algunos gérmenes responsables de enfermedades de transmisión sexual (herpes simple, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*) pueden remedar la sintomatología de un brote.

#### **1.4.1. Criterios clínicos.**

La CU debe sospecharse en general ante la presencia crónica o recurrente de algunos signos o síntomas. La manifestación clínica más sugerente es la diarrea, que puede ir acompañada o no de rectorragia, normalmente aparece como deposiciones frecuentes y de poca cuantía, y suele ser diurna y nocturna. La diarrea es común, pero no siempre está presente en la CU, pues las formas distales de CU, como la proctitis o la

proctosigmoiditis, pueden presentarse paradójicamente con estreñimiento. A veces, al tener la necesidad de realizar la deposición, solo se consigue expulsar moco y sangre (esputos rectales). Son característicos el tenesmo rectal y la urgencia defecatoria. Puede acompañarse de dolor abdominal o distensión, aunque es menos característico que en la EC.

Tabla 3. Criterios diagnósticos de Lennard-Jones  
Fuente: Lennard-Jones, J.E., Classification of inflammatory bowel disease<sup>111</sup>.

<b>Criterios clínicos</b>	- Rectorragia
	- Diarrea crónica (aunque en un 10% de los casos puede haber estreñimiento)
	- Dolor abdominal
	- Manifestaciones extraintestinales
<b>Criterios radiológicos</b>	- Cambios mucosos: mucosa granular, úlceras espiculares o en botón de camisa, pseudopólipos.
	- Cambios del calibre: Estrechamiento de la luz (aumento del espacio recto-sacro), acortamiento del colon, pérdida de haustración.
<b>Criterios endoscópicos</b>	- Mucosa eritematosa, granular, edematosa y/o friable
	- Exudado o ulceraciones.
	- Hemorragia al roce o espontánea.
	- Pseudopólipos o pólipos
	- Lesiones continuas y afectación constante del recto.
<b>Criterios anatomopatológicos</b>	- Mayores: inflamación exclusiva de la mucosa, úlceras superficiales, distorsión de las criptas, microabscesos, depleción de células caliciformes.
	- Menores: infiltrado inflamatorio crónico difuso, aumento de la vascularización mucosa, metaplasia de células de Paneth, atrofia mucosa, hiperplasia linfoide.

Al tratarse de una enfermedad crónica con alternancia entre períodos de ausencia de síntomas o remisión, y periodos de actividad o brotes, en los que aparecen los síntomas, su gravedad dependerá de la intensidad del grado de inflamación. Por tanto en la práctica clínica los brotes se clasifican según su gravedad en tres categorías: leves, moderados y graves, con una distribución de aproximadamente 50%, 35% y 15% de los casos, respectivamente. La enfermedad de actividad moderada o grave puede asociarse a síntomas sistémicos como pérdida de peso, febrícula o fiebre,

malestar general e hiporexia. Hasta un 15% de los pacientes con CU pueden debutar de forma grave, presentando taquicardia, fiebre, postración y pérdida de peso, asociando distensión abdominal, ausencia de ruidos intestinales con datos de irritación peritoneal y complicaciones como hemorragia digestiva baja, perforación colónica o megacolon tóxico.

Los síntomas también varían en función de la extensión de la afectación, así en la proctitis predomina el tenesmo y urgencia defecatoria, mientras que en la pancolitis se asocia diarrea sanguinolenta, dolor abdominal, fatiga, síndrome constitucional, taquicardia y fiebre. Asimismo, la extensión de la enfermedad puede variar a lo largo de la evolución, aproximadamente el 30-50% de los pacientes presentan una proctitis al diagnóstico, 20-30% afectación hasta colon izquierdo y un 20% pancolitis. En los pacientes con afectación distal aproximadamente entre 20-50% progresan a una afectación más extensa, especialmente aquellos con diagnóstico de la enfermedad en edad precoz y aquellos con colangitis esclerosante<sup>112</sup>.

La presencia o el antecedente de manifestaciones extraintestinales (MEI) típicas de la EII aportan un dato más de sospecha diagnóstica, con una prevalencia que oscila entre el 21-36%. Fundamentalmente, afectación ocular (uveítis, epiescleritis), cutáneomucosa (pioderma gangrenoso, eritema nodoso, aftas orales recurrentes), articular (artropatía periférica o axial, con frecuencia espondilitis o sacroileitis) o hepática (colangitis esclerosante primaria, pericolangitis) entre otras. La actividad de algunas MEI sobre los órganos afectados es paralela al curso de la enfermedad intestinal en algunas formas de artritis periférica, el eritema nodoso, la estomatitis aftosa y la epiescleritis. Por contra, otras manifestaciones aparecen con independencia del curso de la enfermedad, como son el pioderma gangrenoso, la uveítis, la espondiloartropatía y la colangitis esclerosante primaria. También se debe tener en cuenta la posible asociación de la EII con otras enfermedades de origen inmune como la vasculitis o la enfermedad celíaca.

En los parámetros analíticos los pacientes pueden presentar rasgos que indiquen cronicidad, como la elevación de marcadores serológicos de inflamación que serían la velocidad de sedimentación (VSG) y la proteína C reactiva (PCR). La anemia, leucocitosis, trombocitosis, ferropenia y la hipoalbuminemia también son más comunes en casos de enfermedad extensa y actividad grave. La calprotectina es un marcador biológico fecal, concretamente es una proteína procedente de los neutrófilos que traduciría la migración de estos a través de la pared intestinal inflamada, constituyendo un marcador de inflamación colónica, útil en el diagnóstico y tiene buena correlación con la gravedad endoscópica como se describirá más adelante.

Sin embargo ninguno de estos parámetros es específico de CU y sólo nos pueden ayudar a probar la existencia de inflamación colónica más o menos grave. Como alternativa se ha estudiado la presencia de autoanticuerpos y anticuerpos antimicrobianos asociados a la EII. La positividad aislada de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos con tinción perinuclear atípicos (pANCA) es más específica en la CU (88,5%), aunque su baja sensibilidad (50-60%) no los hacen útiles en el diagnóstico ni para la toma de decisiones terapéuticas<sup>113</sup>. La combinación de pANCA positivos con anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) negativos puede ayudar en algunos casos a diferenciar la CU de la EC con alta especificidad (94,3%)<sup>114</sup>.

#### **1.4.2. Criterios radiológicos**

En general el estudio del intestino delgado en CU no está recomendado de forma rutinaria. Sólo en casos de duda diagnóstica con la EC, sería útil el estudio mediante una prueba de imagen radiológica seccional como la tomografía computarizada (entero-TC) o la entero-resonancia magnética (entero-RM), y más recientemente la ecografía intestinal, que evalúan adecuadamente la enfermedad localizada en el intestino delgado. Estas técnicas de imagen han desplazado a los clásicos estudios baritados de tránsito intestinal, por su mayor sensibilidad y capacidad de valoración global de la pared intestinal. Puede resultar de utilidad en la valoración inicial de un brote grave la realización de una radiografía simple de abdomen. Sería de utilidad para detectar signos indirectos como tubulización, acortamiento de la luz colónica, pérdida de haustración o en sospecha de perforación por dilatación colónica mayor de 6 cm o de asas de intestino delgado.

Se conoce que una dosis acumulada mayor o igual a 50 milisieverts (mSv) se relaciona con el desarrollo de tumores del tracto urogenital<sup>115</sup>. Aproximadamente hasta un 20% de las pacientes con EC reciben dosis iguales o superiores a 50mSv de radiaciones ionizantes<sup>116</sup>. Por todo ello, la ecografía intestinal y la entero-RM, dadas su precisión diagnóstica e inocuidad, se han propuesto como las técnicas de elección para la evaluación y el seguimiento de la EC.

La ecografía intestinal es una prueba con gran fiabilidad diagnóstica en la evaluación de pacientes con EII, tanto en el diagnóstico inicial como en el seguimiento, lo que permite demostrar la presencia de complicaciones. Por sus ventajas como la accesibilidad ya que está disponible en todos los hospitales, ser más barata en comparación con otras técnicas y no suponer irradiar a estos pacientes debería convertirse en una técnica de primera línea. Además, proporciona información en tiempo real difícil de obtener con otras pruebas de imagen. El uso de contrastes ecográficos y la elastografía podrían ayudar a diferenciar entre estenosis fibrosas e

inflamatorias, lo que ayudaría a la toma de decisiones médicas o quirúrgicas, que a su vez supondría un mejor manejo del paciente y un importante ahorro en el gasto farmacéutico.

La utilidad de la ecografía en la colitis ulcerosa puede tener interés en tres situaciones clínicas: valorar la extensión de la enfermedad en casos de colonoscopia incompleta, como en un debut grave de la enfermedad, ayudar en el diagnóstico diferencial en casos de colitis indeterminada con el fin de descartar afectación de intestino delgado, y finalmente puede ser una alternativa a la colonoscopia en los brotes de la enfermedad para valorar actividad o extensión de la enfermedad. En cambio, la ecografía no es útil para evaluar el colon cuando hay sospecha de megacolon tóxico o sus complicaciones. Tiene una serie de limitaciones, como son la obesidad, la dificultad de valorar la afectación proximal y la anorrectal, es una técnica explorador dependiente que precisa cierta curva de aprendizaje y requiere conocimientos no solo de la técnica ecográfica, sino también de la EII<sup>117</sup>.

#### **1.4.3. Criterios endoscópicos**

La colonoscopia con toma de biopsias es la técnica básica para el diagnóstico de esta enfermedad en ausencia de complicaciones que la contraindiquen. Las lesiones se inician por norma en recto y la afectación suele ser continua hasta tramos proximales. En ocasiones se pueden encontrar áreas libres de inflamación por afectación discontinua de la mucosa, especialmente en pacientes tratados, como ocurre en pacientes que han recibido tratamiento tópico en los que el recto puede estar preservado. Hasta el 20% de los pacientes con pancolitis presentan también ileítis por reflujo, que se describe endoscópicamente como inflamación leve con eritema y edema mucoso en la región ileal. Existe además el término de parche cecal, área de mucosa afectada que suele aparecer hasta el 75% de colitis izquierda.

Durante la fase de actividad de la CU únicamente presenta afectación en la capa mucosa y en la imagen endoscópica aparece una mucosa con pérdida de patrón vascular, granularidad, edema, eritema, friabilidad, que se evidencia simplemente con insuflar aire, erosiones o úlceras de diferentes tamaños que pueden confluir entre ellas dependiendo de la gravedad. Existen varias escalas y diferentes índices de puntuación endoscópica para valorar la actividad inflamatoria que, clásicamente, se describe como de actividad leve, moderada o grave, aunque ninguno de ellos ha sido validado, que se utilizan más en ensayos clínicos que en práctica diaria.

En la CU de larga evolución, en periodos de inactividad inflamatoria o quiescencia la mucosa muestra un aspecto atrófico, con secuelas cicatriciales, es frecuente la presencia de formaciones pseudopolipoideas, puentes mucosos, de estirpe inflamatoria, más frecuentemente localizados en sigma y colon descendente y raramente en recto. Además, en casos avanzados se observa sangrado espontáneo y alteraciones tan severas que pueden generar estenosis de la luz intestinal, generalmente cuando la enfermedad lleva años de evolución. Las estenosis en la CU representan un riesgo cinco veces mayor de desarrollar cáncer colorrectal, por lo que se aconseja el seguimiento estrecho<sup>118</sup>.

Para un correcto diagnóstico se deberían tomar al menos dos biopsias de cinco de los segmentos colónicos incluyendo recto y preferiblemente también mucosa de íleon terminal si es accesible. Es importante que la toma de biopsias se dirija a las zonas ulceradas y a las zonas de mucosa sana para demostrar el patrón parcheado de la enfermedad. Además, se ha comprobado que, para maximizar el rendimiento, es necesario coger muestras de las úlceras, bordes y aftas para identificar la lesión más específica, los granulomas, aunque estos son difíciles de encontrar<sup>119</sup>.

#### **1.4.4. Criterios histológicos**

El diagnóstico anatomopatológico de la CU activa se basa en una inflamación continua de la mucosa colónica asociada a distorsión arquitectural, plasmocitosis basal y en ocasiones acompañado de un componente inflamatorio agudo causante de criptitis o abscesos crípticos.

No se ha determinado el número de alteraciones necesarias para el diagnóstico de CU, aunque se establece con: la existencia de plasmocitosis basal, aumento celular intenso, difuso y transmucoso de la lámina propia y ensanchamiento de la mucosa o alteraciones de la arquitectura criptal. En las dos primeras semanas tras el inicio de los síntomas, pueden no presentarse los hallazgos típicos de CU. La biopsia en la enfermedad quiescente o ya tratada puede ser normal o persistir alguna de las alteraciones descritas<sup>2</sup>.

Características de cronicidad e inactividad o quiescencia son la atrofia críptica, la metaplasia de células de Paneth, más frecuente en colon izquierdo, la depleción de mucina, los pseudopólipos inflamatorios y la hipertrofia de la muscular.



- La plasmocitosis basal es la presencia de células plasmáticas en la base de las criptas y en la muscular de la mucosa, y ayuda en el diagnóstico diferencial entre CU y colitis infecciosa. Esta característica es uno de los criterios diagnósticos más temprano y con alto valor predictivo para el diagnóstico de CU.
- El infiltrado inflamatorio de la lámina propia con predominio de células plasmáticas, linfocitos y neutrófilos es el causante de la criptitis, definida como la presencia de neutrófilos en epitelio críptico y de los abscesos crípticos, definidos como la presencia de neutrófilos en la luz de la cripta, muy característicos, pero no patognomónicos.

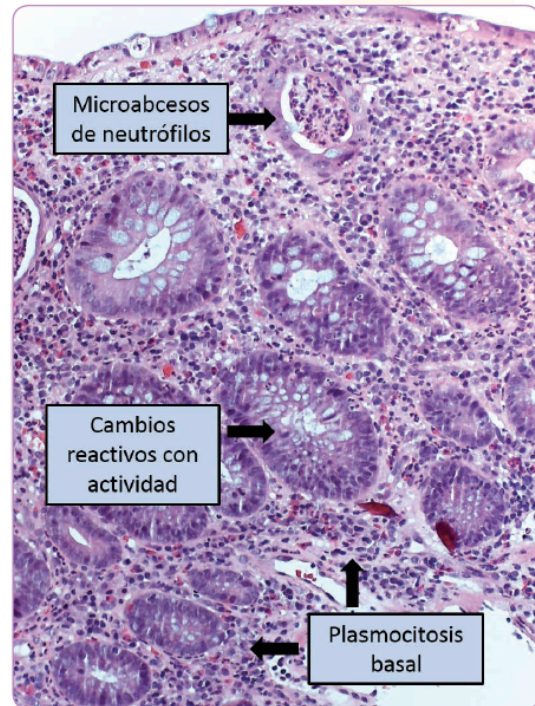


Figura 4. Hallazgos histológicos en el diagnóstico de CU.

- Las criptas presentan distorsión estructural, con cambios regenerativos basales, disminución de sus ramificaciones y del número de células caliciformes. Durante las fases de remisión, disminuye o desaparece el infiltrado inflamatorio y los abscesos crípticos, y se recupera el número de células caliciformes; sin embargo, las criptas suelen continuar mostrando distorsión arquitectural.

#### 1.4.5. Calprotectina fecal

La calprotectina es una proteína citoplasmática liberada por los granulocitos activados, los monocitos y los macrófagos. La barrera mucosa se ve alterada durante la inflamación intestinal, permitiendo que los leucocitos crucen la pared intestinal. A diferencia de muchos marcadores serológicos, la calprotectina permanece estable en heces 7 días, lo que facilita su determinación y sus niveles se correlacionan bien con la actividad inflamatoria endoscópica e histológica en la EII<sup>112</sup>. La determinación de calprotectina fecal ofrece una alta sensibilidad diagnóstica, aunque es poco específica.

Ante un paciente con clínica de diarrea o dolor abdominal crónico, debería considerarse la posibilidad de una EII. Sin embargo, debido a que una elevada proporción de individuos con estos síntomas sufre una patología funcional, la realización sistemática de colonoscopia a todos estos casos parece inapropiada, en términos de

coste-beneficio, lo que limita su aplicabilidad en los casos de baja sospecha diagnóstica o como método de monitorización. Por este motivo, se han buscado pruebas alternativas no invasivas, sencillas y baratas, tanto para el cribado diagnóstico como para la monitorización de la respuesta terapéutica. En este contexto, la determinación de calprotectina fecal ha demostrado un alto valor predictivo negativo, cuando la probabilidad de patología orgánica previa al test es baja<sup>120</sup>. Por esta razón, una sola determinación de calprotectina fecal podría evitar casi dos terceras partes de las endoscopias innecesarias. La determinación de la calprotectina fecal ha demostrado distinguir de forma adecuada los trastornos orgánicos de los trastornos funcionales, con una sensibilidad del 83% y especificidad del 84%, como sería el síndrome de intestino irritable<sup>121</sup>.

El seguimiento de la EII es fundamentalmente clínico, y los controles endoscópicos no se realizan de manera rutinaria por las razones expuestas. Mediante la determinación de la calprotectina fecal en pacientes asintomáticos puede identificarse a aquellos pacientes con inflamación subclínica con un mayor riesgo de recidiva y, por el contrario, definir a aquellos con alta probabilidad de haber conseguido la curación mucosa. La calprotectina fecal es además una herramienta útil en la monitorización individual del tratamiento en la EII. Por ejemplo, ante la respuesta clínica a esteroides sistémicos, la reducción de un valor inicial alto de calprotectina fecal indica respuesta adecuada, permitiendo iniciar la pauta descendente con mayor tranquilidad.

En la interpretación de los valores de calprotectina fecal debe tenerse en cuenta el objetivo de conocer el valor de la calprotectina fecal, ya que este dependerá de la indicación de este marcador. Por ejemplo, en aquellos pacientes con EII conocida sería importante valorar niveles altos cuando se quiere detectar a individuos con alto riesgo de recidiva o niveles bajos, para evitar una colonoscopia, en la monitorización de recurrencia. En cifras concretas, se ha descrito que niveles mayores de 250 µg/g se relacionan con actividad endoscópica y valores menores de 68 µg/g (rango intercuartílico 30-172 µg/g) con ausencia de actividad endoscópica e incluso histológica<sup>122,123</sup>.

## **1.5. CLASIFICACIÓN DE LA COLITIS ULCEROSA**

Las características clínicas de la CU y su curso evolutivo y pronóstico, dependen de la extensión de las lesiones y de la actividad o gravedad de las mismas. En la guía de la European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO) se definen los criterios establecidos por consenso para la tipificación de la enfermedad dependen de la extensión de las lesiones y de la actividad o gravedad de las mismas<sup>124</sup>.

La CU se clasifica de acuerdo al grado de extensión y gravedad según la clasificación de Montreal<sup>125</sup>.

**Extensión:** La extensión de la enfermedad tiene importantes implicaciones pronósticas y terapéuticas. Debe evaluarse en el momento del diagnóstico, pues de ello depende la elección apropiada del tratamiento o la vía de administración, además de tener implicaciones pronósticas a corto y largo plazo de seguimiento. Dependiendo de los segmentos colónicos afectados, la enfermedad puede ser clasificada en (Figura 5):

- E1 o proctitis (afectación rectal exclusivamente. Su límite proximal sería distal a la unión rectosigmoidea).
- E2 o colitis izquierda (desde recto hasta ángulo esplénico)
- E3 o colitis extensa o pancolitis (afectación más proximal al ángulo esplénico).

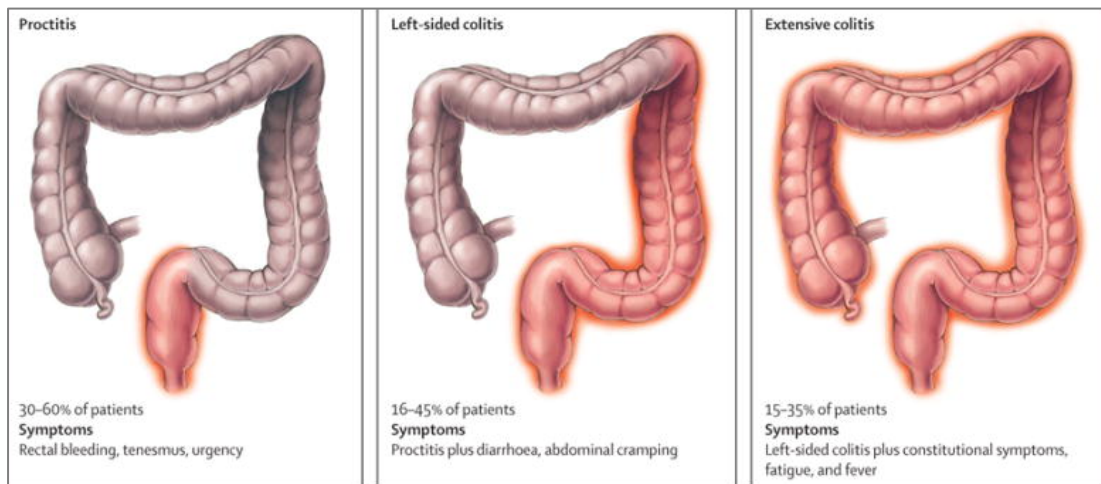


Figura 5. Fenotipos de Colitis Ulcerosa según la clasificación de Montreal. Ilustración de Jill Gregory<sup>4</sup>.

**Gravedad:** se basa en hallazgos clínicos, como el número de deposiciones diarias y la presencia o ausencia de signos sistémicos de inflamación, como fiebre y taquicardia. Según la clasificación de Montreal, se define la actividad de la enfermedad en cuatro grupos: inactiva, enfermedad leve, moderada y grave. El conocimiento de la actividad clínica servirá para determinar la decisión de tratamiento. Así podemos diferenciar atendiendo a la gravedad (*S*, del inglés *severity*) entre:

- S0: Colitis inactiva o en remisión: no hay síntomas de la enfermedad.
- S1: Colitis leve: cuatro o menos deposiciones al día con sangre, sin fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia ni aumento de VSG.

- S2: Colitis moderada: criterios intermedios entre leve y grave. Sin signos o con signos mínimos de afectación sistémica.
- S3: Colitis grave: seis o más deposiciones al día con sangre, fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia, aumento de VSG y signos de afectación sistémica grave.

Tanto la extensión como la gravedad de la enfermedad tiene importantes implicaciones pronósticas y terapéuticas<sup>4</sup>.

## **1.6. VALORACIÓN DE LA GRAVEDAD CLÍNICA Y DE LA ACTIVIDAD INFLAMATORIA**

La evaluación de la actividad de la enfermedad a corto plazo es importante para la toma de decisiones respecto a realizar el tratamiento más adecuado del paciente que tiene un brote. Sin embargo, valorar también la actividad de la enfermedad durante los primeros años del diagnóstico condicionará su curso evolutivo los años posteriores.

Se han ideado varios instrumentos mediante sistemas de puntuación que en la mayoría de ellos incluyen condicionantes clínicos, analíticos y endoscópicos para la evaluación estandarizada de la actividad y gravedad de la enfermedad. Estos índices de actividad sirven de herramienta para cuantificar el grado de actividad en un momento concreto de la evolución de un paciente y permitirán conocer la efectividad de las medidas terapéuticas adoptadas si se hace seguimiento en el tiempo. Existen índices de actividad clínicos, endoscópicos e histológicos y, también índices mixtos.

### **1.6.1. Índices de actividad:**

En la CU existe un paralelismo entre la gravedad clínica y la actividad inflamatoria, sobre todo en las formas extensas de la enfermedad. La primera valoración de la actividad inflamatoria puede realizarse mediante parámetros clínicos y analíticos básicos. En la actualidad no se dispone de ningún índice clínico de actividad de referencia, por lo que es preciso conocer varios para interpretar los resultados de los estudios. Entre los más importantes:

- Índice de Truelove-Witts<sup>126</sup>: es el índice de actividad clínica más utilizado en el que se incluyen variables cualitativas clínicas y de laboratorio. Distingue entre enfermedad inactiva o en remisión y con actividad, diferenciando entre actividad leve, moderado o grave. No es un índice válido en las proctitis, ni da un valor cuantitativo a la actividad, pero se recomienda su uso a la hora de plantearse el ingreso de los pacientes, y se basan las clasificaciones de actividad de la CU de Montreal, de la *European Crohn's and Colitis Organization* (ECCO) y del *American College of Gastroenterology* (ACG).

El índice de Truelove-Wits se ha modificado de forma semicuantitativa (tabla 1) de manera que resulte útil también para identificar la necesidad de ingreso. En general cualquier paciente con seis o más deposiciones con sangre al día asociado a cualquier signo de toxicidad sistémica (pulso > 90lpm, temperatura > 37.8°C, hemoglobina < 10.5g/l, VSG > 30mm/h, o PCR > 30mg/l) debería ser considerado de brote grave e ingresar para tratamiento intravenoso<sup>127</sup>.

Tabla 4. Índice de Truelove-Witts modificado.

PUNTUACION	3 PUNTOS	2 PUNTOS	1 PUNTO
Nº DEPOSICIONES	> 6	4-6	< 4
SANGRE	+ /+++	+	-
HEMOGLOBINA	< 10	10-14	> 14
ALBÚMINA (g/l)	< 30	30-32	> 33
FIEBRE (°C)	> 38	37-38	< 37
TAQUICARDIA	> 100	80-100	< 80
VSG	> 30	15-30	< 15
LEUCOCITOS	> 13.000	10.000-13.000	< 10.000

Inactivo < 11; Brote leve 11-15; Brote moderado 16-20; Brote grave > 20.

- Índice de Seo: Se basa en síntomas y datos de laboratorio: número de deposiciones, sangre en las heces, albúmina, hemoglobina y VSG con cálculo más complejo.
- Índice de Lichtiger: Son útiles en pacientes graves, diseñado para valorar la respuesta al tratamiento con ciclosporina en el brote grave refractario a corticoides. Entre sus variables incluyen el dolor abdominal, los datos de peritonismo y dilatación colónica<sup>128</sup>.
- Índice de la clínica Mayo o UCDAI (Ulcerative Colitis Disease Activity Index): es un índice mixto, elaborado por un conjunto de datos clínicos y endoscópicos, que incluyen el número de deposiciones, la cantidad de sangre en las heces y la actividad endoscópica, así como la valoración global del médico y su relevancia reside en que ha sido utilizado en múltiples ensayos clínicos. El índice de Mayo predice la corticorrefractariedad de un brote grave de CU en caso de no existir mejoría a los 3 y 5 días del inicio del tratamiento. Este índice se utiliza en numerosos trabajos en los que se valora la respuesta a tratamientos, pero empleando puntuaciones distintas y más o menos estrictas para definir la respuesta clínica, la remisión clínica o endoscópica.

La respuesta completa se considera cuando se obtiene una puntuación de 0 en todos los ítems, aunque el índice ha sido adaptado para distintos estudios. La remisión clínica se definió en varios ensayos como una puntuación total  $\leq$  de 2 puntos sin ninguna puntuación de cada ítem  $> 1$ , la respuesta parcial se consideró en caso de un descenso  $\geq 3$  puntos en la puntuación total y un descenso mayor al 30% inicial, con un descenso de al menos 1 punto en el sangrado rectal o una puntuación de 0 o 1.

Tabla 5. Índice de Mayo<sup>127</sup>.

*Si se utiliza el índice de Mayo parcial (sin la puntuación endoscópica) se asume:*

Parámetro	Puntos	Subtotal		
1. FRECUENCIA DE DEPOSICIONES		=.....		
normal para el paciente	0			
1-2 más que lo habitual	1			
3-4 más que lo habitual	2			
> 5 más de lo habitual	3			
2. HEMORRAGIA RECTAL		=.....		
Ninguna	0			
Algunas trazas de sangre	1			
Sangre evidente en la mayoría de las deposiciones	2			
Sólo sangre	3			
3. HALLAZGOS SIGMOIDOSCÓPICOS		=.....		
Normal o enfermedad inactiva	0			
Eritema, leve friabilidad	1			
Eritema marcado, friabilidad evidente	2			
Hemorragia espontánea	3			
4. EVALUACIÓN GLOBAL DEL MÉDICO		=.....		
Normal	0			
Enfermedad leve	1			
Enfermedad moderada	2			
Enfermedad grave	3			
Valoración Global Índice De Mayo	Síntomas	Endoscopia	Médico	Suma total
Leve	1-3	1	1	3 a 5
Moderado	3-6	1-2	2	6 a 10
Grave	> 6	> 2	3	> 10

*Remisión: 0-1; Leve: 2-4; Moderada: 5-6; Severa: 7-9.*

En ensayos clínicos también se ha empleado este índice sin incluir la puntuación endoscópica, denominado índice de Mayo parcial, con una buena correlación con el índice completo y con la percepción de los pacientes sobre la respuesta al tratamiento. Así se utiliza para definir respuesta con una reducción del Mayo parcial  $\geq 3$  puntos o remisión clínica para un Mayo parcial  $\leq 2$  puntos. Ni el índice ni las deficiones de respuesta o remisión han sido totalmente validadas, por lo que un mayor refinamiento y validación de estos índices deberán garantizarse para lograr una eficiencia óptima en la investigación de CU<sup>129</sup>.

También existen índices exclusivamente endoscópicos, que permiten valorar y cuantificar la mejoría o la curación mucosa y son útiles para unificar criterios de interpretación en la endoscopia. No se utilizan en la práctica clínica habitual, su mayor utilidad se adquiere en el contexto de ensayos clínicos. Entre ellos los más utilizados en los ensayos o en la práctica son:

- Subíndice endoscópico de Mayo (MES): introducido por primera vez como un componente del Índice de Actividad Clínica de Mayo. El MES proporciona una puntuación de 0 a 3 basada en cuatro descriptores de la mucosa, que incluyen eritema, friabilidad, patrón vascular y erosiones o ulceración. Así se establece (0): enfermedad inactiva (mucosa normal), (1): enfermedad leve (eritema y friabilidad), (2): enfermedad moderada (eritema marcada, ausencia de patrón vascular, friabilidad, erosiones), (3): enfermedad grave (sangrado espontáneo, presencia de úlceras) (Tabla 6). Aunque aún no ha sido validado, el MES se ha utilizado ampliamente en ensayos clínicos y en la práctica habitual debido a su facilidad de uso. Con una puntuación de 0 se logra el objetivo de curación mucosa<sup>130</sup>.

Tabla 6: Subíndice endoscópico de Mayo.

Mayo 0	Mucosa normal
Mayo 1	Eritema y granularidad leve, leve disminución de patrón vascular submucoso
Mayo 2	Eritema franco, friabilidad, sangramiento al contacto, patrón vascular ausente
Mayo 3	Úlceras y sangrado espontáneo

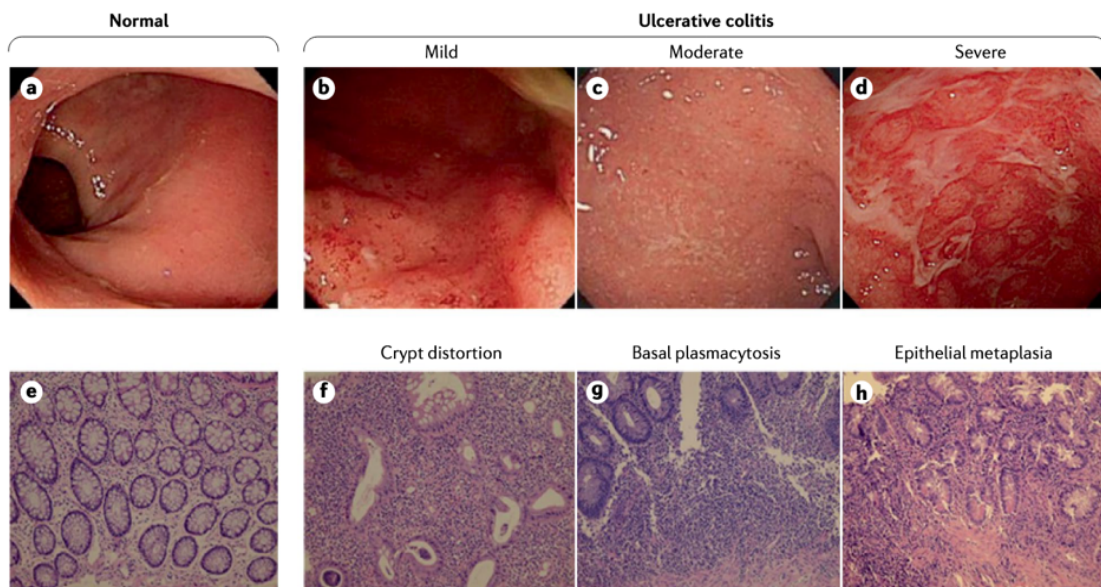


Figura 6: Subíndice endoscópico de Mayo. *Extraído de Kobayashi et al*<sup>131</sup>.

(a) Puntuación 0 = normal; remisión endoscópica. (b) Puntuación 1=leve; eritema, patrón vascular disminuido, friabilidad leve. (c) Puntuación 2=moderada; eritema marcado, ausencia de patrón vascular, friabilidad, erosiones. (d) Puntuación 3=grave; ulceración, hemorragia espontánea. (e-h) hallazgos histológicos.

- Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS), es un sistema de puntuación validado más recientemente, que emplea la suma de las puntuaciones de tres descriptores de la mucosa, incluido el patrón vascular (puntuación de 0 a 2), sangrado (puntuación de 0 a 3), y erosión/úlceras (puntuación de 0 a 3) (Figura7). Cada puntuación refleja la lesión más grave; por lo tanto, no se puede determinar la participación microscópica. Este sistema se puede aplicar fácilmente en la práctica y los ensayos clínicos de rutina, aunque se ha informado una concordancia

interobservador moderada. En comparación con MES, el sistema de puntuación UCEIS es más objetivo, tiene más especificidad, y tiene mejor sensibilidad para la actividad de la enfermedad de la CU. Aunque cada estudio utiliza sus propias definiciones, no existe una definición validada de remisión endoscópica o criterios para categorizar la CU leve, moderada y grave en el sistema UCEIS<sup>132,133</sup>.

Descriptor	Puntaje	Definición
Patrón vascular	Normal 0 puntos	Patrón vascular normal con arborización de capilares cuyos bordes están claramente definidos o levemente borrosos
	Pérdida del patrón en parches 1 punto	Pérdida irregular o en parches de la visualización del patrón vascular
	Pérdida completa del patrón 2 puntos	Pérdida completa de la visualización del patrón vascular
Sangrado	Sin sangrado 0 puntos	No hay sangre visible
	Mucoso 1 puntos	Algunos puntos o líneas de sangre coagulada sobre la mucosa, la que puede ser lavada
	Luminal leve 2 puntos	Escasa sangre líquida libre en el lumen
	Luminal moderado o grave 3 puntos	Sangre líquida franca en el lumen o sangrado espontáneo desde una mucosa hemorrágica después de lavar el lumen
Erosiones y úlceras	Sin lesiones 0 puntos	Mucosa normal
	Erosiones 1 punto	Pequeños defectos de continuidad de la mucosa (< 5 mm), de color blanco o amarillo, de bordes planos
	Úlcera superficial 2 puntos	Defectos de continuidad de la mucosa > 5 mm, correspondientes a pequeñas úlceras cubiertas por fibrina
	Úlcera profunda 3 puntos	Defectos excavados de continuidad de la mucosa, correspondientes a úlceras más profundas y de bordes levemente elevados



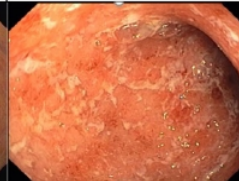
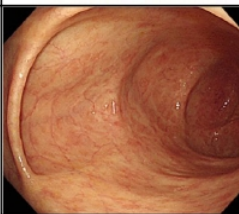






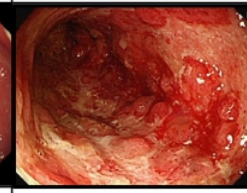
Score	0	1	2	3	
Patrón Vascular					
	Normal	Patchy obliteration	Obliterated		
Sangrado					
	No visible blood	Mucosal	Luminal mild	Luminal moderate	
	Erosiones y úlceras				
		No visible erosion	Erosions	Superficial ulcer	Deep ulcer

Figura 7. Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS):  
Puntuación entre 0 y 8 puntos. Remisión de 0 a 1 punto. Extraído de KO Kim<sup>34</sup>



- **Índices histológicos:** La correlación de los índices histológicos con los clínicos y endoscópicos es discreta, de hecho, la ausencia de lesiones mucosa en la endoscopia (curación mucosa), no refleja una ausencia histológica de inflamación. La inflamación histológica persistente, aguda o crónica, se ha asociado con mayores tasas de reagudización, hospitalización, colectomía y riesgo de neoplasia colorrectal. Los dos más empleados son el índice de Ryely y el índice de Geboes.

Los índices cuantitativos mixtos como el UCDAI, o endoscópicos como el MES o el UCEIS, son especialmente útiles en el contexto de ensayos clínicos controlados, para definir la inclusión de pacientes y para establecer el concepto de recidiva, remisión y éxito terapéutico. La correlación entre los índices clínicos y endoscópicos en la colitis ulcerosa es buena. La remisión clínica se acompaña de remisión endoscópica en más del 70% de los casos y el riesgo de recidiva clínica disminuye cuando existe curación endoscópica. Para considerar la curación endoscópica como objetivo terapéutico, actualmente se recomienda una puntuación de 0 empleando UCEIS. No obstante, el índice endoscópico de Mayo es el más utilizado en los ensayos clínicos, generalmente se considera curación de las lesiones una puntuación endoscópica de 0 o 1, si bien una puntuación de 0 ofrece más beneficios clínicos a largo plazo, como sería la remisión<sup>135</sup>.



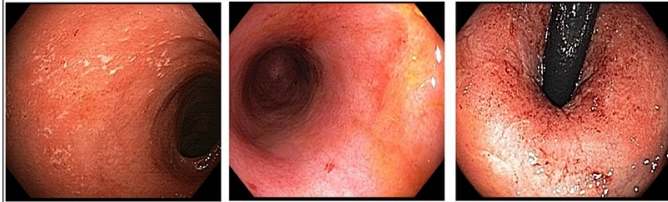

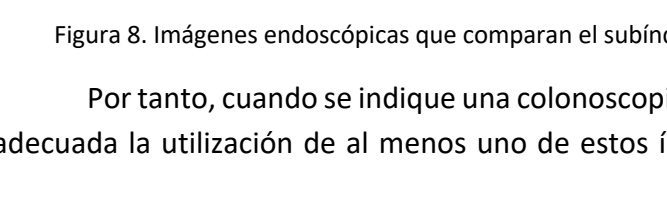
			UCEIS Score	Mayo Score	Endoscopic Features
			0	0	Normal
			1-3	1	Erythema, decreased vascular pattern, mild friability
			4-6	2	Marked erythema, absent vascular pattern, friability, erosions
			7-8	3	Spontaneous bleeding, ulceration

Figura 8. Imágenes endoscópicas que comparan el subíndice endoscópico de Mayo y el UCEIS<sup>136</sup>

Por tanto, cuando se indique una colonoscopia en la colitis ulcerosa, se considera adecuada la utilización de al menos uno de estos índices endoscópicos o mixtos. Son

sencillos de aplicar y resultan especialmente útiles porque permiten unificar criterios de interpretación, y nos aportan una información integrada para la ayuda en la toma de decisiones terapéuticas.

### 1.7. OPCIONES TERAPÉUTICAS

Se considera que no existe en la actualidad un tratamiento curativo para la CU. Por ello, el principal objetivo de los tratamientos para la CU es inducir la remisión y, una vez conseguida, mantener la remisión clínica en un escenario libre de corticoides, evitando recidivas y consiguiendo la curación de la mucosa. Adicionalmente son objetivos igualmente importantes proporcionar un alivio sintomático, mantener un estado de nutrición apropiado y conseguir una calidad de vida lo más cercana posible a la de una persona sana y, procurando evitar cirugías innecesarias.

La elección del tratamiento va a depender, en gran medida, de factores como el grado de actividad inflamatoria, la extensión y localización, el patrón evolutivo, las complicaciones locales o extraintestinales, la aparición de efectos adversos y la relación coste-efectividad. Así, a la estrategia clásica de ir incrementando el nivel de fármacos antiinflamatorios o inmunomoduladores según la gravedad clínica e histológica de la enfermedad (“step-up”), se ha añadido la estrategia denominada “top-down”, con cambios y adaptaciones según la respuesta del paciente en un intento de modificar la historia natural de la enfermedad. Dicha estrategia se basa en el uso precoz de fármacos inmunomoduladores y biológicos con el fin de prevenir consecuencias irreversibles, reducir la necesidad de cirugía y mantener una calidad de vida aceptable desde el primer brote de la enfermedad.

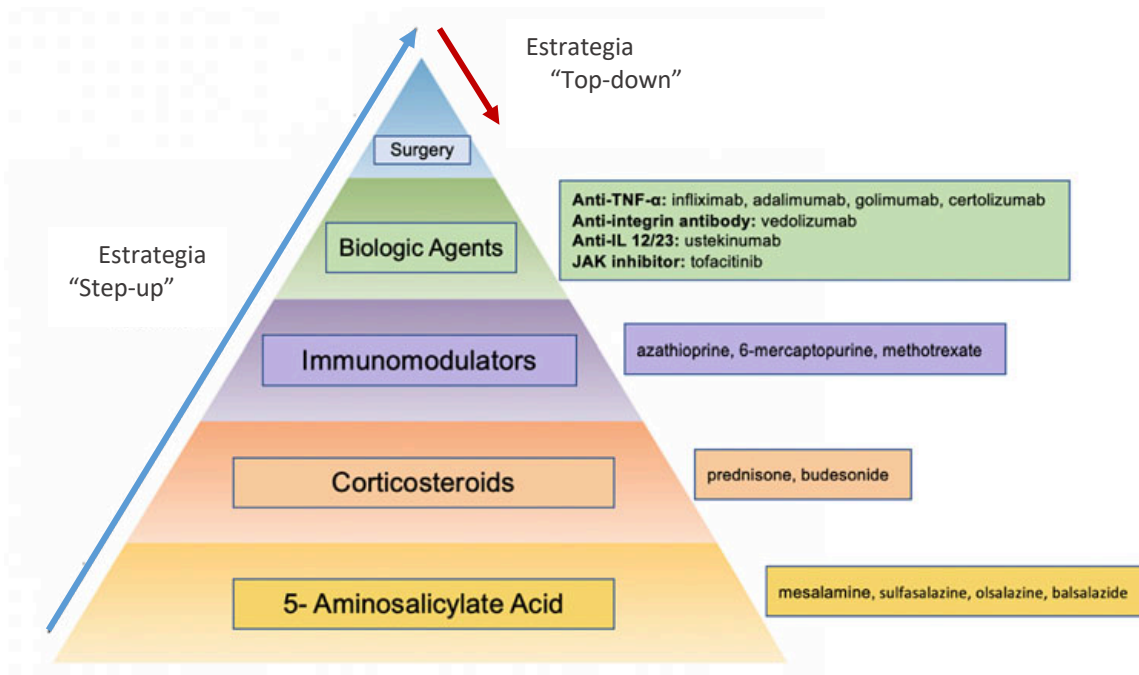


Figura 9. Estrategias terapéuticas en EII. Adaptado de Aoli et al<sup>137</sup>

Los fármacos más utilizados incluyen los salicilatos, corticoides, inmunomoduladores y las terapias biológicas, de manera que el abordaje quirúrgico se reserva para casos de difícil control o con recurrencias frecuentes. Sin embargo, continúa habiendo muchas incógnitas en cuanto al mecanismo de acción de los fármacos con los que contamos en el momento actual. En los últimos años se ha avanzado hacia la caracterización de sus efectos, con la modulación de vías de señalización inmunorreguladora que a menudo están vinculados directa o indirectamente a la autofagia<sup>138</sup>.

En función del objetivo, distinguimos entre una terapia de inducción de la remisión o bien de mantenimiento. Los tratamientos convencionales utilizados en inducción de la remisión clínica son aminosalicilatos y esteroides; mientras que se recurre a los inmunomoduladores para el mantenimiento, con el propósito a conseguir de la desaparición de las lesiones mucosas. Es lo que se ha llamado “cicatrización mucosa”, siendo ahora uno de los objetivos primarios de los estudios terapéuticos y comienza a serlo también en la práctica clínica. El mantenimiento de la remisión clínica se ha asociado a la reducción de tasas de hospitalización y de resección quirúrgica, así como a la consecuente disminución en el consumo de recursos sanitarios.

### **1.7.1. Salicilatos**

Los aminosalicilatos son el tratamiento de primera línea en la inducción y el mantenimiento de la colitis ulcerosa, habiendo también demostrado ser eficaces en la profilaxis del desarrollo de carcinoma colorrectal en los pacientes con EII y afectación colónica. El primer aminosalicilato empleado en el tratamiento de la CU fue la sulfasalazina, un medicamento que contiene en su estructura molecular dos principios activos que son la sulfapiridina y el ácido 5-aminosalicílico (5-ASA o mesalazina), donde el componente activo y responsable de la actividad antiinflamatoria es la mesalazina. La sulfapiridina actúa como un transportador y es el responsable de los efectos adversos.

Los 5-ASA presentan efectos antiinflamatorios a través de la regulación de sistemas antioxidantes; la inhibición de la motilidad leucocitaria, la activación de leucotrienos y plaquetas; además de ejercer un potente efecto inhibitorio sobre la activación de NFκB, TNFα, IL-1 y TGFβ; la formación de óxido nítrico y la prevención de daño mitocondrial. Muchas de estas actividades podrían afectar directa o indirectamente a la autofagia. El 5-ASA por sí solo, administrado por vía oral, es inactivo, ya que se ve afectado por el pH ácido del estómago y no llega al intestino, que es el sitio de acción. Es por ello que se han desarrollado diversos preparados y sistemas de liberación controlada. Podemos distinguir dos tipos de moléculas: por un lado los profármacos, que consisten en distintos dímeros entre el ácido 5-ASA y diferentes portadores inertes que impiden la absorción en tramos proximales del tubo digestivo;

y, por otro lado, las formulaciones de liberación controlada, en las que el 5-ASA está protegido por una resina acrílica en combinación con un buffer de bicarbonato que se desintegra solamnete a pH superior a 6 o 7, permitiendo liberar el fármaco bien desde ileon distal o en el colon, respectivamente. La eficacia del tratamiento parece ser directamente proporcional a la dosis empleada. También se ha observado que el 5-ASA administrado por vía oral presenta concentraciones rectales inferiores a las del colon derecho, a excepción de las formulaciones con matrix de resina, por lo que la opción de aplicar tratamiento tópico en forma de supositorios, espumas o enemas rectales permite alcanzar concentraciones elevadas de 5-ASA en la mucosa colónica distal<sup>139</sup>.

Tabla 7. Formulaciones y presentaciones de 5-ASA orales y tópicas.

<b>Formulación</b>	<b>Presentación</b>	<b>Liberación a pH</b>	<b>Lugar de liberación</b>
<i>Eudragit-L</i>	<i>Claversal® comp</i>	> 6	<i>Yeyuno-Ileon y colon</i>
<i>Eudragit-S</i>	<i>Asacol® comp</i> <i>Lixacol® comp</i>	> 7	<i>Ileon terminal-colon</i>
<i>Microgránulos etilcelulosa</i>	<i>Pentasa® granulado</i>	<i>No depende</i>	<i>Todo el tubo</i>
<i>Eudragit-L con matriz granular</i>	<i>Salofalk® granulado</i>	> 6	<i>Yeyuno distal-colon</i>
<i>Eudragit-S con multimatrical</i>	<i>Mezavant® comp</i>	> 7	<i>Ileon terminal-colon</i>
<i>Supositorio</i>	<i>Claversal® Salofalk®</i>	<i>No depende</i>	<i>Recto</i>
<i>Espuma Rectal</i>	<i>Claversal® Salofalk®</i>	<i>No depende</i>	<i>Recto-sigma</i>
<i>Suspensión Rectal</i>	<i>Salofalk®</i> <i>Pentasa®</i>	<i>No depende</i>	<i>Recto-sigma-colon descendente</i>

- Vía oral: 5-ASA para la inducción de la remisión del paciente con brote leve-moderado de CU a dosis mínima de 2,4 g/día y probablemente óptima superior a 3 g/día en dosis única diaria para favorecer el cumplimiento terapéutico. Para el mantenimiento de la remisión la dosis mínima efectiva es 1 g/día, aunque es preferible usar 2 g/día. La mayoría de pacientes responden a dosis de 2-3 g y dosis mayores se utilizan en pacientes con sintomatología más grave o si no responden inicialmente a una dosis menor.

- Vía rectal: 5-ASA (en todos los pacientes con brotes, sea cual sea su extensión): supositorios en proctitis, espuma en rectosigmoiditis y enemas en colitis izquierda o extensa; dosis mínima de 1 g/día para inducción de remisión y de 1 g, 2 ó 3 veces por semana para el mantenimiento de la misma.

La mesalazina tiene un perfil de seguridad favorable. Sus efectos secundarios son raros, pudiendo producir cuadros por hipersensibilidad (neumonitis, miocarditis), y nefritis intersticial. En pacientes con insuficiencia renal previa, comorbilidad relevante o cotratamiento con fármacos nefrotóxicos, se recomienda control periódico analítico de función renal.

### **1.7.2. Corticoides**

Son fármacos de primera línea para el control de los brotes moderados-graves de los pacientes con EI. Son, probablemente, los medicamentos que más remisiones han inducido en las fases agudas de la EI y que, al mismo tiempo, más efectos secundarios han producido por prolongar indevidamente su uso, ya que nunca se deben usar como terapia de mantenimiento. El mecanismo de acción de los corticoides es multifactorial: bloquea la vía del ácido araquidónico mediante la inhibición de la fosfolipasa A2, actúa inhibiendo la función leucocitaria y de citoquinas proinflamatorias y se ha descrito además que la vía mTORC1 de la autofagia tendría un papel importante en la respuesta al tratamiento con corticosteroides.

En los pacientes con brote grave de CU se ha demostrado que reducen la mortalidad, por lo que será de vital importancia evaluar la respuesta al tratamiento a los 3-5 días desde el inicio, ya que el grado de respuesta precoz predice el riesgo de colectomía. Podemos utilizar corticoides orales (prednisona 1 mg/kg/día o equivalente) en el brote moderado de ambas entidades y en el brote leve de CU que no responde adecuadamente a aminosalicilatos. En el brote grave se empleará la vía intravenosa (6-metilprednisolona en dosis equivalente a 1mg/kg/día de prednisona).

Como alternativa a los corticoides tradicionales, se desarrollaron nuevas moléculas que proporcionan la acción esteroidea en localizaciones intestinales concretas y que presentan un efecto de primer paso hepático muy importante, con lo que disminuye su paso a circulación sistémica: budesonida y dipropionato de beclometasona. Éste último puede emplearse a dosis 5-10 mg/día en CU distal de leve a moderada como terapia añadida a 5-ASA en pacientes que no responden adecuadamente. Los corticoides tópicos se utilizan en la actualidad como segunda línea terapéutica en la proctitis y en la CU izquierda, siendo la mesalazina tópica de elección.

El comportamiento de la enfermedad ante el tratamiento con corticoides muestra dos perfiles de pacientes definidos. Se estima que entre 10-30% de los pacientes son corticorretractarios y entre 20-30% de los pacientes desarrollarán corticodependencia. Estas situaciones de corticorretractariedad y corticodependencia durante la inducción de la remisión son indicación de tratamiento inmunosupresor, biológico o quirúrgico<sup>140</sup>.

### **1.7.3. Inmunomoduladores**

Existen tres familias diferentes de fármacos inmunomoduladores: tiopurinas (azatioprina y mercaptopurina); metotrexato y calcineurínicos (ciclosporina (CsA) y tacrolimus). De los diversos inmunomoduladores, los más usados en CU son azatioprina

y 6-mercaptopurina, análogos de las purinas que interfieren con el metabolismo de los ácidos nucleicos y ejercen efectos tóxicos sobre las células linfoides.

Las indicaciones principales de las tiopurinas en CU son el mantenimiento de la remisión en la enfermedad corticodependiente o corticorrefractaria, el mantenimiento de la remisión tras el control de un brote grave de CU con ciclosporina o en terapia combinada con fármacos biológicos en pacientes graves, como recoge *el consenso elaborado por la Organización Europea de Crohn y Colitis (ECCO)*<sup>140</sup>.

La dosis adecuada es de 2,5 mg/kg/día para azatioprina y de 1,5 mg/kg/día para mercaptopurina. Algunos autores recomiendan utilizar dosis inferiores en pacientes con actividad intermedia de la Tiopurina Metiltransferasa (TPMT). Esta es la principal responsable de la formación de nucleótidos de 6-tioguanina (6-TGN), metabolitos responsables de la mielotoxicidad de las tiopurinas pero también de su efecto inmunomodulador terapéutico. Tienen un inicio de acción lento, por lo que no serán de utilidad para inducir la remisión durante un brote. Por ello, se recomienda esperar hasta 6 meses para asumir que el tratamiento no es efectivo. Se calcula que un 30-40% de los pacientes no responden a tiopurinas y un 10-20% no toleran el tratamiento.

Aproximadamente, el 17% de los pacientes tienen que retirar el tratamiento debido a efectos adversos. Algunos son idiosincrásicos, independientes de la dosis como intolerancia digestiva, pancreatitis, fiebre, artralgias, mialgias, exantema y algunos casos de hepatotoxicidad; y otros efectos adversos son dosis-dependientes como la mielotoxicidad o hepatotoxicidad, que puede ser mixta.

Es posible la monitorización de metabolitos en el seguimiento mediante determinaciones de la concentración de 6-TGN y 6-metilmercaptopurina (6-MMP) en sangre, lo que permite identificar a los sujetos hipermetiladores, así como detectar la infradosificación y la falta de cumplimiento. Algunas sociedades científicas como la European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO) se contempla su utilización durante el tratamiento con tiopurinas. Se podría decir que los niveles de 6-TGN pueden ayudar a predecir la respuesta al tratamiento y la toxicidad ya que se han identificado valores a partir de los cuales un mayor porcentaje de pacientes alcanza el objetivo terapéutico o padece mielotoxicidad. La monitorización podría ser útil en las situaciones que se muestran en la siguiente tabla 8.

Los inhibidores de la calcineurina (CsA y tacrolimus) se incluirían junto con los biológicos y cirugía entre las opciones terapéuticas en los brotes de CU grave corticorefractaria. La estrategia terapéutica más adecuada en dicho contexto debe proponerse dependiendo de la edad, comorbilidades, tratamiento previo con AZA o 6-MP, o curso previo de la enfermedad. Aunque no existe indicación de la CsA para el

tratamiento de la EII, sin embargo, constituyó el único tratamiento alternativo a la colectomía en la CU corticorrefractaria en la década de los años 90, antes de la aprobación de infliximab. Actualmente, su principal indicación sigue siendo la CU corticorrefractaria, particularmente en pacientes naïve a tiopurinas o en aquellos con infección tuberculosa latente<sup>141</sup>. Se dispone de menor evidencia para el uso del tacrolimus, aunque existen algunos datos que le atribuyen cierta eficacia en la enfermedad de Crohn perianal. La CsA se emplea normalmente a dosis de 2mg/kg/día, ajustándose para alcanzar niveles entre 200-400ng/ml. El tacrolimus también se emplea a dosis entre 0,1-0,2mg/kg vía oral con tasas de respuesta de entre 60-80%, similares a CsA<sup>142</sup>.

Tabla 8. Monitorización de tiopurinas. *Extraído de Bermejo et al<sup>143</sup>.*

PACIENTE EN TRATAMIENTO CON TIOPURINAS Y RESPUESTA INSUFICIENTE O TOXICIDAD INTERPRETACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE NIVELES DE METABOLITOS DE TIOPURINAS.					
CAUSA	FALTA DE CUMPLIMIENTO	INFRADOSIFICACIÓN	HIPERMETILADOR (POR LO GENERAL, TPMT ALTA)	REFRACTARIEDAD AUTÉNTICA	ACTIVIDAD TMPT BAJA O NULA
NIVEL DE 6TGN	BAJO O INDETECTABLE	BAJO (<230)	BAJO (<230)	TERAPÉUTICO (230-400) O ALTO (>400)	ALTO (>400)
NIVEL DE 6MMP	BAJO O INDETECTABLE	BAJO O NORMAL	ALTO (>5700)	NORMAL O ALTO (>5700)	BAJO (<5700)
RIESGOS	MAL CONTROL DE LA ENFERMEDAD	MAL CONTROL DE LA ENFERMEDAD	HEPATOTOXICIDAD MAL CONTROL DE LA ENFERMEDAD	HEPATOTOXICIDAD MIELOTOXICIDAD MAL CONTROL DE LA ENFERMEDAD	MIELOTOXICIDAD
RECOMENDACIÓN	EDUCACIÓN	AUMENTO DE DOSIS	COTRATAMIENTO CONALOPURINOL	CAMBIO DE TRATAMIENTO	REDUCIR DOSIS AL 50% O CAMBIO DE TRATAMIENTO

Unidades: pmol/8 x 10<sup>8</sup> GR

#### 1.7.4. Biológicos

Desde finales de los años 90 los fármacos biológicos han revolucionado el tratamiento de los pacientes con EII, ya que han permitido cambiar el objetivo terapéutico, pasando del mero control de los síntomas a la cicatrización de las lesiones endoscópicas. Estos fármacos no solo inducen la remisión clínica, sino que mantienen esta a largo plazo, disminuyendo la aparición de complicaciones y la necesidad de hospitalizaciones y cirugías, lo que en definitiva mejora el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes.

Son anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas específicas implicados en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria crónica. En la EII se emplean principalmente anticuerpos frente al factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) (infliximab, adalimumab, golimumab), además de otros más recientes dirigidos contra otras dianas, como las integrinas (vedolizumab) o interleucina IL-12/23 (ustekinumab).

Para la selección del fármaco biológico no se dispone de datos de ensayos clínicos comparativos directos entre ellos y las comparaciones indirectas son complejas por las diferencias en el diseño de los trabajos. Algunas revisiones sistemáticas o metaanálisis informaron de diferencias de eficacia inconsistentes en la enfermedad de Crohn y de una posible superioridad de infliximab en comparación con otros agentes anti-TNF en la fase de inducción del tratamiento de la CU. No se han informado diferencias significativas en el perfil de seguridad, aunque el aumento de la inmunogenicidad de infliximab aumenta potencialmente la necesidad de la prescripción conjunta de un inmunomodulador, con las consecuencias que de ello se derivan. La terapia combinada que usa azatioprina con infliximab tiene un efecto sinérgico, con evidencia de beneficio en el aumento de los niveles de infliximab y la reducción de la formación de anticuerpos contra infliximab, incluso en pacientes que han fallado previamente a la monoterapia con tiopurinas.

Los anti-TNF son anticuerpos dirigidos frente al factor de necrosis tumoral, TNF $\alpha$ , una citoquina proinflamatoria e inmunoreguladora producida por macrófagos, linfocitos T activados, monocitos y mastocitos de la mucosa intestinal. Han probado su utilidad en CU activa, de moderada a grave, en pacientes adultos que han presentado una respuesta inadecuada al tratamiento convencional, que incluye corticoides y azatioprina (AZA) o 6-mercaptopurina (6-MP), que sean intolerantes o presenten contraindicaciones médicas a dichos tratamientos, para inducir remisión, respuesta clínica, fomentar la cicatrización mucosa y reducir la necesidad de colectomía a corto plazo<sup>140</sup>.

Infliximab se administra vía perfusión intravenosa, con una dosis de inducción de 5mg/kg, repetida a las 2 y 6 semanas, y cada 8 semanas para mantenimiento, en ambas formas de EII. Los efectos adversos como reacciones agudas a la perfusión ocurren en aproximadamente el 10% de los pacientes tratados con infliximab y pueden incluir fiebre o escalofríos (3%), reacciones cardiopulmonares como dolor torácico o disnea (1%) y prurito o urticaria sola o combinada con reacciones cardiopulmonares (1%). En menos del 1% de los pacientes se producen reacciones graves a la perfusión, como anafilaxia, convulsiones, erupción eritematosa e hipotensión. Con los inhibidores del TNF administrados por vía subcutánea (adalimumab y golimumab) se han informado reacciones en el lugar de la inyección y también reacciones anafilácticas<sup>136</sup>.

Vedolizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une de forma específica a la integrina  $\alpha 4\beta 7$ , que se expresa mayoritariamente en linfocitos T colaboradores que migran al intestino. Mediante la unión a  $\alpha 4\beta 7$  de ciertos linfocitos, vedolizumab inhibe la adhesión de estas células a la molécula de adhesión celular adesina de la mucosa 1 (MadCAM-1). MadCAM-1 se expresa de manera principal en las células endoteliales del intestino y juega un papel crítico en la migración de los linfocitos T a los tejidos del tubo gastrointestinal.



Vedolizumab ha demostrado eficacia tanto en la inducción a la remisión como en el mantenimiento de la misma en pacientes con o sin experiencia previa a fármacos anti-TNFs. En CU, el estudio Varsity mostró la superioridad de vedolizumab frente a adalimumab en la remisión clínica<sup>110</sup>. En EC carecemos de estudios comparativos publicados. Cuenta con la ventaja de la inmunosupresión intestinal específica que puede resultar especialmente atractiva en pacientes mayores donde la infección y el cáncer preocupan de un modo especial. Además, no altera la respuesta inmune a los antígenos administrados por vía parenteral, aunque sí afecta la respuesta a las vacunas administradas por vía oral. Las reacciones adversas notificadas de forma más común son infecciones (como nasofaringitis, infección del tracto respiratorio superior, bronquitis, gripe y sinusitis), dolor de cabeza, náuseas, pirexia, fatiga, tos y artralgias.

Ustekinumab es un anticuerpo monoclonal IgG1κ totalmente humano que se une con especificidad a la subunidad proteica p40 que comparten las citocinas interleukinas humanas (IL)-12 e IL-23. Ustekinumab inhibe la bioactividad de la IL-12 y la IL-23 humanas al impedir la unión de p40 a la proteína receptora IL-12RB1, expresada en la superficie de las células inmunitarias. La IL-12 y la IL-23 son citocinas heterodímeras secretadas por las células presentadoras de antígenos activadas, como los macrófagos y las células dendríticas, y ambas citoquinas participan en funciones inmunitarias; la IL-12 estimula las células natural Killer y conduce a la diferenciación de células T CD4+ a las células con fenotipo Th1, la IL-23 induce la vía Th17. Debido a la unión de ustekinumab a la subunidad p40 que comparten la IL-12 y la IL-23, se interrumpen las vías de las citoquinas Th1 y Th17, que son centrales en la patología de la EII.

En CU, el ensayo UNIFI investigó el uso de ustekinumab como terapia de inducción y mantenimiento en la CU moderada a severamente activa en adultos que no respondieron o no toleraron los corticosteroides, inmunomoduladores, terapia anti-TNF (uno o más) o vedolizumab<sup>140</sup>, aportando un inicio de acción más rápido que vedolizumab, la remisión clínica en la semana 8 se logró en 15.5% y las tasas de remisión de la semana 44 del 38.4% - 43.8%. Las reacciones adversas más frecuentes (> 5%) en los estudios clínicos con ustekinumab fueron nasofaringitis y cefalea<sup>144</sup>.

#### **1.7.5. Nuevas moléculas pequeñas**

Tofacitinib, a diferencia de los otros nuevos tratamientos, es una molécula pequeña de síntesis química que se administra vía oral, lo cual supone un agran ventaja. Tofacitinib es un inhibidor potente y selectivo de la familia de las JAK que inhibe JAK1, JAK2, JAK3 y, en menor medida, TyK2. La inhibición de JAK1 y JAK3 por tofacitinib atenúa las señales de transducción activadas por las interleucinas (IL-2, -4, -6, -7, -9, -15 y -21) y los interferones de tipo I y II, lo que da lugar a la modulación de la respuesta inmune

e inflamatoria. Por lo tanto, su mecanismo de acción en la CU consiste en la inhibición de varias citocinas que están relacionadas con la patogenia de la enfermedad<sup>145</sup>.

Tofacitinib se utiliza en la inducción y en el mantenimiento de pacientes con CU activa de moderada a grave que han tenido una respuesta insuficiente, una pérdida de respuesta o han sido intolerantes al tratamiento convencional o a un medicamento biológico. El perfil de efectos adversos de tofacitinib es similar al de los inmunosupresores y biológicos utilizados para el tratamiento de la CU, a excepción de la incidencia de herpes zóster, con una incidencia ligeramente superior. El protocolo prebiológico debe de hacerse de rutina también en su caso y precisa monitorización periódica ya que las reacciones adversas notificadas con más frecuencia en pacientes que estaban tomando tofacitinib en los estudios fueron dolor de cabeza, náuseas, anemia, hipertensión arterial, hipercolesterolemia, mialgias y artralgias. Tofacitinib debe utilizarse con precaución en pacientes con factores de riesgo de tromboembolismo venoso.

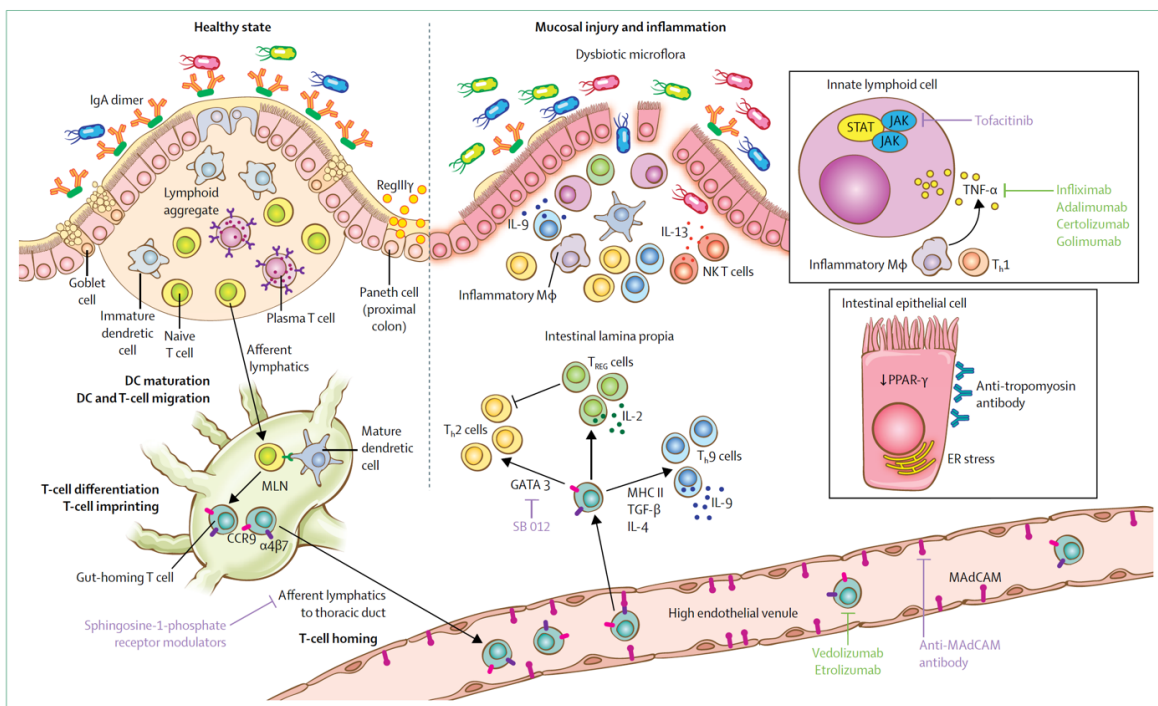


Figura 10. Dianas terapéuticas probadas o prometedoras en la Colitis Ulcerosa. *Extraído de Ungaro et al* <sup>2</sup>.

### 1.7.6. Cirugía

Aunque la base del tratamiento de la CU es farmacológico, en el transcurso de la enfermedad alrededor de un 25% de los pacientes van a precisar cirugía, y de estos, el 50% serán intervenidos en los primeros 10 años desde el comienzo de su enfermedad. La cirugía urgente está indicada en los pacientes con brote CU grave que no responden al tratamiento médico intensivo o en situaciones que suponen un riesgo vital como el megacolon tóxico, hemorragia masiva o perforación. Las indicaciones más frecuentes de

cirugía electiva son la refractariedad al tratamiento con corticoides intravenosos y a terapias de rescate como anti-TNF o CsA, la intolerancia al tratamiento de mantenimiento a largo plazo y la aparición de displasia o cáncer colorrectal. Aunque la mortalidad está asociada a los brotes graves, ésta ha disminuido a menos del 1% en las últimas décadas. Hay que tener en cuenta que un retraso en la cirugía puede aumentar el riesgo postoperatorio de complicaciones y las tasas de mortalidad <sup>146</sup>.

La intervención de elección es la proctocolectomía restauradora con reservorio ileoanal. Una alternativa es la proctocolectomía con ileostomía definitiva (menos de un 5% de las intervenciones por CU) a los pacientes que no quieren realizarse un reservorio y a aquellos con riesgo de fallo del reservorio (mala función esfinteriana, enfermedad anoperineal previa y comorbilidades importantes). La anastomosis ileorrectal en los casos en los que el recto esté lo suficientemente conservado es una opción que, individualmente, puede contemplarse. Su mayor ventaja es que se evitan los problemas de la proctectomía, como son la disfunción urinaria y sexual, que pueden llegar a afectar hasta a un 10% de pacientes, episodios de incontinencia, aumento del número de deposiciones, etc. Es obligatorio el seguimiento endoscópico a largo plazo por el riesgo de displasia y neoplasia a nivel rectal<sup>147</sup>.

## **1.8. PRONÓSTICO**

En la historia natural de la enfermedad hay que considerar la extensión anatómica, ya que la CU comienza afectando el recto y se extiende de forma continua a tramos proximales del colon. De acuerdo con un estudio prospectivo en el momento de la presentación, la inflamación que se limita al recto o proctitis ocurre en un tercio de los pacientes; a colon distal a la flexura esplénica y al recto en otro tercio, y es proximal al ángulo esplénico en el tercio restante. La afectación más extensa o pancolitis se observa en el 25% de los pacientes. Los pacientes con proctitis ulcerosa localizada tienen el mejor pronóstico. Las manifestaciones sistémicas graves, complicaciones tóxicas y la degeneración maligna son improbables y la extensión tardía de la enfermedad se produce sólo en alrededor del 20-30% <sup>148</sup>.

El curso clínico de la CU se caracteriza por brotes que se alternan con períodos de remisión; una minoría de pacientes puede tener una actividad continua. La gravedad de los brotes y su respuesta al tratamiento varía, siendo difícil de predecir y, además, se ha observado que cambia con el tiempo; así la actividad de la enfermedad tiende a disminuir. En una cohorte danesa que no recibió tratamiento inmunosupresor, el 45% de los pacientes estaban en remisión clínica después de unos años, y la proporción con la enfermedad activa cada año disminuyó gradualmente a aproximadamente el 30%, cerca de un tercio de los pacientes no tenían recurrencia en los 10 años tras el primer brote y en los pacientes con una presentación grave en los que se evitó la colectomía, tendían a tener un curso más benigno de la enfermedad durante el siguiente año. Las

tendencias de tratamiento de la enfermedad también cambian así las tiopurinas y los anti-TNF se utilizan cada vez con mayor frecuencia y precocidad, mientras que la tasa de colectomías ha disminuido en los últimos 30 años<sup>149</sup>.

La progresión de la enfermedad, su extensión y la gravedad de los síntomas en el momento del diagnóstico son los mejores predictores de colectomía. La necesidad de colectomía está alrededor del 20%-30% después de 25 años, y la probabilidad de colectomía es mayor durante el primer año después del diagnóstico, llegando al 10% en el primer ingreso<sup>148</sup>. Infliximab y CsA son tratamientos eficaces en aquellos cuadros graves que no responden a corticoides y pueden retrasar o prevenir la colectomía en la mayoría de los pacientes. La cirugía no puede ser considerada como un tratamiento definitivo en pacientes a los que se realiza un reservorio ileoanal, pues hasta un 10% de éstos presenta reservoritis refractaria a los antibióticos considerada como una recurrencia de la enfermedad inflamatoria y pudiendo incluso requerir terapias inmunosupresoras, biológicas e incluso la exéresis del reservorio<sup>150</sup>.

El riesgo de cáncer de colon en CU está incrementado respecto a la población general, debido al efecto carcinogénico inducido por la inflamación mucosa crónica y es proporcional al tiempo de evolución de la enfermedad y la cantidad de colon afectada, pero no necesariamente a la gravedad clínica de los episodios. Algunos estudios sugieren que la inflamación microscópica sostenida es un factor de riesgo y que el uso de 5-ASA para controlar la inflamación confiere protección. El CCR comienza a aparecer a los 7 años del comienzo de la enfermedad en pacientes con pancolitis y luego se desarrolla en 0,5-1% de los pacientes cada año a partir de ese momento. Por lo tanto, después de 20 años de enfermedad, aproximadamente entre 7-10% de los pacientes han desarrollado CCR. Pero en los pacientes que además de padecer EII tienen colangitis esclerosante primaria están expuestos a un riesgo aún más alto de padecer CCR a lo largo de su vida. Se recomienda la vigilancia colonoscópica, preferiblemente durante los períodos de remisión y mediante pancromoendoscopia, en pacientes cuya enfermedad tiene un tiempo de evolución de más de 8 años desde el inicio de los síntomas (excepto en aquellos con proctitis) o cuando existe colangitis esclerosante primaria, en cuyo caso la colonoscopia de control debe comenzar en el momento del diagnóstico<sup>151</sup>.

## 2. AUTOFAGIA

El término autofagia proviene de las raíces etimológicas griegas “auto” (uno mismo) y “phagos” (comer). Se refiere a un proceso celular catabólico caracterizado por el secuestro selectivo de material citoplasmático, ya sean macromoléculas u orgánulos, en exceso o deteriorados, que implique su traslado al lisosoma para su degradación enzimática, reciclando de esta manera los principios inmediatos de las macromoléculas<sup>152</sup>. La autofagia es uno de los tres mecanismos principales utilizados por las células para aislar, eliminar y reciclar residuos, siendo los otros la degradación proteosómica y la fagocitosis.

Se han identificado tres formas diferentes de autofagia<sup>153</sup>: autofagia mediada por chaperonas (AMP), microautofagia, y macroautofagia. La autofagia mediada por chaperonas se reserva para un subgrupo de proteínas solubles sin plegar que contienen la secuencia pentapeptídica KFERQ que son reconocidas selectivamente por la proteína chaperona citosólica HSC70; y trasladadas al lisosoma a través de LAMP-2A (lysosome-associated membrane protein 2), desencadenando su degradación sin la necesidad de formación de una vesícula. En la microautofagia el material citoplasmático a degradar es directamente engullido por la invaginación de la propia membrana lisosomal, secuestrando áreas del citosol donde se encuentra la carga, sin vesículas intermedias.

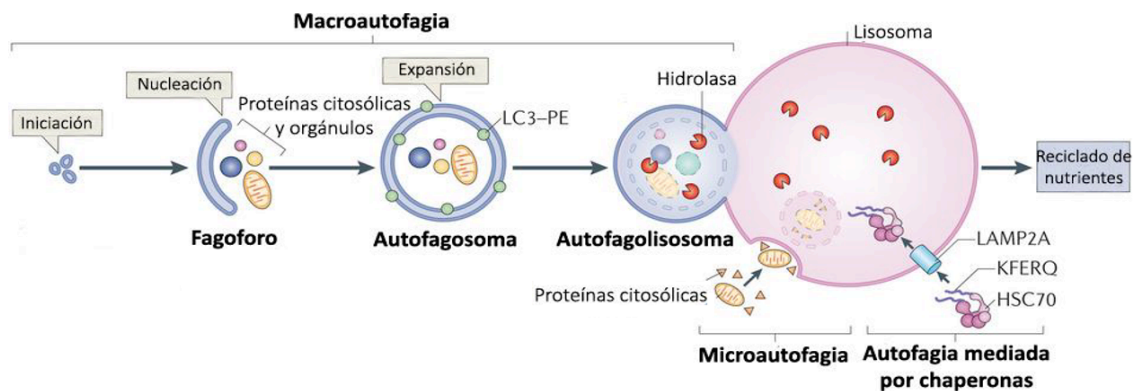


Figura 11. Esquema de los distintos tipos de autofagia según su mecanismo. *Adaptado de Kaur J. et al.*

Finalmente en el caso de la macroautofagia, forma a la que habitualmente se hace referencia cuando se menciona simplemente autofagia, se forma una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma para engullir el material citoplasmático, proteínas, orgánulos dañados o incluso patógenos, y los traslada a los lisosomas. Después, la membrana exterior del autofagosoma se fusiona con la de lisosoma y su membrana interior y el contenido que transporta se degrada. Los principios inmediatos resultantes se reutilizan siendo de nuevo vehiculizados al citosol (Figura 11)<sup>154</sup>.

## 2.1. Bases moleculares de la Autofagia

La autofagia es una ruta de degradación lisosomal altamente controlada por distintos complejos de proteínas codificadas por los genes *ATG* que entran en acción a lo largo del proceso. Supone la mayor vía celular regulada para la degradación de macromoléculas (proteínas, lípidos, glucógeno y nucleótidos) y también la única vía conocida para la degradación de orgánulos por hidrolasas lisosomales<sup>155</sup>. Este proceso se activa como mecanismo protector a corto plazo ante diferentes situaciones de estrés metabólico como privación de nutrientes y factores de crecimiento, estrés del retículo endoplasmático, presencia de citocinas o hipoxia. Sin embargo, en ausencia de estrés, funciona basalmente para regular constantemente la homeostasis celular mediante la degradación de orgánulos dañados, agregados proteicos anormales, proteínas mal plegadas y la eliminación de patógenos, para obtener energía de los componentes y orgánulos disfuncionales. Numerosos estudios han demostrado que la autofagia juega un papel esencial en el desarrollo y la diferenciación, y puede actuar también como mecanismo protector del DNA, limitando su daño y la inestabilidad genómica<sup>156</sup>. Se ha visto que la desregulación de esta vía está implicada en el desarrollo de patologías tales como enfermedades inflamatorias y autoinmunes como la EII, la obesidad, el cáncer y desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer o el Parkinson<sup>157, 88</sup>.

Tabla 9. Genes relacionados con la autofagia (Atg) en levaduras y sus productos ortólogos en mamíferos con su función. Modificada de Pyo et al<sup>158</sup>.

Genes <i>Atg</i> en levaduras	Proteína en mamíferos	Función
Atg1	ULK1/2	Ser/Thr quinasa. Forma parte del complejo ULK1/2
Atg2	ATG2A,B	Proteína de membrana. Se une a WIPI4 y recluta a ATG9
Atg3	ATG3	Importante en la conjugación de LC3 con PE
Atg4	ATG4A, B, C, D	Cistein proteasa que procesa Pro-LC3
Atg5	ATG5	Forma parte del complejo ATG12-ATG5
Atg6	Beclin1	Componente del complejo Vps34 PI3P quinasa
Atg7	ATG7	Importante en la conjugación de ATG12-5 y ATG8-PE
Atg8	LC3A, B, C	Marcador del autofagosoma por conjugación con PE
Atg8	GABARAP, GABARAPL1, GATE-16	Marcador del autofagosoma por conjugación con PE
Atg9	ATG9	Proteína de membrana importante en la expansión del autofagosoma
Atg10	ATG10	Importante en la conjugación de ATG12-5
Atg12	ATG12	Forma parte del complejo ATG12-ATG5
Atg13	ATG13	Componente del complejo ULK1/2 quinasa
Atg14	ATG14L	Subunidad del complejo Vps34 PI3P quinasa
Atg16	ATG16L1	Forma complejo ATG12-5 y participa en la conjugación ATG8-PE
Atg17	FIP200	Componente del complejo ULK1/2 quinasa
Atg18, Atg21	WIPI1/2/3/4	Proteínas de unión a ATGs
	ATG101	Componente del complejo ULK1/2 quinasa
	AMBRA1	Regulador del complejo Vps34 PI3P quinasa
VPS15	P150	Subunidad reguladora del complejo Vps34 PI3P quinasa
	RUBICON	Regulador negativo del complejo Vps34 PI3P quinasa
	UVRAG	Regulador del complejo Vps34 PI3P quinasa
Vps34	VPS34	PI3 quinasa

Este mecanismo común a todas las células eucariotas fue estudiado en mamíferos y descrito por primera vez en 1963. Aunque no ha sido hasta hace algo más de una década

cuando estudios moleculares en levaduras, han permitido la caracterización de todos los genes *Atg* (Autophagy-related genes) relacionados con este proceso. Posteriormente, han sido identificados sus ortólogos en eucariotas superiores (*ATG* en Tabla 9), sugiriendo que la autofagia es un proceso crucial, evolutivamente conservado.

## **2.2. El proceso de Autofagia: Etapas y proteínas que intervienen**

El proceso de autofagia se divide en distintas etapas. Se inicia con la formación de la doble membrana de aislamiento o fagóforo, no estando claro aún el origen de dicha membrana ni el lugar donde sucede su nucleación. Se ha propuesto tanto que se sintetiza de novo como que se forma a partir de la fusión de diferentes partes de membranas existentes, procedentes del RE y otros compartimentos como mitocondrias o aparato de Golgi. Seguidamente el fagóforo experimenta una elongación, expandiéndose y curvándose alrededor de los compuestos citosólicos que se van a degradar. Al juntarse los extremos y cerrarse, se forma la vesícula que conocemos como autofagosoma, la cual, una vez madura, se fusionará con el lisosoma para conformar el autofagolisosoma y proceder a la degradación de la carga. Los productos resultantes son liberados al citoplasma y finalmente el autofagolisosoma es degradado.

A lo largo de todo el proceso toman acción diferentes macrocomplejos proteicos (*core autophagy machinery*) codificados por los genes *ATG*, que participan en las diferentes etapas de la ruta, resultando ser el eje de la maquinaria autofágica<sup>159</sup>.

### **2.2.1. Iniciación del fagoforo**

La inducción de la autofagia comienza con la formación de la membrana de aislamiento o fagoforo. En esta primera etapa interviene principalmente el complejo protéico ULK1-ATG13-ATG101-FIP200. La iniciadora del proceso es la proteína quinasa ULK1 (Unc-51-like kinase 1) que forma tal complejo tetramérico con ATG13, la proteína de andamiaje FIP200 (focal adhesion kinase family-interacting protein 200kD) y la proteína ATG101, que se une y estabiliza a ATG13 (Figura 12 )<sup>160</sup>. ULK1 es capaz de fosforilar Atg13 y FIP200, induciendo la autofagia. Este complejo, a diferencia de lo observado en levaduras, se forma incluso en condiciones ricas en nutrientes<sup>161</sup>.

Se cree que estas dos proteínas ULK1 y ULK2 (Unc-51-like kinase 1 y 2) podrían tener una función redundante en la regulación de la autofagia. El complejo ULK1 quinasa está regulado por la serina/treonina quinasa mTOR (mammalian Target of Rapamycin) cuando constituye el complejo mTORC1. Este complejo está formado por mTOR, Raptor (Rapamycin-sensitive adapter protein of mTOR) y la proteína LST8. Bajo condiciones ricas en nutrientes el complejo mTORC1 interactúa con el complejo ULK1 quinasa y

fosforila ULK1 y ATG13. La fosforilación de estas moléculas inhibe el marcaje de membrana del complejo kinasa ULK1 y se inhibe la autofagia. La proteína mTOR actúa como un regulador negativo de la autofagia reconociendo condiciones de riqueza de nutrientes<sup>162</sup>. Sin embargo, en condiciones de privación de nutrientes (Figura 12), nitrógeno o ATP el complejo mTORC1 es inactivo y se disocia del complejo ULK1 quinasa, permitiendo a ULK1 fosforilar los otros componentes del complejo y a sí misma, dirigirse al sitio de ensamblaje de fagoforo, llevando esto a inducir y activar la autofagia.

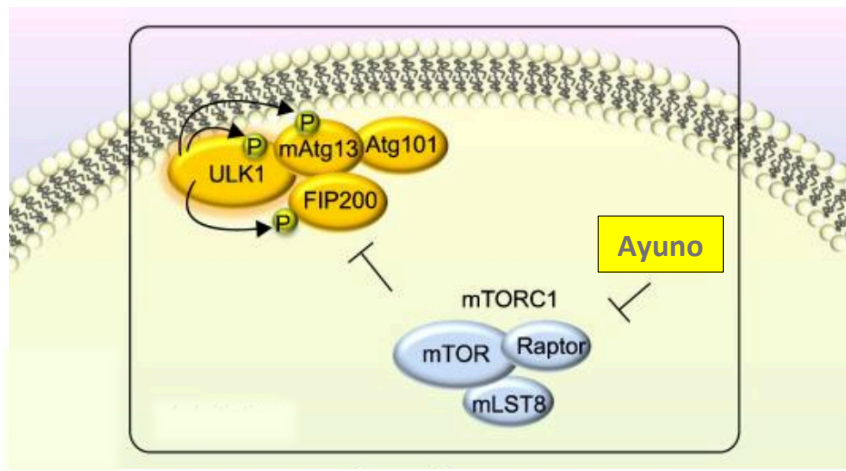


Figura 12. Moléculas claves en la iniciación del proceso de autofagia. Modificado de Pyo et al<sup>158</sup>.

La acción de este complejo no solo depende de la situación nutricional de la célula, si no de la presencia de factores de crecimiento. Estos factores, mediante el complejo PI3K de clase I, inducen la activación de mTORc1. En cambio, un estado de inanición lo bloquea, induciendo la autofagia. mTORc1 también puede ser inhibido por fármacos como la Rapamicina, aunque se ha visto que no siempre resulta sensible. Otro factor que inhibe su acción es AMPK, una quinasa que además activa al complejo de ULK1 en situación de disminución del ratio ATP/AMP. Así, AMPK regula el metabolismo celular para mantener la homeostasis energética. La activación del complejo ULK1 depende por tanto de estímulos de supervivencia celular<sup>163</sup>.

### **2.2.2. Nucleación del fagoforo. Complejo PI3K de clase III**

La nucleación del autofagosoma está controlada por la activación del complejo proteico PI3K de clase III. Este complejo se forma con la interacción de las proteínas Vps34, también conocido como complejo PI3KC3 (fosfatidilinositol-3-quinasa unidad catalítica 3), p150, Beclin-1 y ATG14 (Figura 13). La interacción de Vps34 con ATG14 a través de su región específica dirige el complejo hacia la membrana emergente del autofagosoma. Se cree además que ATG14 es la proteína responsable del mantenimiento de la curvatura de la membrana del autofagosoma en formación. Beclin1 interactúa con Vps34, lo cual es necesario para que Vps34 sea capaz de fosforilar



el fosfatidilinositol (PI) a fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P), que se encarga de reclutar proteínas al fagoforo para guiar el crecimiento de la membrana, momento crítico para la elongación del fagoforo. Beclin1 se encuentra interactuando con la proteína Bcl-2 y es importante también en la regulación de la nucleación del autofagosoma. En condiciones normales Bcl-2 inhibe a Beclin1, mientras que, en condiciones de estrés, Beclin1 se disocia de Bcl-2, permitiendo la activación de Vps34, desplazando al fagoforo y estimulando consecuentemente la autofagia<sup>164</sup>.

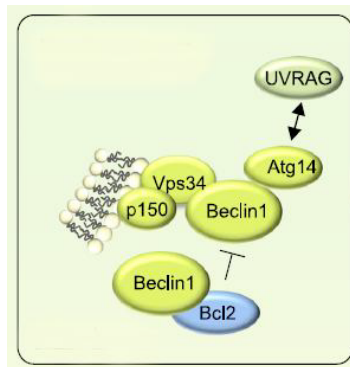


Figura 13. Moléculas claves en la nucleación del fagoforo. Modificado de Pyo et al<sup>158</sup>

El complejo PI3KC3 interacciona con otro complejo, UVRAG, que si se une a SH3GLB1/Bif-1(Bax-interacting factor 1), induce la formación del autofagosoma, estimulando la autofagia. Por el contrario, cuando se da una situación de abundancia de nutrientes, se forma el complejo UVRAG y Rubicon (RUN domain-and cysteine-rich domain-containing Beclin1-interacting protein), que va a regular de forma negativa la maduración del autofagosoma e inhibe el proceso. Es decir, el complejo PI3K de clase III controla la ruta eficazmente en esta fase, uniéndose a una u otra proteína de forma que la regulación pueda ser positiva o negativa<sup>165</sup>.

### **2.2.3. Elongación del fagoforo y expansión de la membrana del autofagosoma**

La elongación de la membrana comienza simultáneamente a la nucleación de las vesículas, una vez incluida la carga a degradar en las inmediaciones de la membrana. En esta etapa interviene la proteína ATG14L, miembro del complejo PI3K de clase III, inicia el reclutamiento de la maquinaria de ATG que participa en la elongación del fagóforo, y su subsecuente transformación en autofagosoma. Son dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina (Ubiquitin-like, Ubl) los que principalmente se llevan a cabo de manera casi simultánea:

- **Sistema de conjugación ATG12:** ATG12 se activa mediante la unión por un enlace tioéster de alta energía con el residuo Cys572 de ATG7 (enzima E1-like). Después, ATG12 es transferida a ATG10 (enzima E2-like) y, finalmente, se une a un residuo de lisina de

ATG5 mediante un enlace isopeptídico. ATG10 media la formación de este complejo. Más tarde, la unión de ATG16L formará el complejo completo multimérico, que es esencial en la formación del pre-autofagosoma. Una vez que éste esté formado, las proteínas ATG se envían de nuevo al citoplasma por un mecanismo desconocido<sup>166,167</sup>.

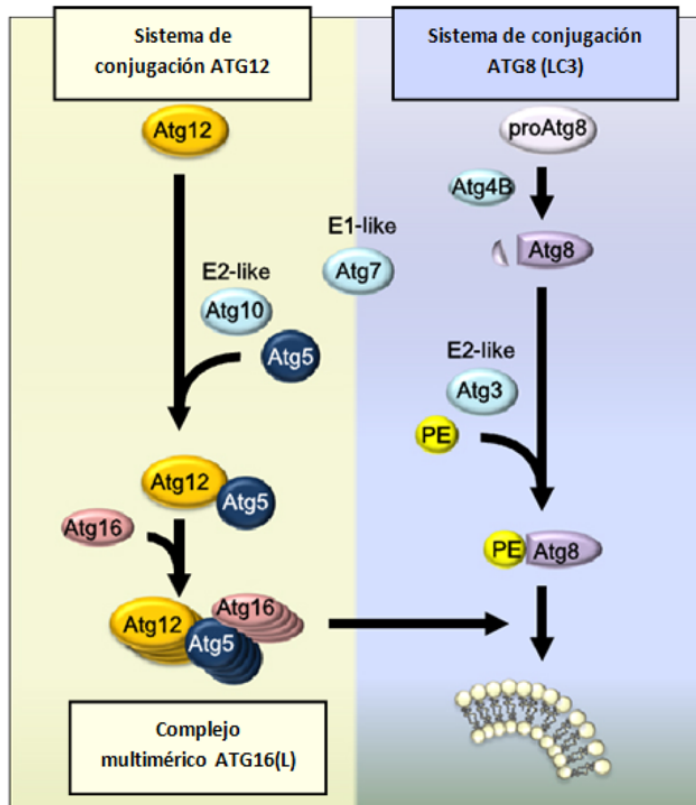


Figura 14. Sistemas de conjugación tipo ubiquitina en la expansión de la membrana.

Modificado de Pyo et al<sup>158</sup>

- **Sistema de conjugación de ATG8:** Este segundo sistema de conjugación, se basa en el procesamiento o modificación de LC3 (homólogo de Atg8) mediante la lipidación con fosfatidiletanolamina (PE), siendo esencial en el proceso de formación de los autofagosomas. LC3 se sintetiza inicialmente como pro-LC3, que se procesa por la cisteína proteasa ATG4B para obtener su forma citosólica, LC3-I. A través de las proteínas ATG7 y ATG3, LC3-I se conjuga con fosfatidiletanolamina (PE) para transformarse en la forma lipídica LC3-II, que se ancla a las membranas interna y externa del autofagosoma para dirigir específicamente la elongación de las mismas (Figura 14). LC3-II permanece en los autofagosomas maduros hasta la fusión con el lisosoma. La conversión de LC3-I a LC3-II se considera un marcador de la inducción de la autofagia<sup>168</sup>.

Existen evidencias de que podría haber un acoplamiento de los dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina puesto que la sobreexpresión de ATG3 (complejo de Atg8)

facilita la conjugación ATG12-ATG5. El complejo ATG9 también participa en la expansión de la membrana del autofagosoma al funcionar como transportador, en un proceso que implica la proteína ATG16L1 y el complejo ATG2-WIPI4, promoviendo el reclutamiento de lípidos, para abastecer la membrana emergente<sup>169</sup>.

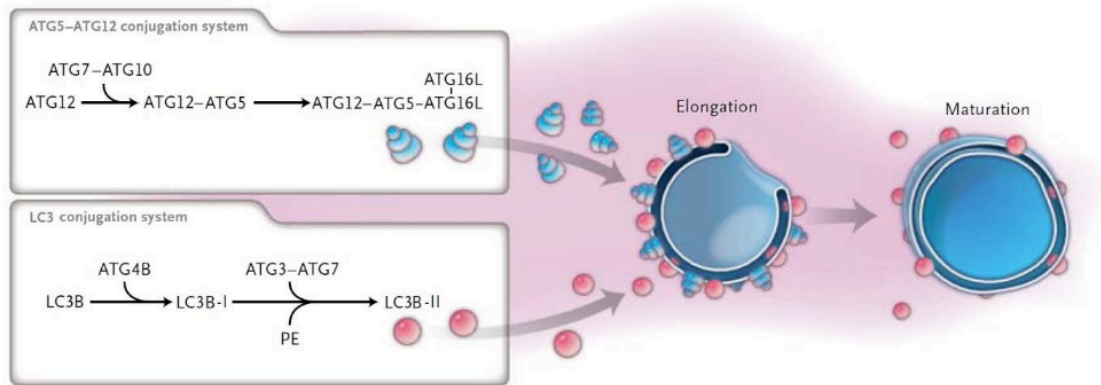


Figura 15. Sistemas de conjugación en la elongación y maduración de la membrana del autofagosoma. Adaptada de Choi M.D. et al<sup>163</sup>

#### **2.2.4. Maduración del autofagosoma, fusión y degradación lisosomal**

En una última etapa del proceso es esencial para que, una vez completada la elongación y el cierre de la membrana del autofagosoma alrededor del material celular a degradar, éste se fusione con un lisosoma para formar el autofagolisosoma.

Los mecanismos moleculares que conducen al cierre del autofagosoma son poco conocidos. No obstante, se sabe que se requiere de las proteínas de la membrana lisosomal como la Rab7 (GTPasa), el análogo mamífero de SNARE (N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor), a la proteína ATG14 (beclin-1-associated autophagy-related key regulator (ATG14L) promueve la fusión mediante la proteína SNARE STX17.<sup>170</sup>

Numerosos estudios han identificado varias moléculas reguladoras de la maduración del autofagosoma y su degradación. Estas incluyen a LAMP2 (proteína lisosomal de membrana), CLN3, el complejo PI3K de clase III, o el sistema ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) como un regulador que desempeña un importante papel en la fusión<sup>171</sup>. La maquinaria de este complejo ha sido identificada por ser necesaria para el cierre del fagoporo, la fusión del autofagosoma y la biogénesis lisosomal. El citoesqueleto también juega un papel fundamental en esta etapa, ya que se asocia con el autofagosoma y lo mueve hasta alcanzar el lisosoma<sup>172</sup>.

Una vez formado el autofagolisosoma, se lleva a cabo la degradación de la carga celular por enzimas hidrolíticas, tales como cisteín proteasas, o las catepsinas, encargadas de la digestión de la carga autofágica por las hidrolasas lisosomales. Cuando el autofagosoma está maduro, en su membrana LC3-II se separa de la PE mediante la acción de ATG4 y vuelve al citoplasma como LC3-I. Las moléculas resultantes de la degradación, mayoritariamente aminoácidos, son transportados de vuelta al citosol para sintetizar nuevas proteínas y mantener las funciones celulares<sup>173</sup>.

### 2.3. Regulación de la Autofagia y el origen de la membrana

La autofagia está controlada por vías que interpretan el estado de energía celular, siendo la quinasa dependiente de AMP (AMPK) la que dirige el metabolismo celular a partir de ATP. AMPK se activa por una disminución de ATP/AMP, tal como ocurre durante la falta de nutrientes. La activación de AMPK es dependiente de la fosforilación por la quinasa LKB1<sup>174</sup>. Cuando AMPK se activa da lugar a la inhibición de la actividad de mTOR y la subsiguiente activación de la autofagia. Asimismo, la activación de AMPK puede contribuir a activar la autofagia en respuesta a una mayor concentración de citocinas y durante la hipoxia.

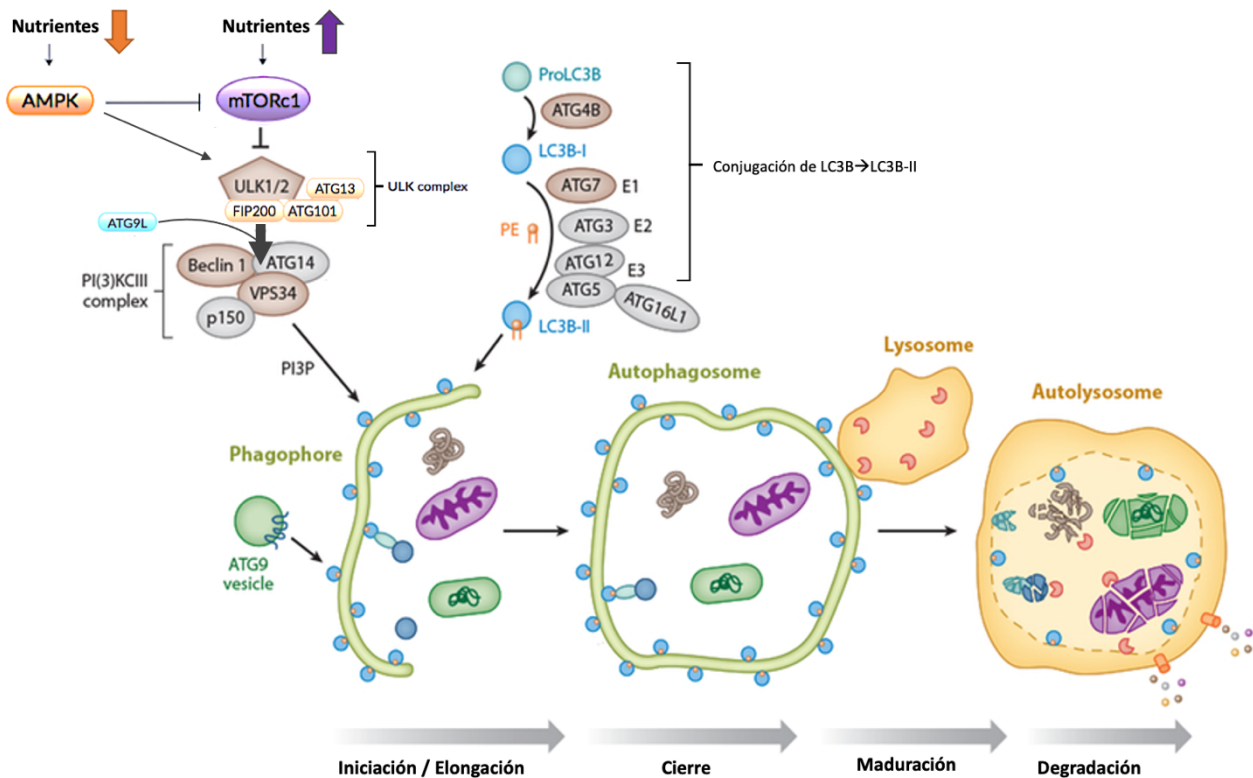


Figura 16. Principales mecanismos moleculares de la autofagia, modificada de Santana-Codina et al<sup>175</sup>.

El sensor nutricional mTORC1 es el principal complejo que controla la presencia de factores de crecimiento y nutrientes produce la activación de mTORC1, que inhibe la autofagia al bloquear la acción del complejo Ulk1 (Figura 16). A la inversa, la escasez de nutrientes conduce a la inducción de la autofagia a través de la supresión mTORC1. Los inhibidores mTORC1 como rapamicina pueden inducir autofagia incluso en condiciones donde hay abundancia de nutrientes. Además, Ulk1 puede ser fosforilado por mTOR y AMPK. La disociación rápida entre Ulk1 y AMPK prepara las células para una rápida inducción de autofagia tras la retirada de nutrientes. Estas observaciones muestran que tanto mTOR como AMPK regulan directamente Ulk1 y coordinar el inicio de la autofagia de los mamíferos<sup>176</sup>.

A pesar del considerable progreso que se está realizando en la identificación de proteínas implicadas en el proceso de autofagia, el origen de la membrana en la formación de los autofagosomas es muy discutido y existen varias hipótesis. La primera apuesta porque se forma de novo a partir de depósitos de ATG9 que llegan hasta los endosomas tardíos marcados con LC3 desde el aparato de Golgi en un proceso dependiente de ULK1 y ATG13. La segunda opción sugiere que la membrana del autofagosoma se formaría fundamentalmente a partir de la de un orgánulo citoplásmico como el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, la mitocondria o la propia membrana citoplasmática. La activación de este proceso se alcanza por la síntesis de PIP3 por parte de estas membranas que atrae a otras proteínas responsables de la evaginación y desprendimiento de esa porción de la membrana, formando así los fagóforos<sup>177</sup>.

#### **2.4. Autofagia selectiva.**

La autofagia se ha considerado generalmente como un proceso de degradación no selectivo, pero se han ido encontrando evidencias de que la autofagia puede aislar y eliminar amenazas específicas de una forma selectiva. La carga a degradar primero debe entrar en contacto con la ubiquitina de forma específica, lo que es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis celular. La alteración o defecto en la autofagia selectiva conlleva la interrupción de la homeostasis y resulta en diversas enfermedades, indicando la gran importancia fisiológica de este sistema<sup>178</sup>.

Una de las funciones de la autofagia es la eliminación de sustratos citosólicos ubiquitinados, agregados proteicos, orgánulos dañados o patógenos. En este tipo de autofagia tiene lugar su reconocimiento por parte de un receptor autofágico selectivo y su reclutamiento por la maquinaria molecular del autofagosoma para su degradación final en el lisosoma. Los tipos de autofagia selectiva que existen se denominan habitualmente en función del cargo a degradar. Así tendríamos agregafagia para

proteínas agregadas, xenofagia para patógenos externos, REfagia, para el retículo endoplasmático, mitofagia para mitocondrias, ferritinofagia para ferritina, lipofagia para agregados lipídicos.

El reconocimiento selectivo del contenido a degradar se realiza mediante interacciones con proteínas receptoras específicas que unen físicamente la carga a degradar con la membrana del autofagosoma en formación<sup>179</sup>. La maquinaria del autofagosoma que reconoce estas proteínas receptoras son las proteínas ATG8. En mamíferos existen seis: LC3A, LC3B, LC3B GABARAP, GABARAP-L1 and GABARAP-L2/GATE-16, que se encuentran ancladas a la membrana del autofagosoma e interactúan con los receptores a través de la región de Interacción con LC3 (LIR), también conocida como el motivo de Interacción con Atg8, para obtener resultados selectivos de degradación autofágica<sup>180</sup>.

Las señales de carga se pueden clasificar como reconocimiento dependiente e independiente de ubiquitina. Los receptores dependientes de ubiquitina son aquellos que, en vez de reconocer directamente al sustrato, reconocen cadenas de poliubiquitina unidas a éste. Varias proteínas de unión a ubiquitina, como p62, NBR1, OPTN y NDP52/CALCOCO2, han sido identificados como receptores de autofagia responsables de la entrega de cargas ubiquitinadas al sistema de autofagia<sup>181</sup>.

El receptor más estudiado de este tipo es la proteína p62/sequestosoma1 (*SQSTM1*)<sup>180</sup>. En su estructura presenta varios dominios, entre los que se incluye un dominio de oligomerización PB1, importante para la agregación de agregados proteicos y también se une e inhibe a ERK1, crucial para la regulación negativa de la adipogénesis o la inflamación y un motivo LIR para la interacción con las proteínas Atg8.

Además, p62/SQSTM1 presenta otros dominios (Figura 17), a través de los cuales es capaz de interactuar con otras proteínas, como el ZZ, que se une a RIP, lo que conecta a p62 con la activación de NF-κB en la ruta de TNF. El dominio TB se une a TRAF6, lo que es relevante tanto en la osteoclastogénesis inducida por RANK como en la tumorigénesis inducida por Ras o la activación de NF-κB. p62/SQSTM1 también interactúa con Raptor, bloqueando la autofagia a través de la activación de mTOR. Esta inhibición de la autofagia, mediante la capacidad de p62 de interactuar con LC3, sirve para autocontrolar los niveles de p62, lo que pone de manifiesto su papel como regulador central en muchos procesos fisiológicos y patológicos<sup>182</sup>.

Una autofagia defectuosa, que impida la selección del contenido a degradar conlleva acumulación de agregados de p62, lo que apoya la idea de que p62 actúa como una proteína clave en varias cascadas de señalización como la apoptosis y la activación de NF-κB. Concretamente TRAF6 contribuye a la activación mediada por CD40 de NF-κB

y otras moléculas de señalización. La actividad de NF-κB se ha incrementado en las células inmunitarias de la lámina propia y en el epitelio intestinal de la EII<sup>183</sup>.

Además, la proteína p62 participa en la carcinogénesis a través dominio KIR y la interacción de Keap1 siendo importante para la regulación de Nrf2 y el control de especies reactivas de oxígeno (ROS), la respuesta a proteínas mal plegadas (unfolded protein response - UPR) y garantizar el paso de las células a través de la mitosis, todos ellos, factores importantes en el cáncer<sup>184,185</sup>.

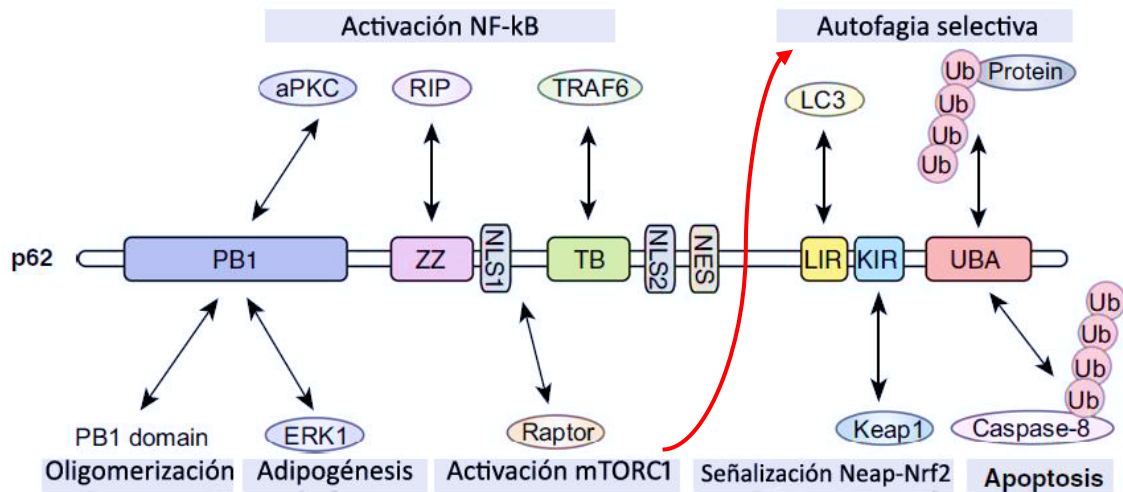


Figura 17. Proteínas de interacción con p62 y sus funciones. Modificado de Moscat et al <sup>186</sup>

Por último, el dominio de asociación a ubiquitina (UBA), con el que se une directamente a las moléculas de sustrato poli o monoubiquitinas marcadas para la degradación por el proteasoma o la autofagia. Parece que p62/SQSTM1 se une preferencialmente a las cadenas de ubiquitina K63, mientras que las K48 son reconocidas por los proteasomas y, por tanto, se degradan allí. Este fenómeno podría suponer un nuevo nivel de regulación de la autofagia selectiva y demuestra la función cooperativa del sistema autofagia-lisosoma y el sistema ubiquitina-proteasoma<sup>187</sup>.

### 3. Autofagia y Respuesta inmune

La autofagia actúa en varias etapas de la respuesta inmune: Frente a agentes patógenos, degradándolos vía autofagosoma; eliminando cuerpos apoptóticos durante la respuesta inflamatoria; o mediante la presentación de moléculas antigénicas por proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC)<sup>188</sup>.

**En la inmunidad innata**, tiene lugar la inducción de la autofagia por patógenos, como *A. Streptococci*, que son envueltos por el autofagosoma y luego liberados para la

hidrólisis lisosomal. O bien mediante macroautofagia de bacterias que impiden la fusión con el lisosoma, como *Mycobacterium tuberculosis* evitando la formación del fagolisosoma, y de *Rickettsias*, *Listeria monocytogenes*, y *Salmonella typhimurium*, microorganismos capaces de escapar al autofagosoma.

La autofagia ha sido ampliamente vinculada a las vías de señalización de la inmunidad innata y está regulada por los receptores de reconocimiento de patrones como receptores de tipo Toll (TLRs), receptores tipo nod (NLRs), receptores tipo RIG-I (RLRs) sensores citosólicos de DNA (CDS) y genes estimulados por interferon (STING), así como inflamasomas. La autofagia regula la activación del inflamasoma, plataforma molecular activada ante infecciones o estrés, que conlleva a la liberación de citocinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$  e IL-18. En el mecanismo de inhibición del inflamasoma dependiente de la autofagia, se ha sugerido que el autofagosoma selecciona al inflamasoma para su degradación, en parte debido a que se activa la formación del autofagosoma por el incremento en ROS en las mitocondrias<sup>189</sup>.

**En la inmunidad adaptativa**, la inducción de la autofagia capacita a la célula para digerir patógenos o residuos en su propio citosol, libera antígenos citosólicos en el lumen de compartimentos endosomales que contienen moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) o bien en endosomas que contienen sensores innatos de daños como TLR7.

Las moléculas del MHC clase I presentan principalmente productos de la degradación proteosomal a las células T CD8+. En el proceso se encapsulan los antígenos citoplasmáticos y nucleares, proteínas virales o autoantígenos, que escapan de los autofagosomas y son degradados por el proteosoma. Este mecanismo inmunovigilancia facilita la eliminación de células infectadas con patógenos, garantizando la apropiada respuesta a patógenos. En lo que respecta a la participación de la macroautofagia en la presentación-cruzada, básicamente dos estudios han demostrado que los antígenos tumorales y virales son presentados con mejor eficiencia por las células T CD8+ cuando es activada la ruta de autofagia.

Las moléculas de MHC clase II presentan péptidos antigénicos derivados de proteínas extracelulares, que son principalmente generados por degradación lisosomal, a las células T CD4+. Estas moléculas se expresan sobre la superficie de células presentadoras de antígenos como células B, células dendríticas y macrófagos, así como células epiteliales tímicas medulares y corticales. La macroautofagia y la autofagia mediada por chaperonas están involucradas en la presentación de antígenos intracelulares por MHC clase II. Alteraciones genéticas relacionadas o bloqueo de la macroautofagia con inhibidores de PI3K, dan lugar a que se inhiba la presentación de antígenos y ocasiona una mayor vulnerabilidad al patógeno.



Además, los componentes del núcleo autofágico, como LC3, se han aislado de las moléculas MHC clase II humanas y de ratón. Los péptidos generados por degradación lisosomal se presentan mediante las moléculas MHC clase II a los linfocitos T CD4 +, por lo que la autofagia puede estimular las células T CD4 + configurando las respuestas de linfocitos T contra patógenos. Este hallazgo de presentación cruzada de antígenos endocíticos en MHC clase I y epítomos derivados de la autofagia en la clase MHC II también podría usarse para evaluar la regulación de la autofagia<sup>190</sup>.

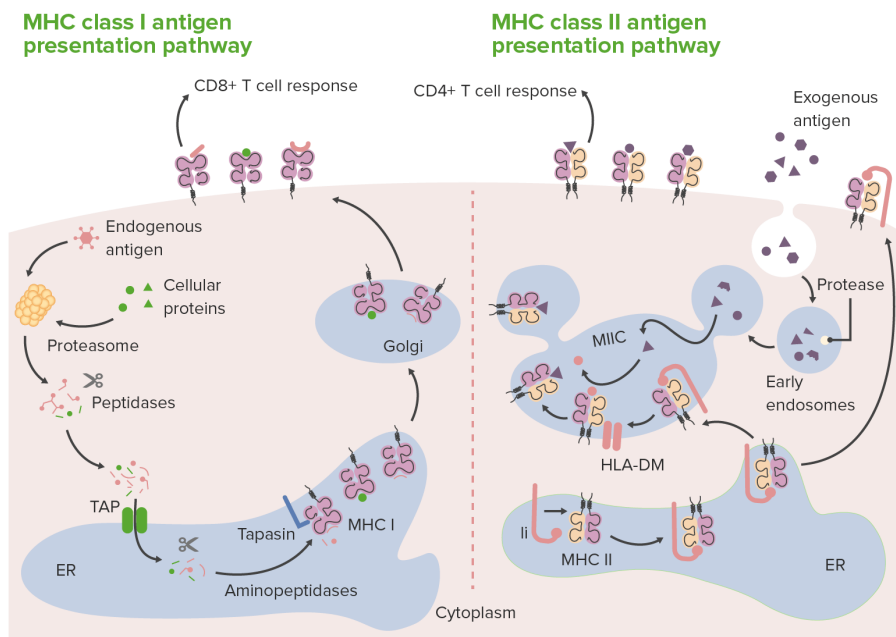


Figura 18. Vías de presentación de antígenos a través del complejo mayor de histocompatibilidad. Extraído de Grubbs et al<sup>191</sup>.

#### 4. Implicación de la Autofagia en la Colitis Ulcerosa

##### 4.1. Modulación de la Autofagia y fenotipo de la colitis ulcerosa.

Algunos estudios han demostrado la implicación de varios receptores autofágicos, incluidos p62, mTOR, LC3, TRAF6 o subunidades reguladoras como NRBF2 y AMPK, que participan en diversas señales biológicas que afectan la inmunidad innata, apoptosis, respuestas inflamatorias que se relacionan con el control de la homeostasis intestinal, implicadas en la patogenia de la CU<sup>192</sup>. Comprender como se activan p62, los receptores autofágicos adicionales o los reguladores de las vías de señalización autofágica para mejorar la inflamación colónica excesiva, permitirá el desarrollo de estrategias terapéuticas más eficaces contra la EII.

En la CU en la que se ha observado autofagia defectuosa, con disminución del recambio de los niveles de p62. Esto tendría implicaciones relevantes ya que p62 es una proteína estructural esencial que se une e interacciona con gran variedad de proteínas asociadas. En un estudio realizado en una línea de células epiteliales, la supervivencia intracelular de bacterias *Escherichia coli* invasora adherente LF82, que promueven la respuesta inflamatoria gastrointestinal, fue mayor en las células silenciadas para p62<sup>193</sup>. En estudios con animales y humanos, un flujo autofágico defectuoso con p62 elevado se observó en modelos y tejidos con EII. Además, en inmunohistoquímica la expresión de p62 fue mayor en las células epiteliales de la mucosa inflamada que en las de la mucosa no inflamada<sup>194</sup>.

En pacientes con CU activa, el nivel de activación del factor de transcripción 4 (ATF4), importante proteína relacionada con la autofagia, se encontró significativamente disminuido en la mucosa intestinal inflamada en comparación con que en la mucosa normal. Los hallazgos revelados por ese estudio indican la reducción del proceso de autofagia en la CU<sup>195</sup>. Pruebas recientes han mostrado que la activación del receptor nuclear intestinal, receptor de vitamina D (VDR), podría regular a la baja la inflamación intestinal mediante la inducción supresión del inflammasoma mediada por autofagia<sup>196</sup>. Además, se ha descrito la deficiencia de flujo de autofagia dependiente de mTOR en células epiteliales intestinales de pacientes con CU activa<sup>197</sup>. Esos hallazgos sugieren la correlación entre el inicio de la autofagia defectiva y el inicio de la CU.

En los estudios actuales sobre CU, el sulfato de dextrano sódico (DSS) se aplica ampliamente para la creación del modelo animal de CU, que facilita significativamente el estudio de la CU. En los modelos de CU inducida por DSS, *Wu et al*<sup>198</sup> mostraron que el factor de unión al receptor nuclear 2 (NRBF2), un subunidad reguladora de la Beclin-1-ATG14- relacionada con la autofagia complejo VPS15-VSP34, es necesario para la eliminación de células mediante apoptosis y la supresión de la inflamación en la colitis. Los estudios demostraron que la autofagia contribuyó a mantener y restaurar la homeostasis de la microbiota intestinal en modelos de CU inducida por DSS, por tanto, mejorar el nivel de la autofagia probablemente puede servir como un regulador potencial. La señalización AMPK-mTOR-p70S6K, una vía autofágica clásica, demostró que está involucrada en este proceso<sup>199</sup>. De acuerdo con esos hallazgos, inducir AMPK-mTOR-p70S6K- autofagia mediada por la activación de ciertos receptores contribuyó a la atenuación de los síntomas de la CU y a la supresión de inflamación intestinal en modelos de ratones CU inducidos por DSS.

En otro estudio de *Macias-Ceja et al* analizaron el papel que juega la estimulación de la autofagia de la mucosa en colitis inducida por ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS), sugiriendo que los estimuladores de la autofagia serían de interés en el manejo clínico de la EII<sup>200</sup>.

## 4.2. Opciones terapéuticas relacionadas con la ruta de Autofagia.

A pesar de los avances en el conocimiento de los mecanismos y actores involucrados en la autofagia, todavía carecemos de una comprensión completa de sus funciones. Los trabajos recientes van dilucidando el papel de la autofagia en la patogenia y progresión de la EII. Además, podemos considerar varias terapias relacionadas con la autofagia, que han demostrado ser eficaz en la mejora de la EII. Por ello es importante continuar investigando en los mecanismos por los cuales los receptores autofágicos interfieren con los tratamientos que se disponen y en que medida afectan a los resultados clínicos.

El mecanismo de acción de los fármacos actuales para la EII aún no se conoce por completo. Sin embargo, se ha avanzado en los últimos años hacia la caracterización de sus efectos, con la modulación de las vías de señalización inmunorreguladoras a menudo vinculadas directa o indirectamente a la respuesta de autofagia. Es importante destacar que estos estudios heterogéneos se han realizado en una amplia variedad de tipos y entornos de células; destacando la necesidad de explorar el efecto de estos fármacos sobre la actividad de la vía de autofagia en el contexto de la EII (Tabla10).

Tabla 10. Fármacos y mecanismos de modulación relacionados con Autofagia. Adaptado de Hooper et al<sup>138</sup>

Fármaco	Mecanismo descrito de modulación en Autofagia.
Corticosteroides	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inducción de la autofagia en el músculo esquelético in vivo, y linfocitos humanos primarios mediante aumento de los inhibidores de mTORC1.</li> <li>• Inducción de la autofagia mediada por dexametasona en linfocitos T</li> <li>• Inhibición de la autofagia en monocitos humanos infectados con <i>Aspergillus fumigatus</i></li> </ul>
Aminosalicilatos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La sulfasalazina disminuyó la autofagia a través de la inhibición de NFκB en un modelo murino in vivo de cáncer.</li> <li>• La sulfasalazina indujo la muerte celular autofágica a través de la inhibición de la vía Akt y la activación de la vía ERK en una línea celular de carcinoma de células escamosas orales</li> </ul>
Tiopurinas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La autofagia se activa en los hepatocitos tratados con tiopurinas</li> <li>• Aumento de la autofagia en células epiteliales del modelo de colitis animal debido a la rápida conversión bacteriana local del profármaco tioguanina en metabolito activo</li> </ul>
CyA y Tacrólimus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Autofagia inducida por citotoxicidad de ciclosporina como proceso de supervivencia en células de glioma maligno<sup>83</sup> y en células epiteliales del túbulo proximal renal.</li> <li>• Autofagia inducida por tacrolimus en neuroblastoma de ratón y líneas celulares microgliales y en cerebros de ratones tratados con tacrolimus</li> </ul>
Biológicos [anti-TNF]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los agentes anti-TNF pueden inducir la reactivación de la TB, al menos parcialmente debido a la disminución de la autofagia</li> <li>• TNF estimula la autofagia en fibroblastos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide, en músculo esquelético, en células lisas vasculares ateroscleróticas, en células trofoblásticas y en macrófagos de ratón.</li> </ul>

## Salicilatos

Las actividades antiinflamatorias de 5-ASA incluyen la eliminación de ROS dañinos, la regulación positiva de los sistemas antioxidantes endógenos, la inhibición de la motilidad de los leucocitos, la activación de leucotrienos y plaquetas, la interferencia con NFκB, TNFα, IL-1 y TGF-β, la inhibición del óxido nítrico formación, prevención del daño mitocondrial y detención del ciclo celular del epitelio colónico en fase S.<sup>69</sup> En teoría, muchas de estas actividades podrían afectar directa o indirectamente la autofagia debido a una reducción del estrés celular. Un estudio, que investigó la sulfasalazina como inhibidor de NFκB en un modelo murino in vivo de caquexia por cáncer, informó una disminución en la autofagia (Figura 19). Esto podría deberse a un efecto directo de la inhibición de NFκB, ya que la señalización de NFκB regula la autofagia de manera dependiente del contexto<sup>201</sup>, o a través de una o más de las otras vías reguladas por la sulfasalazina.

## Corticoides

El tratamiento con corticosteroides regula a la baja las citocinas proinflamatorias, incluidas IL-1, IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), al inhibir la transcripción de genes involucrados en su producción y afectar la estabilidad del ARN mensajero (ARNm) para inhibir la expresión de proteínas. Además, la señalización inflamatoria inducida por NFκB disminuye debido a la interacción con los receptores de corticosteroides<sup>202</sup>.

La respuesta clínica a los corticosteroides en pacientes con CU se ha relacionado con mTORC1 (Figura 19). En un estudio de transcriptómica, se observó que los perfiles de miARN y ARNm en la mucosa rectal de pacientes con CU diferían entre respondedores y no respondedores al tratamiento con corticosteroides. El ARNm con la expresión diferencial más significativa entre los grupos fue el transcrito inducido por daño en el ADN 4, un inhibidor de la actividad de mTORC1, que aumentó en los respondedores después de 3 días de tratamiento con corticosteroides.

La estimulación de la autofagia por glucocorticoides es relevante para el tratamiento de neoplasias linfoides malignas, ya que está íntimamente relacionada con la inducción de la apoptosis en poblaciones de células T inmaduras, al carecer estas células del inhibidor de la proteína apoptótica Bcl-2. Cuando se sobreexpresaba Bcl-2 en linfocitos T inmaduros, se demostró que se inhibía la apoptosis inducida por dexametasona. Los linfocitos T pueden aumentar los niveles de autofagia, presumiblemente debido a la inhibición de la apoptosis. Además, la inducción de la autofagia prolongó la supervivencia de las células malignas tratadas con dexametasona<sup>203</sup>

## **Tiopurinas**

Las tiopurinas, incluidas la azatioprina, la 6-mercaptopurina y la 6-tioguanina, son fármacos inmunosupresores que se utilizan para tratar la EII. Tienen un inicio de acción relativamente lento, pero pueden mantener la remisión en casos de EC de moderados a graves y también han demostrado cierta eficacia para la inducción de la remisión. El profármaco de uso común azatioprina se convierte en 6-mercaptopurina [6-MP] por el glutatión en la pared intestinal. A través de una vía enzimática de varios pasos, el fármaco se descompone en metabolitos de tiopurina, nucleótidos de tioguanina [TGN] y nucleótidos de metilmercaptopurina [MMPN].

A pesar de la falta de comprensión del mecanismo de acción de las tiopurinas, se ha demostrado que la autofagia tiene un papel protector en los hepatocitos durante la terapia con tiopurinas, sugiriendo que un tratamiento combinado de tiopurinas con fármacos que inducen la autofagia puede reducir sus efectos adversos, mejorando su eficacia y seguridad<sup>204</sup>. En otro estudio, se demostró que la conversión bacteriana local rápida del profármaco de tioguanina en metabolito activo aumenta la autofagia en las células epiteliales, lo que da como resultado una mayor eliminación de bacterias intracelulares y una disminución de la inflamación intestinal y la activación inmunitaria en modelos de colitis inducida<sup>205</sup>.

La azatioprina induce la autofagia a través de mecanismos que involucran la modulación de la señalización del objetivo de rapamicina (mTORC1) y la estimulación del sensor PERK de respuesta de proteína desplegada (UPR). La inducción de la autofagia por azatioprina se correlacionó con mejor eliminación de AIEC e indujo un aumento significativo de LC3-II unido al autofagosoma en poblaciones de células mononucleares de sangre periférica ex vivo, lo que respalda los hallazgos in vitro. En pacientes, el polimorfismo de un solo nucleótido ATG16L1 T300A asociado a EC no atenuó la inducción de autofagia por azatioprina<sup>206</sup>.

## **Anticalcineurínicos**

La ciclosporina y el tacrolimus modulan la autofagia como parte de su mecanismo de acción, pero no se ha identificado ningún vínculo con el metotrexato. La ciclosporina, utilizada originalmente para prevenir el rechazo del trasplante de órganos, actúa bloqueando la activación de los linfocitos y otras células inmunitarias. Como este fármaco tiene efectos muy citotóxicos, varios estudios han demostrado que el tratamiento con ciclosporina puede inducir la autofagia en respuesta a la toxicidad, ya sea como un proceso de supervivencia o como parte de un mecanismo de muerte celular. Esto se acompañó de la inhibición de mTORC1 y una respuesta al estrés del ER, con bloqueo de la señalización del ER y disminución de la acumulación del marcador de autofagia LC3-II (Figura 19). Además, cuando se inhibe la autofagia mediante el bloqueo de ULK1, ATG5 o ATG7, se demostró que aumenta la muerte celular inducida por la

ciclosporina. Estos resultados sugieren que la autofagia se induce como una respuesta protectora a los efectos citotóxicos de la ciclosporina<sup>207,208</sup>.

### Agentes biológicos

La sobreproducción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias es una característica común asociada con enfermedades inflamatorias. Para el tratamiento se utilizan anticuerpos monoclonales que atacan y neutralizan citoquinas como TNF $\alpha$ , IL-12, IL-23, IL-21, IL-22, IL-32 e IFN- $\gamma$ , con miras a disminuir la señalización proinflamatoria de EII. Estos agentes biológicos generalmente se reservan para el tratamiento de pacientes con EC refractaria o CU dependientes de esteroides para inducir y mantener la remisión.

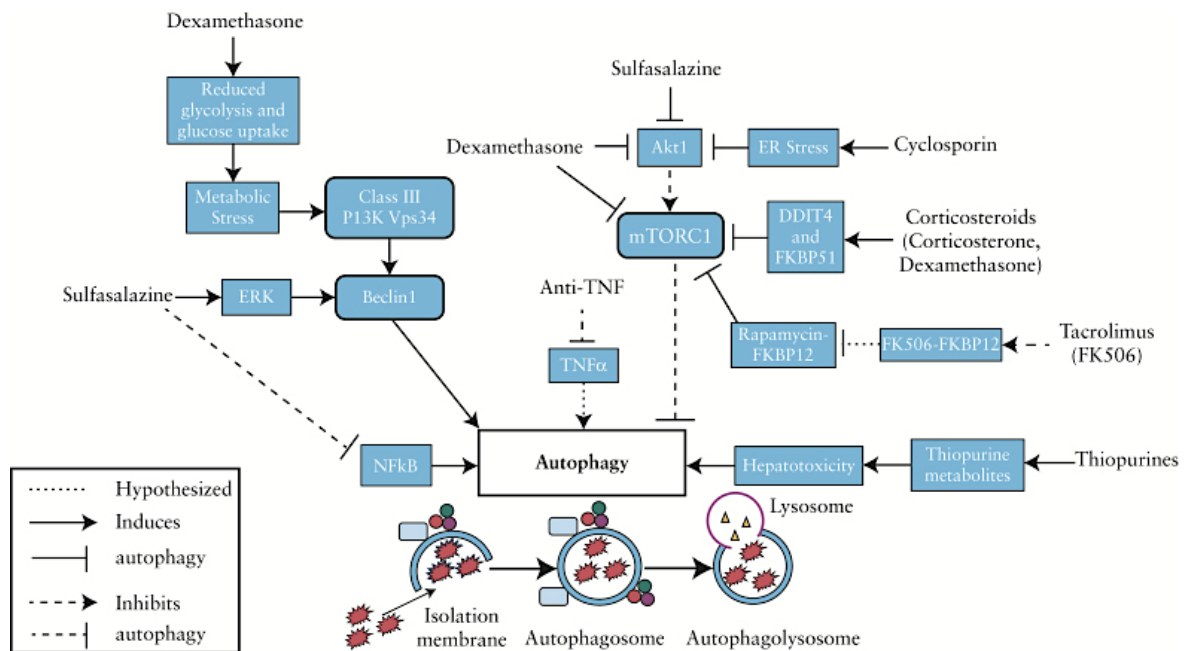


Figura 19. Fármacos actuales que modulan la vía de la autofagia<sup>138</sup>.

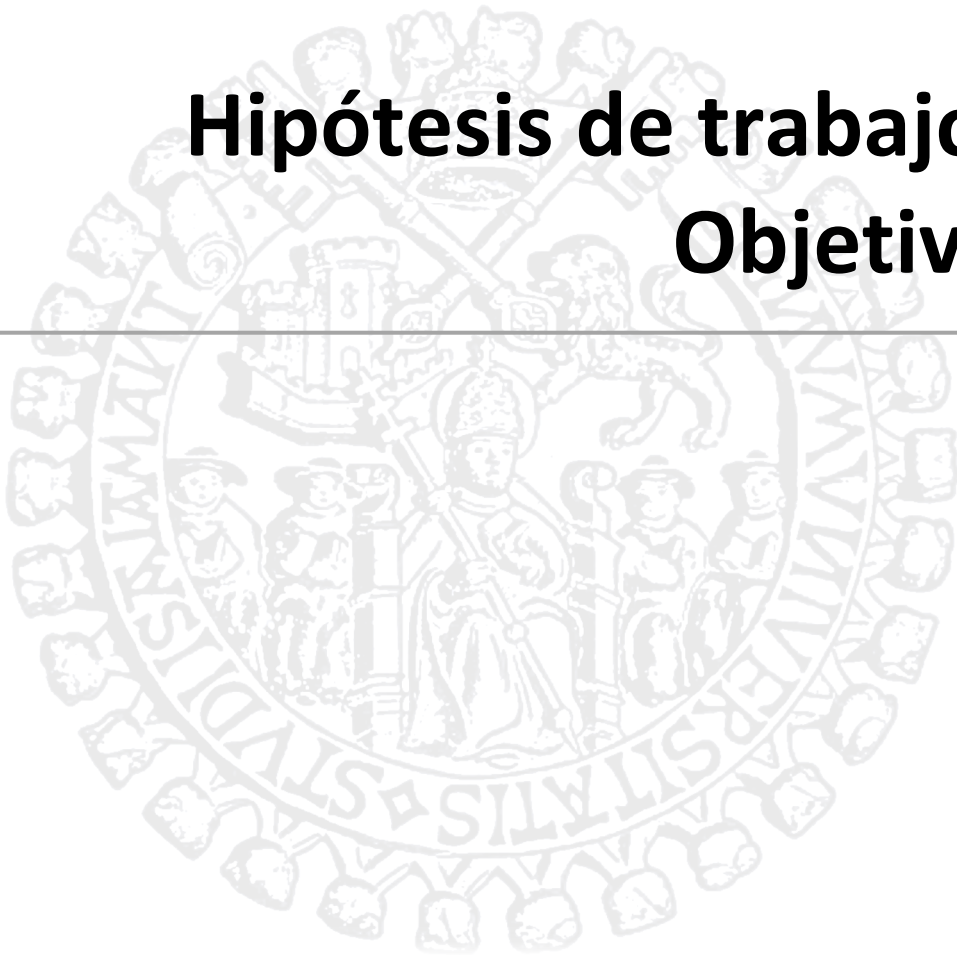
El TNF $\alpha$  juega un papel importante en la modulación de la respuesta inflamatoria y, aunque los efectos del TNF $\alpha$  se han estudiado ampliamente en una variedad de tipos de células, su mecanismo de acción en el intestino aún se desconoce. Un efecto confirmado del TNF $\alpha$  es la modulación de la autofagia, que se ha observado en fibroblastos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide, en músculo esquelético, en células lisas vasculares ateroscleróticas y en células trofoblásticas<sup>209</sup>. El efecto del TNF $\alpha$  sobre la mitofagia, un tipo específico de autofagia que implica la degradación de las proteínas y orgánulos mitocondriales, también se ha demostrado en macrófagos de ratón<sup>210</sup>.

La modulación de la autofagia representa una opción terapéutica emocionante para el tratamiento de la EII. Sin embargo, hasta la fecha hay poca evidencia de que el control de la autofagia pueda estar directamente relacionada con la mejora de la enfermedad, con solo un estudio de casos publicado, donde el inhibidor de mTORC1 sirolimus (rapamicina) mejoró los síntomas y la curación en un paciente con EC grave refractaria<sup>211</sup>.

La necesidad de explorar nuevas opciones con tratamientos combinados destinados a modular tanto la UPR como la autofagia justifican una mayor investigación. A la luz de los resultados obtenidos hasta la fecha, parece que la autofagia es específica del tipo de célula que afecte, lo que dificulta vincular mecánicamente la autofagia inducida por fármacos con la modulación de la enfermedad. Independientemente de esto, existe una necesidad apremiante de determinar cómo estos medicamentos modulan la vía de la autofagia, específicamente en pacientes con mutaciones conocidas en los genes que regulan la vía de autofagia, y esto debe comenzar con la consolidación de estudios en un entorno in vitro. Sin duda, una comprensión más completa de sus mecanismos de acción permitirá tomar mejores decisiones mejor informadas con respecto a la idoneidad del tratamiento farmacológico para la EII de forma individualizada<sup>212</sup>.

# Hipótesis de trabajo y Objetivos

---





## **HIPÓTESIS:**

La vía de la autofagia parece tener un claro efecto modulador de la respuesta inflamatoria en la colitis ulcerosa. Por lo tanto, podría existir una asociación entre los perfiles de expresión de proteínas relacionadas con esta vía y el fenotipo, de manera que los cambios en la autofagia podrían ser un biomarcador de la enfermedad

## **OBJETIVOS**

- El objetivo general es caracterizar perfiles de expresión de proteínas relacionadas con autofagia y correlacionarlos con la evolución de la enfermedad.
  
- Los objetivos específicos consisten en:
  1. Determinar los perfiles de expresión de 6 proteínas relacionadas con la autofagia p62, LC3, TRAF6, mTOR, Beclin1 y PIK3CA en la mucosa intestinal de pacientes con Colitis Ulcerosa.
  2. Conocer si los patrones de expresión de las proteínas características de autofagia tienen relación con las variables clínicas, analíticas y endoscópicas que incluyen el nivel de actividad, extensión de la enfermedad y/o respuesta adecuada al tratamiento.
  3. Analizar el grado de asociación entre cada patrón específico de expresión de proteínas y las variables fenotípicas que determinan la actividad inflamatoria, extensión y respuesta al tratamiento.
  4. Evaluar cuáles de los diferentes patrones de expresión de las proteínas características de autofagia demuestran valor pronóstico de forma independiente, representando utilidad para la práctica clínica.

# Materiales y métodos

---



## 1. Diseño del Estudio

Estudio observacional prospectivo, cuyo objetivo es evaluar el perfil de expresión de las proteínas relacionadas con la vía de Autofagia y su impacto en el seguimiento. Para ello, se incluyó una cohorte de pacientes con colitis ulcerosa en seguimiento en la unidad de EII del Hospital Universitario de Salamanca, los cuales se sometieron a colonoscopia entre de junio de 2015 a septiembre de 2019.

Para la cohorte del grupo control se invitó a participar a pacientes asintomáticos, sin otras enfermedades autoinmunes o inflamatorias, incluidos en el programa de cribado de CCR de nuestro centro con resultado de colonoscopia normal sin alteraciones de la mucosa de colon. Se incluyeron finalmente en el estudio un total de 58 pacientes. De la cohorte de pacientes con colitis ulcerosa se incluyeron 48 pacientes y de la cohorte del grupo control se incluyeron 10 pacientes.

### **Criterios de selección**

Los pacientes fueron seleccionados de forma consecutiva realizándose una búsqueda dirigida en las agendas de endoscopias destinadas a pacientes con EII.

#### ○ Criterios de inclusión:

- Pacientes mayores de 18 años.
- Firma del consentimiento informado del estudio.
- Pacientes con diagnóstico compatible con CU según criterios clásicos clínicos, radiológicos, histológicos, y endoscópicos (criterios de Lennard-Jones) a los que se les realizaba una colonoscopia.
- Seguimiento clínico de al menos tres años posteriores a la colonoscopia con o sin colonoscopia de control durante el seguimiento.

#### ○ Criterios de exclusión:

- Pacientes con seguimiento clínico posterior a la colonoscopia que finalmente no cumplieran criterios diagnósticos de Lennard-Jones.

### **Variables clínicas:**

#### ● **Características basales:**

- **Edad:** se recogió la edad de cada paciente en el momento del diagnóstico y la edad al diagnóstico de la enfermedad
- **Género:** Hombre o mujer.

- **Antecedentes familiares de EII:** Se tuvo en cuenta si los pacientes tenían familiares de primer o de segundo grado con antecedentes de EII.
- **Hábito tabáquico:** Se definieron 2 categorías, fumador y no fumador. Entre los primeros se incluyeron a todos aquellos que en algún momento habían fumado, aunque no fuesen fumadores activos cuando se diagnosticó la enfermedad, sin entrar en otras consideraciones dado el tamaño de la muestra.
- **Características de la enfermedad:** Se agruparon los pacientes siguiendo la clasificación de Montreal para extensión y gravedad, descrita previamente.
- **Manifestaciones extraintestinales:** Se diferenciaron entre los que las habían desarrollado y los que no. Se tuvieron en cuenta la artropatía periférica, eritema nodoso, pioderma gangrenoso, uveítis o colangitis esclerosante primaria.
- **Ingresos por brote de la enfermedad o por problemas asociados a la misma:** Se analizó si el paciente había requerido ingreso hospitalario en el transcurso de su enfermedad, así como el número de ingresos. Asimismo, se tuvo en cuenta si alguno de esos ingresos fue debido a la aparición de alguna de las complicaciones siguientes: megacolon, hemorragia digestiva, perforación o absceso intraabdominal.
- **Uso de corticoides en el primer brote y durante la evolución de la enfermedad:** Utilización de tratamiento esteroideo en el primer brote de la enfermedad y en la evolución de la enfermedad, previamente a la colonoscopia, así como cuántos meses antes.
- **Desarrollo de corticodependencia o corticorresistencia:** Aparición de corticodependencia, definida como la reaparición de la sintomatología al reducir la dosis por debajo de 10mg al día de prednisona al día o la necesidad de dos ciclos de corticoides en un periodo de seis meses o de tres ciclos en un año. Corticorresistencia: se definió como la ausencia de respuesta a tratamiento con corticoides a dosis adecuadas durante un periodo de tiempo preestablecido antes de iniciar el tratamiento, entre una y dos semanas en función de la gravedad del cuadro.

- **Desarrollo de complicaciones asociada a la enfermedad:** se analizó la presencia de complicaciones como megacolon, hemorragia digestiva perforación y el desarrollo de displasia de alto grado o CCR.
- **Utilización de inmunosupresores o de fármacos biológicos:** Se analizó si el paciente, durante el curso de la enfermedad, había recibido tratamiento con fármacos inmunomoduladores: azatioprina, 6-mercaptopurina o metotrexato, o con fármacos biológicos: infliximab o adalimumab, en cada uno de ellos se tuvo en cuenta:
  - Indicación: inducción de la remisión; mantenimiento; manifestaciones extra-intestinales.
  - Respuesta clínica: mejoría de la sintomatología sin/con otro tratamiento concomitante.
  - Remisión clínica: desaparición de la sintomatología en ausencia de otro tratamiento concomitante.
  - Aparición de efectos adversos y si su aparición obligó a la retirada del fármaco.
- **Reservoritis:** se analizaron la presencia de reservoritis y la necesidad de cirugía en esta situación.
- **Cirugías:** se evaluó si el paciente había requerido cirugía o no en relación con la EII. Si se había procedido a resección intestinal o también si el paciente había recibido más de una intervención quirúrgica en el caso de complicaciones y/o drenaje de abscesos.
- **Fecha de la colonoscopia.**
- **Actividad endoscópica** en la colonoscopia de inclusión y la colonoscopia de seguimiento, cuando hubo lugar, según el subíndice endoscópico de Mayo.
- **Actividad clínica** en el momento de la inclusión y durante el seguimiento, combinada con la actividad endoscópica, medida por el índice UCDAI
- Determinaciones seriadas de **calprotectina fecal**, cuando estuvo disponible.

## **2. Métodos**

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación médica (CEIm) del Hospital Universitario de Salamanca. Todos los pacientes y controles firmaron un consentimiento informado al inicio del estudio, tras ser invitados a participar y previo a la recogida de la muestra (ver ANEXO-I).

### **Recogida de datos clínicos**

Se revisó la historia clínica de todos los pacientes y se recogieron los datos de la evolución clínica, extensión y comportamiento de la enfermedad mediante estudio endoscópico y técnicas radiológicas, se clasificaron según los criterios de Montreal, y fueron recogidos de forma prospectiva de la historia clínica de los pacientes. Se completaron mediante entrevista presencial o telefónica en aquellos casos en los que la información era incompleta. Los datos se incluyeron en una tabla de EXCEL para posterior tratamiento estadístico.

### **Obtención y procesado de las muestras**

Las colonoscopias se realizaron con endoscopios de la marca comercial Olympus, modelo GIF H180. Las biopsias recogidas con pinza de forma pareada se evaluaron por parte de patólogos pertenecientes al servicio de Anatomía Patológica como procedimiento habitual. Se obtuvieron portaobjetos de todas las muestras teñidas con eosina y hematoxilina descartándose displasia. La muestra pareada se procesaba al momento y se confirmaba la presencia de las mismas alteraciones, descartándose igualmente displasia, mediante el estudio morfológico de las biopsias en fresco, antes de proceder a la extracción de proteínas. El estudio morfológico de una biopsia en fresco es un procedimiento que requiere que el tejido esté carente de fijación y que ha de ser remitido inmediatamente de su toma al departamento de Anatomía patológica. En el laboratorio se procesaron las muestras para su congelación con nitrógeno líquido a -190°C y posteriormente se cotejaron al microscopio, antes de ser remitidas al laboratorio de la Unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, donde se procedió a la extracción y purificación de proteínas.

### **Extracción de proteínas**

La extracción de proteínas se llevó a cabo a partir de las muestras de tejido de mucosa de colon recogidas mediante pinza de biopsia. De las biopsias recibidas de mucosa de colon, se tomaron muestras de 100-200mg y se homogeneizaron en tampón de lisis RIPA (1% Igepal, 0.5% deoxicolato sódico, 0.1% SDS en PBS 1X) suplementado

con inhibidor de proteasas Api (pepstatina A, aprotinina y leuceptina) con ayuda del homogeneizador Polytron® System PT 1200 E, (Thermo Fisher Scientific). La mezcla se incubó durante 30 minutos a 4°C en agitación y se centrifugó a 12000g durante 15 minutos a 4°C, trasladando el sobrenadante, que es el que contiene el extracto proteico total, a un nuevo tubo Eppendorf® y almacenándolo a -80°C para evitar la desnaturalización y degradación de la muestra, hasta el momento de su uso.

## Anticuerpos

Para este trabajo se han utilizado ocho anticuerpos primarios diferentes, dos anticuerpos secundarios conjugados con la peroxidasa de rábano (HRP). Se muestran a continuación (Tabla11):

Tabla 11. Anticuerpos usados en este trabajo en los experimentos de Western Blot.

Anticuerpo	Tipo	Origen	Concentración WB	Casa comercial	Tamaño proteína (KDa)
Anti-LC3B	Primario	Conejo	1:1000	Novus Biologicals (NB600-1384)	17 (LC3-II) y 19 (LC3-I)
Anti-p62	Primario	Conejo	1:2000	Abcam® (ab109012)	62
Anti-mTOR	Primario	Conejo	1:2000	Cell signaling (#2972)	289
Anti- $\alpha$ Tubulina	Primario	Ratón	-	Sigma-Aldrich (T6199)	
Anti-Beclin1	Primario	Ratón	1:2000	Abcam® (ab114071)	70
Anti-PI3KCA	Primario	Conejo	1:1000	Abcam® (ab40776)	110
Anti-TRAF6	Primario	Conejo	1:8000	Abcam® (ab3915)	58
Anti- $\beta$ -actina	Primario	Ratón	1:10000	Sigma-Aldrich	42
Anti-Rabbit (HRP)	Secundario	Cabra	1:10000	Millipore (AP307P)	
Anti-Mouse (HRP)	Secundario	Cabra	1:10000	GE Healthcare (NXA931)	

## **Análisis de proteínas por electrotransferencia e inmunodetección (Western-Blot)**

Mediante esta técnica analizamos la expresión de las proteínas LC3B, p62/SQSTM1, TRAF6, mTOR, Beclin1 y PI3KCA. Las proteínas extraídas de la mucosa de colon de nuestros pacientes se cuantificaron mediante el método de la Seroalbúmina bovina (BSA) o en un Nanodrop® ND2000 (Thermo Fisher Scientific, Johannesburgo, Sudáfrica). Para realizar la electroforesis, las muestras de proteína total se prepararon mezclando 200µg de cada extracto proteico con tampón de carga (Tris 100mM pH 6.8, 20% glicerol, 4% SDS, 0.05% azul de bromofenol y 2% β- mercaptoetanol) y se desnaturalizaron durante 5-10 minutos a 100°C en un baño seco. Tras esto, se procedió a la carga de las muestras en geles SDS-PAGE para su separación en función del tamaño mediante electroforesis vertical con minigeles discontinuos (Sodium-Dodecylsulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis) siguiendo el protocolo de Laemmli<sup>213</sup>.

El gel separador se preparó a un porcentaje de acrilamida adecuado al tamaño de las proteínas a separar (8-12% acrilamida/bis-acrilamida 30%) (BioRad) en tampón Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 y SDS al 10%. Encima del gel separador, se preparó un gel concentrador al 4% acrilamida/bis acrilamida 30% en tampón Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 y SDS al 10%. Para la polimerización de los geles se utilizó AMPS (persulfato de amonio) y TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina). La electroforesis se realizó a 150 voltios en condiciones desnaturalizantes en tampón de electroforesis (Tris 20mM, Glicina 192mM y SDS al 1%) y como marcador de peso molecular se utilizó el marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific), en el que los tamaños que muestra en kDa son: 170, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15 y 10.

Una vez separadas por tamaño, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF Immobilon-P (Millipore Corporation) utilizando el sistema de transferencia semiseca TRANS BLOT® SD (BioRad) durante 45 minutos a 15 voltios en tampón 25mM Tris-HCl pH 8.5, 192mM Glicina y 20% metanol. Posteriormente, la membrana fue bloqueada durante 1 hora en una solución de leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T (0.1 % Tween-20 en TBS) para saturar todos los sitios inespecíficos de unión a proteínas. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario específico para la proteína de interés a la dilución adecuada (Tabla 11) en TBS-T con BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich) al 3% toda la noche a 4°C.

Tras varios lavados con TBS-T en agitación, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Tras nuevos lavados de la membrana con TBS-T, se utilizó el sistema de quimioluminiscencia basado en la oxidación del luminol



en presencia de peróxido de hidrogeno Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific), según las especificaciones del fabricante y se expuso la membrana a películas fotosensibles de autorradiografía (FUJIFILM) para la detección de proteínas<sup>214,215</sup>.

Los fragmentos correspondientes a las proteínas de interés se cuantificaron usando el programa de análisis de imagen ImageJ Features (Microsoft Java 1.1.4 public domain in <https://imagej.nih.gov/ij/>).

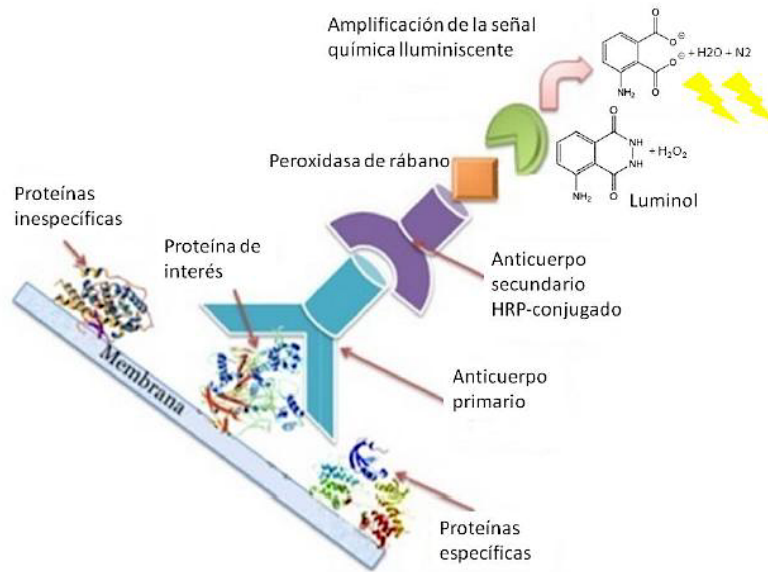


Figura 20. Fundamento teórico de la detección de proteínas mediante la técnica Western Blot por reacción quimioluminiscente. (HRP: peroxidasa de rábano).

### 3. Análisis Estadístico

La descripción de los datos cuantitativos se ha realizado mediante la media y desviación típica en el caso que la variable siguiera una distribución Normal. Se ha calculado la mediana y su rango intercuartílico si la distribución no fuera Normal. Las variables cualitativas se han descrito con frecuencias y sus respectivos porcentajes.

La representación de los datos se ha llevado a cabo mediante diagramas de sectores y barras para variables cualitativas y mediante box-plot para variables cuantitativas. El diagrama de puntos o dispersión se ha representado para ilustrar la asociación entre variables cuantitativas.

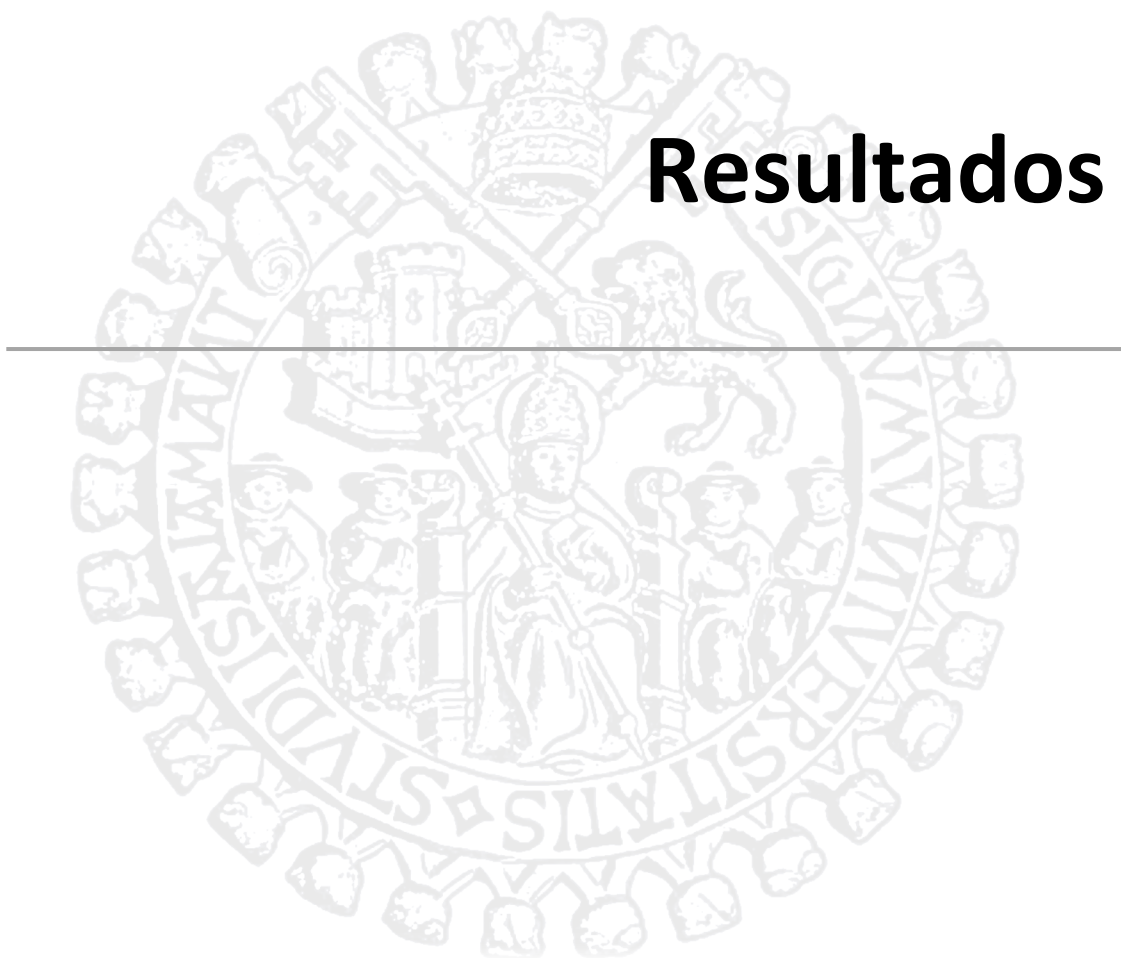
Para contrastar la normalidad de las variables se ha aplicado el test de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lilliefors. La comparación de dos medias poblacionales cuando la variable sigue una distribución Normal se ha llevado a cabo mediante el test t en el caso de varianzas poblacionales iguales o con el test t mediante la aproximación de Welch cuando las varianzas poblacionales son diferentes. Si el número de poblaciones a comparar es mayor de dos se ha aplicado el Análisis de la Varianza para un factor (ANOVA) en el caso de variables normales y homocedásticas o el test no paramétrico Kruskal-Wallis cuando no se cumplieron alguno de los supuestos de normalidad y homocedasticidad. En el caso de detectar diferencias estadísticamente significativas mediante la ANOVA o Kruskal-Wallis se utilizan los tests a posteriori de Bonferroni o Dunn respectivamente. Cuando las medidas son apareadas porque se repiten en el tiempo o porque son sometidas a situaciones diferentes se ha aplicado el test t para datos apareados o test no paramétrico de Wilcoxon dependiendo de la normalidad de los datos.

La asociación entre variables cualitativas se ha analizado aplicando el test Chi-cuadrado para tablas de contingencia siempre que el número de frecuencias superiores a 5 fueran mayor de un 20%, en caso contrario se utilizó el test exacto de Fisher. Para el análisis de asociación de variables cuantitativas se ha calculado el coeficiente de correlación de Pearson en el caso de que las variables fueran cuantitativas o el coeficiente de correlación de Spearman si una de las variables o ambas están medidas en escala ordinal.

El nivel de significación se ha fijado en 0,05. Los análisis estadísticos se han realizado mediante el programa estadístico SAS-JMP versión 12.

Los datos ampliados y las tablas complementarias resultantes del análisis están disponibles en el ANEXO-II.

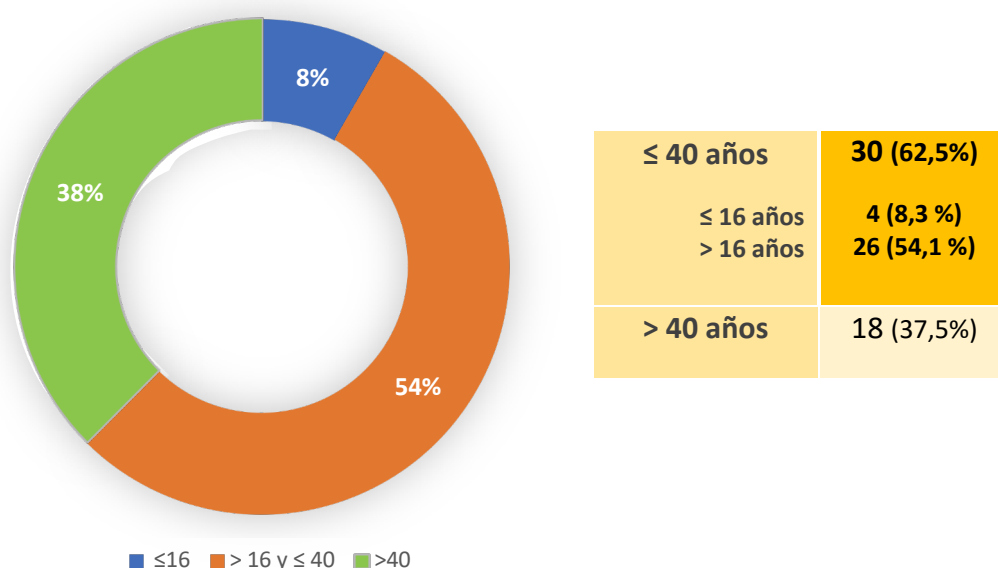
# Resultados



## 1. Características clínicas

La muestra está compuesta mayoritariamente por pacientes menores de 40 años (62,5%), con predominio de los diagnosticados entre 16 y 40 años (54,1%), si bien hay mayor concentración de pacientes con edades comprendidas entre 30 y 40 años. La edad media al diagnóstico fue de  $37,68 \pm 14,32$  años. Los porcentajes de los distintos grupos de edad se muestran en la siguiente figura:

**Figura 21.** Distribución de grupos de edad al diagnóstico (n (%)).



Respecto al género, la serie muestra un ligero predominio del sexo masculino (60,4%). El 35,4% de los pacientes eran fumadores o habían fumado. La duración media de la enfermedad desde la edad del diagnóstico fue de 11,43 años con un seguimiento máximo desde el diagnóstico de 18 años. Solo 4 pacientes (8%) refirieron antecedentes familiares de primer grado con diagnóstico previo de CU.

En relación a la extensión de la enfermedad aplicando la Clasificación de Montreal de la enfermedad inflamatoria intestinal, cerca de la mitad de los pacientes presentaban una pancolitis (E3) (47,9%), con menor predominio de la afectación izquierda (E2) (35,4%) y la proctitis (E1) (16,6%).

Evaluando las frecuencias de la gravedad, hubo un predominio de enfermedad moderada (S2)(35,4%) y grave (S3) (2,1%) y hasta un 33,3 % de enfermedad leve (S1). El resto de los casos (29,1%) se encontraban al momento

de la inclusión en forma inactiva o en remisión (S0), con lo que la mayoría de los grupos de gravedad eran uniformes.

En el 16,6% se asoció la presencia de manifestaciones extraintestinales, con predominio de la afectación oligoarticular asimétrica (8,3%), uveitis anterior con inyección ciliar (6,2%) y hepatitis autoinmune tipo I asociada (2,1%).

Respecto a las complicaciones durante el seguimiento, el 29,1% de los pacientes habían tenido al menos un ingreso hospitalario y en el 2,1% presentó alguna complicación asociada a la enfermedad (CCR y/o displasia de alto grado). No se describió ninguna complicación en forma de presentación de megacolon tóxico ni perforación. En la tabla 12 se describen (en número y porcentaje) las características de las variables analizadas.

**Tabla 12. Variables clínicas de pacientes y controles [n (%), ( $\bar{x} \pm DT$ )].**

<b>Características</b>	<b>Colitis Ulcerosa (n=48)</b>	<b>Controles (n=10)</b>
<b>Sexo (Mujer/Varón)</b>	19 (39.6) / 29 (60.4)	5/5
<b>Edad (años)</b>	48,52 $\pm$ 18,46	58,90 $\pm$ 5,36
<b>Tabaco, n (nunca/si)</b>	31 (64.6) / 17 (35.4)	8 (80) / 2 (20)
<b>Duración enfermedad (años)</b>	11.43 $\pm$ 18,01	
<b>Extensión, n (%)</b>		
<i>E1-Proctitis</i>	8 (16.6)	
<i>E2-Colitis Izquierda</i>	17 (35.4)	
<i>E3-Pancolitis</i>	23 (47.9)	
<b>Gravedad, n (%)</b>		
<i>S0 - Remisión</i>	14 (29.1)	
<i>S1- Leve</i>	16 (33.3)	
<i>S2- Moderada</i>	17 (35.4)	
<i>S3- Grave</i>	1 (2.1)	
<b>M. Extraintestinales (si/no)</b>	8 (16.6) / 40 (83.3)	
<b>Complicaciones (si/no)</b>	14 (29.2) / 34 (70.8)	

## 2. Opciones farmacológicas y terapéuticas.

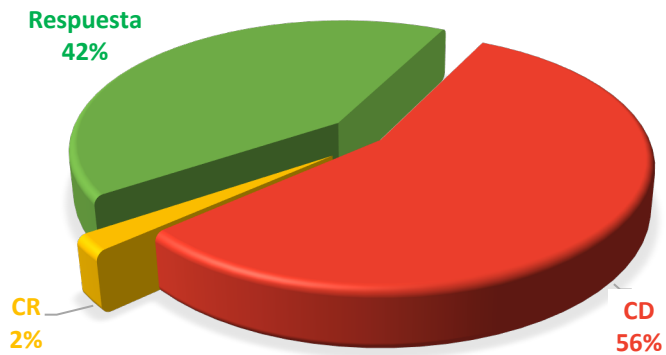
En cuanto a las opciones terapéuticas, se emplearon aminosalicilatos en todos los pacientes y en el transcurso de la enfermedad se utilizaron corticoides en el 87,5%; mientras que solo en el primer brote los recibieron el 64,5%. De los paciente que recibieron corticoides, el 56,2% desarrolló corticodependencia y solo el 2,1 % corticorresistencia.

**Tabla 13.** Tipos y modalidades de tratamientos [n (%)].

<b>TRATAMIENTOS, n (%)</b>	<b>Colitis Ulcerosa (n=48)</b>
<b>5-ASA</b>	<b>48 (100)</b>
<b>Glucocorticoides</b>	<b>42 (87.5)</b>
<b>1er brote</b>	31 (64.6)
<b>Corticodependencia/Corticorresistencia (CD/CR)</b>	27/1
<b>Azatioprina</b>	<b>27 (56.2)</b>
<i>Monoterapia</i>	21
<i>Combinado</i>	5
<i>Otras causas</i>	1
<i>Remisión libre de CE o respuesta</i>	23
<b>TRATAMIENTOS, n (%)</b>	
<b>Anti-TNF<math>\alpha</math></b>	<b>20 (41,6)</b>
<b>IFX</b>	<b>14 (29,1)</b>
<i>Respuesta</i>	13 (92,8) *
<i>Remisión clínica</i>	8 (57,1) *
<b>ADA</b>	<b>6 (12,5)</b>
<i>Respuesta</i>	4 (66,6) *
<i>Remisión clínica</i>	1 (16,6) *
<b>Antiintegrina-VEDO</b>	<b>3 (6,25)</b>
<i>Respuesta</i>	3 (100) *
<i>Remisión clínica</i>	1 (33) *
<b>Cirugía</b>	<b>2 (4,2)</b>

\* Representan los porcentajes respecto a los que recibieron dicho tratamiento

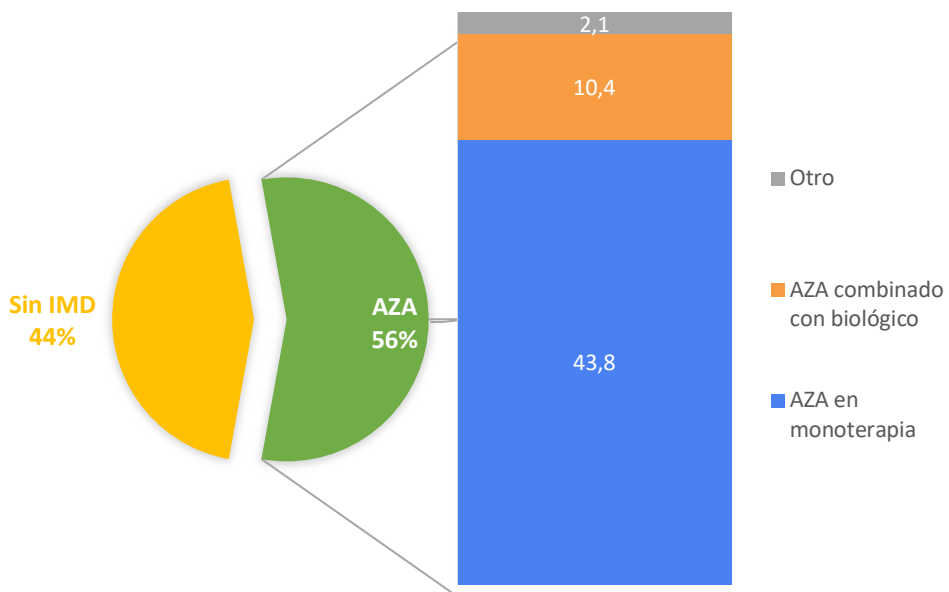
**Figura 22.** Respuesta a corticoides.



Azatioprina se utilizó en el 56,3% de los casos; en monoterapia en 21 casos (43,8%) y en combinación con biológico en 5 casos (10,4%). A un caso se le administraba previamente por coexistir diagnóstico anterior de hepatitis autoinmune (2,1%).

Su indicación principal fue el mantenimiento de la remisión en el 87,5%, obteniéndose remisión libre de corticosteroides en 23 casos (47,9%) de los casos tratados con inmunomoduladores. Ningún paciente de la muestra recibió 6-mercaptopurina.

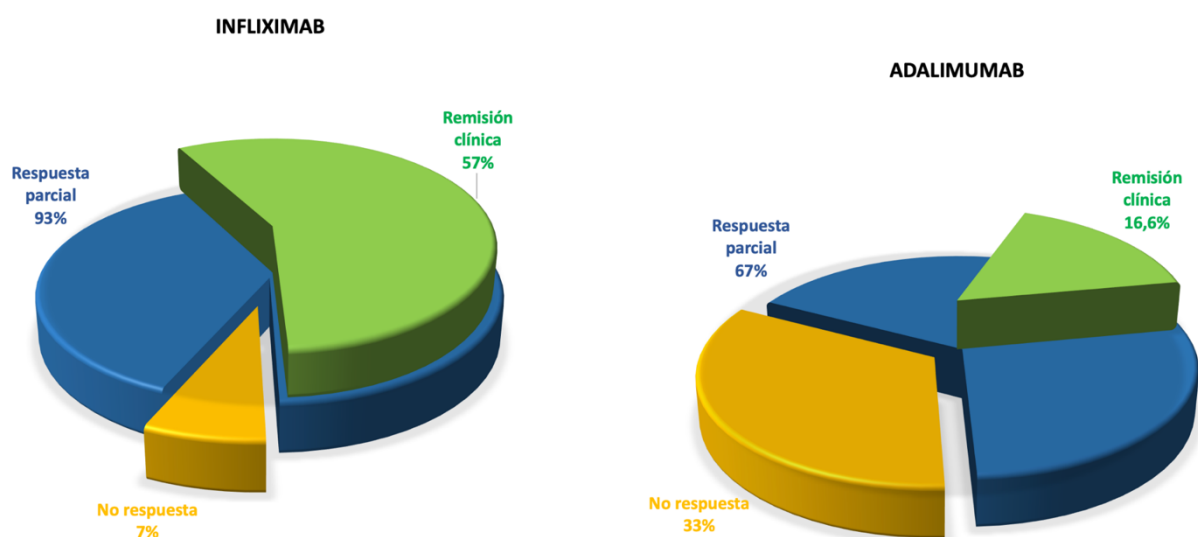
**Figura 23.** Porcentaje de pacientes que recibieron tratamiento con AZA.



Los fármacos biológicos anti-TNF se emplearon en el 41,6% y anti-integrina en el 6,25%. Se administró infliximab al 29,1% y presentando respuesta clínica el 92,8%, definida por un descenso de la actividad mayor a tres puntos según UCDAI; y alcanzando remisión clínica el 57,1% de los tratados. A 6 pacientes de esta muestra se les pautó adalimumab con respuesta en el 66,6 % y remisión del 16,6% de los tratados; y a 3 pacientes con vedolizumab con 100% de respuesta y 33% de remisión clínica, pero por su escaso número se ha desestimado mayor análisis estadístico de estos aspectos.

En ninguno de los casos moderados o graves se optó por el uso de ciclosporina. El 6,25% de los pacientes de nuestra muestra presentaron alguna reacción adversa leve asociada a azatioprina y el 2,1% a infliximab.

**Figura 24.** Porcentaje de pacientes con respuesta y remisión clínica a cada uno de los tratamientos anti-TNF $\alpha$  recibidos.



El 4,2% de los pacientes fueron sometidos a cirugía, los cuales necesitaron resección intestinal por falta de respuesta al tratamiento médico. El tipo de cirugía empleada fue panproctocolectomía con ileostomía temporal, seguida de una reconstrucción con reservorio ileoanal. Se logró remisión clínica tras la cirugía en todos los casos durante el periodo de seguimiento del estudio.



### 3. Análisis descriptivo de las asociaciones entre las variables a estudio atendiendo a la extensión de la enfermedad.

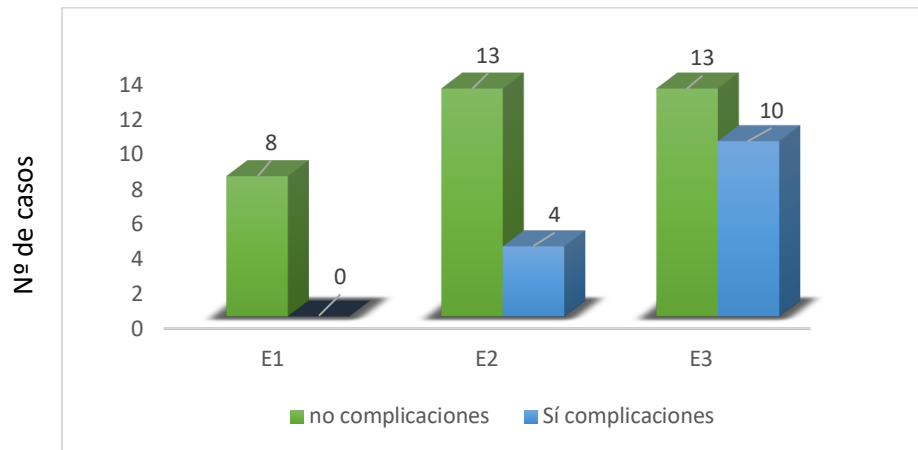
Para el análisis de asociación de las variables clínicas con la extensión se ha empleado la clasificación de Montreal que designa E1 para proctitis, E2 para colitis izquierda y E3 para pancolitis. No se ha detectado relación entre la extensión y el género, la presencia o no de hábito tabáquico, la duración de la enfermedad ni con la presencia de manifestaciones extra-intestinales. Si bien se apreciaron diferencias en cuanto a las complicaciones como mayor número de ingresos en aquellos casos con mayor extensión de la enfermedad de colitis izquierda a pancolitis.

**Tabla 14.** Distribución entre extensión y variables clínicas [n (%)].

Variables clínicas		Extensión			p-valor
		E1	E2	E3	
Tabaquismo	Sí	5 (37,5%)	5 (29,4%)	7 (30,4%)	0,115
	No	3 (62,5%)	12 (70,6%)	16 (69,6%)	
Complicaciones	Sí	2 (25%)	7 (41,2%)	5 (21,7%)	0,432
	No	6 (75%)	10 (58,8%)	18 (78,3%)	
Uso de corticoides	Sí	4 (50%)	16 (94,1%)	22 (95,7%)	0,01
	No	4 (50%)	1 (5,9%)	1 (4,3%)	
Respuesta a corticoides	CD/CR	1 (12,5%)	13 (76,5%)	14 (60,8%)	0,0026
	Respuesta	7 (87,5%)	4 (23,5%)	9 (39,2%)	
AZA	Sí	1 (12,5%)	12 (70,6%)	14 (60,8%)	0,0067
	No	7 (87,5%)	5 (29,4%)	9 (39,1%)	
IFX	Sí	2 (25%)	7 (41,2%)	5 (21,7%)	0,432
	No	6 (75%)	10 (58,8%)	18 (78,2%)	
ADA	Sí	2 (25%)	3 (17,7%)	1 (4,4%)	0,668
	No	6 (75%)	14 (82,3%)	22 (95,6%)	

Con respecto a la necesidad de distintos tratamientos o la presencia de complicaciones según extensión de la enfermedad, existieron diferencias en cuanto al uso de corticoides y azatioprina (Tabla 14), pero lo que resulta de mayor interés destacar es la respuesta a los distintos tratamientos respecto a la extensión, y únicamente se encontraron diferencias en corticodependencia de

aquellos con colitis izquierda respecto a los que tenían pancolitis (76,5 vs 60,8%), así como en el empleo de azatioprina en el grupo con colitis izquierda vs proctitis (70,6 vs 12,5%).



**Figura 25.** Presencia de complicaciones según extensión.

#### **4. Análisis exploratorio de las asociaciones entre las variables a estudio atendiendo a la gravedad de la enfermedad y respuesta al tratamiento.**

El análisis de la asociación entre las variables clínicas y la gravedad de la enfermedad o la respuesta a fármacos, se realizó con la escala T-W, que define S0 para silente, S1 para leve, aglutinando S2 y S3 para moderado-grave.

No se ha detectado relación entre la gravedad y las variables clínicas. Esta ausencia de significación estadística puede ser debida al tamaño de la muestra del estudio. No obstante, en algunas de estas asociaciones, cuando hemos encontrado una diferencia absoluta entre los porcentajes de al menos un 15%, hemos resaltado dicho resultado por haberlo considerado clínicamente relevante, como reflejo de tendencia, aunque no hubiera significación estadística.

Con respecto a la necesidad de distintos tratamientos según la actividad de la enfermedad, y concretamente en la respuesta a los tratamientos en función de los distintos niveles de gravedad, no hubo diferencias en la distribución de los diferentes fármacos empleados en el momento de inclusión en el estudio.

**Tabla 15.** Asociación entre gravedad y variables clínicas [n (%)].

Variables clínicas		Gravedad			p-valor
		S0	S1	S2-3	
Duración de la enfermedad (años)	<11	7 (50%)	7 (43,7%)	12 (66,7%)	0,117
	>11	7 (50%)	9 (56,3%)	6 (33,3%)	
Tabaquismo	Sí	3 (21,4%)	5 (31,3%)	9 (50%)	0,544
	No	11 (78,6%)	11 (68,7%)	9 (50%)	
Complicaciones	Sí	5 (35,7%)	5 (31,3%)	4 (22,4%)	0,796
	No	9 (64,3%)	11 (68,7%)	14 (77,6%)	
Uso de corticoides	No	1 (7,1%)	3 (18,7%)	2 (11,1%)	0,351
	Sí	13 (92,9%)	13 (81,3%)	16 (61,2%)	
AZA	No	6 (42,8%)	7 (43,7%)	8 (44,4%)	0,961
	Sí	8 (57,2%)	9 (56,3%)	10 (55,6%)	
IFX	No	9 (64,3%)	13 (81,3%)	12 (66,7%)	0,294
	Sí	5 (35,7%)	3 (18,7%)	6 (33,3%)	
ADA	No	12 (85,7%)	13 (81,3%)	17 (94,4%)	0,743
	Sí	2 (14,3%)	3 (18,7%)	1 (5,5%)	
VEDO	No	14 (100%)	15 (93,7%)	16 (88,9%)	0,341
	Sí	0 (0%)	1 (6,25%)	2 (11,1%)	

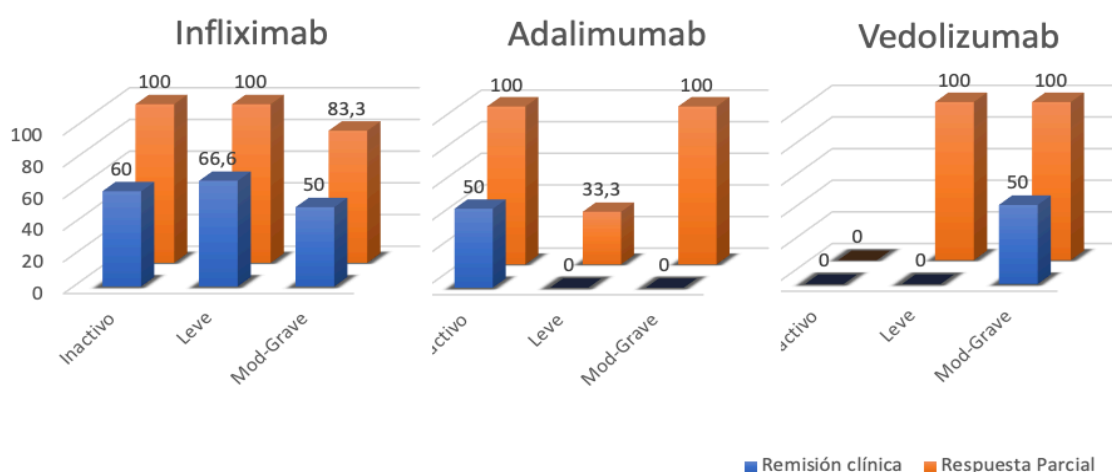
De los pacientes con enfermedad grave más del 60% eran corticodependientes o corticorresistentes. No se encontraron diferencias significativas respecto a la respuesta a corticoides en el grupo de actividad leve respecto al moderado a grave (44 %vs 38,8%), ni tampoco al uso de azatioprina. Más del 50% de los pacientes en el momento de inclusión estaban recibiendo azatioprina en cada uno de los grupos. El 33% de los pacientes con enfermedad grave recibió infliximab, mientras el 18% y 35% con enfermedad moderada o leve respectivamente, lo estaban recibiendo a la inclusión en el estudio. Se sometieron a colectomía 2 casos graves por falta de respuesta al tratamiento con biológicos.

Las categorías "respuesta" y "remisión" se describen en base al total de los que recibieron dicho tratamiento. Un mismo paciente puede tener respuesta y remisión como se recoge en la definición de variables. La respuesta a fármacos biológicos, en concreto Infliximab, fue mayor en aquellos casos con curso clínico leve frente a los de actividad moderada a grave (100 vs 83%). La remisión clínica a cada uno de los tratamientos biológicos atendiendo a los grupos de gravedad se logra en al menos el 50% en los que se empleó infliximab y en el 100% en los que se administró Vedolizumab (Tabla 16).

**Tabla 16.** Asociación entre tratamientos recibidos y respuesta [n (%)].

Variables clínicas		Gravedad			p-valor
		S0	S1	S2-3	
Uso de Corticoides	No	1 (7,1%)	3 (18,7%)	2 (11,1%)	0,351
	Sí	13 (92,9%)	13 (81,3%)	16 (61,2%)	
	Respuesta	6 (42,8%)*	7 (43,7%)*	7 (38,8%)*	0,431
	CD/CR	8 (57,2%)*	9 (56,3%)*	11 (61,2%)*	
AZA	No	6 (42,8%)	7 (43,7%)	8 (44,4%)	0,961
	Sí	8 (57,2%)	9 (56,3%)	10 (55,6%)	
	Respuesta	7 (87,5%)*	7 (77,7%)*	9 (90%)*	
IFX	No	9 (64,3%)	13 (81,3%)	12 (66,7%)	0,294
	Sí	5 (35,7%)	3 (18,7%)	6 (33,3%)	
	Respuesta	5 (100%)*	3 (100%)*	5 (83,3%)*	
	Remisión	3 (60%)*	2 (66,6%)*	3 (50%)*	
ADA	No	12 (85,7%)	13 (81,3%)	17 (94,4%)	0,743
	Sí	2 (14,3%)	3 (18,7%)	1 (5,5%)	
	Respuesta	2 (100%)*	1 (33,3%)*	1 (100%)*	
	Remisión	1(50%)*	0 (0%)*	0 (0%)*	
VEDO	No	14 (100%)	15 (93,7%)	16 (88,9%)	0,341
	Sí	0 (0%)	1 (6,25%)	2 (11,1%)	
	Respuesta	-	1 (100%)*	2 (100%)*	
	Remisión	-	0 (0%)*	1 (50%)*	

\*Representan los porcentajes respecto al total de los que recibieron tratamiento.



**Figura 26.** Porcentaje de respuesta a tratamientos biológicos recibidos [%].

## 5. Estudio de la expresión de las proteínas relacionadas con la ruta de autofagia en muestras tisulares de pacientes con Colitis Ulcerosa.

El objetivo es analizar el proceso de la autofagia en la mucosa de colon normal y en pacientes con colitis ulcerosa con y sin actividad inflamatoria. Para ello se busca determinar que proteínas relacionadas con autofagia podrían ser factores diagnósticos o pronósticos de dicha condición. Hemos estudiado mediante western blot las proteínas p62/SQSTM1, LC3B y TRAF6 en 58 muestras de mucosa de colon. En los casos analizados para mTOR los resultados se han determinado tras el análisis de 55 muestras, Beclin1 se analizó en 35 muestras, finalmente, PIK3CA se analizó en 25 muestras, obtenidas tras la realización de los westerns blot que se obtuvieron para una evaluación válida de dicha expresión. Dichas diferencias en el tamaño muestral han sido consideradas respectivamente en los sucesivos análisis sin desequilibrio de los grupos establecidos en el diseño del estudio.

Para poder determinar si la expresión de alguna de estas proteínas está relacionada con la extensión o la gravedad de la enfermedad, se analizaron también 10 muestras de individuos sanos a los que se les realizaba colonoscopia en el contexto del programa de cribado de otras enfermedades no inflamatorias en población asintomática. En todos los casos estudiados, los resultados fueron normalizados usando una muestra control presente en todas las réplicas y membranas de estudio. Se empleó  $\beta$ -actina como muestra de normalización cumpliéndose las características requeridas para ello según las estrategias de normalización más extendidas<sup>216</sup>.

### 5.1. Análisis de la expresión de la proteína p62.

El estudio de la expresión de la proteína p62 se llevó a cabo mediante western-blot, observándose densidad nula o tenue de los fragmentos de 62KDa que se corresponden con la proteína (Figura27).

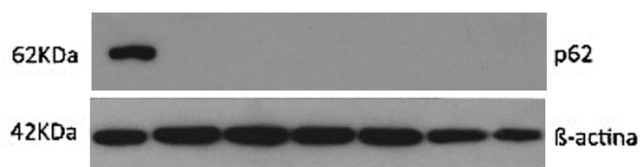


Figura 27. Imágenes representativas de western blot de la expresión de p62 y  $\beta$ -actina (control de carga) en muestras de mucosa de colon.

El análisis de la expresión de la proteína p62 mostró que en aproximadamente el 79,3% de las muestras los niveles de expresión eran prácticamente nulos o carecían de expresión. Mientras el 20,7% restante mostraba una expresión muy marcadamente disminuida comparada con la del control, considerando los bajos valores absolutos observados tras la cuantificación densitométrica (Figura 28).

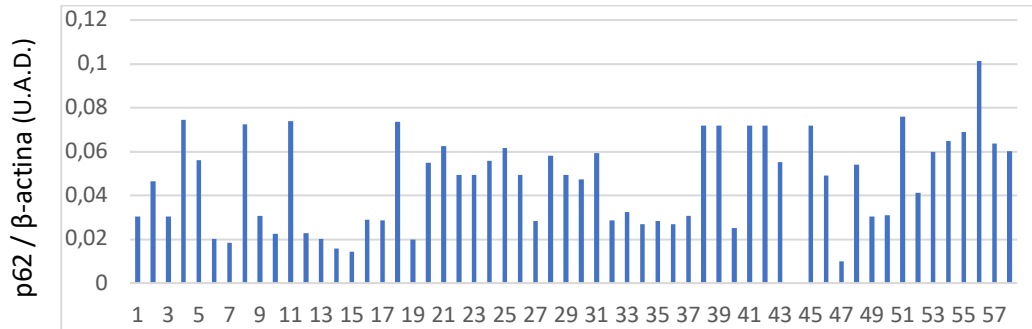


Figura 28. Representación gráfica de la expresión de la proteína p62 en muestras tisulares de mucosa de colon. Se representa la cuantificación densitométrica con la ratio de proteína de interés/ $\beta$ -actina de cada muestra normalizado respecto al control seleccionado (T98G).

Al analizar las diferencias entre los grupos de extensión y la expresión de p62 se han detectado diferencias significativas entre las medianas poblacionales ( $p$ -valor=0,007). Las diferencias detectadas por el test a posteriori de Dunn son entre grupo control y colitis izquierda ( $p$ -valor=0,018, diferencia de medianas de 0,033), y entre pancolitis y colitis izquierda ( $p$ -valor=0,046, diferencia entre medianas de 0,027) (Figura 29), sugiriendo que, aún con niveles absolutos tan bajos, p62 podría tener valor como marcador de extensión.

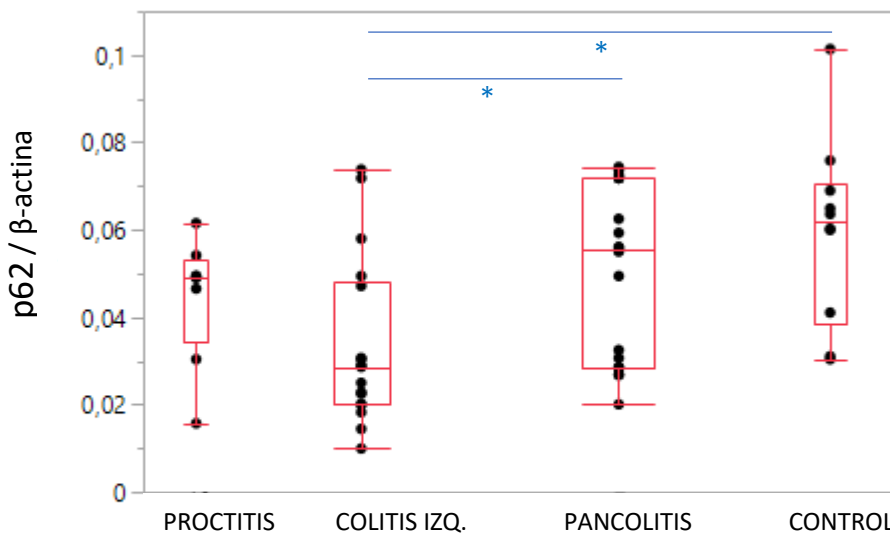


Figura 29. Representación en Box-Plot de la distribución de los valores de la expresión de la proteína p62 en muestras tisulares de mucosa de colon atendiendo a la extensión de la enfermedad. Los segmentos entre box-plot muestran entre que grupos hay diferencias estadísticamente significativas. Prueba test de Dunn (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

En el estudio de la expresión de la proteína p62 atendiendo a los grupos de gravedad de la enfermedad, se observó que todos los grupos cumplían con la normalidad y eran homocedásticos, por lo que se usaron las medias realizando análisis del Anova. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de p62 (p-valor=0,04). Si analizamos las diferencias entre los grupos se muestra que la única comparación significativa es la del grupo control con los pacientes con afectación leve (S1) (p-valor=0,0264).

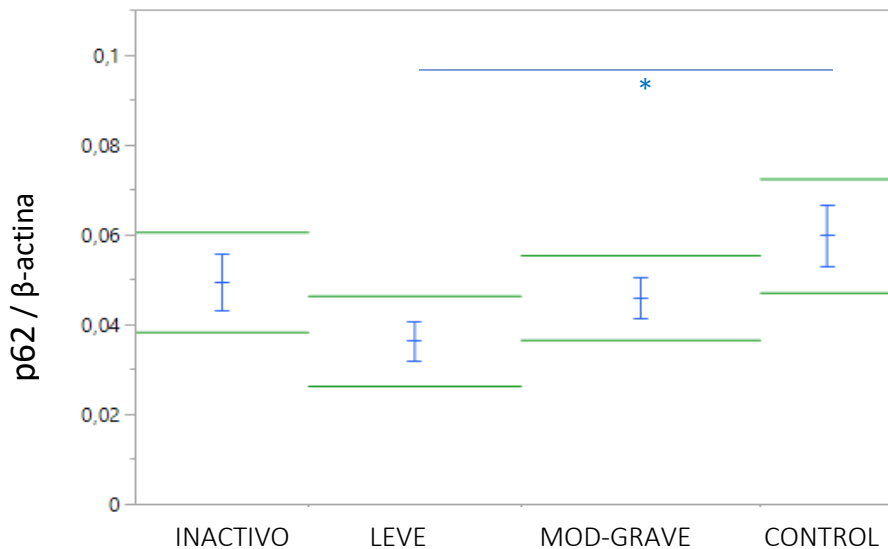


Figura 30. Representación de los intervalos de confianza para las medias de los valores de expresión de la proteína p62 en muestras tisulares de mucosa de colon atendiendo a la gravedad de la enfermedad. (Líneas verdes: IC al 95%, líneas azules: Media±Error estándar). Los segmentos entre box-plot muestran entre que grupos hay diferencias estadísticamente significativas. Test de Bonferroni (\* p<0,05).

La comparación entre el grupo con actividad, el grupo en remisión y el grupo control puso de manifiesto que la ausencia de p62 está relacionada con los grupos con enfermedad, pero también con el grupo control (Test exacto de Fisher: p-valor<0,001) (Tabla 17). Por tanto, la ausencia o baja expresión de la proteína, no se asoció ni gravedad ni a ninguna de las variables clínicas analizadas en las muestras de nuestro estudio. Ello sugiere que dicha ausencia de expresión podría estar relacionada con activación de la vía de autofagia tanto en mucosa de colon normal como en la de los pacientes con CU.

**Tabla 17.** Porcentajes de pacientes según la expresión de p62.

p62			
	Sin expresión	Baja expresión	Expresión normal
<b>Actividad</b>	31	3	0
	91,2%	8,8%	-
<b>Remisión</b>	13	1	0
	92,8%	7,2%	-
<b>Control</b>	2	8	0
	20%	80%	-
<b>Total</b>	46	12	0
	79,3%	20,7%	-

## 5.2. Análisis de la expresión de la proteína LC3B.

El estudio de LC3B se llevó a cabo mediante western blot y permitió detectar, tanto la forma LC3B-I, que se detecta a 19KDa; como la forma conjugada con fosfatidiletanolamida, LC3B-II. A pesar de que esta última tiene mayor peso molecular, migra más rápido en SDS-PAGE debido a su hidrofobicidad, por lo que muestra un peso molecular aparentemente más bajo y se detecta a 17KDa. (Figura 31).

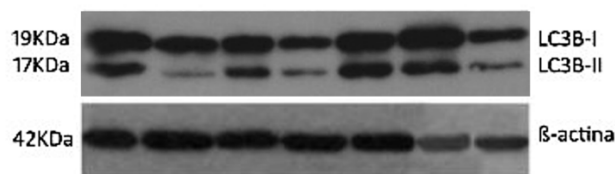


Figura 31. Western blot de la expresión de LC3B en algunas de las muestras de mucosa de colon estudiadas y β-actina (control de carga).

El análisis de la expresión de las proteínas LC3B-I y II en mucosa de colon mostró resultados homogéneos comparados entre si, tomándose como referencia las medidas de LC3B-II. Aproximadamente el 65% de las muestras con actividad presentaban niveles de expresión normales frente al 7% de las muestras en remisión, con expresión disminuida, y los controles sin enfermedad en los que más del 90% carecían de expresión o era prácticamente nula (Figura 32 y tabla 18).

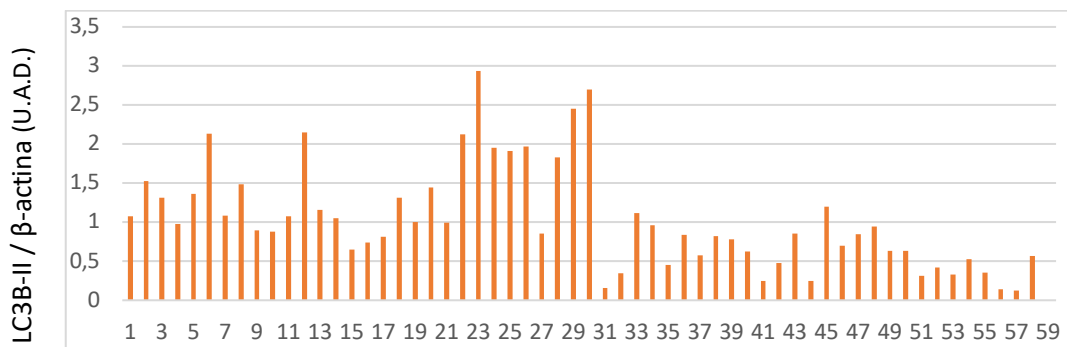


Figura 32. Representación gráfica de la expresión de LC3B-II en muestras tisulares de mucosa de colon. Se representa la cuantificación densitométrica con la ratio de LC3B-II/β-actina de cada una de las muestras normalizadas respecto al control seleccionado (T98G).



Al analizar estos resultados de expresión y las variables clínicas de los pacientes, vimos que no existía una asociación significativa. La asociación entre la expresión de LC3B-II y la extensión presenta resultados estadísticamente significativos ( $p$ -valor $<0.001$ ). Las diferencias se han detectado entre el grupo control y proctitis ( $p$ -valor=0,0005; diferencia entre medianas=0,911), así como entre control y colitis izquierda ( $p$ -valor=0,0013; diferencia de medianas=0,611) y entre control y pancolitis ( $p$ -valor=0,009; diferencia de medianas=0,57) para la proteína LC3B-II (Figura 33).

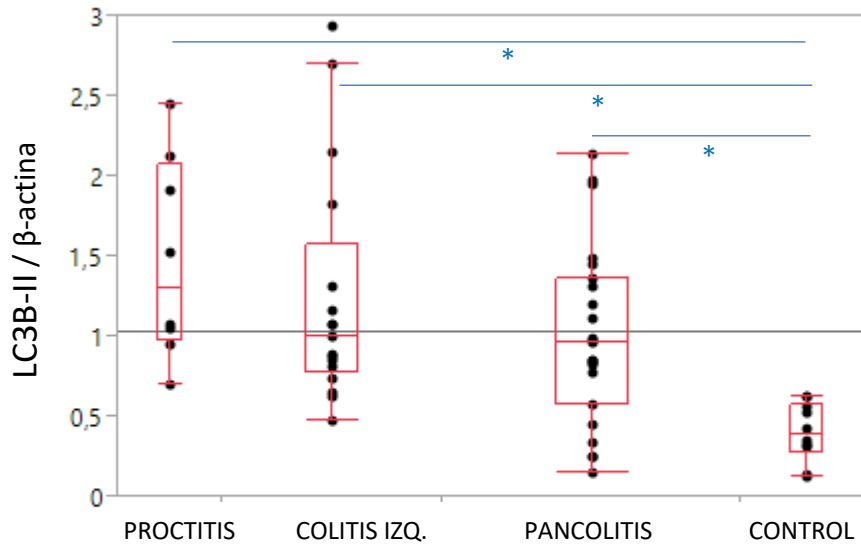


Figura 33. Representación en Box-Plot de la distribución de los valores absolutos de la expresión de la proteína LC3B en muestras tisulares de mucosa de colon atendiendo a la extensión de la enfermedad. Los segmentos entre box-plot muestran entre que grupos hay diferencias estadísticamente significativas. Prueba test de Dunn (\*  $p$ <0,05; \*\*  $p$ <0,01).

En el estudio de la expresión de la proteína LC3B, atendiendo a los grupos de gravedad de la enfermedad, se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p$ -valor $<0,0001$ ). Las diferencias se detectaron entre el grupo control y los grupos con actividad leve y moderada-grave ( $p$ -valor=0,0002; diferencia de medianas=-0,75 y  $p$ -valor $<0,0001$ ; diferencia de medianas=-0,84, respectivamente), e inactivo frente a los grupos de actividad leve y moderada-grave ( $p$ -valor=0,0063; diferencia de medianas=-0,47 y 0,0006; diferencia de medianas=-0.75, respectivamente).

Por tanto, parece clara la relación entre mayor grado de actividad y mayor nivel de expresión de LC3B con diferencias más patentes al establecer comparaciones con el grupo control, aunque no parece ser un marcador óptimo para discriminar entre el grupo con actividad leve y el grupo con actividad moderada a grave.

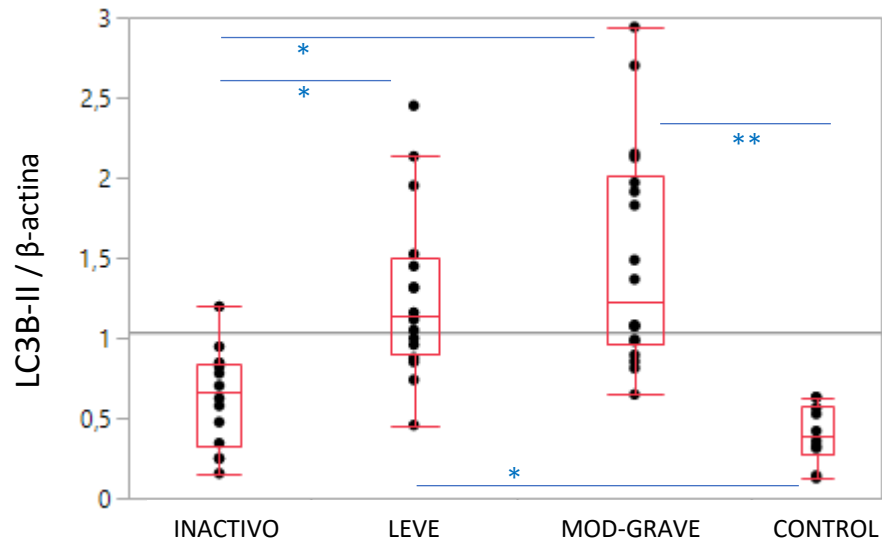


Figura 34. Representación en Box-Plot de la distribución de los valores absolutos de la expresión de la proteína LC3B-II en muestras tisulares de mucosa de colon atendiendo a la gravedad de la enfermedad. Los segmentos entre box-plot muestran entre que grupos hay diferencias estadísticamente significativas. Prueba test de Dunn (\* p<0,05; \*\* p<0,01).

La comparación entre los grupos de pacientes y control, mostró que la expresión de LC3B-II está asociada con la activación de la vía de autofagia en mucosa de colon como en estudios previos (Test exacto de Fisher: p-valor<0,001) (Tabla 18), sugiriendo que esta proteína podría estar relacionada con el grado de actividad y extensión de la enfermedad, sin poder obtener la potencia estadística suficiente para demostrar que es capaz de discriminar entre diferentes niveles de actividad, probablemente por el tamaño muestral del estudio.

**Tabla 18.** Porcentajes de pacientes según la expresión de LC3B-II.

LC3B-II			
	Sin expresión	Baja expresión	Expresión normal
<b>Actividad</b>	1	11	22
	2,9%	32,3%	64,7%
<b>Remisión</b>	6	7	1
	42,8%	50%	7,2%
<b>Control</b>	9	1	0
	90%	10%	0%
<b>Total</b>	16	19	23
	27,6%	32,7%	39,6%

### 5.3. Análisis de la expresión de la proteína TRAF6.

El estudio de la expresión de la proteína TRAF6 mediante western blot, permitió observar un fragmento a 58KDa que se corresponde con el tamaño de la proteína (Figura 35).

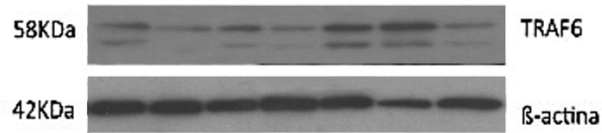


Figura 35. Western blot de la expresión de TRAF6 en algunas de las muestras estudiadas. β-actina fue el control de carga.

El análisis de la expresión de la proteína TRAF6 en colitis ulcerosa y controles sanos mostró expresiones normales de la proteína en el 26% de los casos con actividad, mientras que el 44% la tenía disminuida y el 29% restante carecía de expresión como ocurrió en el 100% de las muestras del grupo en remisión y el 100% de los controles sanos (Figura 36).

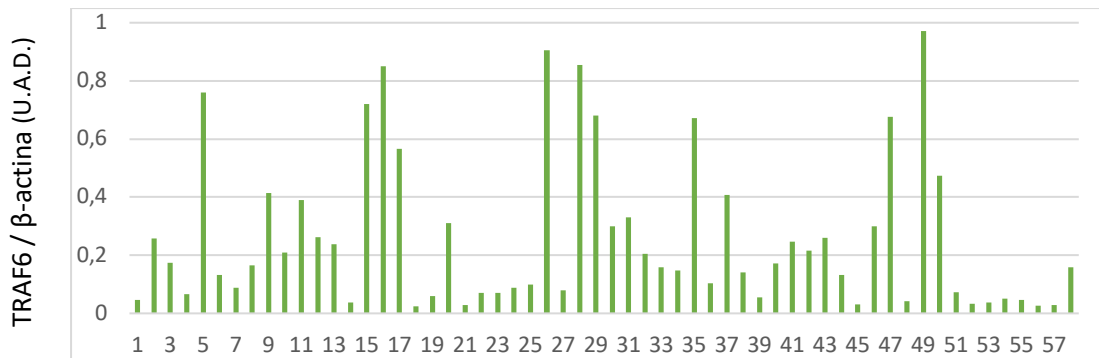


Figura 36. Representación gráfica de la expresión de TRAF6 en muestras tisulares de mucosa de colon. Se representa la cuantificación densitométrica con la ratio de TRAF6/β-actina de cada una de las muestras normalizadas respecto al control seleccionado (T98G).

El estudio de asociación entre los resultados de expresión de TRAF6 y las variables clínicas y demográficas de los pacientes no mostró diferencias significativas entre ellos. No obstante, se ha detectado que hay diferencias en la expresión de TRAF6 y la extensión ( $p$ -valor $<0,001$ ). Las diferencias se detectan entre el grupo control y el resto de los grupos de extensión. La diferencia entre las medianas del grupo control y colitis izquierda fue de 0,13 ( $p$ -valor $<0,001$ ), entre el control y pancolitis fue de 0,161 ( $p$ -valor=0,004) y con proctitis fue 0,257 ( $p$ -valor $<0,03$ ) para la proteína TRAF6 (Figura 37).

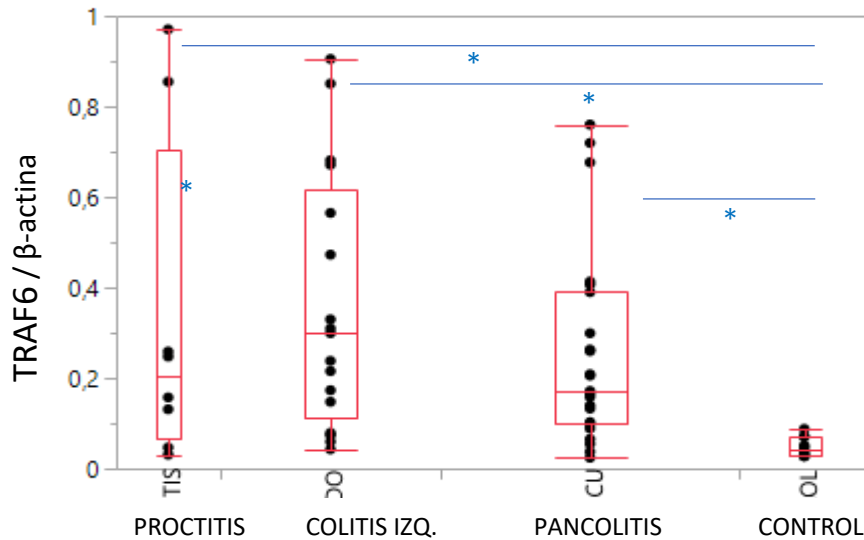


Figura 37. Representación en Box-Plot de la distribución de los valores absolutos de la expresión de la proteína TRAF6 en muestras tisulares de mucosa de colon atendiendo a la extensión de la enfermedad. Los segmentos entre box-plot muestran entre que grupos hay diferencias estadísticamente significativas. Prueba test de Dunn (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

En el estudio de la expresión de la proteína TRAF6, atendiendo a los grupos de gravedad de la enfermedad, nuevamente se detectaron diferencias significativas entre los grupos control frente a los grupos con actividad leve y moderada-grave ( $p$ -valor  $< 0,0001$  y  $0,0003$ , respectivamente), e inactivo frente a los grupos con actividad leve y moderada-grave ( $p$ -valor  $= 0,0016$  y  $0,0325$ , respectivamente). Por tanto, se reconoce una relación directa entre el grado de actividad y el nivel de expresión de TRAF6, como también ocurre con LC3B-II.

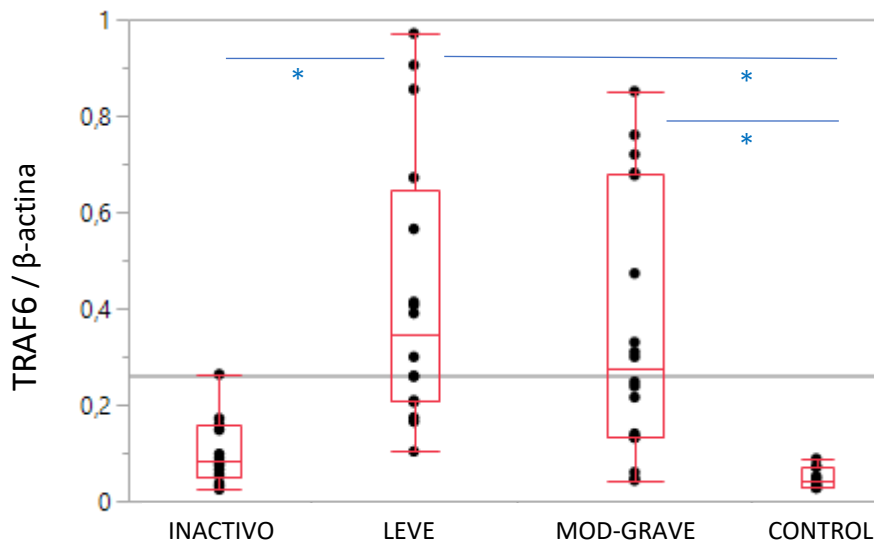


Figura 38 Representación en Box-Plot de la distribución de los valores absolutos de la expresión de la proteína TRAF6 en muestras tisulares de mucosa de colon atendiendo a la gravedad de la enfermedad. Los segmentos entre box-plot muestran entre que grupos hay diferencias estadísticamente significativas. Prueba Test de Dunn (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ )

Al comparar la expresión de TRAF6 en los distintos grupos a estudio observamos que la ausencia de expresión de TRAF6 está asociada a los pacientes con enfermedad en remisión y a los controles sanos (Test exacto de Fisher:  $p < 0.001$ ) (Tabla 19), sugiriendo que la expresión normal de la misma podría estar relacionada con mayor actividad de la enfermedad, de manera análoga a como ocurría con LC3B-II.

**Tabla 19.** Porcentajes de pacientes según la expresión de TRAF6.

TRAF6			
	Sin expresión	Baja expresión	Expresión normal
<b>Actividad</b>	10	15	9
	29,4%	44,1%	26,5%
<b>Remisión</b>	14	0	0
	100%	0%	0%
<b>Control</b>	10	0	0
	100%	0%	0%
<b>Total</b>	34	15	9
	58,6%	25,8%	15,5%

#### 5.4. Análisis de la expresión de la proteína mTOR.

La proteína mTOR se estudió mediante western blot, viéndose fragmentos de 289KDa que se corresponden con esta proteína (Figura 39).

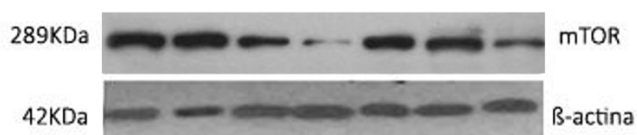


Figura 39. Western blot de la expresión de mTOR en algunas de las muestras estudiadas.  $\beta$ -actina fue el control de carga.

Al estudiar la expresión proteica de mTOR ninguna de las muestras analizadas del grupo con actividad expresó mTOR y en el grupo en remisión su expresividad representada era prácticamente nula, mientras que en el grupo de controles sanos en aproximadamente el 44% presentaron una expresión baja (Figura 40 y tabla 20).

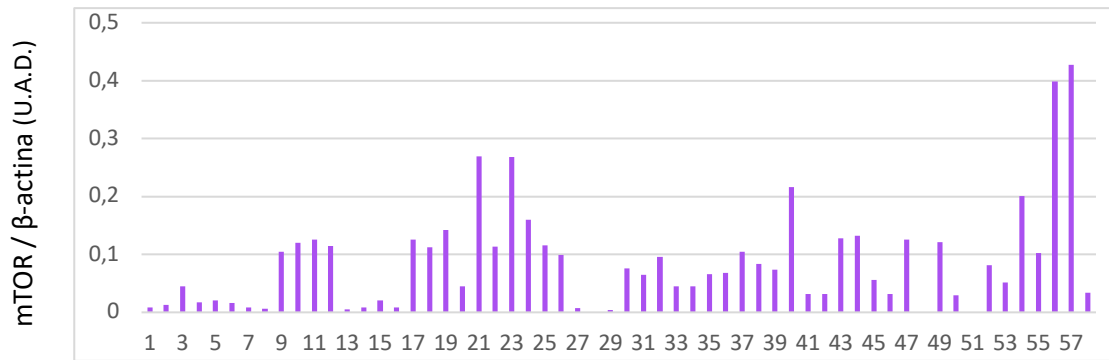


Figura 40. Representación gráfica de la expresión de mTOR en muestras tisulares de mucosa de colon. Se representa la cuantificación densitométrica con la ratio de mTOR/ $\beta$ -actina de cada una de las muestras normalizadas respecto al control seleccionado (T98G).

Analizando los resultados de expresión de mTOR comparativamente con las características clínicas de los pacientes, no se objetivó asociación entre ellas. El análisis de global de las diferencias en medianas entre los diferentes grupos de extensión en la expresión ha sido significativo ( $p$ -valor=0,03). Se han detectado diferencias significativas entre el grupo control y colitis izquierda ( $p$ -valor=0,0027; diferencia entre medianas=0,135), así como entre el grupo control y pancolitis ( $p$ -valor=0,0407; diferencia de medianas=0,097).

Si bien en la comparativa del grupo proctitis está próxima a la significación estadística (Figura 41). Todo ello sugiere que, como ocurría con p62, también con niveles absolutos bajos, pero algo más determinantes, mTOR indica una tendencia en sus valores como posible marcador de extensión.

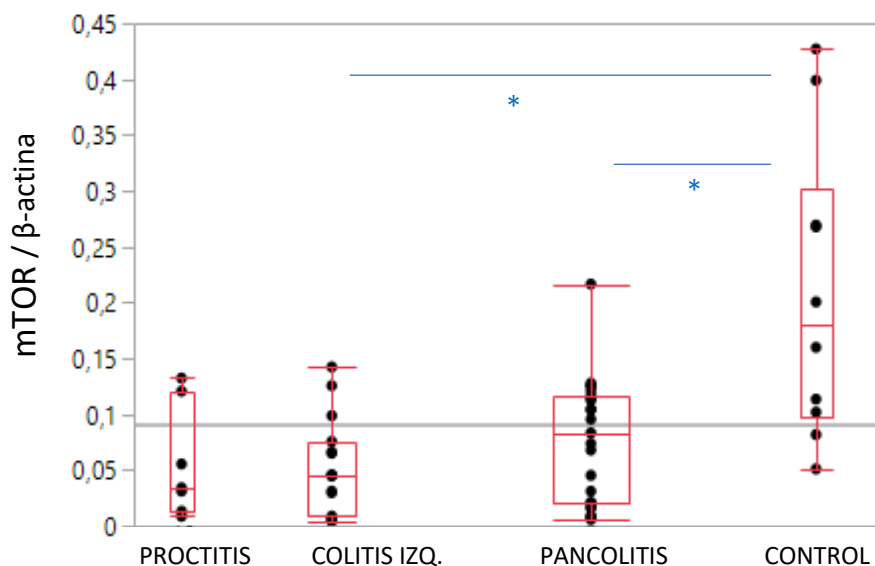


Figura 41. Representación en Box-Plot de la distribución de los valores de la expresión de la proteína mTOR en muestras tisulares de mucosa de colon atendiendo a la extensión de la enfermedad. Los segmentos entre box-plot muestran entre que grupos hay diferencias estadísticamente significativas.

Prueba Test de Dunn (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ )

Se han detectado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de gravedad y la expresión de esta proteína (p-valor=0,005). Si analizamos las diferencias entre los distintos grupos se observaron diferencias significativas entre el grupo control frente al grupo con actividad moderada-grave y al grupo inactivo (p-valor=0,0008 y 0,0162, respectivamente) y se identifica una tendencia no significativa entre el grupo control y el grupo con afectación leve.

Con todo, marginalmente se podría establecer una relación indirecta entre el grado de actividad y el nivel de expresión de mTOR, como también ocurre con p62.

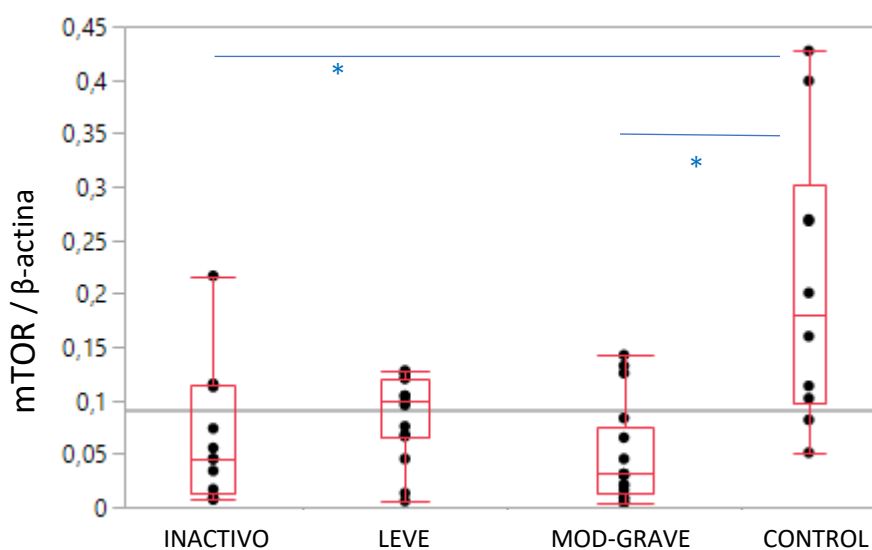


Figura 42. Representación en Box-Plot de la distribución de los valores de la expresión de la proteína mTOR en muestras tisulares de mucosa de colon atendiendo a la gravedad de la enfermedad. Prueba Test de Dunn (\* p<0,05, \*\* p<0,01)

La comparación entre los distintos grupos a estudio sobre la expresión de mTOR permite sugerir que la ausencia de expresión de mTOR está asociada principalmente a los pacientes con enfermedad activa y en remisión (Test exacto de Fisher: p-valor<0,001) (Tabla 20), sugiriendo que la expresión nula o baja podría estar relacionada con mayor actividad de la enfermedad y por tanto una activación de la autofagia.

**Tabla 20.** Porcentajes de pacientes según la expresión de mTOR.

mTOR (n=55)			
	Sin expresión	Baja expresión	Expresión normal
<b>Actividad</b>	33	0	0
	100%	0%	-
<b>Remisión</b>	12	1	0
	92,3%	7,7%	-
<b>Control</b>	5	4	0
	55,5%	44,5%	-
<b>Total</b>	50	5	0
	90,9%	9,1%	-

## 5.5. Análisis de la expresión de la proteína Beclin1.

Mediante western blot, se representó un fragmento a 70KDa que se corresponde con el tamaño de la proteína Beclin1 (Figura 43).

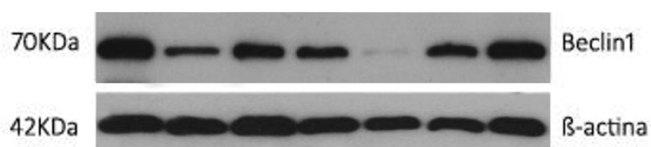


Figura 43. Western blot de la expresión de Beclin1 en algunas de las muestras estudiadas.  $\beta$ -actina fue el control de carga.

El análisis de la expresión de la proteína Beclin1 en colitis ulcerosa solo mostró niveles de expresión normales en el 16% de los casos, mientras que el 82% la tenía disminuida o carecía de expresión como ocurría en la extensa mayoría del control y del grupo en remisión (Figura 44).

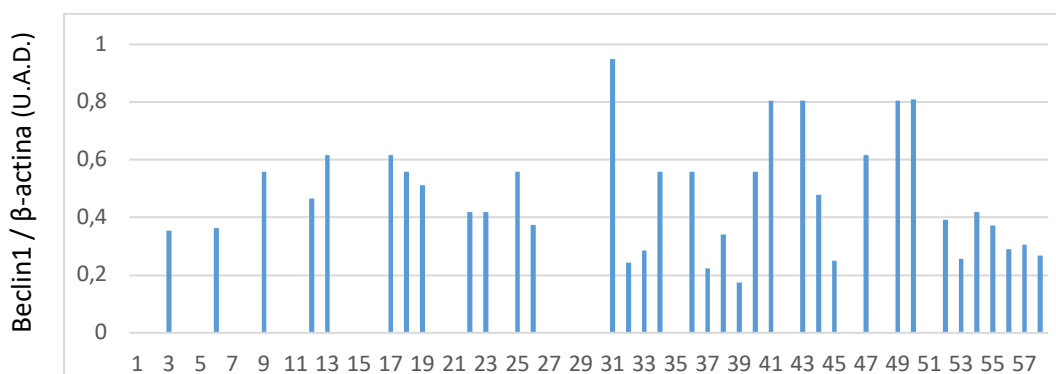


Figura 44. Representación gráfica de la expresión de Beclin1 en muestras tisulares de mucosa de colon. Se representa la cuantificación densitométrica con la ratio de Beclin1/ $\beta$ -actina de cada una de las muestras normalizadas respecto al control seleccionado (T98G).

El estudio de asociación entre los resultados de expresión de Beclin1 y las variables clínicas y demográficas de los pacientes no mostró diferencias significativas entre ellos. No se han detectado diferencias significativas entre todos los grupos de extensión ( $p$ -valor=0,121), pero estos resultados hay que tomarlos con cautela ya que los tamaños muestrales son más pequeños. De hecho, la diferencia comparable entre las medianas del grupo control y colitis izquierda es de 0,2, aunque no supongan significación estadística puede considerarse una diferencia experimental relevante.



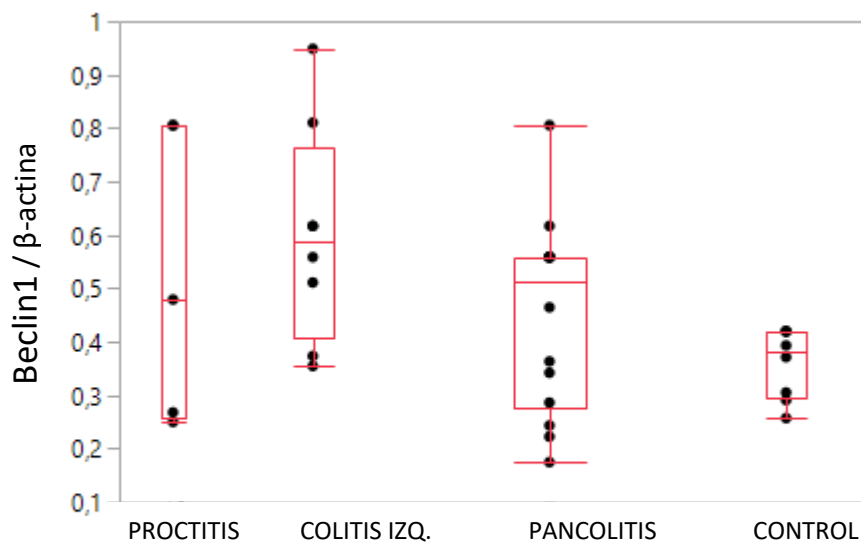


Figura 45. Representación en Box-Plot de la distribución de los valores de la expresión de la proteína Beclin1 en muestras tisulares de mucosa de colon atendiendo a la extensión de la enfermedad. Prueba Test de Dunn (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ )

En el estudio de la expresión de la proteína Beclin1, atendiendo a los grupos de gravedad de la enfermedad. No se han detectado diferencias estadísticamente significativas entre las medianas poblacionales ( $p$ -valor=0,07), aunque están próximas a la significación. El grupo control presenta valores medios menores que el resto de los grupos con la mayor diferencia entre el grupo control y el grupo con actividad moderada a grave (Figura 46). Podría describirse cierta tendencia entre el grado de actividad y el nivel de expresión de Beclin1, como también ocurre con LC3B-II.

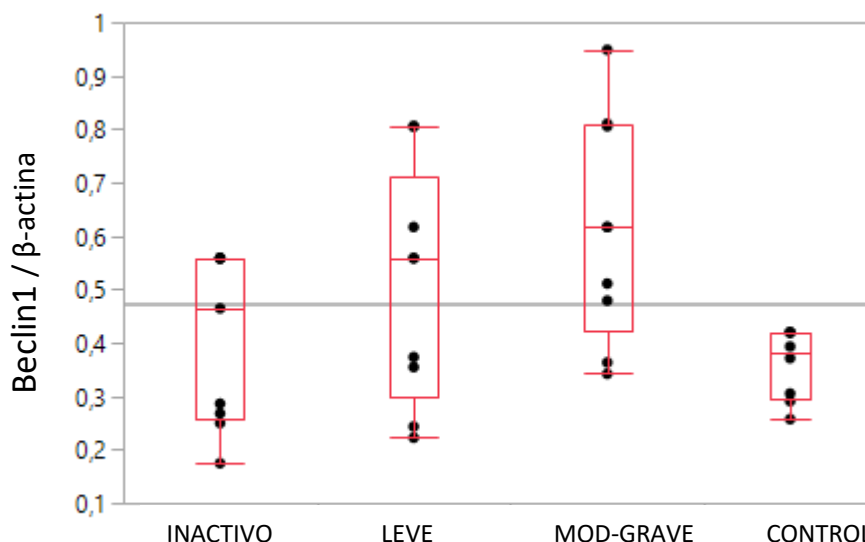


Figura 46. Representación en Box-Plot de la distribución de los valores de la expresión de la proteína Beclin1 en muestras tisulares de mucosa de colon atendiendo a la gravedad de la enfermedad. Prueba Test de Dunn (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ )

Al comparar la expresión de Beclin1 en los distintos grupos a estudio observamos que la ausencia de expresión de Beclin1 está asociada a los pacientes con enfermedad en remisión y a los controles sanos (88% y 100%, respectivamente) (Tabla 21), sugiriendo que la expresión normal de la misma podría estar relacionada con mayor actividad de la enfermedad (Test exacto de Fisher: p-valor=0,415).

**Tabla 21.** Porcentajes de pacientes según la expresión de Beclin1.

Beclin1 (n=35)			
	Sin expresión	Baja expresión	Expresión normal
<b>Actividad</b>	12	3	3
	66,6%	16,6%	16,6%
<b>Remisión</b>	8	1	0
	88,8%	11,2%	0%
<b>Control</b>	8	0	0
	100%	0%	0%
<b>Total</b>	28	4	3
	80%	11,4%	8,6%

## 5.6. Análisis de la expresión de la proteína PIK3CA.

El estudio de la expresión de la proteína PIK3CA se llevó a cabo mediante western blot, obteniendo el fragmento correspondiente a esta proteína a 110KDa (Figura 47).

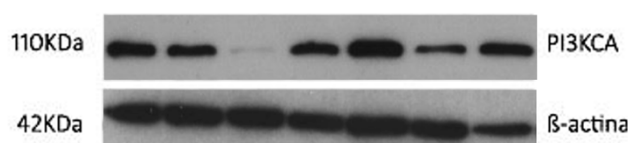


Figura 47. Western blot de la expresión de PIK3CA en algunos de las muestras estudiadas.  $\beta$ -actina fue el control de carga.

Al analizar la expresión de PIK3CA en muestras de mucosa de colon se observó que aproximadamente el 84% analizado carecía de la expresión de la misma y el otro 16% de muestras restantes mostró expresión baja, que correspondía a aquellos casos con colitis ulcerosa activa o en remisión (Figura

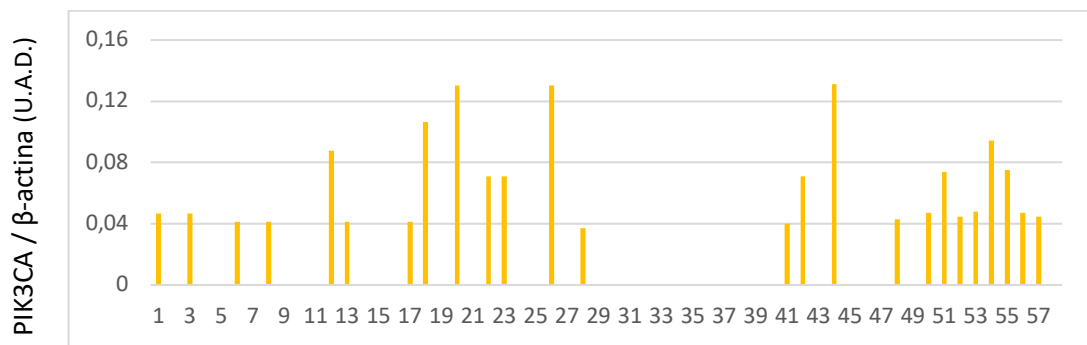


Figura 48. Representación gráfica de la expresión de PIK3CA en muestras tisulares de mucosa de colon. Se representa la cuantificación densitométrica con la ratio de PIK3CA/ $\beta$ -actina de cada una de las muestras normalizadas respecto al control seleccionado (T98G).

El análisis de la asociación entre los resultados de expresión de PIK3CA y las variables clínicas y demográficas de los pacientes no mostró diferencias significativas entre los grupos. Si bien, ello puede deberse a que los tamaños muestrales de cada grupo son muy pequeños, las mayores diferencias entre los grupos son las que aparecen entre los tres grupos de extensión de la enfermedad y el grupo control, como ocurre con significación en el resto de las proteínas estudiadas.

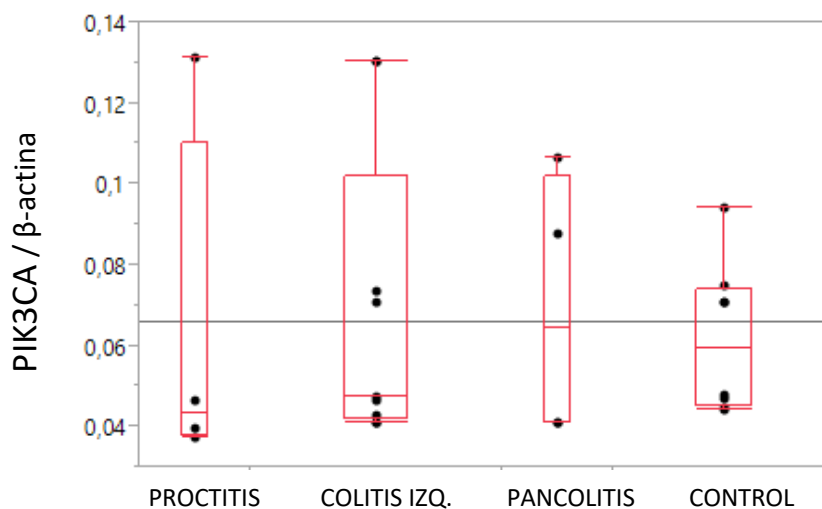


Figura 49. Representación en Box-Plot de la distribución de los valores absolutos de la expresión de la proteína PIK3CA en muestras tisulares de mucosa de colon atendiendo a la extensión de la enfermedad. Test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Respecto al estudio de la expresión de la proteína PIK3CA, cabe señalar que al tener pocas observaciones las potencias de los contrastes son bajas. Tras aplicar contraste no paramétrico de Kruskal-Wallis no se han detectado

diferencias significativas ( $p$ -valor=0,1793), y además los estimadores de medias y mediana no se corresponden al patrón de otras proteínas donde el grupo control y el grupo en remisión o inactivo presentaban valores mas bajos.

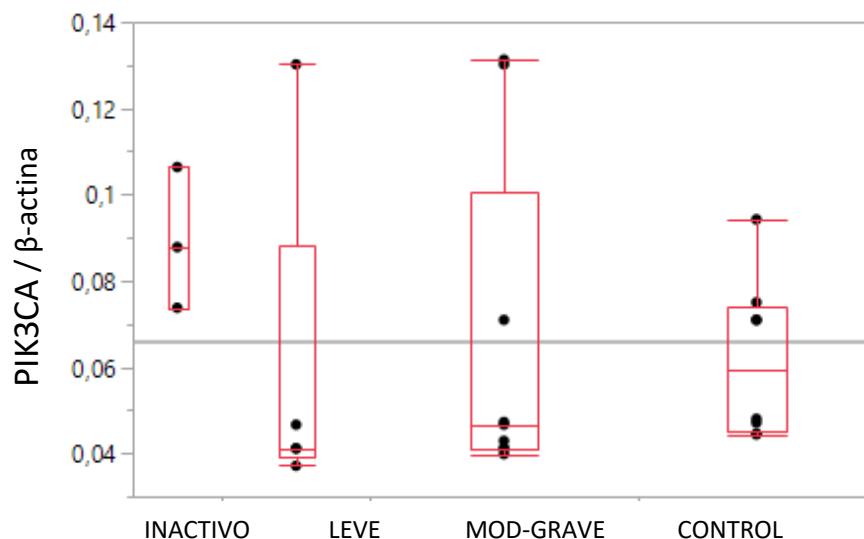


Figura 50. Representación en Box-Plot de la distribución de los valores absolutos de la expresión de la proteína PIK3CA en muestras tisulares de mucosa de colon atendiendo a la actividad de la enfermedad. Test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

En el análisis de cada uno de los grupos no se detecto asociación entre la expresión de PIK3CA y los grupos de gravedad de la enfermedad (Test exacto de Fisher:  $p$ -valor=0.301). No obstante, la comparación entre grupos mostró que la ausencia de PIK3CA está asociada al grupo control, mientras que su expresión baja fue más frecuente en el grupo inactivo (33,3 vs 21,5%), sin poder determinar significativamente que esa ausencia de PIK3CA pudiera estar relacionada con enfermedad activa.

**Tabla 22.** Porcentajes de pacientes según la expresión de PIK3CA.

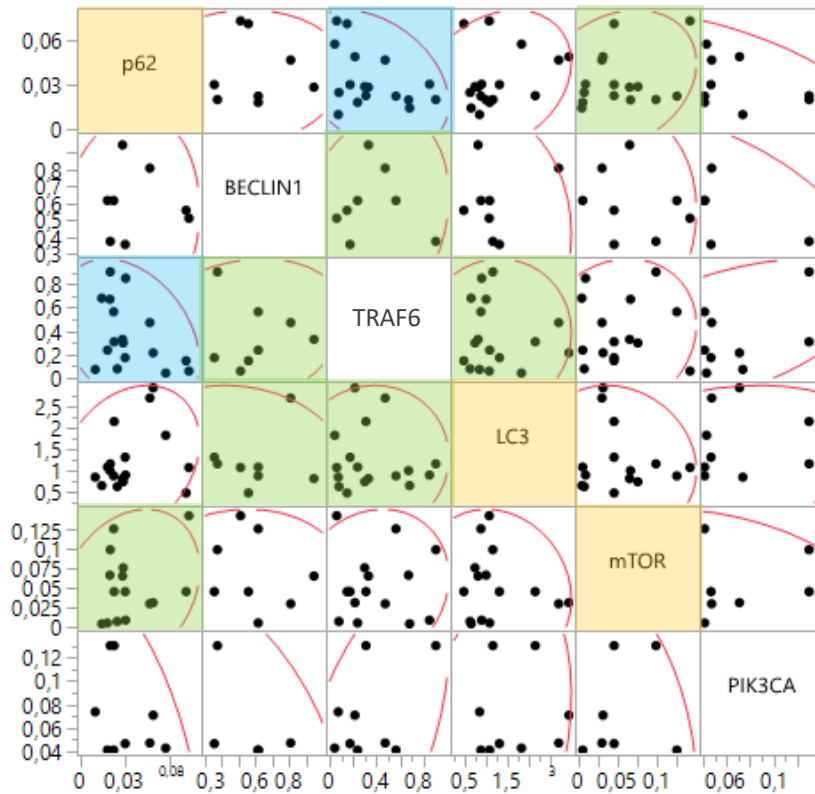
	PIK3CA (n=25)		
	Sin expresión	Baja expresión	Expresión normal
<b>Actividad</b>	11 78,5%	3 21,5%	0 -
<b>Remisión</b>	2 66,6%	1 33,3%	0 -
<b>Control</b>	8 100%	0 0%	0 -
<b>Total</b>	21 84%	4 16%	0 -

## **5.7. Correlación de la expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia según extensión y gravedad.**

Para determinar la posible relación entre las diferentes proteínas incluidas en este trabajo, de las muestras tisulares a estudio, se estimaron los coeficientes de correlación usando los valores cuantitativos obtenidos de la normalización de la expresión de cada una de las proteínas en cada muestra de mucosa de colon.

Las figuras 51 a 54 representan las matrices de correlación en los diferentes grupos de extensión (Proctitis, colitis izquierda y pancolitis) así como en el grupo control. Destacan los casos de proctitis en los que se observó una asociación significativa, con el coeficiente de correlación positivo, denotando una correlación positiva fuerte entre LC3 con Beclin1 ( $r = 0,77$ ) y moderada entre LC3 y TRAF6 ( $r = 0,48$ ), así como moderada entre p62 y mTOR ( $r = 0,62$ ); mientras denotan correlación negativa débil entre p62 y TRAF6 ( $r = -0,49$ ).

Atendiendo al grupo de colitis izquierda las relaciones fueron prácticamente en su mayoría tenues, y si analizamos el grupo pancolitis, se apreciaron asociaciones débiles positivas entre Beclin1 y PIK3CA o mTOR y moderadas negativas entre Beclin1 y p62 ( $r = -0,41$ ). Si examinamos el mapa de correlación del grupo control se identifican correlación positiva fuerte entre Beclin1 y TRAF6 ( $r = 0,83$ ) junto con PIK3CA ( $r = 0,76$ ). La correlación negativa moderadamente fuerte resultó entre p62 y LC3 ( $r = -0,74$ ), siendo débil entre TRAF6 y mTOR ( $r = -0,33$ ).

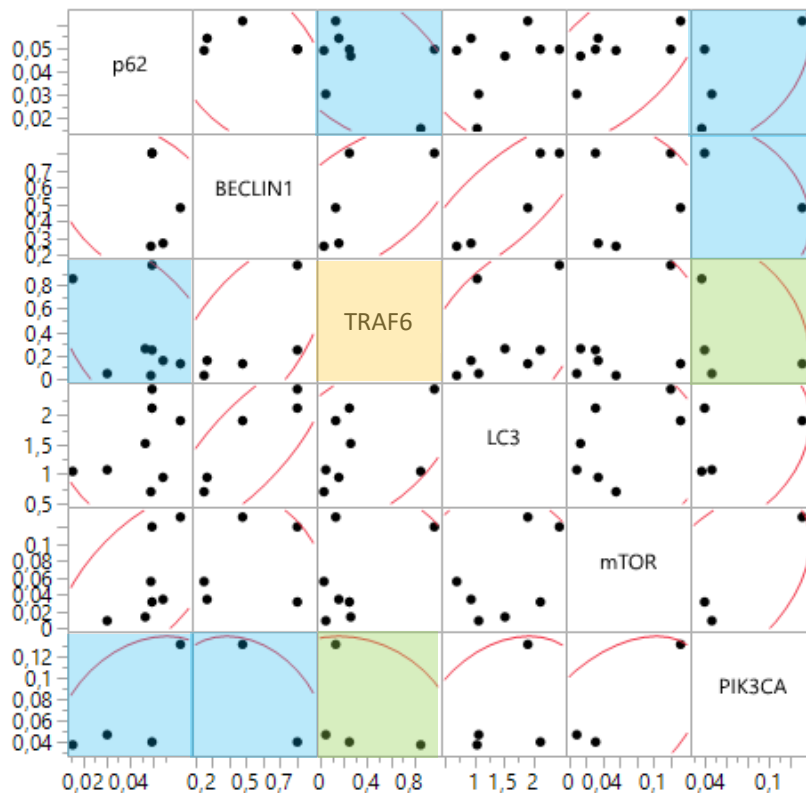


## PROCTITIS

Figura 51.

**Diagrama de correlaciones** entre la expresión de las proteínas de la ruta de autofagia en muestras tisulares de mucosa de colon con extensión proctitis (E1). Diagramas a color\*  $p < 0,05$ .

Coefficiente de correlación ver en ANEXO  
 (-Correlaciones positivas marcadas en verde,  
 -Correlaciones negativas marcadas en azul  
 -Si la línea roja es próxima a una elipse indica mayor grado de correlación, mientras que si es un círculo presenta ausencia de correlación).

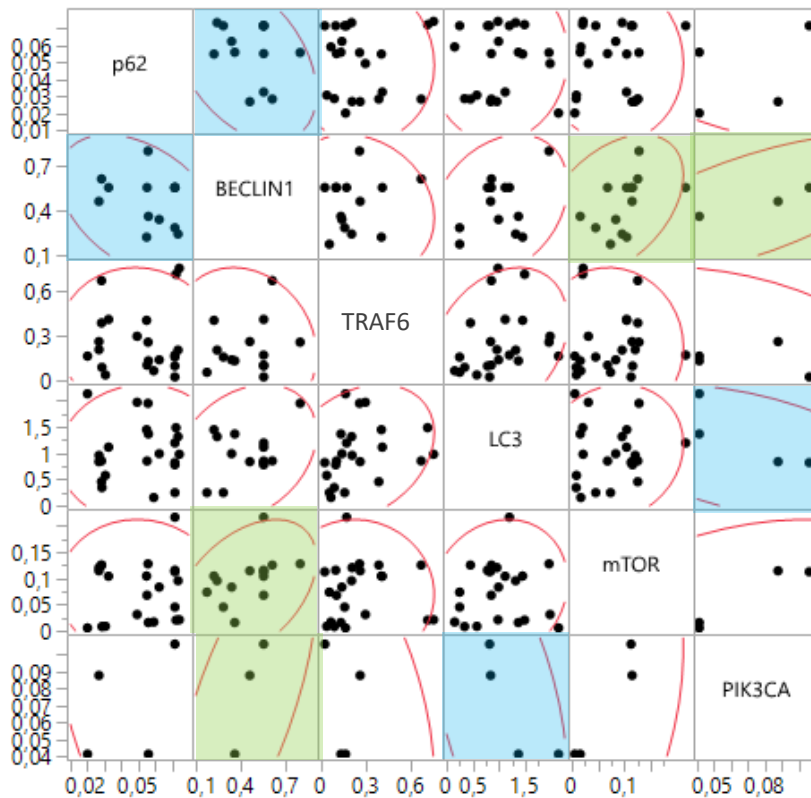


## COLITIS IZQUIERDA

Figura 52.

**Diagrama de correlaciones** entre la expresión de las proteínas de la ruta de autofagia en muestras tisulares de mucosa de colon con extensión colitis izquierda(E2). Diagramas a color\*  $p < 0,05$

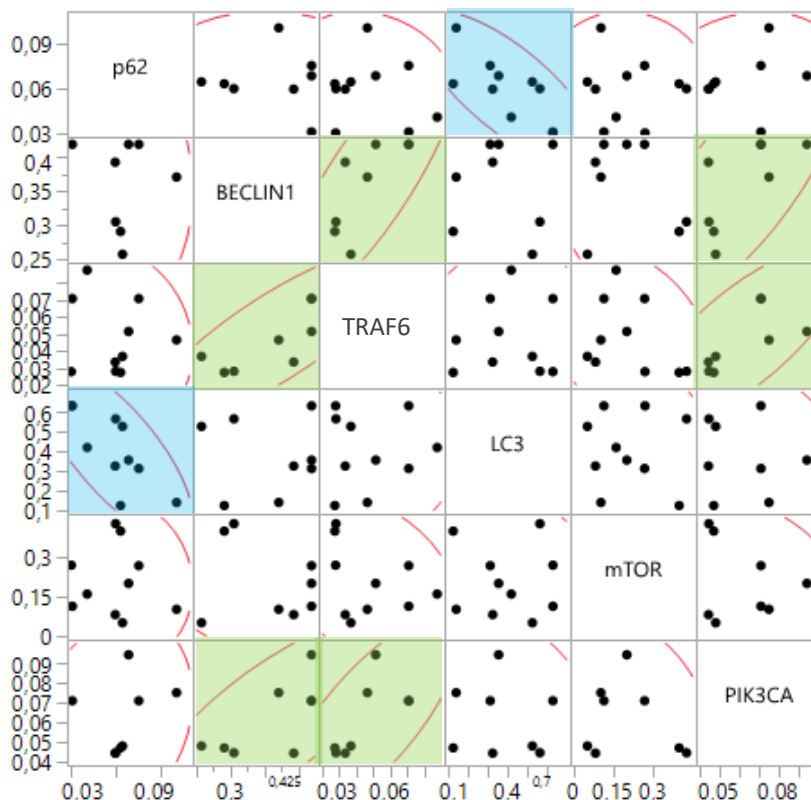
Coefficiente de correlación ver en ANEXO  
 (-Correlaciones positivas marcadas en verde,  
 -Correlaciones negativas marcadas en azul  
 -Si la línea roja es próxima a una elipse indica mayor grado de correlación, mientras que si es un círculo presenta ausencia de correlación).



### PANCOLITIS

Figura 53.  
**Diagrama de correlaciones** entre la expresión de las proteínas de la ruta de autofagia en muestras tisulares de mucosa de colon con extensión pancolitis(E3). \*  $p < 0,05$ .

Coefficiente de correlación ver en ANEXO  
 (-Correlaciones positivas marcadas en verde,  
 -Correlaciones negativas marcadas en azul  
 -Si la línea roja es próxima a una elipse indica mayor grado de correlación, mientras que si es un círculo presenta ausencia de correlación).

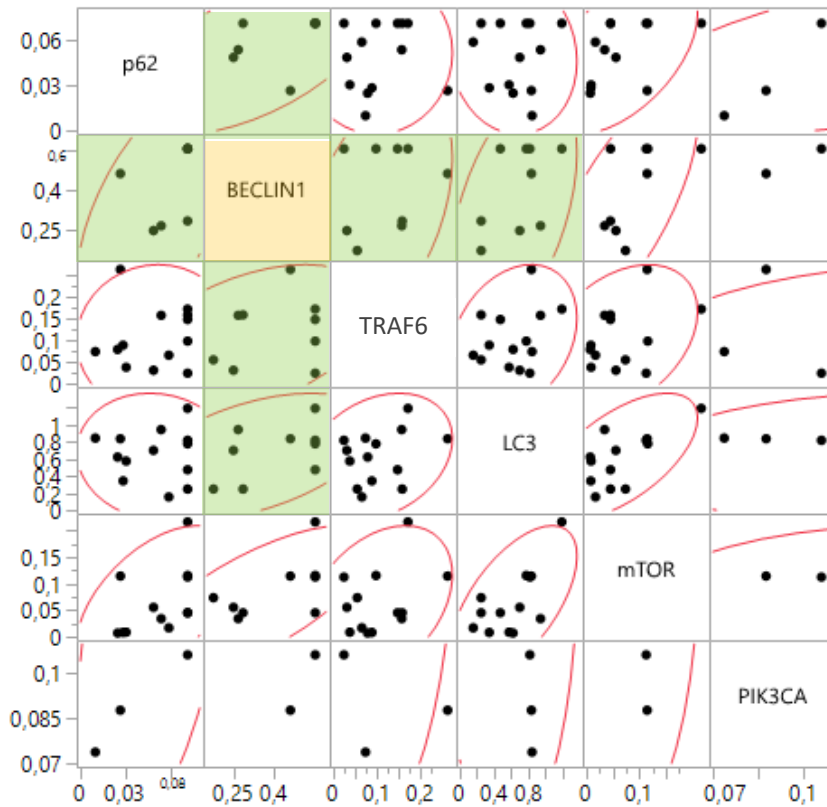


### CONTROL

Figura 54.  
**Diagrama de correlaciones** entre la expresión de las proteínas de la ruta de autofagia en muestras tisulares de mucosa de colon de individuos sanos (Grupo control). \*  $p < 0,05$ .

Coefficiente de correlación ver en ANEXO  
 (-Correlaciones positivas marcadas en verde,  
 -Correlaciones negativas marcadas en azul  
 -Si la línea roja es próxima a una elipse indica mayor grado de correlación, mientras que si es un círculo presenta ausencia de correlación).

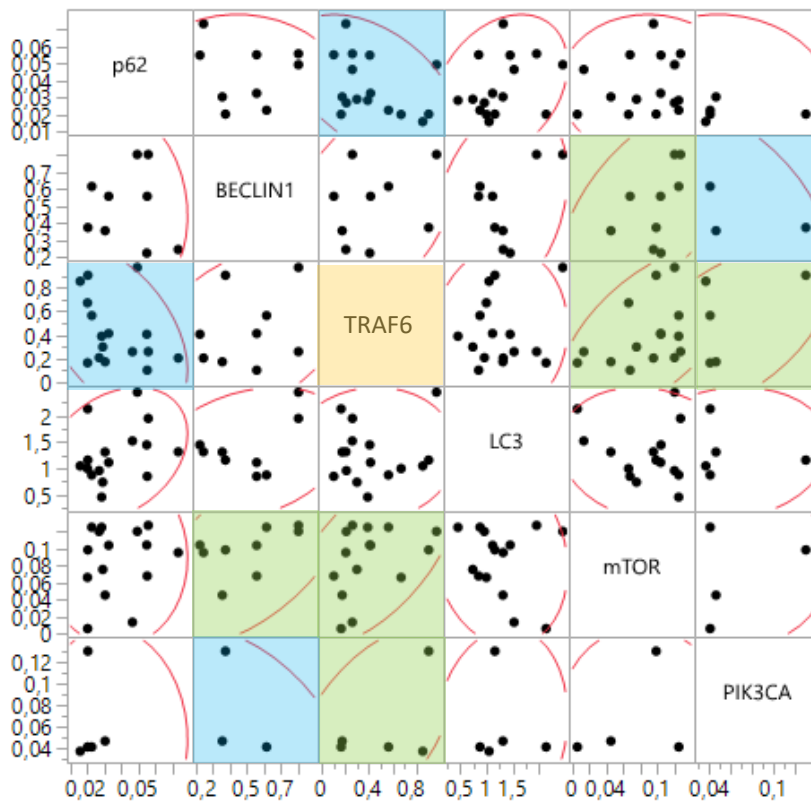
Las figuras 55 a 58 representan las matrices de correlación en los grupos de actividad según escala de T-W (remisión, leve, moderado-grave) así como en el grupo control.



## GRUPO EN REMISIÓN

Figura 55.  
**Diagrama de correlaciones** entre la expresión de las proteínas de la ruta de autofagia en muestras tisulares de mucosa de colon de pacientes en remisión. \* $p < 0,05$ .

Coefficiente de correlación ver en ANEXO  
 (-Correlaciones positivas marcadas en verde,  
 -Correlaciones negativas marcadas en azul  
 -Si la línea roja es próxima a una elipse indica mayor grado de correlación, mientras que si es un círculo presenta ausencia de correlación).

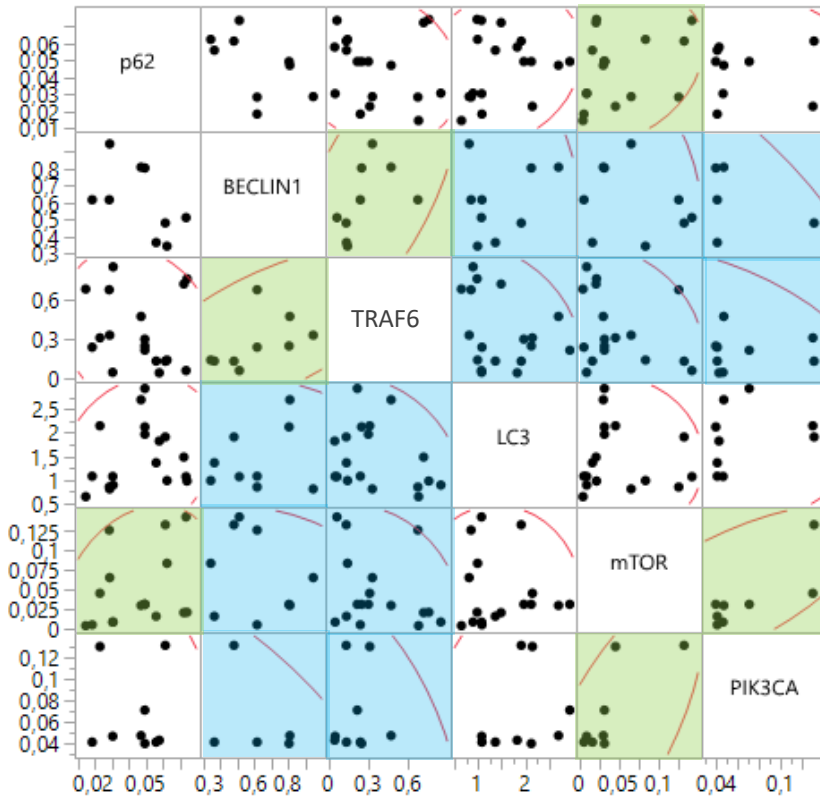


## GRUPO LEVE (S1)

Figura 56.  
**Diagrama de correlaciones** entre la expresión de las proteínas de la ruta de autofagia en muestras tisulares de mucosa de colon con actividad leve(S1). \* $p < 0,05$ .

Coefficiente de correlación ver en ANEXO  
 (-Correlaciones positivas marcadas en verde,  
 -Correlaciones negativas marcadas en azul  
 -Si la línea roja es próxima a una elipse indica mayor grado de correlación, mientras que si es un círculo presenta ausencia de correlación).

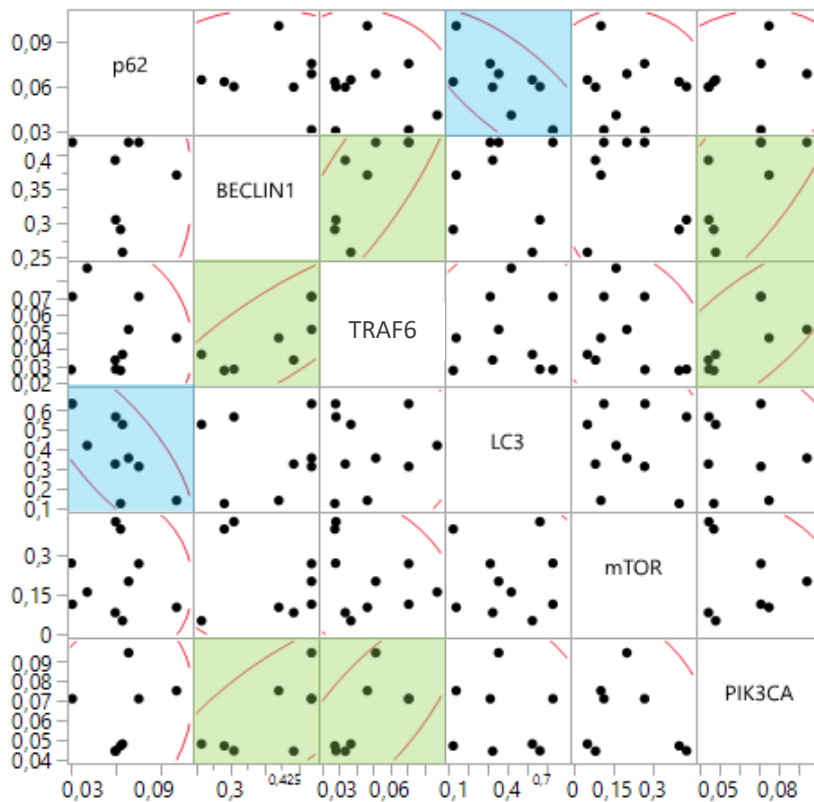




## MODERADO-GRAVE

Figura 57.  
**Diagrama de correlaciones** entre la expresión de las proteínas de la ruta de autofagia en muestras tisulares de mucosa de colon con actividad moderada-grave (S2-3) \*p<0,05.

Coefficiente de correlación ver en ANEXO  
 (-Correlaciones positivas marcadas en verde,  
 -Correlaciones negativas marcadas en azul  
 -Si la línea roja es próxima a una elipse indica mayor grado de correlación, mientras que si es un círculo presenta ausencia de correlación).



## CONTROL

Figura 58.  
**Diagrama de correlaciones** entre la expresión de las proteínas de la ruta de autofagia en muestras tisulares de mucosa de colon de individuos sanos (Grupo control). \*p<0,05.

Coefficiente de correlación ver en ANEXO  
 (-Correlaciones positivas marcadas en verde,  
 -Correlaciones negativas marcadas en azul  
 -Si la línea roja es próxima a una elipse indica mayor grado de correlación, mientras que si es un círculo presenta ausencia de correlación).

En los casos con enfermedad silente o en remisión en los que se observó una asociación significativa, el coeficiente de correlación fue positivo, denotando una correlación positiva moderada entre Beclin1 y p62 ( $r = 0,57$ ), Beclin1 y TRAF6 ( $r = 0,43$ ) y entre Beclin1 y LC3 ( $r = 0,48$ ), mientras que las correlaciones con mTOR aparentemente moderadas, no se valoran por la presencia de valores extremos "outlayer" que desvirtúan la matriz de correlación y el valor de  $r$ .

En el grupo leve se observó una asociación significativa, con el coeficiente de correlación positivo, denotando una correlación positiva moderadamente fuerte entre TRAF6 y mTOR ( $r = 0,60$ ), así como entre Beclin1 y mTOR ( $r = 0,57$ ); mientras denotan correlación negativa moderada entre TRAF6 y p62 ( $r = -0,45$ ) y entre Beclin1 y PIK3CA ( $r = -0,49$ ).

Atendiendo al grupo con gravedad moderada-grave se identificó asociación significativa, con un coeficiente de correlación positivo, moderadamente fuerte entre Beclin1 y TRAF6 ( $r = 0,65$ ), y entre mTOR y PIK3CA ( $r = 0,71$ ), con correlación positiva débil entre p62 y mTOR ( $r = 0,27$ ). Se apreciaron asociaciones negativas débiles entre LC3 y Beclin1 ( $r = -0,24$ ), y entre LC3 y TRAF6 ( $r = -0,29$ ), así como entre mTOR y Beclin1 ( $r = -0,28$ ). También se detectó asociación negativa fuerte entre PIK3CA y Beclin1 ( $r = -0,79$ ), y moderada entre mTOR y TRAF6 ( $r = -0,54$ ). La asociación más fuertemente negativa de toda la matriz en este grupo se identificó entre PIK3CA y Beclin1 ( $r = -0,79$ ).

Recordar que una correlación alta no implica causalidad entre variables, para intentar demostrar una asociación causa-efecto se tendría que llevar a cabo un diseño experimental controlado. Además, al tener tamaño muestral pequeño los valores atípicos pueden influir mucho en el valor de la correlación.

## **5.8. Correlación de la expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia según actividad inflamatoria.**

Con el objetivo de describir la posible relación entre las diferentes proteínas incluidas en este trabajo y la actividad inflamatoria de los grupos a estudio medida mediante el sistema de puntuación UCDAI, se calculó el coeficiente de correlación de Spearman dada la naturaleza ordinal de la puntuación UCDAI. Se utilizaron los valores cuantitativos normalizados correspondientes a la expresión de las proteínas en cada una de las muestras.

Se han representado a continuación las rectas de regresión para ilustrar la asociación lineal entre cada una de las proteínas, pero sin intención de hacer un análisis de regresión. También se han mostrado las bandas de confianza para explorar la distribución de los valores atípicos. En las figuras representadas, una pendiente ascendente indica correlación positiva con los valores de UCDAI representados en el eje de las X.

Se observó una asociación significativa con las proteínas LC3B, TRAF6, Beclin1, denotando una correlación positiva entre dichas proteínas y la puntuación UCDAI, como índice de actividad. Por el contrario, el coeficiente de correlación fue negativo, denotando una asociación significativa negativa entre mTOR y mayor grado de actividad, medida por UCDAI. En los siguientes gráficos vemos la nube de puntos con la diferenciación entre los individuos con diferente puntuación de gravedad, medida por UCDAI. Los puntos rojos pertenecen al grupo silente, los verdes al leve, los azules al moderada-grave y los amarillos al control. Los resultados se recogen en las tablas del ANEXO-II.

Respecto a la proteína p62, se identificó una relación negativa moderada con  $r_s = -0.21$  ( $p = 0,1214$ ). La mayor asociación significativa se observa en los resultados de la proteína LC3 ( $r_s = 0,6984$ ,  $p < 0,0001$ ), y de la proteína TRAF6 ( $r_s = 0,6309$ ,  $p < 0,0001$ ), siendo la correlación positiva. Los coeficientes muestran una asociación moderada entre cada uno de los pares comparados, porque a medida que una variable aumenta, la otra variable también aumenta. En el caso de la proteína mTOR, la correlación es negativa ( $r_s = -0,4732$ ,  $p = 0,0003$ ), mientras Beclin1 muestra correlación significativa positiva ( $r_s = 0,4235$ ,  $p = 0,0112$ ).

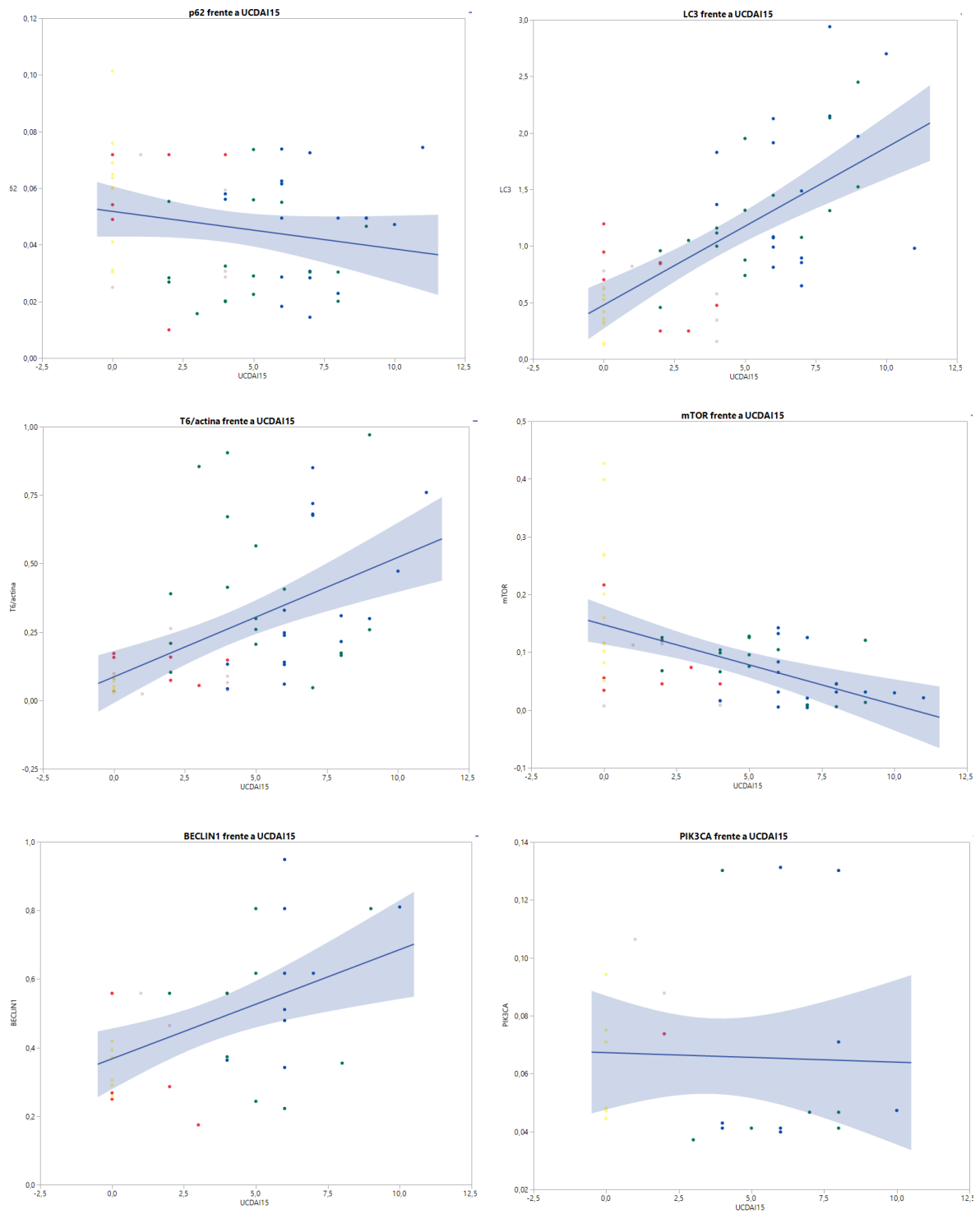


Figura 59. Representación en nube de puntos con la distribución de los valores de expresión de las proteínas en muestras tisulares de mucosa de colon atendiendo a la actividad de la enfermedad medida por UCDAI. Se muestra la recta de regresión y sus bandas de confianza (Léase puntos rojos = inactivo, puntos verdes = leves, puntos azules = moderada a grave y puntos amarillos = control)  $r_s$  = Coeficiente de Spearman.

## 5.9. Caracterización del perfil de expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia según la respuesta terapéutica.

Se analizaron las observaciones de los valores de expresión para los grupos con o sin respuesta terapéutica junto con el grupo control. La proteína p62 no se expresó de forma normal en más de tres cuartos de las muestras (79%) en ninguno de los grupos a estudio. Por contra, la expresión normal de LC3B y TRAF6 fue mayor en los dos grupos de tratamiento con una distribución muy similar, mostrándose marginalmente superior en el grupo sin respuesta. El grupo control mostró una expresión disminuida de todas las proteínas. La expresión normal fue inferior al 7% para Beclin1 y nula para mTOR y PIK3CA en ambos grupos de respuesta terapéutica.

Tabla XX. Porcentajes de pacientes según la respuesta y p62 (Test exacto de Fisher: p-valor<0,001).

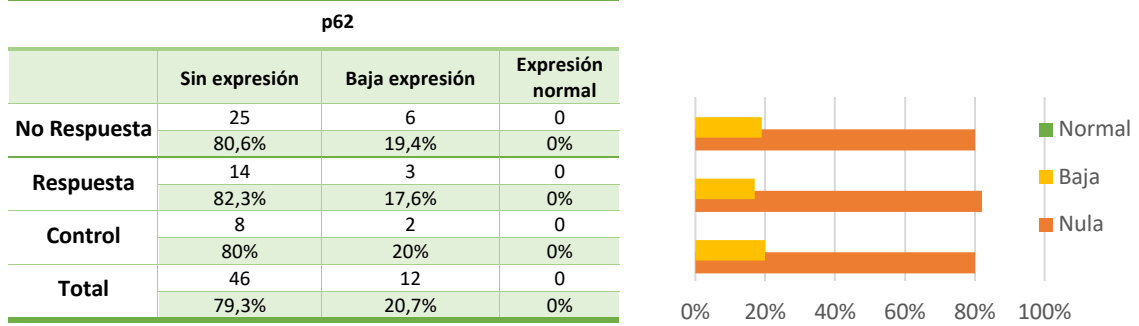


Tabla XX. Porcentajes de pacientes según la respuesta y LC3B (Test exacto de Fisher: p-valor<0,001).

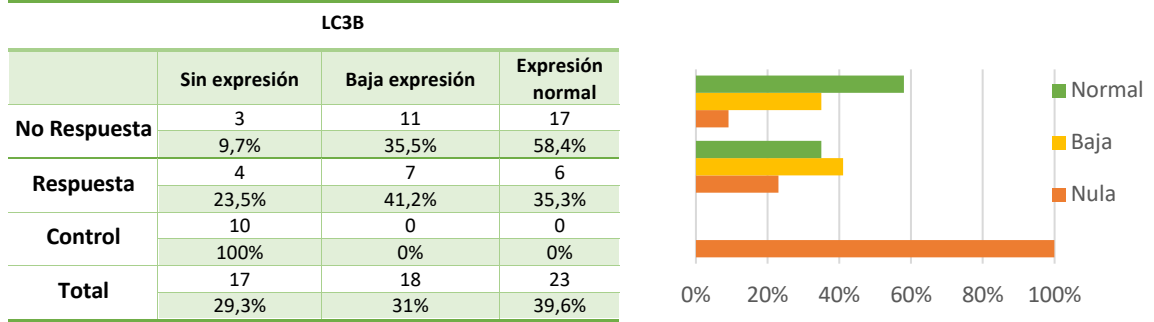
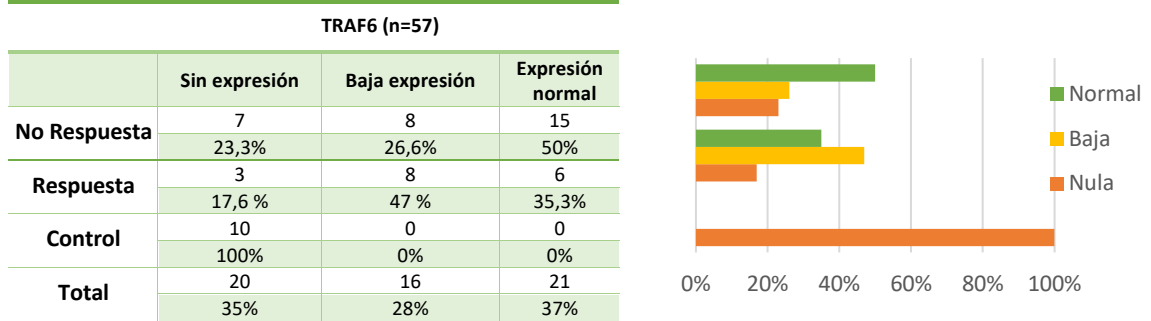


Tabla XX. Porcentajes de pacientes según la respuesta y TRAF6 (Test exacto de Fisher: p-valor<0,001).



## 6. Estado de la autofagia y su valor pronóstico:

### 6.1. Relación entre la evolución en extensión y la expresión de proteínas de autofagia.

Con el fin de estudiar la influencia que tiene la vía de la autofagia en la progresión proximal de la enfermedad, se han realizado medidas de la expresión de las proteínas en segmentos distales y proximales de la mucosa de colon. Un diferente nivel de expresión entre los segmentos proximales y distales podría determinar una relación pronóstico con potencial de predecir aquellos casos que progresan proximalmente con actividad inflamatoria hacia pancolitis.

No se ha detectado que la media resultante entre ambas determinaciones de la extensión anatómica de cada uno de los casos evaluados sea diferente de forma estadísticamente significativa con relación al análisis de p62 ( $p=0,093$ ), ni de Beclin1 ( $p=0,125$ ) ni de mTOR ( $p<0,414$ ). Sin embargo, para TRAF6 se ha detectado un cambio estadísticamente significativo ( $p<0,001$ ), observando que se produce un descenso en los valores de la proteína en la extensión proximal con respecto a la extensión distal. Es decir, la expresión de TRAF6 es más elevada en los casos de proctitis o colitis izquierda que progresan en el seguimiento. Si analizamos los valores descriptivos por grupo de gravedad se observa cambios mayores según aumenta la puntuación de Mayo. No obstante, los cambios en los distintos grupos de gravedad no alcanzan la significación estadística ( $p=0,10$ ), considerando el tamaño muestral.

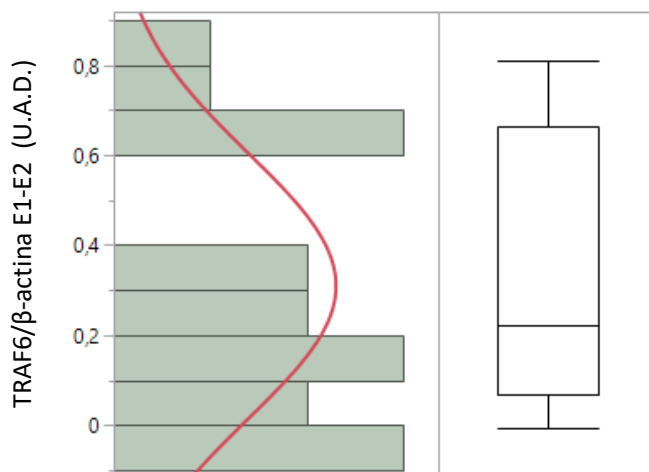


Figura 60.  
Representación en Histograma y Box-plot de las diferencias entre la expresión de TRAF6 en muestras tisulares (n=18) de mucosa de colon y el patrón de progresión a pancolitis. (\* $p<0,05$ ).

Si observamos los resultados de LC3, también se encuentran resultados estadísticamente significativos ( $p<0,0001$ ), coincidiendo con que se produce un

descenso en la diferencia de los valores de la proteína en la extensión proximal con respecto a la extensión distal, como ocurre con TRAF6. Pero si se analizan los cambios en función de la gravedad los resultados descriptivos no se detectan diferencias significativas ( $p=0,197$ ) aunque en la gráfica representada se observe una tendencia de los valores resultantes próxima a la significación (Ver ANEXOS).

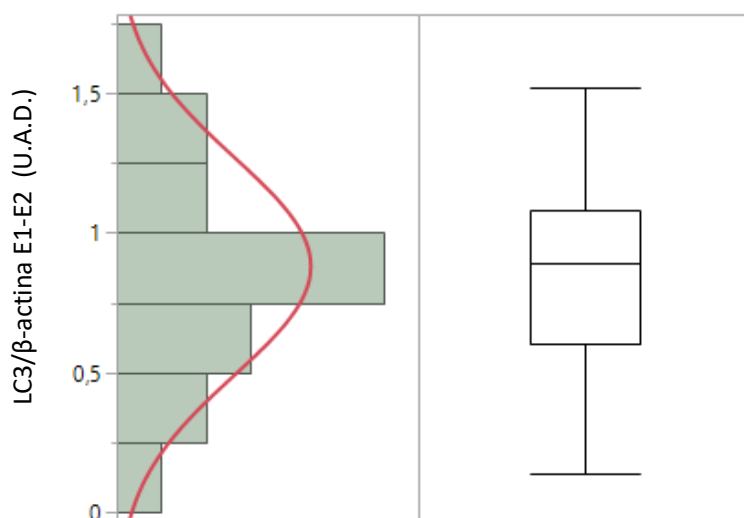


Figura 61. Representación en Histograma Y Box-plot de las diferencias entre la expresión de LC3 en muestras tisulares (n=18) de mucosa de colon y el patrón de progresión a pancolitis. (\* $p<0,05$ ).

## 6.2. Relación entre la evolución de la actividad y la expresión de proteínas de autofagia.

Para determinar la influencia que tiene la vía de la autofagia en la evolución de la actividad de la enfermedad, se han analizado los datos de evolución a los cuatro años desde el inicio del estudio y se ha cuantificado el cambio de actividad de nuestra cohorte en ese periodo de tiempo mediante la escala T-W modificada. La expresión de las diferentes proteínas en los grupos de actividad sigue una distribución no normal en la mayoría de los casos y además incumplen el supuesto de homocedasticidad.

No se ha detectado que los cambios de la actividad durante el periodo de observación de cada uno de los casos evaluados sean diferente de forma estadísticamente significativa en relación al análisis de p62 ( $p=0,79$ ), ni de Beclin1 ( $p=0,219$ ) ni de PIK3CA ( $p=0,79$ ).

Sin embargo, para la expresión de la proteína TRAF6 se ha detectado diferencias entre los cambios de actividad ( $p=0,01$ ). Las diferencias se han detectado entre los que

no modificaron su actividad y los que disminuyeron su actividad en el periodo de seguimiento de cuatro años, hasta actividad leve o silente ( $p$ -valor=0,0349).

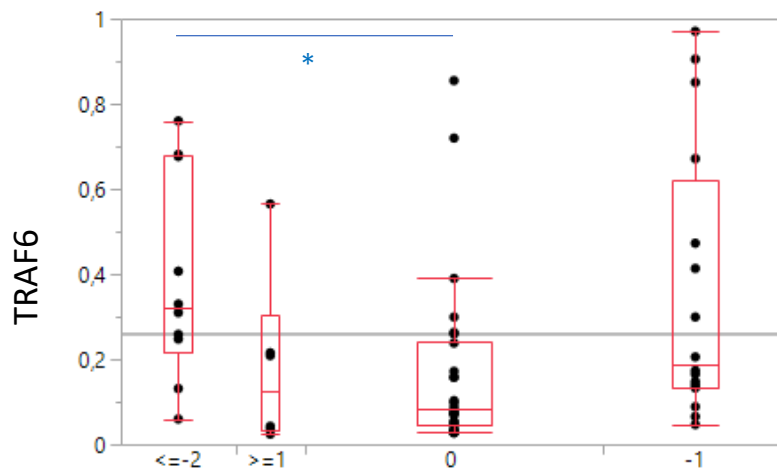


Figura 62. Representación en Box-Plot de la distribución de los grupos de cambio de actividad en función de la expresión de la proteína TRAF6 en muestras tisulares de mucosa de colon. Test no paramétrico de Kruskal-Wallis; (\*  $p < 0,05$ ).

Igualmente, para mTOR se han detectado diferencias estadísticamente significativas entre los cambios de actividad ( $p$ -valor=0,04). Las diferencias fueron entre los niveles de expresión de aquellos que no modificaron su actividad y los que disminuyeron notablemente su actividad, hasta actividad leve o silente, en el periodo de seguimiento de cuatro años ( $p$ -valor=0,0273).

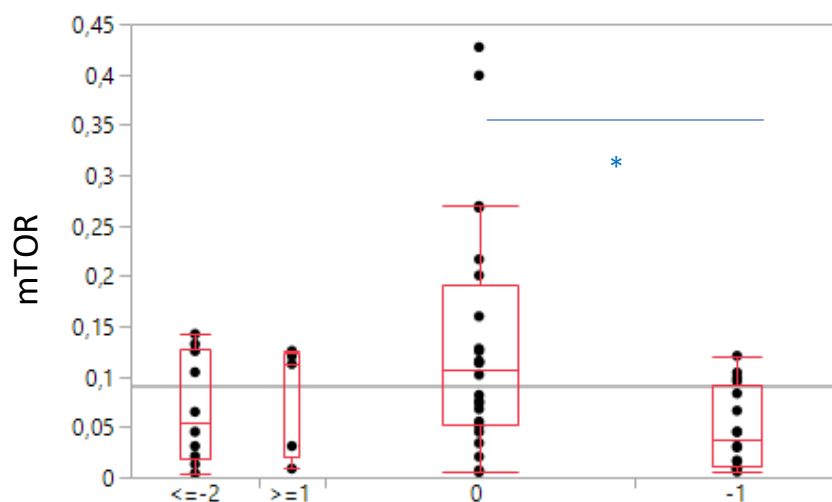


Figura 63. Representación en Box-Plot de la distribución de los grupos de cambio de actividad en función de la expresión de la proteína mTOR en muestras tisulares de mucosa de colon. Test no paramétrico de Kruskal-Wallis; (\*  $p < 0,05$ ).



Más destacable son los resultados para LC3, en los que se han detectado diferencias estadísticamente significativas entre los cambios de actividad ( $p$ -valor=0,002). Las diferencias se deben entre los niveles de expresión de aquellos que no modificaron su actividad respecto los que disminuyeron su actividad en el periodo de seguimiento de cuatro años, hasta actividad leve ( $p$ =0,0095), o silente ( $p$ =0,014).

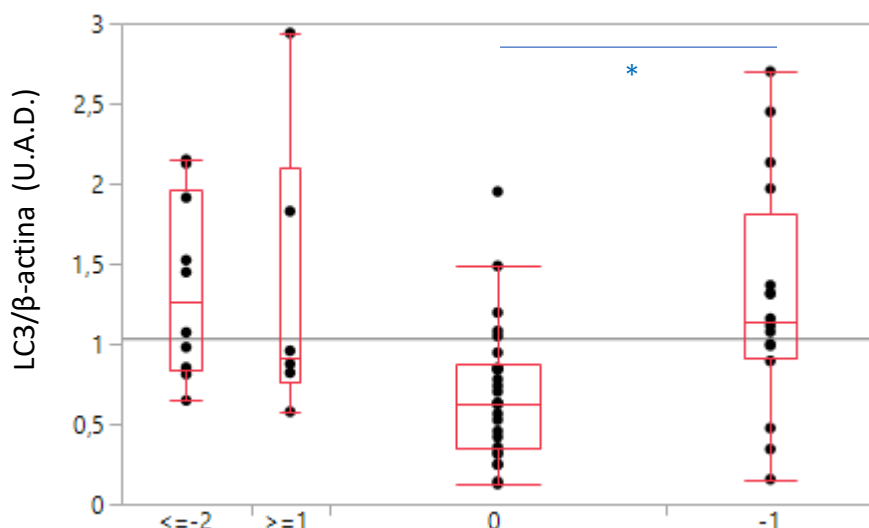


Figura 64. Representación en Box-Plot de la distribución de los grupos de cambio de actividad en función de la expresión de la proteína LC3 en muestras tisulares de mucosa de colon. Test no paramétrico de Kruskal-Wallis; (\*  $p < 0,05$ ).

Para valorar la actividad, también se determinó la puntuación UCDAI basal al momento de la inclusión y al final del seguimiento se decidió por protocolo aplicar el índice de Mayo parcial, que mide de modo no invasivo la actividad de la CU, excluyendo la subpuntuación de endoscopia por no disponer de nueva colonoscopia en todos los casos. Se ha demostrado que esta versión abreviada del índice de Mayo parcial y el índice de Mayo completo o UCDAI (Ulcerative Colitis Disease Activity Index) se correlacionan con la evaluación del paciente sobre el cambio en la actividad de la CU.

*Lewis et al* informaron una reducción de  $\geq 3$  puntos en el índice de Mayo y en el índice de Mayo parcial para constituir un cambio clínicamente significativo que se considere respuesta parcial (RP). También recomendó que la remisión clínica (RC) de la CU se definiera utilizando una puntuación de Mayo de  $\leq 2$  puntos, sin ninguna puntuación de cada ítem  $> 1$ .<sup>129,217</sup> (Tabla 5). En nuestro estudio en el grupo con CU activa el porcentaje de RP a final de seguimiento fue del 13% y la remisión clínica alcanzaron el 63% de los pacientes con enfermedad activa. En el grupo de CU inactiva, el 77,7% mantuvieron remisión clínica.

Si analizamos la correlación de estos resultados mediante la puntuación UCDAI tomada como referencia en el momento de la inclusión con respecto a la obtenida al final del periodo de seguimiento, se detectaron diferencias entre los cambios de actividad y los valores de las proteínas, obteniendo una asociación moderada e inversa con LC3 y TRAF6; y más débil y positiva con mTOR. Para la expresión de la proteína TRAF6 se ha detectado diferencias entre los cambios de actividad ( $p=0,0001$ ), para LC3 ( $p=0,0002$ ), y mTOR ( $p=0,0145$ ).

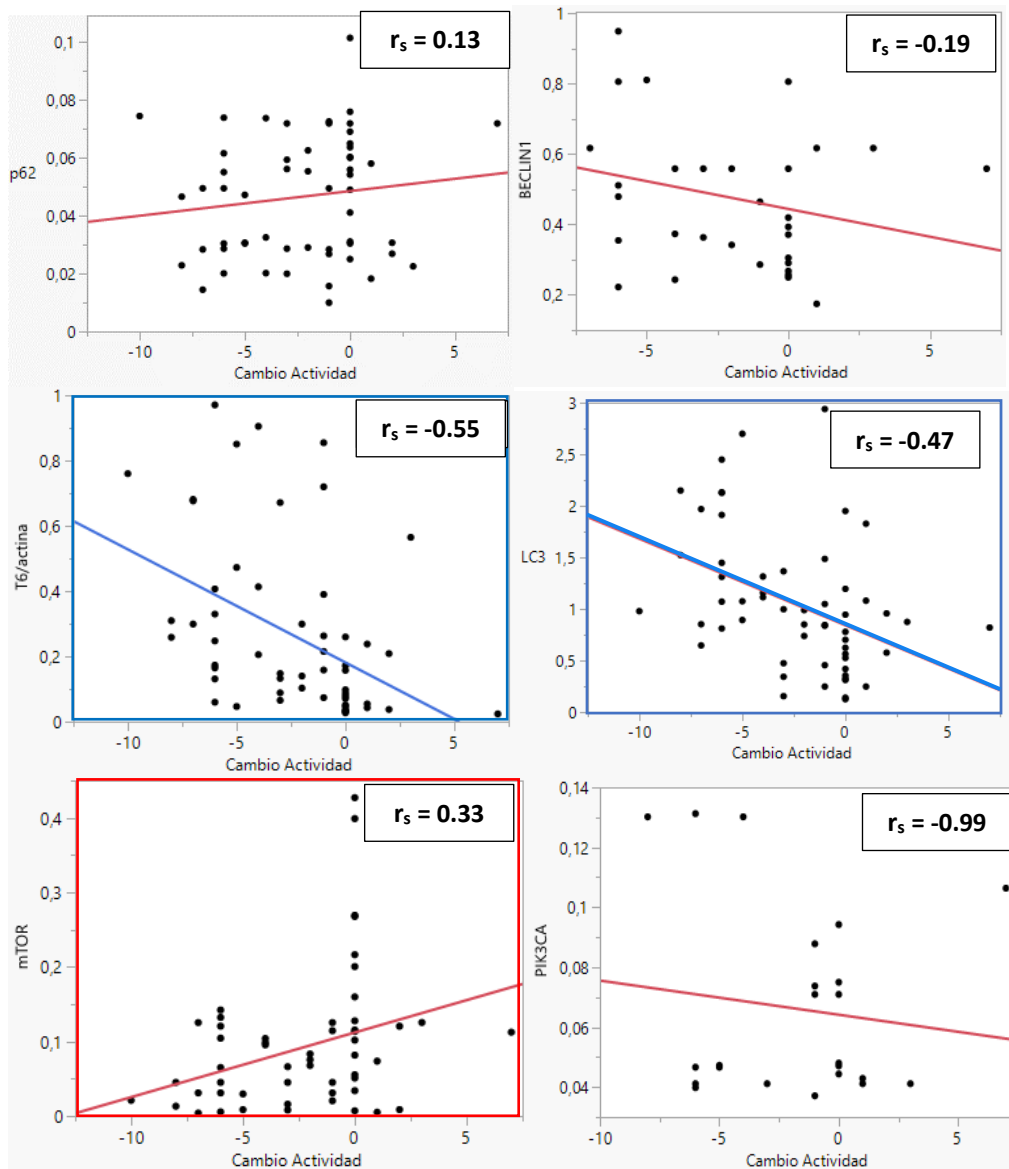


Figura 65. Representación en diagrama de puntos de la distribución de los valores de expresión de las proteínas en muestras tisulares de mucosa de colon atendiendo a la evolución de la actividad de la enfermedad medida por UCDAI. ( $r_s$  = Coeficiente de Spearman).

### 6.3. Relación entre la evolución de la actividad medida por calprotectina fecal y la expresión de proteínas de autofagia.

Otra forma de determinar la influencia que tiene la vía de la autofagia en la evolución de la actividad de la enfermedad puede ser a través de un marcador subrogado como las determinaciones de calprotectina fecal obtenidas durante el periodo de inclusión. Resulta difícil establecer una equivalencia directa entre determinados valores o puntos de corte de CF y la actividad de la CU, determinada con una puntuación concreta de UCDAI, al carecer de estudios previos diseñados específicamente. No obstante, con la interpretación de los subanálisis realizados en los diferentes ensayos clínicos<sup>218</sup>, y precisamente gracias a ellos, por consenso se establecen unos rangos para según que puntuación UCDAI de forma aproximada. Así se estima que:

- puntuaciones UCDAI < 2 deben corresponder a valores CF < 200 µg/g.
- puntuaciones UCDAI > 3 deben corresponder a valores CF > 200 µg/g.

En nuestra muestra tras realizar en análisis de correlación entre los valores de CF basal y la puntuación UCDAI, en la representación de los datos se identifica esa correlación positiva ( $r_s=0,73$ ,  $p<0,0001$ ). Sin que el objetivo sea la definición de unos puntos de corte para CF, se puede observar como la variabilidad en las determinaciones de CF basal para valores superiores de 200 µg/g, no permite una correlación aproximada con UCDAI, para así poder establecer rangos intermedios por encima de una puntuación de 7 siguiendo el sistema UCDAI.

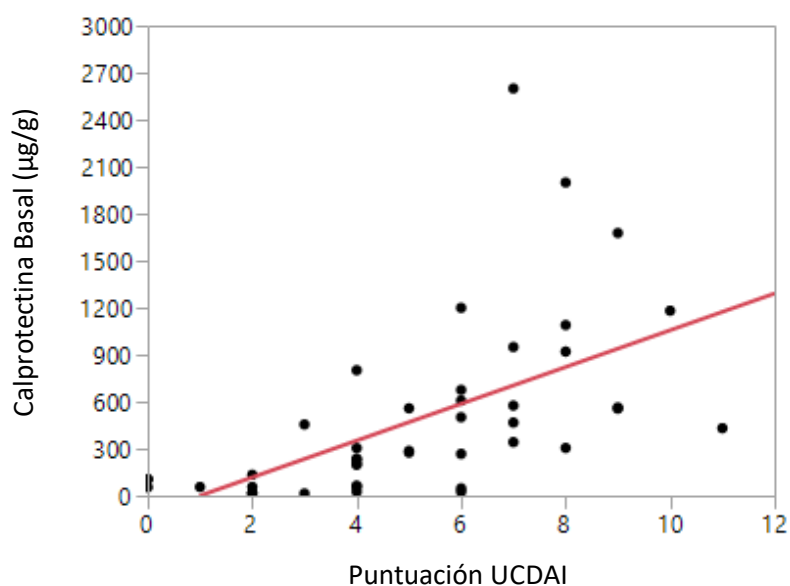


Figura 66. Diagrama de puntos con los valores CF basal respecto puntuación UCDAI a la inclusión.

Con respecto a nuestro objetivo de analizar la vía de la autofagia, se buscó determinar cómo era la correlación de los valores de CF basal con los diferentes niveles de expresión de cada una de las proteínas a estudio. Para ello se ha determinado el coeficiente de correlación para variables continuas. Se halló una asociación significativa entre la CF basal y las determinaciones de la proteína LC3 con correlación positiva moderada ( $r_s = 0,43$ ;  $p < 0,0001$ ) y por contra, se identificó una relación negativa débil para la proteína mTOR, relación más débil ( $r_s = -0,21$ ;  $p < 0,0001$ ) para p62 y PIK3CA.

	$r_s$
<i>p62</i>	-0,2180
<i>Beclin1</i>	0,0474
<i>TRAF6</i>	0,1804
<b>LC3</b>	<b>0,4338</b>
<i>mTOR</i>	-0,2904
<i>PIK3CA</i>	-0,2477

Tabla XX. Correlación de la expresión de proteínas con los valores basales de CF. ( $r_s$  = Coeficiente de correlación de Spearman).

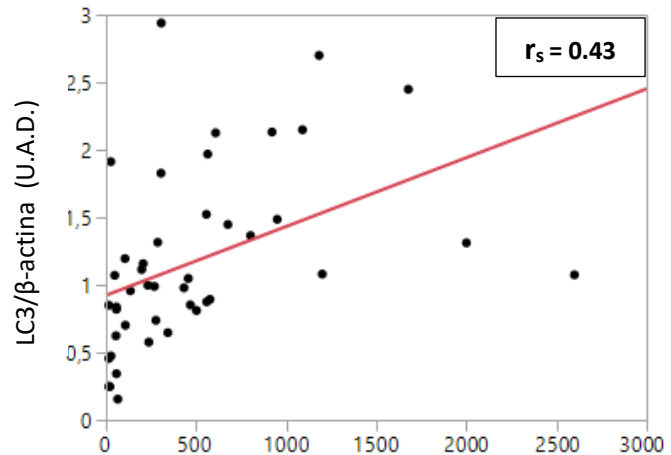


Figura XX. Diagrama de puntos de LC3 frente a los valores basales de CF. ( $r_s$  = Coeficiente de correlación de Spearman).

A continuación, se han analizado los valores de CF como dato de evolución, recogiendo los valores basales y a los cuatro años del inicio del estudio y se ha cuantificado el nuevo valor de CF de nuestra cohorte en ese periodo de tiempo (Figura 68). Como era de esperar, en la mayoría de los casos se observa una disminución de los valores basales respecto a las cifras de CF tras el periodo de seguimiento. Empleando el valor de CF como medida objetiva de actividad y un marcador validado de actividad inflamatoria, con menos sesgos que otras medidas, se buscan correlaciones.

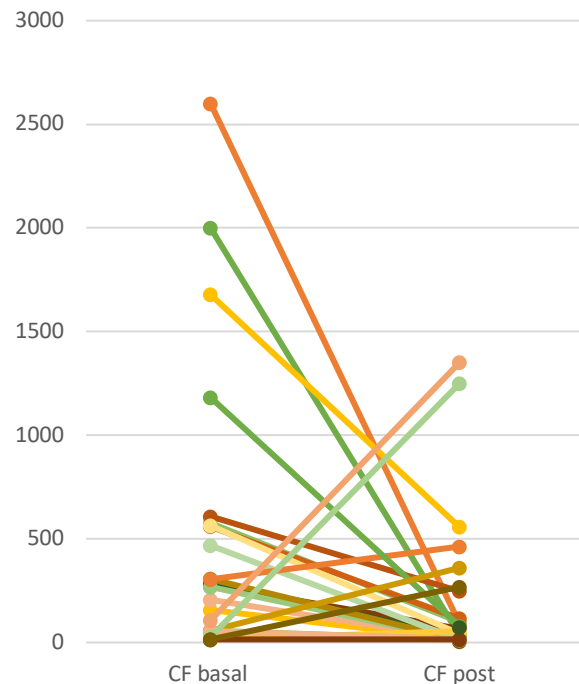


Figura 68. Evolución de las determinaciones de CF. durante el período de seguimiento.

Se observó una asociación significativa entre el cambio de CF y las determinaciones de las proteínas, identificando para la proteína LC3 una correlación negativa moderada ( $r_s = -0,40$ ). Es decir que aquellos casos que expresaban la proteína LC3, presentaron en su evolución una caída más pronunciada del marcador CF, pudiendo representar dicha correlación un factor pronóstico.

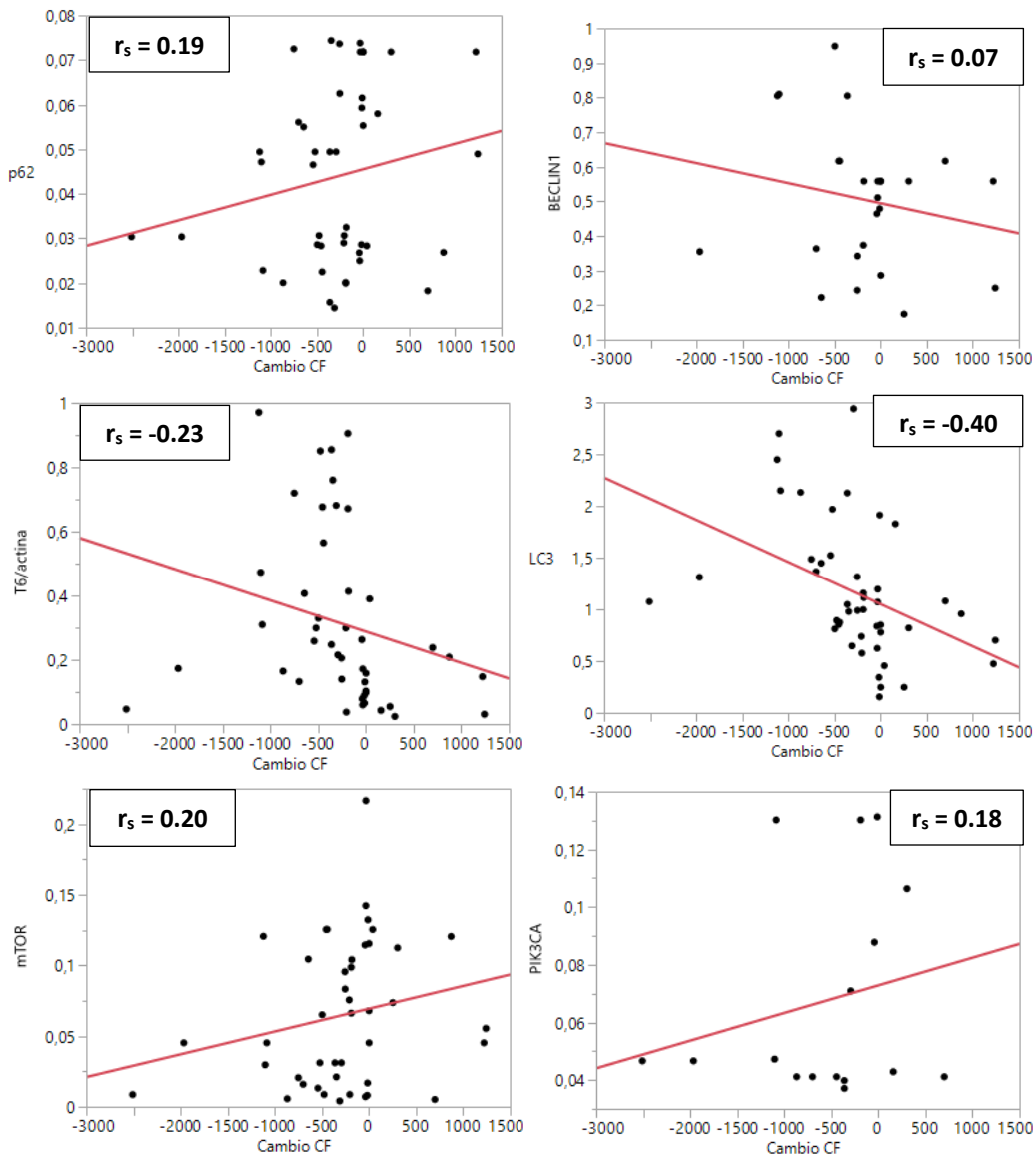


Figura 69. Diagrama de puntos de la expresión de proteínas frente a los valores basales de CF. ( $r_s$  = Coeficiente de correlación de Spearman).

#### 6.4. Relación entre la necesidad de cambio en la estrategia terapéutica y la expresión de proteínas de autofagia.

Para determinar la influencia que tiene la vía de la autofagia en la necesidad de cambio en la estrategia terapéutica de la enfermedad, se han analizado los datos de evolución a los cuatro años del inicio del estudio y se ha cuantificado el cambio de tratamiento de nuestra cohorte en ese periodo de tiempo. La escalada o desescalada terapéutica se ha establecido mediante la asignación de una categoría con números enteros positivos o negativos, según la magnitud de ese cambio de tratamiento siguiendo la gradación "step-up" o "top-down" que se describe en la introducción. Se realiza prueba de Kruskal-Wallis en la expresión de las diferentes proteínas porque en la mayoría de los grupos de cambio de tratamiento no se cumple el supuesto de normalidad.

No se ha detectado que la media resultante entre ambas determinaciones de la extensión de cada uno de los casos evaluados sea diferente de forma estadísticamente significativa en relación al análisis de p62 ( $p=0,357$ ), ni de TRAF6 ( $p=0,25$ ) ni de mTOR ( $p=0,57$ ) ni PIK3CA. Las observaciones de Beclin1 fueron bajas para considerar valor clínico de los resultados.

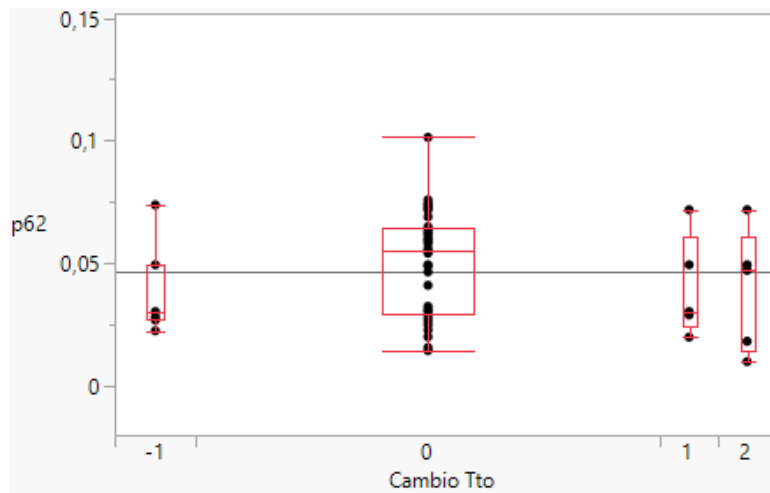


Figura 70. Representación en Box-Plot de la distribución de los grupos de cambio de tratamiento en función de la expresión de la proteína p62 en muestras tisulares de mucosa de colon. Test no paramétrico de Kruskal-Wallis; (\*  $p<0,05$ ).

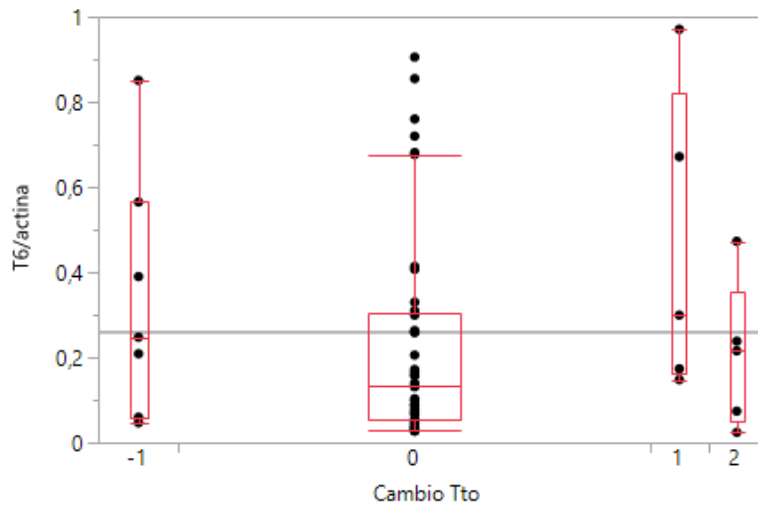


Figura 71. Representación en Box-Plot de la distribución de los grupos de cambio de tratamiento en función de la expresión de la proteína TRAF6 en muestras tisulares de mucosa de colon.  
Test no paramétrico de Kruskal-Wallis; (\*  $p < 0,05$ ).

Sin embargo, para LC3 aunque no se han detectado diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,304$ ), se interpreta que a pesar de emplear correcciones para eliminar la variabilidad es insuficiente debido a que las medias dan información sesgada. De tal manera que si observamos únicamente las medianas representadas para LC3 en la figura 72, entre los niveles de expresión de aquellos que no modificaron su tratamiento respecto de los que realizaron una o dos escaladas en el tratamiento durante el periodo de seguimiento de cuatro años, se identifica una clara tendencia, a diferencia del resto de proteínas analizadas, sin poder demostrar significación estadística.

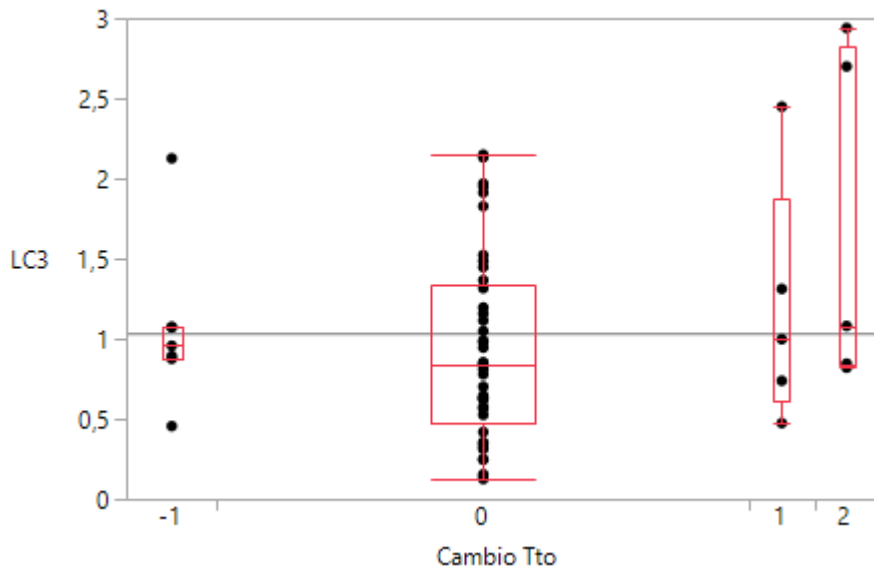


Figura 72. Representación en Box-Plot de la distribución de los grupos de cambio de tratamiento en función de la expresión de la proteína LC3 en muestras tisulares de mucosa de colon.  
Test no paramétrico de Kruskal-Wallis; (\*  $p < 0,05$ ).

## 6.5. Análisis exploratorio del perfil de alteraciones en la expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia y su clasificación por grupos o categorías pronóstico.

La conversión de LC3-I a LC3-II y la degradación de p62 se consideran marcadores de la inducción y del flujo autofágico respectivamente. De acuerdo con los patrones de expresión de estas proteínas, buscamos ordenar las muestras incluidas en el estudio en cuatro grupos para determinar su estado de la autofagia (Tabla 27): el grupo A poseería expresiones bajas de LC3-II y p62, indicando niveles basales de autofagia; el grupo B tendría bajos niveles de LC3-II, pero altos de p62, indicando una autofagia basal aberrante en los últimos estadios del proceso; el grupo C presentaría sobreexpresión de LC3-II y bajos niveles de p62, indicando activación de la autofagia; y el grupo D mostraría altos niveles de LC3-II y p62, lo que significaría una activación de la autofagia que se vería interrumpida en etapas tardías del proceso<sup>219</sup>.

Tabla 27. Porcentajes de pacientes considerando la expresión conjunta de LC3B-II y p62 respecto a la actividad.

	<b>A</b> Bajo LC3-II Bajo p62	<b>B</b> Bajo LC3-II Alto p62	<b>C</b> Alto LC3-II Bajo p62	<b>D</b> Alto LC3-II Alto p62
<b>Activa</b>	9 26,5%	3 8,8%	18 53%	4 11,7%
<b>Remisión</b>	12 85,7%	1 7,1%	1 7,1%	-
<b>Control</b>	8 80%	-	2 20%	-
<b>Total</b>	29 50%	4 6,9%	21 36,2%	4 6,9%

Según esta agrupación, se observa que todas las muestras incluidas en este trabajo se pueden incluir en los grupos A y C. Tanto en respondedores como en no respondedores parece que predomina tener la autofagia activada, aunque el porcentaje es significativamente mayor en el grupo C de no respondedores frente al grupo A de respondedores (55% vs 65% respectivamente)

Tabla 28. Porcentajes de pacientes de expresión conjunta de LC3B-II y p62 respecto a la respuesta terapéutica.

	<b>A</b> Bajo LC3-II Bajo p62	<b>B</b> Bajo LC3-II Alto p62	<b>C</b> Alto LC3-II Bajo p62	<b>D</b> Alto LC3-II Alto p62
<b>No respuesta</b>	14 45%	-	17 55%	-
<b>Respuesta</b>	11 65%	-	6 35%	-
<b>Control</b>	8 80%	-	2 20%	-
<b>Total</b>	33 56,9%	-	25 43,1%	-



# Discusión



La etiopatogenia de la CU es compleja y ampliamente desconocida, ya que se asocia tanto a factores genéticos como ambientales derivados del estilo de vida, promoviendo un estado de *disbiosis* que genera una respuesta inmune disonante. Uno de los mecanismos involucrados en varias etapas de la respuesta inmunológica es la vía de la autofagia.

La autofagia es un proceso precisamente regulado e indispensable para la degradación de proteínas de vida larga, siendo además la única vía conocida para la degradación de orgánulos. En los últimos años, el estudio de la autofagia ha revelado su implicación en la patogénesis de múltiples enfermedades, entre las que se incluyen enfermedades inflamatorias, neurodegenerativas, obesidad, diabetes o cáncer<sup>152</sup>. Uno o varios defectos en esta vía de la autofagia se han vinculado notablemente a la patogénesis de la EII.

En el momento actual no disponemos de tratamientos farmacológicos ni quirúrgicos curativos para la CU. Los múltiples fármacos empleados para su tratamiento se centran en conseguir la remisión de la fase activa y consiguen mantener la enfermedad sin actividad. Pero uno de cada cinco pacientes con un brote grave de colitis ulcerosa es sometido a colectomía por fracaso de los medicamentos disponibles, por lo que resultan necesarias nuevas terapias que limiten y controlen el avance de dicho proceso inflamatorio y estas novedades pueden formularse a partir de la caracterización de esta vía de la autofagia en la CU.

### **1.1 ANALISIS EXPLORATORIO ATENDIENDO A LA EXTENSIÓN, LA GRAVEDAD DE LA ENFERMEDAD Y A LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.**

Las características clínicas de los pacientes con CU incluidos en nuestro trabajo tienen una distribución en concordancia con otras poblaciones similares. Nuestra cohorte está compuesta por pacientes relativamente jóvenes, con una edad media al diagnóstico paralela a estudios epidemiológicos que describen un rango de edad entre 30-40 años. La distribución en cuanto al género es bastante homogénea, con predominio del género masculino (60,4% V; 39,6% M), similar a lo descrito en otros estudios<sup>19</sup>. Respecto a los antecedentes familiares, el 8 % de nuestra población tenía algún familiar de primer o segundo grado con EII, lo que concuerda con lo descrito previamente, donde se habla de una frecuencia del 8–14%<sup>26</sup>, sin que ello influya en el fenotipo o curso de la enfermedad. Las MEI se presentaron en el 16,6 %, y han sido las manifestaciones

musculoesqueléticas las más frecuentes, como se describe en otros estudios, donde la artropatía aparece entre 20-30% de los pacientes con EII<sup>220</sup>. El porcentaje de fumadores en nuestra cohorte no estaba balanceado en los grupos, y apenas superaba el 25%, por lo que el análisis de la influencia del tabaquismo no se realizó.

La extensión de la enfermedad se ajusta a lo descrito en otras series, con predominio y porcentaje ligeramente superior de pancolitis (47,9%) pero similar de colitis izquierda (35,4%)<sup>221</sup>. Estos hallazgos podrían estar en relación con la duración de la enfermedad, con un tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta el momento de inclusión, que en la mayoría de los pacientes superaban los 15 años. Esto es debido a que, durante el curso de la enfermedad, la extensión proximal de la inflamación progresa, y con el paso del tiempo alrededor del 50% de los pacientes progresan a pancolitis<sup>222</sup>.

La gravedad de la enfermedad se distribuye en nuestra cohorte con un 29% de los pacientes en remisión, un 33,3% con afectación leve, presentando enfermedad moderada un 35% y enfermedad grave apenas un 2% en el momento de la realización de colonoscopia. Esta escasa proporción de pacientes con enfermedad grave debe entenderse en el contexto de que la inclusión se estableció de forma consecutiva y prospectiva a partir de los pacientes que acudían a realizarse la revisión. Este hecho podría condicionar un sesgo de selección del grupo de pacientes con actividad grave. Para contrarrestarlo y que el análisis fuera balanceado entre los distintos niveles de gravedad se determinó agrupar las afectaciones moderada y grave a lo largo de todo el estudio. Más del 30% de los casos de nuestra cohorte presentaron complicaciones, requiriendo ingreso hospitalario en algún momento de la enfermedad. La prevalencia de displasia y/o CCR fue baja, del 2,1%, respecto a lo recogido en series más amplias<sup>223</sup>.

Sobre la respuesta al tratamiento, en nuestra cohorte, el número de pacientes que precisaron corticoides o azatioprina, ha sido similar a otros estudios que incluyeron un mayor número de pacientes. Respecto a los que desarrollaron corticodependencia o corticorresistencia, así como los que precisaron del uso de corticoides en el primer brote también ha sido similar el número de pacientes a lo descrito en otras series<sup>224</sup>. Con respecto al uso de los tratamientos biológicos un 41,6% recibieron anti-TNF $\alpha$  y un 6,25% se trataron con un anti-integrina de forma balanceada lo que permitió su análisis. Se administró infliximab al 29,1% presentando respuesta clínica el 92,8%, definida por un descenso de la actividad mayor a tres puntos según UCDAI; y alcanzando remisión clínica el 57,1% de los tratados. El porcentaje de pacientes que precisaron colectomía fue del 4,2%, bien por falta de respuesta al tratamiento médico o bien por la aparición de complicaciones, porcentaje que se asemeja con series más extensas que describen un porcentaje de colectomía en 10 años de seguimiento que oscila entre un 6% y un 16%; y entre un 2% y un 9% en 5 años desde el diagnóstico<sup>225</sup>.

Del análisis de las asociaciones entre las variables a estudio atendiendo a la extensión de la CU se objetiva que tiene influencia en el curso clínico y el pronóstico de la enfermedad. Como en las series revisadas, en nuestra muestra, los pacientes con colitis extensa han sido los más necesitados de terapias intensivas o incluso colectomía<sup>226</sup>, con diferencias significativas en cuanto al uso de corticoides ( $p=0,01$ ) e inmunomoduladores ( $p<0,001$ ), pero no significativo con los biológicos o la necesidad de cirugía. Si analizamos la gravedad de la CU, los diferentes grupos están correctamente balanceados respecto a las variables clínicas establecidas como pronósticas, y también encontramos una distribución homogénea entre la gravedad de la enfermedad y el uso de tratamiento corticoideo, inmunomodulador, biológico o la necesidad de cirugía. La homogeneidad de estos datos es imprescindible para evitar sesgos de selección y poder establecer comparaciones de la expresión de las proteínas en los diferentes grupos de actividad (Tablas 12 y 13).

Respecto a las asociaciones entre tratamientos recibidos y la respuesta entre cada uno de los grupos de gravedad, a diferencia de otros estudios, no encontramos asociación con la respuesta o remisión con los diferentes fármacos empleados, lo cual, como hemos señalado anteriormente, era lo deseable para que el análisis de los valores de expresión de proteínas pudiera establecerse sin sesgos de selección. Resulta llamativo que la tasa de respuesta clínica en todos los grupos de gravedad con los corticoides es inferior al 60% descrito, lo cual va en consonancia con la mayor tasa de corticorresistencia y corticodependencia<sup>227</sup>. En el caso de los inmunomoduladores las tasas de respuesta supera el 50% recogido en revisiones sistemáticas amplias<sup>228</sup>. Para los biológicos, las discretas diferencias pueden ser atribuibles al escaso número de observaciones analizadas y al tamaño muestral, en cualquier caso tasas favorables respecto a lo descrito<sup>229</sup> (Tabla 16).

## **1.2 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA RUTA DE AUTOFAGIA.**

### **1.2.1 Análisis de la expresión de las proteínas**

La reciente asociación de alteraciones en la autofagia con la patogénesis de la inflamación ha generado un interés creciente en este proceso. De hecho, la autofagia ha sido estudiada en múltiples tipos de cáncer y enfermedades inflamatorias entre las que se encuentra la Colitis Ulcerosa<sup>230,231</sup>.

En el presente estudio hemos analizado la expresión de seis proteínas diferentes directamente implicadas con el proceso de la autofagia en pacientes con CU para intentar esclarecer cuál es el papel de la autofagia en la patogenia y desarrollo de la enfermedad.

## **p62**

La proteína SQSTM1/p62 desempeña múltiples funciones y actúa en diferentes rutas metabólicas, por lo que alteraciones genéticas o expresión aberrante de esta proteína se han relacionado con diferentes enfermedades. Es un modulador implicado en las rutas de señalización de NFκB y en la autofagia. Su papel en este último proceso tiene una importancia creciente, al ser la principal molécula receptora que interviene en el reconocimiento del material que se degrada en la autofagia selectiva, y de señalización para la activación del complejo mTORC1 en los lisosomas<sup>232</sup>.

La cantidad de SQSTM1/p62 aumenta cuando se inhibe la autofagia y disminuye cuando se induce la autofagia, pero el impacto potencial de la regulación transcripcional y/o traduccional o la formación de agregados insolubles debe abordarse en sistemas experimentales individuales<sup>233</sup>. SQSTM1/p62 se encuentra habitualmente distribuido en el citoplasma, el núcleo, los autofagosomas y los lisosomas. En respuesta al estrés se trasloca a los sustratos autofágicos ubiquitinados y migran hasta la maquinaria enzimática<sup>182</sup>. Se ha observado que un aumento del flujo autofágico es responsable de la degradación de p62 y que el bloqueo de este proceso conlleva a la formación de agregados de la proteína y su acumulación, lo que significa que en el tejido se está produciendo una autofagia defectiva o aberrante<sup>234</sup>.

Sin embargo, la medición de la expresión de p62 estrictamente como marcador del flujo autofágico sigue siendo controvertida y puede malinterpretarse principalmente porque esta proteína está sujeta a una regulación compleja tanto a nivel transcripcional como postraduccional. Este método de medición presenta limitaciones en periodos cortos de tiempo, puesto que una inducción de autofagia prolongada disminuye los niveles totales de proteínas degradadas en este proceso, específicamente p62, y no permite discernir frente a otros procesos significativos a largo plazo, como una menor síntesis proteica de p62.

En el presente trabajo el estudio de expresión de la proteína p62 muestra que el 100% de los pacientes con CU en actividad o en remisión tienen expresiones bajas de la proteína o carecen por completo de ella (Tabla 17). De hecho, estos resultados también aparecen en los controles sanos, que aunque la expresión nula solo tiene lugar en el 20% de ellos frente al 90% de grupo CU, el 80% restante de los controles sanos que presentan baja expresión puede ser explicado por la hipótesis observada de la diferenciación celular en las criptas del colon<sup>182</sup>. Los niveles de p62 pueden estar disminuidos en

mucosa de colon normal como resultado de la propia degradación autofágica que se encuentra fisiológicamente activa en la mucosa de colon normal<sup>235</sup>. Existen indicios que prueban que el nivel de expresión de p62 no siempre se correlaciona inversamente con la actividad autofágica<sup>236</sup>. Este efecto se ha descrito también en cáncer de colon, donde su expresión se correlaciona inversamente con el pronóstico del tumor<sup>237</sup>.

El análisis de las características clínicas o de tratamiento en nuestros pacientes no mostró ninguna asociación con la expresión de p62. No obstante, respecto a extensión entre grupo control y colitis izquierda se determinaron diferencias muy sutiles, igual que entre grupo control y los pacientes con afectación leve respecto a la gravedad, que no permiten extraer conclusiones sólidas. La ausencia o baja expresión de p62 se asoció con peor pronóstico en pacientes con cáncer o otras afecciones inflamatorias<sup>238</sup>. A la vista de estos resultados, necesitaríamos ver si combinaciones de perfiles de expresión que incluyan p62 podrían ser usados como biomarcador pronóstico que se describen en el siguiente apartado.

### **LC3B**

La proteína LC3B forma parte de uno de los sistemas de ubiquitinación y su lipidación es esencial en el proceso autofágico al ser fundamental en la expansión de la membrana del autofagosoma<sup>239</sup>. Su forma citosólica, LC3B-I, se conjuga con fosfatidiletanolamina para obtener la forma LC3B-II, que se ancla en la membrana del autofagosoma y reconoce receptores de proteínas ubiquitinadas, como p62, acercando de esta manera el material a degradar a la maquinaria autofágica. La inducción de la autofagia promueve la conversión de LC3-I a LC3-II, considerándose esta última proteína el marcador más específico y preciso de la actividad autofágica<sup>240</sup>.

Nuestros resultados muestran que la proteína LC3B-II se expresa en aproximadamente el 97% de las muestras de CU activa a diferencia de las muestras control que en su mayoría carecen de expresión (Tabla 18), por lo que podría estar relacionada con el grado de actividad, hallándose diferencias más patentes al establecer comparaciones entre el grupo control y el de actividad moderada-grave (Figura 34). Al analizar la asociación ente la expresión y las variables clínicas de los pacientes, se comprobó que no existía una asociación significativa, pero si hubo una tendencia entre la expresión de LC3B y la extensión con resultados que posteriormente identificaremos en la descripción de la correlación. Por tanto, nuestros resultados revelan que la expresión de LC3B-II en CU se asocia a formas de mayor gravedad o más extensas, sugiriendo su posible papel como marcador de peor pronóstico.

Sin embargo, de acuerdo con algunos estudios realizados, se ha demostrado que son habituales niveles bajos de expresión de LC3B-II en cáncer o enfermedades degenerativas, sugiriendo que la reducción de la actividad o incluso actividad normal de

la autofagia podría estar relacionada con un peor pronóstico en estas patologías. Algunos estudios proponen que esto puede ser debido al hecho de que la proteína podría estar acumulada<sup>158</sup>, en vez de formando parte de los autofagosomas y activando la ruta autofágica. Por otro lado, otros trabajos han descrito que en dichas enfermedades puede expresarse LC3 fundamentándose en la hipótesis de la activación de la vía no canónica<sup>241</sup>

Aún considerando estos hallazgos contradictorios, nuestros resultados se apoyan en que existe un claro aumento en la cantidad de LC3B-II en presencia del inhibidor y éste suele ser indicativo de flujo en la vía de la autofagia<sup>200</sup>, permitiendo establecer la relación de la expresión de LC3B-II con el pronóstico de la CU.

## **TRAF6**

La proteína TRAF6 pertenece a la familia de los factores asociados al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF) que median la transducción de señales de rutas celulares. Entre otras funciones de TRAF6 están participar en la ruta de transducción de la familia IL1R/TLR, que desempeña un papel importante en la respuesta inmune innata<sup>242</sup>. Pero además TRAF2, TRAF3, TRAF4 y TRAF6 también funcionan como proteínas adaptadoras y ubiquitina ligasas E3, que a través de su interacción con p62 regula la ruta de NF- $\kappa$ B mediante ubiquitinación para reclutar el complejo TAK1 y la activación de kinasa I $\kappa$ B (IKK $\beta$ )<sup>243</sup>. De este modo participan en la transducción de señales inmunes innatas y adaptativas, lo que conduce en última instancia, a la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, AP-1 y factores reguladores de interferón, que promueven la transcripción de diversas citocinas y quimiocinas proinflamatorias<sup>244,245</sup>.

Recientemente se ha demostrado que TRAF3 es un regulador negativo de la inflamación en el modelo de ratón con colitis inducida por TNBS al interferir con las vías proinflamatorias mediadas por IL-17/IL-17R/Act1/TRAF6. Estos hallazgos sugieren que TRAF6 funciona como regulador antiinflamatorio en la colitis experimental en ratones. De manera similar, la eliminación específica de TRAF6 en células epiteliales intestinales también conduce a colitis grave inducida por DSS en ratones, lo que sugiere que TRAF6 presenta un efecto antiinflamatorio protector en las células epiteliales intestinales, y dicho efecto parece ser independiente de la ruta TLR<sup>246</sup>. Todo en conjunto representan nuevos indicios de la importancia de TRAF6 en el proceso de autofagia, no sólo por su interacción con p62, sino porque es necesario para la activación del complejo mTORC1<sup>247</sup>, regulando de esa manera la vía de autofagia en la patogenia de la CU.

En nuestro trabajo hemos observado que la ausencia de expresión de TRAF6 está asociada a los pacientes con enfermedad en remisión y a los controles sanos. Mientras que en los pacientes con actividad los niveles de expresión de TRAF6 son variables,

viéndose expresión normal comparada con el control en un 26% de los casos, un 44% presentaron disminución de la expresión y el 29% restante con expresión nula (Tabla 19). Estos resultados muestran que la ausencia de expresión de TRAF6 o su expresión baja se asocian con aquellos casos con actividad leve, sugiriendo que la expresión de la proteína es directamente proporcional al nivel de actividad de la enfermedad, o de otro modo, su expresión en casos de CU activa podría ser explicada por su efecto regulador para potenciar la inhibición de la inflamación.

### **mTOR**

mTOR es una serin/treonin quinasa clave en la regulación de multitud de funciones celulares, como el crecimiento, la proliferación y la supervivencia. Esta proteína puede estar formando parte de dos complejos: mTORC1 y mTORC2<sup>248</sup>. mTORC1 inhibe el inicio de la autofagia mediante la fosforilación directa del complejo ULK1 quinasa en abundancia de nutrientes. Por el contrario, en condiciones de deficiencia de nutrientes, la actividad de mTORC1 se regula negativamente y el complejo es incapaz de inhibir el inicio de la autofagia<sup>249,250</sup> (Figura 16).

Nuestro estudio de mTOR en mucosa de colon muestra que la expresión de esta proteína está ausente o baja en prácticamente el 100% de pacientes con CU activa o en remisión, y el 44% de los controles sanos lo expresan de forma baja. Estos resultados se asocian con las diferencias de gravedad del grupo control frente al grupo con actividad moderada-grave de forma más significativa. Si analizamos la extensión, como ocurría con p62, también con niveles absolutos bajos, pero algo más determinantes, mTOR indica una tendencia en sus valores como posible marcador de extensión. El análisis de las características clínicas o de tratamiento en nuestros pacientes no mostró ninguna asociación con la expresión de mTOR.

En conclusión, nuestros resultados revelan la expresión disminuida de mTOR en CU y que la ausencia de expresión de esta proteína se asocia a formas más extensas o graves, sugiriendo su posible papel como marcador de peor pronóstico, ya que en ausencia de expresión de mTOR la autofagia deja de estar suprimida.

### **Beclin1**

Beclin1, es el ortólogo en mamíferos de Atg6 en levaduras, y resulta una proteína clave en el proceso de autofagia ya que forma, junto con las proteínas Vps34/PI3K, ATG14 y p150, el complejo multimérico PI3K de clase III, esencial en el inicio de la formación del autofagosoma. Precisamente por ser necesario para la formación del autofagosoma, muchos estudios han centrado sus análisis en Beclin1. Dependiendo de las proteínas con las que va a formar complejos, Beclin1 puede regular el proceso de autofagia de forma positiva o negativa<sup>251</sup>.



Muchos estudios han relacionado la expresión de Beclin1 con la progresión y el pronóstico de diferentes enfermedades degenerativas o cáncer. Así, se ha visto que en CCR la sobreexpresión de Beclin1 puede generar mecanismos de resistencia a quimioterapia, lo que indica que la autofagia al favorecer a las células de CCR tratadas con 5-FU, se correlaciona con un peor pronóstico de la enfermedad<sup>252</sup>. Durante la muerte celular inducida por inflamación en EII, también se ha demostrado que la inducción de la autofagia tiene un efecto protector limitando la apoptosis. Esto es debido a la restricción del cambio de la función proautofágica a proapoptótica, tanto de Beclin1 como de ATG5, que tiene lugar durante la inflamación del tejido intestinal, favoreciendo la función de barrera intestinal<sup>253</sup>.

Nuestros resultados muestran expresiones de Beclin1 cercanas a la del control en más de la mitad de casos con CU activa y casi el 90% de los casos con CU en remisión, mientras que los casos restantes, 20% muestran expresión normal de la proteína o la presentan muy baja (Tabla 21). A pesar de que el valor pronóstico de esta proteína está demostrado en CCR o en EII, en nuestro trabajo no hemos encontrado relación entre sus niveles de expresión y las características clínicas, extensión o gravedad de los casos incluidos en nuestro trabajo, por lo que un estudio en mayor profundidad, con una muestra mayor, sería necesario para confirmar estos resultados.

### **PIK3CA**

La proteína PI3K (fosfatidil-inositol 3 quinasa de clase III) es crucial en el metabolismo celular, y además tiene un papel importante en la regulación de la carcinogénesis. Su interacción con p150, Beclin-1 y mATG14 genera el complejo proteico PI3K de clase III, necesario para la nucleación del fagoforo y el proceso de autofagia. La activación de miembros de la ruta PI3K/AKT/mTOR, como PIK3CA, producen una activación constitutiva de efectores como mTOR, conocido inhibidor de la autofagia; sin embargo, existen moléculas que antagonizan la acción de PIK3CA, como el gen supresor PTEN, que puede ser considerado un activador de la autofagia en EII<sup>254</sup>.

En los resultados de nuestro trabajo, la expresión de PIK3CA está disminuida en la mayoría de los casos de CU incluidos en nuestra serie (84%), independientemente del grado de actividad, extensión o características clínicas. No obstante, sería necesario un estudio en mayor profundidad y con una muestra mayor para descartar por completo el valor pronóstico de la expresión de PIK3CA en CU.

### 1.2.2 Correlación de la expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia.

En nuestro estudio hemos encontrado correlación significativa en la expresión de varias proteínas implicadas en la ruta de la autofagia de las muestras de mucosa de colon.

En primer lugar, atendiendo a la extensión, si observamos el diagrama de correlaciones (Figura 51), en proctitis se determinaron asociaciones moderadas de LC3B con TRAF6 y Beclin1; y de p62 con mTOR; en colitis izquierda y en pancolitis estas mismas asociaciones fueron débiles, y en el grupo control llamativamente negativas de p62 con LC3B. Debemos admitir la limitación de la relevancia clínica de esta observación, ya que en situación de brote con actividad grave la extensión de la enfermedad pasa a un segundo plano<sup>125</sup>.

En segundo lugar, atendiendo a la gravedad (Figura 55), en el grupo en remisión encontramos asociaciones moderadas o débiles de Beclin1 con p62, LC3B y TRAF6; en el grupo leve, de mTOR con Beclin1 y TRAF6; en el grupo moderada-grave se identificó asociación significativa Beclin1 con TRAF6; mTOR con PIK3CA y, además, asociación negativa de mTOR con TRAF6; y PIK3CA con Beclin1. En el análisis de la puntuación UCDAI, de forma paralela como cabía esperar comparando con la gravedad, y a como se observó en la extensión, igualmente existe una asociación significativa con las proteínas LC3B, TRAF6, Beclin1, con coeficiente de correlación positivo, denotando una correlación entre dichas proteínas y la puntuación UCDAI.

Considerando estas asociaciones, deben ser interpretadas con mayor detalle:

- La interacción que más se repite en nuestro estudio es la existente entre LC3B, TRAF6 y Beclin1, que resulta lógica teniendo en cuenta que las tres proteínas interactúan entre ellas. De hecho, TRAF6 se une a LC3B a través de p62 y ubiquitina a Beclin1<sup>255</sup>. La presencia de dos dominios de unión a TRAF6 en Beclin1 facilitaría la unión entre las proteínas y su ubiquitinización<sup>256</sup>; de esta manera, TRAF6 ejercería su función reguladora con la formación del autofagosoma y activar la autofagia, lo que podría explicar la correlación entre las proteínas TRAF6, LC3B y Beclin1.
- La asociación entre p62 y mTOR encontrada en el grupo proctitis, estaría apoyada al considerar que ambas proteínas interactúan de forma dependiente, a través del dominio NLS1, donde Raptor promueve la activación de la vía PI3K/Akt/mTORC1. Por lo tanto, p62 es una parte integral del complejo mTORC1 y es necesario para mediar la señalización de aminoácidos y la activación de sus efectores S6K1 y 4EBP1<sup>257</sup>.
- La asociación inversa entre las proteínas p62 y LC3B hallada en el grupo control de extensión, se justificaría al ser ambas moduladores del proceso de autofagia ya que pueden interaccionar de manera directa entre ellas a través de su dominio LIR<sup>258</sup>.

- La correlación positiva entre las proteínas mTOR y PIK3CA se observa en el grupo con mayor actividad. Pero estas proteínas no intervienen de manera conjunta en otra ruta que no sea la autofágica y, en ella, sus roles son contrarios al ser mTOR un inhibidor de la ruta y PIK3CA un regulador positivo. No obstante, se han descrito recientemente en CCR mecanismos que conducen a una doble inhibición de mTOR y PIK3CA de forma conjunta, favoreciendo la regresión tumoral<sup>259</sup>. Para confirmar la relación de este hallazgo en la fisiopatología de la EII serían necesarios estudios más amplios.
- La correlación positiva entre Beclin1 y p62 en el grupo en remisión. Estas moléculas no intervienen conjuntamente en ninguna ruta diferente a la autofagia y en el proceso autofágico poseen papeles contrarios. Beclin1 es un regulador positivo, y la ausencia de expresión de p62 es indicativo de una activación de la vía. Por tanto, no cabría esperar una correlación positiva entre estas proteínas. Estos resultados podrían ser debidos a alteraciones en otras proteínas implicadas en la autofagia no analizados en nuestro trabajo, y que hipotéticamente sólo se manifiestan una vez se ha controlado la actividad inflamatoria.
- La correlación negativa moderada de mTOR con TRAF6, resulta antagónica, ya que de forma general sus roles son paralelos, al ser mTOR un inhibidor de la ruta y TRAF6 un activador de mTOR. Tampoco hemos encontrado la base biológica de la correlación entre las expresiones de la proteína PIK3CA con LC3 y mTOR en sentido positivo, ni con Beclin1 y con TRAF6 en sentido negativo. No obstante, aunque las funciones versátiles de la familia TRAF podrían explicar esta observación, resulta más evidente que el menor tamaño muestral para determinaciones de PIK3CA y mTOR, según el grupo estudiado, sería la causa de estos hallazgos.

En tercer lugar, atendiendo a la respuesta (Tablas 27 y 28), el análisis de los valores de expresión de p62 para los grupos con o sin respuesta terapéutica y controles no arrojó diferencias. Sin embargo, el estudio de la expresión de LC3B y TRAF6 en el grupo sin respuesta al tratamiento, mostró porcentajes de expresión normal en el 58% y 50%, respectivamente, siendo estos porcentajes de expresión normal mayores que aquellos que respondieron al tratamiento y resultando inexistentes en el grupo control. Estos hallazgos sugieren nuevamente un papel distintivo de LC3B y, en menor medida, TRAF6 como marcadores pronósticos en relación con la respuesta al tratamiento.

### **1.3 NUEVAS APROXIMACIONES CON VALOR PRONÓSTICO BASADAS EN LA AUTOFAGIA**

Desde que en los años noventa Yoshinori Ohsumi descubriera los mecanismos de la autofagia<sup>260</sup>, se ha reflejado un creciente reconocimiento por el papel primordial que posee este proceso celular en funciones fisiológicas y en la enfermedad. Sin

embargo, los últimos avances en este campo sugieren que solo estamos empezando a dilucidar la interacción entre la autofagia y las vías de señalización de la inmunidad innata en algunas enfermedades.

Nuestro trabajo aporta evidencias de la influencia que tiene la vía de la autofagia en la evolución de la CU. A continuación, se describen varias aproximaciones a este análisis según los resultados obtenidos:

- La relación del patrón de progresión proximal y la expresión de determinadas proteínas de autofagia. Es decir, la extensión de la enfermedad distal a pancolitis en los cuatro años de seguimiento se relaciona con la magnitud de las diferencias en los resultados de LC3B. Se produce un descenso en la diferencia de los valores de la proteína LC3B en la extensión proximal con respecto a la extensión distal, de la misma manera que ocurre con TRAF6. Estos resultados sugieren la utilidad de ambas proteínas como marcador de progresión proximal en el seguimiento. Adicionalmente, en el análisis del patrón de progresión, también se determinó si en el tiempo de seguimiento los cambios en la extensión también se correspondían con cambios en la clasificación de la gravedad medida por T-W. En este subgrupo de pacientes no se detectaron diferencias significativas.

- La relación entre la evolución de la actividad y la expresión de proteínas, se analizó, en primer lugar, por los cambios en la clasificación de gravedad de la CU durante el seguimiento. De tal manera que se han detectado diferencias en la expresión de la proteína TRAF6 entre los que no modificaron su actividad y los que disminuyeron su actividad en el periodo de seguimiento de cuatro años, hasta actividad silente.

Más significativas son las observaciones con LC3B, en la que las diferencias también aparecen entre los niveles de expresión de aquellos que no modificaron su actividad respecto a los que disminuyeron su actividad en el periodo de seguimiento de cuatro años, hasta considerar respuesta parcial o remisión clínica.

Analizar estos cambios de actividad con el índice de T-W modificado tiene como desventaja que no valora la extensión de las lesiones, por lo que en algunos casos de formas distales (especialmente en proctitis) no es aplicable. Otras limitaciones son que no está validado y que no es suficientemente discriminativo para medir cambios más sutiles en la actividad de la enfermedad.

Para evaluar mejor la actividad medida por una escala de puntuación hubiera sido deseable considerar el índice de UCEIS; pero por su facilidad de uso y ser el más utilizado en los ensayos clínicos más clásicos el índice más empleado en nuestro centro al momento de la recogida de variables fue el índice de Mayo completo o UCDAI.

Se determinó la puntuación UCDAI basal al momento de la inclusión y al final del seguimiento se aplicó su versión abreviada, el índice de Mayo parcial, que mide de modo no invasivo la actividad de la CU, excluyendo la subpuntuación de endoscopia por no disponer de nueva colonoscopia en todos los casos. Se ha demostrado que esta versión abreviada y el UCDAI se correlacionan con la evaluación del paciente sobre el cambio en la actividad de la CU<sup>129,217</sup>.

En la figura 65 se muestra la distribución de los valores de expresión respecto a los cambios en la puntuación de UCDAI muestra que la asociación moderada e inversa se obtuvo con LC3B y TRAF6; y más débil y positiva con mTOR. Lo que apoya los resultados anteriores obtenidos mediante la puntuación T-W y permite establecer que la expresión de LC3B y TRAF6 se asocia con mejoría en la actividad medida de forma objetiva, con una disminución en el índice de Mayo parcial  $\leq 2$  puntos. Es decir, que una expresión normal basal de LC3B y TRAF6 se asocia a mayor probabilidad de alcanzar remisión clínica.

- La relación entre la evolución de la actividad medida por calprotectina fecal y la expresión de proteínas de autofagia es otra forma de determinar su valor pronóstico en el seguimiento.

Nuestras determinaciones de CF basal y los datos de actividad son congruentes con los observados<sup>218</sup>, de tal forma que valores de CF basal superiores a 200 $\mu\text{g/g}$  se correlacionan con puntuaciones UCDAI  $>7$ ; o lo que es lo mismo, actividad moderada o grave. Comprobado este punto, nos permitió determinar la correlación de los valores de CF basal con los diferentes niveles de expresión de cada una de las proteínas. Se halló una asociación significativa entre la CF basal y las determinaciones de la proteína LC3B con correlación positiva moderada (Tabla 26 y figura 67).

Adicionalmente, comprobamos cómo los cambios de los valores de CF durante el seguimiento (Figura 69) se relacionan con una determinada expresión de proteínas. Se identificó una correlación negativa moderada para LC3B. Es decir que aquellos casos que tenían mayores niveles de expresión de LC3B en el momento basal, presentaron en su evolución una caída más pronunciada del marcador CF hasta valores inferiores a 152 $\mu\text{g/g}$ , concordantes con remisión bioquímica, o valores menores de 68  $\mu\text{g/g}$  con ausencia de actividad endoscópica e incluso histológica<sup>123</sup>. Acorde a lo descrito<sup>261</sup>, nuestros resultados establecen con dicha correlación un factor que nos permite identificar pacientes con menor probabilidad de recaída.

- La relación entre la necesidad de cambio en la estrategia terapéutica durante el seguimiento y la expresión de proteínas de autofagia también se analizó y, únicamente observamos que, entre los niveles de expresión de aquellos que no modificaron su tratamiento respecto de los que realizaron una o dos escaladas en el tratamiento

durante el periodo de seguimiento de cuatro años, las medianas representadas para LC3B, a diferencia del resto de proteínas analizadas (Figura 72), presentan una clara tendencia ascendente para mayores valores de LC3B, sin poder demostrar significación estadística. Si esta tendencia demostrara significación en una muestra más amplia, podría plantearse como una herramienta útil para valorar cambios en el manejo terapéutico, como ha ocurrido en otras enfermedades con mecanismos paralelos<sup>262</sup>.

### **Estado de la autofagia**

Un análisis conjunto de la expresión de p62 y LC3B es la forma más fiable de establecer el estado de la autofagia. Ambas se consideran marcadores del flujo autofágico y de la inducción, respectivamente. LC3B es un marcador de autofagosomas, ya que tras conversión de LC3-I a LC3-II (forma lipídada) se encuentra en sus membranas. La proteína p62 es un marcador del flujo autofágico que sirve de puente entre LC3B y sustratos ubiquitinados y es degradada por el fagosoma disminuyendo su cantidad<sup>233</sup>.

Nuestro análisis conjunto atendiendo a la actividad, mostró que más de la mitad de todos los casos de CU con actividad inflamatoria presentan activación de la ruta, una cuarta parte muestran autofagia basal, y un 11% que presentan autofagia inhibida. Por contra, el grupo de CU en remisión el 85% mostraba un estado de autofagia basal, y de forma llamativa hasta el 20% de las muestras de casos controles con mucosa normal presentaron activación de la ruta, circunstancia también descrita en estudios previos<sup>235</sup>.

Por otro lado, atendiendo a la respuesta terapéutica, nuestros datos mostraron que más de la mitad de los pacientes no respondedores presentan activación de la ruta frente a la mayoría de los pacientes respondedores que presentan una autofagia basal.

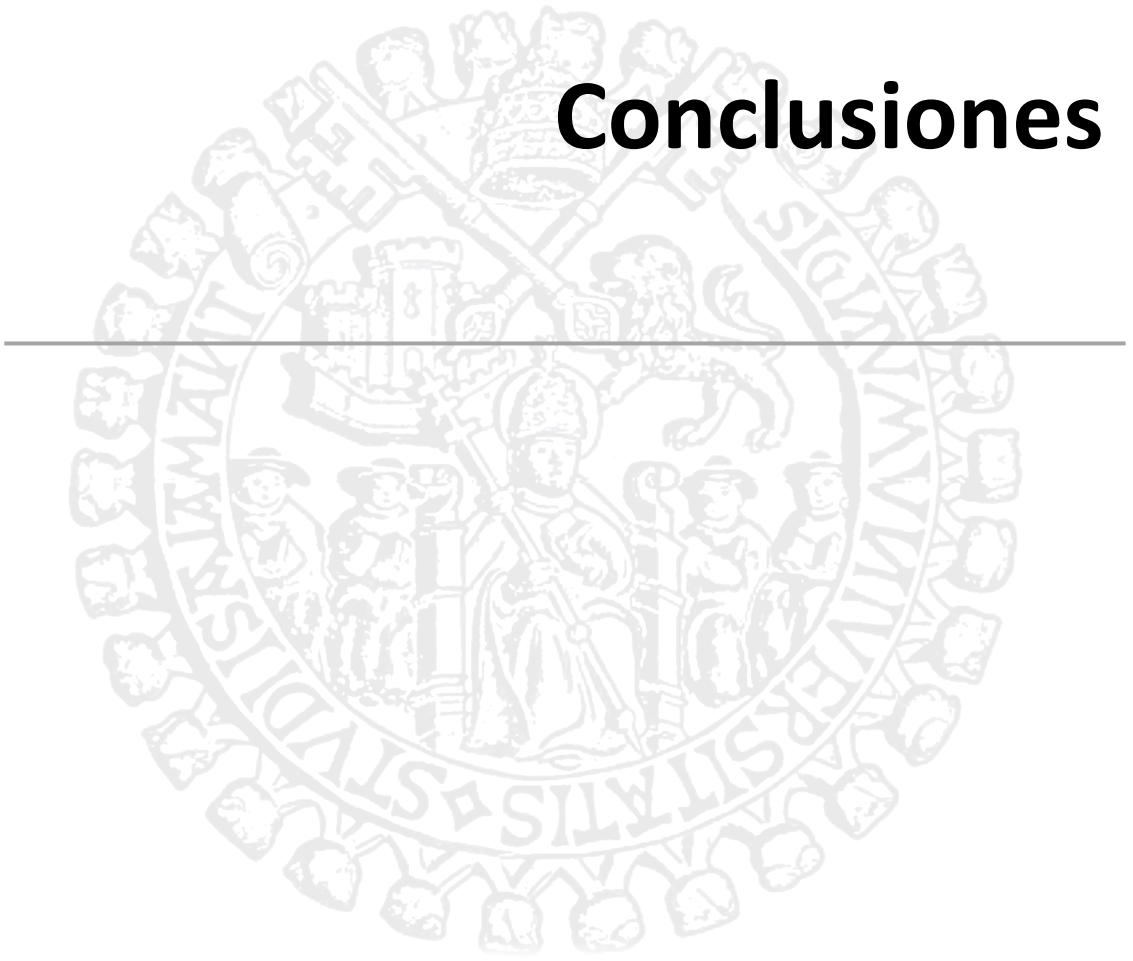
De este análisis conjunto de la expresión de p62 y LC3B podemos concluir que nuestros resultados no permiten demostrar significación estadística para la asociación entre el estado de la autofagia y el pronóstico de los pacientes, a pesar de que el estudio de la expresión de LC3B y p62, de manera independiente, sí mostró relación con el pronóstico de los pacientes. Este hecho se debe al reducido tamaño muestral, pero el análisis descriptivo de las diferencias observadas entre los distintos grupos (Tablas 27 y 28) si permite especular con la posibilidad de clasificar en categorías pronóstico al momento del diagnóstico. La identificación de un perfil de alteraciones concreto, por tanto, podría ser clave en la predicción de la evolución de la enfermedad y su respuesta al tratamiento <sup>263</sup>. La ampliación de este estudio para obtener un tamaño muestral mayor sería necesaria antes de descartar la expresión conjunta de estas proteínas como un marcador asociado al pronóstico que modifique su manejo.

## 1.4 LIMITACIONES

En nuestro estudio las principales limitaciones han sido:

- Sesgo de selección al ser de tipo observacional, de casos y controles, direccionalidad retrógrada (del efecto al factor de exposición) en los que el muestreo se hace en relación con la enfermedad de forma consecutiva, por lo que el sesgo de selección no se puede evitar y los sujetos pueden no ser representativos de la población a la que se pretende extrapolar las conclusiones.
- El pequeño tamaño muestral debido a la metodología elegida. Dichas técnicas de proteómica obligan a la obtención de muestras tisulares, cuando cada vez es más frecuente que en pacientes en remisión el método de cribado sea la cromoendoscopia, en lugar de las biopsias parcheadas de todos los segmentos del colon. Esto tal vez se relacione con la falta de significación estadística en algunos análisis de correlación que aun así han resultado útiles para marcar unas tendencias mostradas en el análisis exploratorio.
- Es necesario mencionar que la expresión de proteínas en muestras tisulares también se estudia de forma paralela mediante técnicas de inmunohistoquímica o inmunofluorescencia, por lo que estos resultados aportarían información adicional y permitirían contrastar los encontrados en nuestro estudio mediante western-blot.

# Conclusiones





1. Nuestros resultados muestran una activación de la vía de la autofagia en la mucosa de colon de pacientes con Colitis Ulcerosa.
2. La expresión de LC3B se asocia a formas de mayor gravedad o más extensas, sugiriendo su posible utilización como marcador pronóstico en Colitis Ulcerosa.
3. En el estudio preliminar la expresión de la proteína TRAF6 es marginalmente proporcional al nivel de actividad de la enfermedad y la ausencia de mTOR se asocia a formas más extensas o graves.
4. La asociación que más se repite en los pacientes con actividad de nuestro estudio es la existente entre LC3B, TRAF6 y Beclin1. TRAF6 y Beclin1 ejercerían su función reguladora con la formación del autofagosoma, incrementando la expresión de LC3B, siendo este marcador LC3B indicativo de flujo en la vía de la autofagia.
5. La expresión normal de LC3B es mayor en los no respondedores, que presentan activación de la ruta, frente a la mayoría de los pacientes respondedores que presentan una autofagia basal, y serviría de indicador en relación a la respuesta al tratamiento.
6. Existe correlación con la actividad medida en UCDAI, de forma que una expresión normal basal de LC3B y TRAF6 se asocia a mayor probabilidad de alcanzar remisión clínica en nuestra muestra.
7. En este trabajo mostramos una asociación significativa entre los valores de calprotectina basal y la expresión de la proteína LC3B, que permitiría identificar pacientes con menor probabilidad de recaída. Consideramos que se deben realizar estudios de estas proteínas en series más amplias de pacientes para confirmar su validez como biomarcadores en esta enfermedad.
8. Nuestro trabajo pone de manifiesto el posible papel como biomarcadores de LC3B y TRAF6 en el seguimiento de los pacientes con Colitis Ulcerosa.

# Bibliografía



1. Magro, F. *et al.* Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders. *J. Crohns Colitis* 11, 649–670 (2017).
2. Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P. B., Peyrin-Biroulet, L. & Colombel, J.-F. Ulcerative colitis. *Lancet Lond. Engl.* 389, 1756–1770 (2017).
3. Kirsner, J. B. Historical origins of current IBD concepts. *World J. Gastroenterol.* 7, 175 (2001).
4. Silverberg, M. S. *et al.* Toward an Integrated Clinical, Molecular and Serological Classification of Inflammatory Bowel Disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can. J. Gastroenterol.* 19, 5A-36A (2005).
5. Molodecky, N. A. *et al.* Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 142, 46-54.e42; quiz e30 (2012).
6. Ng, S. C. *et al.* Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet Lond. Engl.* 390, 2769–2778 (2017).
7. Shivashankar, R., Tremaine, W. J., Harmsen, W. S. & Loftus, E. V. Incidence and Prevalence of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in Olmsted County, Minnesota From 1970 Through 2010. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 15, 857–863 (2017).
8. GBD 2017 Inflammatory Bowel Disease Collaborators. 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. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 5, 17–30 (2020).
9. Burisch, J. & Munkholm, P. Inflammatory bowel disease epidemiology. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 29, 357–362 (2013).
10. Khalili, H. *et al.* Geographical variation and incidence of inflammatory bowel disease among US women. *Gut* 61, 1686–1692 (2012).
11. Puig, L. *et al.* [Prevalence of ten Immune-mediated inflammatory diseases (IMID) in Spain]. *Rev. Esp. Salud Publica* 93, e201903013 (2019).
12. Chaparro, M. *et al.* Incidence, Clinical Characteristics and Management of Inflammatory Bowel Disease in Spain: Large-Scale Epidemiological Study. *J. Clin. Med.* 10, 2885 (2021).
13. Gyde, S. *et al.* Mortality in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 83, 36–43 (1982).
14. Manninen, P. *et al.* Mortality in ulcerative colitis and Crohn's disease. A population-based study in Finland. *J. Crohns Colitis* 6, 524–528 (2012).
15. Jess, T., Gomborg, M., Munkholm, P. & Sørensen, T. I. A. Overall and cause-specific mortality in ulcerative colitis: meta-analysis of population-based inception cohort studies. *Am. J. Gastroenterol.* 102, 609–617 (2007).
16. Selinger, C. P. *et al.* Cause-specific mortality and 30-year relative survival of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 1880–1888 (2013).
17. Jess, T., Frisch, M. & Simonsen, J. Trends in overall and cause-specific mortality among patients with inflammatory bowel disease from 1982 to 2010. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 11, 43–48 (2013).
18. Loftus, C. G. *et al.* Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 254–261 (2007).
19. Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P. & Cortot, A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140, 1785–1794 (2011).
20. Barreiro-de Acosta, M. *et al.* Ulcerative colitis in northern Portugal and Galicia in Spain. *Inflamm. Bowel Dis.* 16, 1227–1238 (2010).
21. Betteridge, J. D., Armbruster, S. P., Maydonovitch, C. & Veerappan, G. R. Inflammatory bowel disease prevalence by age, gender, race, and geographic location in the U.S. military health care population. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 1421–1427 (2013).
22. Damas, O. M. *et al.* Inflammatory bowel disease is presenting sooner after immigration in more recent US immigrants from Cuba. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 46, 303–309 (2017).
23. Benchimol, E. I. *et al.* Inflammatory bowel disease in immigrants to Canada and their children: a population-based cohort study. *Am. J. Gastroenterol.* 110, 553–563 (2015).
24. Agrawal, M. *et al.* Inflammatory bowel diseases among first-generation and second-generation immigrants in Denmark: a population-based cohort study. *Gut* 70, 1037–1043 (2021).
25. Chamberlin, W. M. & Naser, S. A. Integrating theories of the etiology of Crohn's disease. On the etiology of Crohn's disease: questioning the hypotheses. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 12, RA27-33 (2006).
26. Ananthakrishnan, A. N. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 205–217 (2015).
27. Wallace, K. L., Zheng, L.-B., Kanazawa, Y. & Shih, D. Q. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 20, 6–21 (2014).

28. Fiocchi, C. Inflammatory bowel disease pathogenesis: Where are we?: Inflammatory bowel disease pathogenesis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 30, 12–18 (2015).
29. Piovani, D. *et al.* Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology* 157, 647–659.e4 (2019).
30. Barreiro-de Acosta, M. *et al.* Emigration to western industrialized countries: A risk factor for developing inflammatory bowel disease. *J. Crohns Colitis* 5, 566–569 (2011).
31. Danese, S., Sans, M. & Fiocchi, C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun. Rev.* 3, 394–400 (2004).
32. Hold, G. L. *et al.* Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years? *World J. Gastroenterol.* 20, 1192–1210 (2014).
33. Wu, N. *et al.* Inflammatory bowel disease and the gut microbiota. *Proc. Nutr. Soc.* 80, 424–434 (2021).
34. Burisch, J. *et al.* Environmental factors in a population-based inception cohort of inflammatory bowel disease patients in Europe--an ECCO-EpiCom study. *J. Crohns Colitis* 8, 607–616 (2014).
35. Lewis, J. D. & Abreu, M. T. Diet as a Trigger or Therapy for Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 152, 398–414.e6 (2017).
36. Li, F., Liu, X., Wang, W. & Zhang, D. Consumption of vegetables and fruit and the risk of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 27, 623–630 (2015).
37. Vinolo, M. A. R., Rodrigues, H. G., Nachbar, R. T. & Curi, R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients* 3, 858–876 (2011).
38. Campmans-Kuijpers, M. J. E. & Dijkstra, G. Food and Food Groups in Inflammatory Bowel Disease (IBD): The Design of the Groningen Anti-Inflammatory Diet (GrAID). *Nutrients* 13, 1067 (2021).
39. Mouli, V. P. & Ananthakrishnan, A. N. Review article: vitamin D and inflammatory bowel diseases. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 39, 125–136 (2014).
40. Biedermann, L. *et al.* Smoking cessation alters intestinal microbiota: insights from quantitative investigations on human fecal samples using FISH. *Inflamm. Bowel Dis.* 20, 1496–1501 (2014).
41. Domènech, E. *et al.* Smoking status and response to thiopurines in steroid-dependent inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 971–975 (2011).
42. Höie, O. *et al.* Ulcerative colitis: patient characteristics may predict 10-yr disease recurrence in a European-wide population-based cohort. *Am. J. Gastroenterol.* 102, 1692–1701 (2007).
43. Parkes, G. C., Whelan, K. & Lindsay, J. O. Smoking in inflammatory bowel disease: impact on disease course and insights into the aetiology of its effect. *J. Crohns Colitis* 8, 717–725 (2014).
44. Blackwell, J. *et al.* The impact of smoking and smoking cessation on disease outcomes in ulcerative colitis: a nationwide population-based study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 50, 556–567 (2019).
45. Ungaro, R. *et al.* Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 109, 1728–1738 (2014).
46. Pasvol, T. J., Bloom, S., Segal, A. W., Rait, G. & Horsfall, L. Use of contraceptives and risk of inflammatory bowel disease: a nested case-control study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 55, 318–326 (2022).
47. Ortizo, R. *et al.* Exposure to oral contraceptives increases the risk for development of inflammatory bowel disease: a meta-analysis of case-controlled and cohort studies. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 29, 1064–1070 (2017).
48. Andersson, R. E., Olaison, G., Tysk, C. & Ekblom, A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* 344, 808–814 (2001).
49. Koutroubakis, I. E., Vlachonikolis, I. G. & Kouroumalis, E. A. Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review. *Inflamm. Bowel Dis.* 8, 277–286 (2002).
50. Sahami, S. *et al.* The Link between the Appendix and Ulcerative Colitis: Clinical Relevance and Potential Immunological Mechanisms. *Am. J. Gastroenterol.* 111, 163–169 (2016).
51. Klement, E., Cohen, R. V., Boxman, J., Joseph, A. & Reif, S. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1342–1352 (2004).
52. Xu, L. *et al.* Systematic review with meta-analysis: breastfeeding and the risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 46, 780–789 (2017).
53. Ananthakrishnan, A. N. *et al.* Association Between Depressive Symptoms and Incidence of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: Results From the Nurses' Health Study. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 57–62 (2013).
54. Heikkilä, K. *et al.* Job Strain and the Risk of Inflammatory Bowel Diseases: Individual-Participant Meta-Analysis of 95 000 Men and Women. *PLoS ONE* 9, e88711 (2014).
55. Marrie, R. A. *et al.* Rising incidence of psychiatric disorders before diagnosis of immune-mediated inflammatory disease. *Epidemiol. Psychiatr. Sci.* 28, 333–342 (2019).
56. Bilski, J. *et al.* Can exercise affect the course of inflammatory bowel disease? Experimental and clinical evidence. *Pharmacol. Rep. PR* 68, 827–836 (2016).
57. Jones, P. D. *et al.* Exercise decreases risk of future active disease in patients with inflammatory bowel

- disease in remission. *Inflamm. Bowel Dis.* 21, 1063–1071 (2015).
58. Sasaki, M. & Klapproth, J.-M. A. The role of bacteria in the pathogenesis of ulcerative colitis. *J. Signal Transduct.* 2012, 704953 (2012).
  59. Álvarez, J. *et al.* Microbiota intestinal y salud. *Gastroenterol. Hepatol.* 44, 519–535 (2021).
  60. Kaur, N., Chen, C.-C., Luther, J. & Kao, J. Y. Intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* 2, 211–216 (2011).
  61. Ordás, I., Eckmann, L., Talamini, M., Baumgart, D. C. & Sandborn, W. J. Ulcerative colitis. *Lancet Lond. Engl.* 380, 1606–1619 (2012).
  62. Shen, Z.-H. *et al.* Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World J. Gastroenterol.* 24, 5–14 (2018).
  63. Alam, M. T. *et al.* Microbial imbalance in inflammatory bowel disease patients at different taxonomic levels. *Gut Pathog.* 12, 1 (2020).
  64. Dominguez-Bello, M. G., Blaser, M. J., Ley, R. E. & Knight, R. Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. *Gastroenterology* 140, 1713–1719 (2011).
  65. Nomura, K. *et al.* Bacteroidetes Species Are Correlated with Disease Activity in Ulcerative Colitis. *J. Clin. Med.* 10, 1749 (2021).
  66. Zakerska-Banaszak, O. *et al.* Dysbiosis of gut microbiota in Polish patients with ulcerative colitis: a pilot study. *Sci. Rep.* 11, 2166 (2021).
  67. Machiels, K. *et al.* A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 63, 1275–1283 (2014).
  68. Varela, E. *et al.* Colonisation by *Faecalibacterium prausnitzii* and maintenance of clinical remission in patients with ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 38, 151–161 (2013).
  69. Lee, M. & Chang, E. B. Inflammatory Bowel Diseases (IBD) and the Microbiome—Searching the Crime Scene for Clues. *Gastroenterology* 160, 524–537 (2021).
  70. Zheng, J., Sun, Q., Zhang, J. & Ng, S. C. The role of gut microbiome in inflammatory bowel disease diagnosis and prognosis. *United Eur. Gastroenterol. J.* 10, 1091–1102 (2022).
  71. Kostic, A. D., Xavier, R. J. & Gevers, D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology* 146, 1489–1499 (2014).
  72. Matsushima, K. & Nagai, S. Unraveling the mystery of the hygiene hypothesis through *Helicobacter pylori* infection. *J. Clin. Invest.* 122, 801–804 (2012).
  73. Castiglione, F. *et al.* Risk factors for inflammatory bowel diseases according to the ‘hygiene hypothesis’: a case-control, multi-centre, prospective study in Southern Italy. *J. Crohns Colitis* 6, 324–329 (2012).
  74. Sood, A. *et al.* Low hygiene and exposure to infections may be associated with increased risk for ulcerative colitis in a North Indian population. *Ann. Gastroenterol.* 27, 219–223 (2014).
  75. IBDMDB Investigators *et al.* Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Nature* 569, 655–662 (2019).
  76. Laharie, D. *et al.* Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring. *Gastroenterology* 120, 816–819 (2001).
  77. Abraham, C. & Cho, J. H. Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 361, 2066–2078 (2009).
  78. Rivas, M. A. *et al.* Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. *Nat. Genet.* 43, 1066–1073 (2011).
  79. Graham, D. B. & Xavier, R. J. Pathway paradigms revealed from the genetics of inflammatory bowel disease. *Nature* 578, 527–539 (2020).
  80. De Lange, K. M. & Barrett, J. C. Understanding inflammatory bowel disease via immunogenetics. *J. Autoimmun.* 64, 91–100 (2015).
  81. Jarmakiewicz-Czaja, S., Zielińska, M., Sokal, A. & Filip, R. Genetic and Epigenetic Etiology of Inflammatory Bowel Disease: An Update. *Genes* 13, 2388 (2022).
  82. Kugathasan, S. *et al.* CARD15 gene mutations and risk for early surgery in pediatric-onset Crohn’s disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 2, 1003–1009 (2004).
  83. Martinon, F. & Tschopp, J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol.* 26, 447–454 (2005).
  84. Cuthbert, A. P. *et al.* The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122, 867–874 (2002).
  85. Ashton, J. J. *et al.* Prediction of Crohn’s Disease Structuring Phenotype Using a NOD2- derived Genomic Biomarker. *Inflamm. Bowel Dis.* 29, 511–521 (2023).
  86. Inohara, N. *et al.* Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn’s disease. *J. Biol. Chem.* 278, 5509–5512 (2003).
  87. Travassos, L. H. *et al.* Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma

- membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.* 11, 55–62 (2010).
88. Kaser, A. & Blumberg, R. S. Autophagy, microbial sensing, endoplasmic reticulum stress, and epithelial function in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 140, 1738–1747 (2011).
  89. Yin, H. *et al.* The Therapeutic and Pathogenic Role of Autophagy in Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* 9, 1512 (2018).
  90. Peng, L.-L. *et al.* IL-23R mutation is associated with ulcerative colitis: A systemic review and meta-analysis. *Oncotarget* 8, 4849–4863 (2017).
  91. Sun, R., Hedl, M. & Abraham, C. IL23 induces IL23R recycling and amplifies innate receptor-induced signalling and cytokines in human macrophages, and the IBD-protective IL23R R381Q variant modulates these outcomes. *Gut* 69, 264–273 (2020).
  92. Franke, A. *et al.* Genome-wide association study for ulcerative colitis identifies risk loci at 7q22 and 22q13 (IL17REL). *Nat. Genet.* 42, 292–294 (2010).
  93. Ho, G.-T. *et al.* Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 128, 288–296 (2005).
  94. Chu, H. *et al.* Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Science* 352, 1116–1120 (2016).
  95. Neumann, C., Scheffold, A. & Rutz, S. Functions and regulation of T cell-derived interleukin-10. *Semin. Immunol.* 44, 101344 (2019).
  96. Zhu, L. *et al.* IL-10 and IL-10 Receptor Mutations in Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol. Res.* 10, 65–69 (2017).
  97. Richard, A. C. *et al.* Reduced monocyte and macrophage TNFSF15/TL1A expression is associated with susceptibility to inflammatory bowel disease. *PLOS Genet.* 14, e1007458 (2018).
  98. Liu, T.-C. *et al.* LRRK2 but not ATG16L1 is associated with Paneth cell defect in Japanese Crohn's disease patients. *JCI Insight* 2, e91917 (2017).
  99. Qiao, D. *et al.* Regulation of Endoplasmic Reticulum Stress-Autophagy: A Potential Therapeutic Target for Ulcerative Colitis. *Front. Pharmacol.* 12, 697360 (2021).
  100. Samoilă, I., Dinescu, S. & Costache, M. Interplay between Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Inflammatory Bowel Diseases Development-A Focus on Ulcerative Colitis. *Cells* 9, 1647 (2020).
  101. Hiippala, K. *et al.* The Potential of Gut Commensals in Reinforcing Intestinal Barrier Function and Alleviating Inflammation. *Nutrients* 10, 988 (2018).
  102. Bach Knudsen, K. E. *et al.* Impact of Diet-Modulated Butyrate Production on Intestinal Barrier Function and Inflammation. *Nutrients* 10, 1499 (2018).
  103. Hering, N. A., Fromm, M. & Schulzke, J.-D. Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *J. Physiol.* 590, 1035–1044 (2012).
  104. Cario, E. & Podolsky, D. K. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect. Immun.* 68, 7010–7017 (2000).
  105. de Souza, H. S. P., Fiocchi, C. & Iliopoulos, D. The IBD interactome: an integrated view of aetiology, pathogenesis and therapy. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 739–749 (2017).
  106. Heller, F. *et al.* Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129, 550–564 (2005).
  107. Ramos, G. P. & Papadakis, K. A. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases. *Mayo Clin. Proc.* 94, 155–165 (2019).
  108. Raza, A., Yousaf, W., Giannella, R. & Shata, M. T. Th17 cells: interactions with predisposing factors in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 8, 161–168 (2012).
  109. Castro-Dopico, T. *et al.* Anti-commensal IgG Drives Intestinal Inflammation and Type 17 Immunity in Ulcerative Colitis. *Immunity* 50, 1099–1114.e10 (2019).
  110. Sands, B. E. *et al.* Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N. Engl. J. Med.* 381, 1201–1214 (2019).
  111. Lennard-Jones, J. E. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 170, 2–6; discussion 16–19 (1989).
  112. Maaser, C. *et al.* ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications. *J. Crohns Colitis* 13, 144–164K (2019).
  113. Vermeire, S., Van Assche, G. & Rutgeerts, P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut* 55, 426–431 (2006).
  114. Reese, G. E. *et al.* Diagnostic precision of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 101, 2410–2422 (2006).
  115. Chatu, S., Subramanian, V. & Pollok, R. C. G. Meta-analysis: diagnostic medical radiation exposure in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 35, 529–539 (2012).
  116. Ciáurriz-Munuce, A. *et al.* Ionizing radiation in patients with Crohn's disease. Estimation and

- associated factors. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 104, 452–457 (2012).
117. Muñoz, F. *et al.* Recomendaciones del Grupo Español de Trabajo en Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa (GETECCU) sobre el empleo de la ecografía abdominal en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterol. Hepatol.* 44, 158–174 (2021).
  118. Rutter, M. D. *et al.* Cancer surveillance in longstanding ulcerative colitis: endoscopic appearances help predict cancer risk. *Gut* 53, 1813–1816 (2004).
  119. Hommes, D. W. & van Deventer, S. J. H. Endoscopy in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 126, 1561–1573 (2004).
  120. Burri, E. & Beglinger, C. Faecal calprotectin -- a useful tool in the management of inflammatory bowel disease. *Swiss Med. Wkly.* 142, w13557 (2012).
  121. van Rheeën, P. F., Van de Vijver, E. & Fidler, V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ* 341, c3369 (2010).
  122. D’Haens, G. *et al.* Faecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 18, 2218–2224 (2012).
  123. Guardiola, J. *et al.* Faecal level of calprotectin identifies histologic inflammation in patients with ulcerative colitis in clinical and endoscopic remission. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 12, 1865–1870 (2014).
  124. Dignass, A. *et al.* Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. *J. Crohns Colitis* 6, 965–990 (2012).
  125. Satsangi, J., Silverberg, M. S., Vermeire, S. & Colombel, J.-F. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 55, 749–753 (2006).
  126. Truelove, S. C. & Witts, L. J. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br. Med. J.* 2, 1041–1048 (1955).
  127. D’Haens, G. *et al.* A Review of Activity Indices and Efficacy End Points for Clinical Trials of Medical Therapy in Adults With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 132, 763–786 (2007).
  128. Lichtiger, S. *et al.* Cyclosporine in severe ulcerative colitis refractory to steroid therapy. *N. Engl. J. Med.* 330, 1841–1845 (1994).
  129. Lewis, J. D. *et al.* Use of the noninvasive components of the Mayo score to assess clinical response in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 1660–1666 (2008).
  130. Viscido, A. *et al.* Systematic review and meta-analysis: the advantage of endoscopic Mayo score 0 over 1 in patients with ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol.* 22, 92 (2022).
  131. Kobayashi, T. *et al.* Ulcerative colitis. *Nat. Rev. Dis. Primer* 6, 74 (2020).
  132. Travis, S. P. L. *et al.* Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). *Gut* 61, 535–542 (2012).
  133. Moriichi, K., Fujiya, M. & Okumura, T. The endoscopic diagnosis of mucosal healing and deep remission in inflammatory bowel disease. *Dig. Endosc. Off. J. Jpn. Gastroenterol. Endosc. Soc.* 33, 1008–1023 (2021).
  134. Kim, K. O. Endoscopic activity in inflammatory bowel disease: clinical significance and application in practice. *Clin. Endosc.* 55, 480–488 (2022).
  135. Christensen, B. & Rubin, D. T. Understanding Endoscopic Disease Activity in IBD: How to Incorporate It into Practice. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 18, 5 (2016).
  136. Rubin, D. T., Ananthakrishnan, A. N., Siegel, C. A., Sauer, B. G. & Long, M. D. ACG Clinical Guideline: Ulcerative Colitis in Adults. *Am. J. Gastroenterol.* 114, 384–413 (2019).
  137. Aloj, M., Nuti, F., Stronati, L. & Cucchiara, S. Advances in the medical management of paediatric IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 99–108 (2014).
  138. Hooper, K. M., Barlow, P. G., Stevens, C. & Henderson, P. Inflammatory Bowel Disease Drugs: A Focus on Autophagy. *J. Crohns Colitis* 11, 118–127 (2017).
  139. Barberio, B. *et al.* Efficacy of Oral, Topical, or Combined Oral and Topical 5-Aminosalicylates, in Ulcerative Colitis: Systematic Review and Network Meta-analysis. *J. Crohns Colitis* 15, 1184–1196 (2021).
  140. Raine, T. *et al.* ECCO Guidelines on Therapeutics in Ulcerative Colitis: Medical Treatment. *J. Crohns Colitis* 16, 2–17 (2022).
  141. Laharie, D. *et al.* Long-term outcome of patients with steroid-refractory acute severe UC treated with ciclosporin or infliximab. *Gut* 67, 237–243 (2018).
  142. Komaki, Y., Komaki, F., Ido, A. & Sakuraba, A. Efficacy and Safety of Tacrolimus Therapy for Active Ulcerative Colitis; A Systematic Review and Meta-analysis. *J. Crohns Colitis* 10, 484–494 (2016).
  143. Bermejo, F. *et al.* Recomendaciones del Grupo Español de Trabajo en Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa (GETECCU) sobre el uso de tiopurinas en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterol. Hepatol.* 41, 205–221 (2018).
  144. Sabino, J., Verstockt, B., Vermeire, S. & Ferrante, M. New biologics and small molecules in inflammatory bowel disease: an update. *Ther. Adv. Gastroenterol.* 12, 1756284819853208 (2019).
  145. Sandborn, W. J. *et al.* Tofacitinib as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N. Engl.*

- J. Med.* 376, 1723–1736 (2017).
146. Randall, J. *et al.* Delayed surgery for acute severe colitis is associated with increased risk of postoperative complications. *Br. J. Surg.* 97, 404–409 (2010).
  147. Spinelli, A. *et al.* ECCO Guidelines on Therapeutics in Ulcerative Colitis: Surgical Treatment. *J. Crohns Colitis* 16, 179–189 (2022).
  148. Moum, B., Ekblom, A., Vatn, M. H. & Elgjo, K. Change in the extent of colonoscopic and histological involvement in ulcerative colitis over time. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 1564–1569 (1999).
  149. Lee, H.-S. *et al.* Long-term prognosis of ulcerative colitis and its temporal change between 1977 and 2013: a hospital-based cohort study from Korea. *J. Crohns Colitis* 9, 147–155 (2015).
  150. Dalal, R. L., Shen, B. & Schwartz, D. A. Management of Pouchitis and Other Common Complications of the Pouch. *Inflamm. Bowel Dis.* 24, 989–996 (2018).
  151. Laine, L. *et al.* SCENIC international consensus statement on surveillance and management of dysplasia in inflammatory bowel disease. *Gastrointest. Endosc.* 81, 489–501.e26 (2015).
  152. Levine, B. & Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27–42 (2008).
  153. Kaur, J. & Debnath, J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 461–472 (2015).
  154. Feng, Y., He, D., Yao, Z. & Klionsky, D. J. The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* 24, 24–41 (2014).
  155. Yang, Z. & Klionsky, D. J. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 335, 1–32 (2009).
  156. Gross, A. S. & Graef, M. Mechanisms of Autophagy in Metabolic Stress Response. *J. Mol. Biol.* 432, 28–52 (2020).
  157. Huang, J. & Klionsky, D. J. Autophagy and human disease. *Cell Cycle Georget. Tex* 6, 1837–1849 (2007).
  158. Pyo, J. O., Nah, J. & Jung, Y. K. Molecules and their functions in autophagy. *Exp. Mol. Med.* 44, 73–80 (2012).
  159. Bento, C. F. *et al.* Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annu. Rev. Biochem.* 85, 685–713 (2016).
  160. Mizushima, N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 132–139 (2010).
  161. Chan, E. Y. W., Longatti, A., McKnight, N. C. & Tooze, S. A. Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 29, 157–171 (2009).
  162. Jung, C. H. *et al.* ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell* 20, 1992–2003 (2009).
  163. Choi, A. M. K., Ryter, S. W. & Levine, B. Autophagy in human health and disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 651–662 (2013).
  164. Decuyper, J.-P., Parys, J. B. & Bultynck, G. Regulation of the autophagic bcl-2/beclin 1 interaction. *Cells* 1, 284–312 (2012).
  165. Vicencio, J. M. *et al.* The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1. *Cell Death Differ.* 16, 1006–1017 (2009).
  166. Mizushima, N. *et al.* Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J. Cell Sci.* 116, 1679–1688 (2003).
  167. Mizushima, N., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.* 27, 421–429 (2002).
  168. Glick, D., Barth, S. & Macleod, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* 221, 3–12 (2010).
  169. Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Komatsu, M., Ueno, T. & Kominami, E. Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *J. Biol. Chem.* 277, 13739–13744 (2002).
  170. Diao, J. *et al.* ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature* 520, 563–566 (2015).
  171. Raiborg, C. & Stenmark, H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458, 445–452 (2009).
  172. Lee, J.-A., Beigneux, A., Ahmad, S. T., Young, S. G. & Gao, F.-B. ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr. Biol. CB* 17, 1561–1567 (2007).
  173. Jahreiss, L., Menzies, F. M. & Rubinsztein, D. C. The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic Cph. Den.* 9, 574–587 (2008).
  174. Shaw, R. J. LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 196, 65–80 (2009).
  175. Santana-Codina, N., Mancias, J. D. & Kimmelman, A. C. The Role of Autophagy in Cancer. *Annu. Rev. Cancer Biol.* 1, 19–39 (2017).
  176. Shang, L. & Wang, X. AMPK and mTOR coordinate the regulation of Ulk1 and mammalian autophagy



- initiation. *Autophagy* 7, 924–926 (2011).
177. Tooze, S. A. & Yoshimori, T. The origin of the autophagosomal membrane. *Nat. Cell Biol.* 12, 831–835 (2010).
  178. Zaffagnini, G. & Martens, S. Mechanisms of Selective Autophagy. *J. Mol. Biol.* 428, 1714–1724 (2016).
  179. Kabeya, Y. *et al.* LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J. Cell Sci.* 117, 2805–2812 (2004).
  180. Pankiv, S. *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* 282, 24131–24145 (2007).
  181. Rogov, V., Dötsch, V., Johansen, T. & Kirkin, V. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol. Cell* 53, 167–178 (2014).
  182. Katsuragi, Y., Ichimura, Y. & Komatsu, M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS J.* 282, 4672–4678 (2015).
  183. Schreiber, S., Nikolaus, S. & Hampe, J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* 42, 477–484 (1998).
  184. Kim, S., Eun, H. & Jo, E.-K. Roles of Autophagy-Related Genes in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Cells* 8, 77 (2019).
  185. Komatsu, M. *et al.* The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat. Cell Biol.* 12, 213–223 (2010).
  186. Moscat, J. & Diaz-Meco, M. T. p62: a versatile multitasker takes on cancer. *Trends Biochem. Sci.* 37, 230–236 (2012).
  187. Khaminets, A., Behl, C. & Dikic, I. Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends Cell Biol.* 26, 6–16 (2016).
  188. Chaplin, D. D. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S3–23 (2010).
  189. Iida, T., Yokoyama, Y., Wagatsuma, K., Hirayama, D. & Nakase, H. Impact of Autophagy of Innate Immune Cells on Inflammatory Bowel Disease. *Cells* 8, 7 (2018).
  190. Schmid, D. & Münz, C. Localization and MHC class II presentation of antigens targeted for macroautophagy. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 445, 213–225 (2008).
  191. Grubbs, H. & Kahwaji, C. I. Physiology, Active Immunity. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2023).
  192. Lippai, M. & Löw, P. The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. *BioMed Res. Int.* 2014, 832704 (2014).
  193. Mimouna, S. *et al.* HIF1A regulates xenophagic degradation of adherent and invasive Escherichia coli (AIEC). *Autophagy* 10, 2333–2345 (2014).
  194. Paiva, N. M. *et al.* Ileal pouch of ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis patients exhibit modulation of autophagy markers. *Sci. Rep.* 8, 2619 (2018).
  195. Hu, X. *et al.* ATF4 Deficiency Promotes Intestinal Inflammation in Mice by Reducing Uptake of Glutamine and Expression of Antimicrobial Peptides. *Gastroenterology* 156, 1098–1111 (2019).
  196. Bakke, D. & Sun, J. Ancient Nuclear Receptor VDR With New Functions: Microbiome and Inflammation. *Inflamm. Bowel Dis.* 24, 1149–1154 (2018).
  197. Zhou, M. *et al.* Boosting mTOR-dependent autophagy via upstream TLR4-MyD88-MAPK signalling and downstream NF-κB pathway quenches intestinal inflammation and oxidative stress injury. *EBioMedicine* 35, 345–360 (2018).
  198. Wu, M.-Y. *et al.* PI3KC3 complex subunit NRB2 is required for apoptotic cell clearance to restrict intestinal inflammation. *Autophagy* 17, 1096–1111 (2021).
  199. Zhang, S. *et al.* Aggravated ulcerative colitis caused by intestinal Metrn1 deficiency is associated with reduced autophagy in epithelial cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 41, 763–770 (2020).
  200. Macias-Ceja, D. C. *et al.* Stimulation of autophagy prevents intestinal mucosal inflammation and ameliorates murine colitis. *Br. J. Pharmacol.* 174, 2501–2511 (2017).
  201. Salminen, A., Hyttinen, J. M. T., Kauppinen, A. & Kaarniranta, K. Context-Dependent Regulation of Autophagy by IKK-NF-κB Signaling: Impact on the Aging Process. *Int. J. Cell Biol.* 2012, 849541 (2012).
  202. Kuenzig, M. E. *et al.* Budesonide for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2014, CD002913 (2014).
  203. Swerdlow, S. *et al.* Apoptosis inhibition by Bcl-2 gives way to autophagy in glucocorticoid-treated lymphocytes. *Autophagy* 4, 612–620 (2008).
  204. Guijarro, L. G., Román, I. D., Fernández-Moreno, M. D., Gisbert, J. P. & Hernández-Breijo, B. Is the autophagy induced by thiopurines beneficial or deleterious? *Curr. Drug Metab.* 13, 1267–1276 (2012).
  205. Oancea, I. *et al.* Colonic microbiota can promote rapid local improvement of murine colitis by thioguanine independently of T lymphocytes and host metabolism. *Gut* 66, 59–69 (2017).
  206. Hooper, K. M. *et al.* The Inflammatory Bowel Disease Drug Azathioprine Induces Autophagy via mTORC1 and the Unfolded Protein Response Sensor PERK. *Inflamm. Bowel Dis.* 25, 1481–1496 (2019).
  207. Ciechomska, I. A., Gabrusiewicz, K., Szczepankiewicz, A. A. & Kaminska, B. Endoplasmic reticulum

- stress triggers autophagy in malignant glioma cells undergoing cyclosporine a-induced cell death. *Oncogene* 32, 1518–1529 (2013).
208. Amiot, A. & Peyrin-Biroulet, L. Current, new and future biological agents on the horizon for the treatment of inflammatory bowel diseases. *Ther. Adv. Gastroenterol.* 8, 66–82 (2015).
209. Cha, H.-H. *et al.* Autophagy induced by tumor necrosis factor  $\alpha$  mediates intrinsic apoptosis in trophoblastic cells. *Reprod. Sci. Thousand Oaks Calif* 21, 612–622 (2014).
210. Bell, C. *et al.* Quantitative proteomics reveals the induction of mitophagy in tumor necrosis factor- $\alpha$ -activated (TNF $\alpha$ ) macrophages. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 12, 2394–2407 (2013).
211. Massey, D. C. O., Bredin, F. & Parkes, M. Use of sirolimus (rapamycin) to treat refractory Crohn's disease. *Gut* 57, 1294–1296 (2008).
212. Cheng, Y., Ren, X., Hait, W. N. & Yang, J.-M. Therapeutic targeting of autophagy in disease: biology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 65, 1162–1197 (2013).
213. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685 (1970).
214. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254 (1976).
215. Smith, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85 (1985).
216. Degasperi, A. *et al.* Evaluating strategies to normalise biological replicates of Western blot data. *PLoS One* 9, e87293 (2014).
217. Mohammed Vashist, N. *et al.* Endoscopic scoring indices for evaluation of disease activity in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 1, CD011450 (2018).
218. Li, J., Zhao, X., Li, X., Lu, M. & Zhang, H. Systematic Review with Meta-Analysis: Fecal Calprotectin as a Surrogate Marker for Predicting Relapse in Adults with Ulcerative Colitis. *Mediators Inflamm.* 2019, 2136501 (2019).
219. Kim, J. S. *et al.* Prognostic Significance of LC3B and p62/SQSTM1 Expression in Gastric Adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 39, 6711–6722 (2019).
220. Harbord, M. *et al.* The First European Evidence-based Consensus on Extra-intestinal Manifestations in Inflammatory Bowel Disease. *J. Crohns Colitis* 10, 239–254 (2016).
221. da Silva, B. C., Lyra, A. C., Rocha, R. & Santana, G. O. Epidemiology, demographic characteristics and prognostic predictors of ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.* 20, 9458–9467 (2014).
222. Magro, F. *et al.* Review of the disease course among adult ulcerative colitis population-based longitudinal cohorts. *Inflamm. Bowel Dis.* 18, 573–583 (2012).
223. Tsai, L. *et al.* Contemporary Risk of Surgery in Patients With Ulcerative Colitis and Crohn's Disease: A Meta-Analysis of Population-Based Cohorts. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 19, 2031-2045.e11 (2021).
224. Khan, N., Abbas, A., Williamson, A. & Balart, L. Prevalence of corticosteroids use and disease course after initial steroid exposure in ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* 58, 2963–2969 (2013).
225. Dai, N., Haidar, O., Askari, A. & Segal, J. P. Colectomy rates in ulcerative colitis: A systematic review and meta-analysis. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* 55, 13–20 (2023).
226. Roda, G. *et al.* Systematic review with meta-analysis: proximal disease extension in limited ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 45, 1481–1492 (2017).
227. Fumery, M. *et al.* Natural History of Adult Ulcerative Colitis in Population-based Cohorts: A Systematic Review. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 16, 343-356.e3 (2018).
228. Timmer, A., Patton, P. H., Chande, N., McDonald, J. W. D. & MacDonald, J. K. Azathioprine and 6-mercaptopurine for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2016, CD000478 (2016).
229. Burr, N. E., Gracie, D. J., Black, C. J. & Ford, A. C. Efficacy of biological therapies and small molecules in moderate to severe ulcerative colitis: systematic review and network meta-analysis. *Gut* gutjnl-2021-326390 (2021) doi:10.1136/gutjnl-2021-326390.
230. Larabi, A., Barnich, N. & Nguyen, H. T. T. New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD. *Autophagy* 16, 38–51 (2020).
231. Jin, M. & Zhang, Y. Autophagy and Inflammatory Diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1207, 391–400 (2020).
232. Komatsu, M. & Ichimura, Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Lett.* 584, 1374–1378 (2010).
233. Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy* 17, 1–382 (2021).
234. Moscat, J. & Diaz-Meco, M. T. Feedback on fat: p62-mTORC1-autophagy connections. *Cell* 147, 724–727 (2011).
235. Groulx, J.-F. *et al.* Autophagy is active in normal colon mucosa. *Autophagy* 8, 893–902 (2012).
236. Sahani, M. H., Itakura, E. & Mizushima, N. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is

restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy* 10, 431–441 (2014).

237. Niklaus, M. *et al.* Expression analysis of LC3B and p62 indicates intact activated autophagy is associated with an unfavorable prognosis in colon cancer. *Oncotarget* 8, 54604–54615 (2017).

238. Hennig, P., Fenini, G., Di Filippo, M., Karakaya, T. & Beer, H.-D. The Pathways Underlying the Multiple Roles of p62 in Inflammation and Cancer. *Biomedicines* 9, 707 (2021).

239. Peña-Martinez, C., Rickman, A. D. & Heckmann, B. L. Beyond autophagy: LC3-associated phagocytosis and endocytosis. *Sci. Adv.* 8, eabn1702 (2022).

240. Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T. & Kominami, E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* 1, 84–91 (2005).

241. Kumar, A. V. & Mills, J. Non-canonical autophagy in aging and age-related diseases. *Front. Cell Dev. Biol.* 11, 1137870 (2023).

242. Inoue, J., Gohda, J. & Akiyama, T. Characteristics and biological functions of TRAF6. *Adv. Exp. Med. Biol.* 597, 72–79 (2007).

243. Dhillon, B., Aleithan, F., Abdul-Sater, Z. & Abdul-Sater, A. A. The Evolving Role of TRAFs in Mediating Inflammatory Responses. *Front. Immunol.* 10, 104 (2019).

244. Shen, J., Qiao, Y., Ran, Z. & Wang, T. Different activation of TRAF4 and TRAF6 in inflammatory bowel disease. *Mediators Inflamm.* 2013, 647936 (2013).

245. Yang, X.-D. & Sun, S.-C. Targeting signaling factors for degradation, an emerging mechanism for TRAF functions. *Immunol. Rev.* 266, 56–71 (2015).

246. Vlantis, K. *et al.* TLR-independent anti-inflammatory function of intestinal epithelial TRAF6 signalling prevents DSS-induced colitis in mice. *Gut* 65, 935–943 (2016).

247. Linares, J. F. *et al.* K63 polyubiquitination and activation of mTOR by the p62-TRAF6 complex in nutrient-activated cells. *Mol. Cell* 51, 283–296 (2013).

248. Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274–293 (2012).

249. Foerster, E. G. *et al.* How autophagy controls the intestinal epithelial barrier. *Autophagy* 18, 86–103 (2022).

250. Jung, C. H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N. M. & Kim, D.-H. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* 584, 1287–1295 (2010).

251. He, R., Peng, J., Yuan, P., Xu, F. & Wei, W. Divergent roles of BECN1 in LC3 lipidation and autophagosomal function. *Autophagy* 11, 740–747 (2015).

252. Park, J. M., Huang, S., Wu, T.-T., Foster, N. R. & Sinicrope, F. A. Prognostic impact of Beclin 1, p62/sequestosome 1 and LC3 protein expression in colon carcinomas from patients receiving 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy. *Cancer Biol. Ther.* 14, 100–107 (2013).

253. Zhu, X. *et al.* Cytosolic HMGB1 controls the cellular autophagy/apoptosis checkpoint during inflammation. *J. Clin. Invest.* 125, 1098–1110 (2015).

254. Tokuhira, N. *et al.* PI3K/AKT/PTEN pathway as a target for Crohn's disease therapy (Review). *Int. J. Mol. Med.* 35, 10–16 (2015).

255. Nakamura, K., Kimple, A. J., Siderovski, D. P. & Johnson, G. L. PB1 domain interaction of p62/sequestosome 1 and MEK3 regulates NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* 285, 2077–2089 (2010).

256. Paul, P. K. *et al.* The E3 ubiquitin ligase TRAF6 intercedes in starvation-induced skeletal muscle atrophy through multiple mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 32, 1248–1259 (2012).

257. Duran, A. *et al.* p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Mol. Cell* 44, 134–146 (2011).

258. Wild, P., McEwan, D. G. & Dikic, I. The LC3 interactome at a glance. *J. Cell Sci.* jcs.140426 (2014) doi:10.1242/jcs.140426.

259. Conciatori, F. *et al.* Fibroblast-Induced Paradoxical PI3K Pathway Activation in PTEN-Competent Colorectal Cancer: Implications for Therapeutic PI3K/mTOR Inhibition. *Front. Oncol.* 12, 862806 (2022).

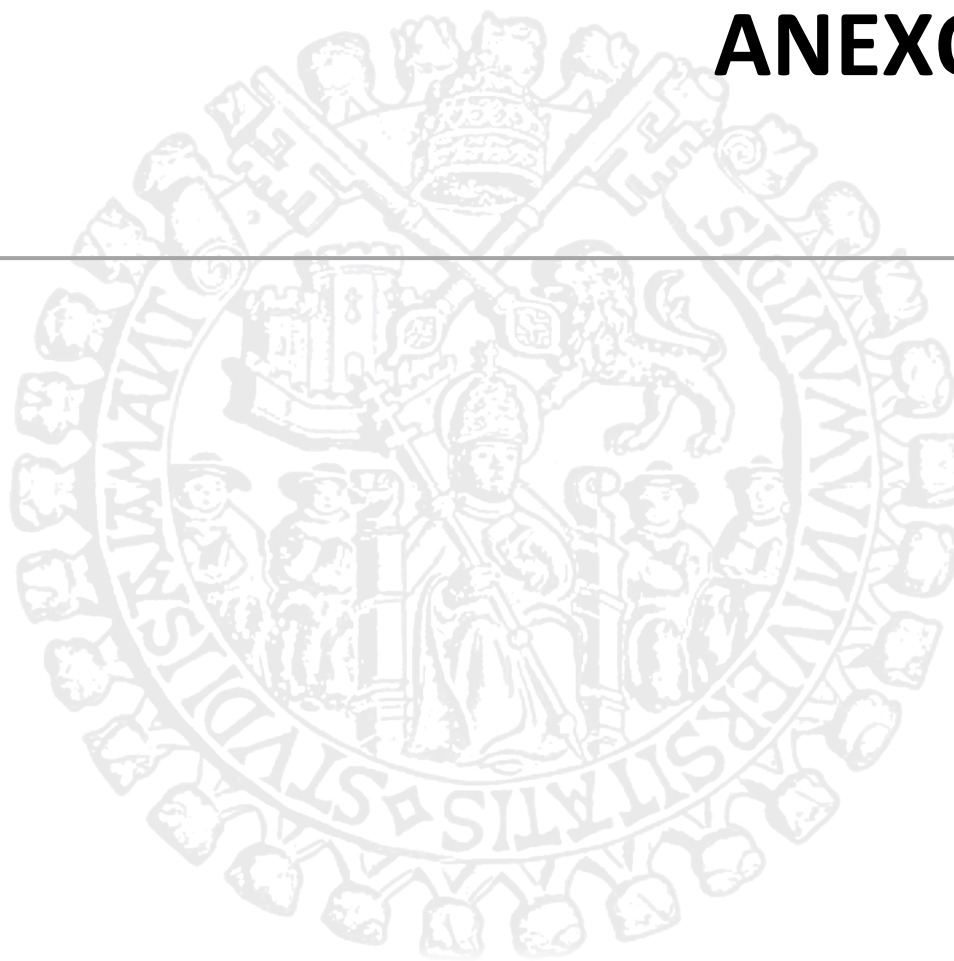
260. Hornyak, T. Profile: Yoshinori Ohsumi: The rise and rise of a biology superstar. *Nature* 543, S19–S19 (2017).

261. Shi, J.-T. *et al.* Diagnostic Accuracy of Fecal Calprotectin for Predicting Relapse in Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. *J. Clin. Med.* 12, 1206 (2023).

262. Spirina, L. V. *et al.* LC3B, mTOR, AMPK Are Molecular Targets for Neoadjuvant Chemotherapy in Gastric Cancers. *Curr. Issues Mol. Biol.* 44, 2772–2782 (2022).

263. Hu, D. *et al.* Clinical application of autophagy proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: a meta-analysis. *Future Oncol. Lond. Engl.* 18, 3537–3549 (2022).

# ANEXOS



**ANEXO:** Hoja de Consentimiento informado para el paciente.

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**NOMBRE Y APELLIDOS.....**

**DNI.....Nº HISTORIA.....**

**MÉDICO QUE INFORMA.....**

**Ha recibido información verbal y escrita sobre el proyecto de investigación "ALTERACIÓN DE LOS MECANISMOS DE AUTOFAGIA EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL".**

**De acuerdo con esta información he entendido que:**

- 1. Se me va a extraer una muestra durante la colonoscopia que tuviera programada, que consiste en una biopsia con pinza de la mucosa de colon, cuyo remanente se va a emplear para realizar un estudio de proteínas.**
- 2. El objeto de dicho estudio es analizar proteínas que estén implicadas en la Colitis Ulcerosa, que puedan tener relación con un peor curso de la enfermedad y con la respuesta a las diferentes opciones de tratamiento.**
- 3. Debido a la complejidad del análisis, los estudios pueden demorarse más de un año.**
- 4. Se me informará de los resultados del estudio a mí y/o a las personas por mí autorizadas.**
- 5. Se guardará la confidencialidad de los resultados del estudio, pudiéndose utilizar los datos para estudios epidemiológicos.**
- 6. Si es mi decisión, puedo ejercer el derecho de anular el consentimiento y/o decidir no saber el resultado, así como solicitar que se destruyan las muestras extraídas.**

**Leído el documento consiento que se me extraiga dicha muestra y se emplee su remanente para realizar el estudio titulado "ALTERACIÓN DE LOS MECANISMOS DE AUTOFAGIA EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL".**

**En Salamanca, a..... de..... de**

**Firma del paciente**

**Firma del médico**

**ANEXO:** Análisis de la expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia en muestras tisulares de mucosa de colon.

**Tablas de valores descriptivos (media y mediana) de extensión y P62**

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
PROCTITIS	8	0,044515	0,014562	0,03234	0,05669
C.IZQUIERDO	17	0,033649	0,019385	0,02368	0,04362
PANCU	22	0,051073	0,019462	0,04244	0,05970
CONTROL	10	0,059743	0,021479	0,04438	0,07511
Nivel	Mediana	RI			
PROCTITIS	0,049199	0,018555			
C.IZQUIERDO	0,028624	0,028239			
PANCU	0,055612	0,043279			
CONTROL	0,061941	0,032141			

**Tablas de valores descriptivos (media ± error estándar) de gravedad y P62**

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%		
SILENTE	13	0,049429	0,022511	0,03583	0,06303		
LEVE	16	0,036335	0,017182	0,02718	0,04549		
MODERADA-ALTA	18	0,045990	0,019511	0,03629	0,05569		
CONTROL	10	0,059743	0,021479	0,04438	0,07511		
Nivel	- Nivel	Diferencia	Error estándar de la diferencia	Límite de control inferior	Límite de control superior	Valor p	
CONTROL	LEVE	0,0234081	0,0080496	0,002058	0,0447587	0,0264*	
CONTROL	MODERADA-ALTA	0,0137529	0,0078757	-0,007136	0,0346423	0,3106	
SILENTE	LEVE	0,0130938	0,0074561	-0,006683	0,0328703	0,3057	
CONTROL	SILENTE	0,0103143	0,0083992	-0,011964	0,0325923	0,6121	
MODERADA-ALTA	LEVE	0,0096552	0,0068610	-0,008543	0,0278533	0,5005	
SILENTE	MODERADA-ALTA	0,0034386	0,0072681	-0,015839	0,0227163	0,9647	

**Tablas de valores descriptivos (media y mediana) de extensión y LC3B**

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
PROCTITIS	8	1,47287	0,630799	0,94551	2,0002
C.IZQUIERDO	17	1,24405	0,727758	0,86988	1,6182
PANCU	23	1,00320	0,554035	0,76362	1,2428
CONTROL	10	0,40289	0,184600	0,27083	0,5349
Nivel	Mediana	RI			
PROCTITIS	1,299243	1,10113			
C.IZQUIERDO	0,99787	0,794821			
PANCU	0,957619	0,789466			
CONTROL	0,387249	0,311041			
Nivel	- Nivel	Z	Valor p	Diferencias de medianas	
PANCU	C.IZQUIERDO	-0,84571	1	-0,040251	
C.IZQUIERDO	PROCTITIS	-0,92571	1	-0,301373	
PANCU	PROCTITIS	-1,63444	0,613	-0,341624	
CONTROL	PANCU	-3,17604	0,0090*	-0,57037	
CONTROL	C.IZQUIERDO	-3,70391	0,0013*	-0,610621	
CONTROL	PROCTITIS	-3,95598	0,0005*	-0,911994	

Tablas de valores descriptivos (media y mediana) de gravedad y LC3B

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
SILENTE	14	0,62833	0,303733	0,4530	0,8037
LEVE	16	1,27056	0,531091	0,9876	1,5536
MODERADA-ALTA	18	1,49332	0,681615	1,1544	1,8323
CONTROL	10	0,40289	0,184600	0,2708	0,5349
Mediana	RI				
0,663073	0,520382				
1,136361	0,608472				
1,223671	1,050466				
0,387249	0,311041				

Tabla con análisis de contrastes por parejas de gravedad en LC3B.

Nivel	- Nivel	Z	Valor p	Diferencia de medianas
MODERADA-ALTA	SILENTE	3,88284	0,0006*	0,560598
LEVE	SILENTE	3,27460	0,0063*	0,473288
MODERADA-ALTA	LEVE	0,52842	1,0000	0,08731
CONTROL	SILENTE	-1,18507	1,0000	-0,275824
CONTROL	LEVE	-4,20051	0,0002*	-0,749112
CONTROL	MODERADA-ALTA	-4,76297	<,0001*	-0,836422

Tablas de valores descriptivos (media ± error estándar) de gravedad y TRAF6

Nivel	Número	Media	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
PROCTITIS	8	0,337270	0,03146	0,64308
C.IZQUIERDO	17	0,359713	0,21501	0,50442
PANCU	23	0,254043	0,16064	0,34745
CONTROL	10	0,048111	0,03262	0,06361

Nivel	Mediana	RI
PROCTITIS	0,202557	0,638015
C.IZQUIERDO	0,299245	0,504895
PANCU	0,171803	0,292043
CONTROL	0,041666	0,042994

Nivel	- Nivel	Z	Valor p	Diferencia de medianas
C.IZQUIERDO	PROCTITIS	0,66471	1,0000	0,096688
PANCU	PROCTITIS	-0,05920	1,0000	-0,030754
PANCU	C.IZQUIERDO	-0,99015	1,0000	-0,127442
CONTROL	PANCU	-3,41739	0,0038*	-0,160891
CONTROL	PROCTITIS	-2,78561	0,0321*	-0,257579
CONTROL	C.IZQUIERDO	-4,04924	0,0003*	-0,130137

Tablas de valores descriptivos (media ± error estándar) de gravedad y TRAF6

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
SILENTE	14	0,103629	0,067661	0,06456	0,14270
LEVE	16	0,428196	0,282310	0,27776	0,57863
MODERADA-ALTA	18	0,353018	0,270330	0,21859	0,48745
CONTROL	10	0,048111	0,021660	0,03262	0,06361

Mediana	RI
0,08377	0,10719
0,344652	0,43854
0,273443	0,545425
0,041666	0,042994

Nivel	- Nivel	Z	Valor p	Diferencias entre medianas
LEVE	SILENTE	3,64958	0,0016*	0,260882
MODERADA-ALTA	SILENTE	2,78094	0,0325*	0,189673
MODERADA-ALTA	LEVE	-0,99343	1,0000	-0,071209
CONTROL	SILENTE	-1,43028	0,9158	-0,042104
CONTROL	MODERADA-ALTA	-4,02482	0,0003*	-0,231777
CONTROL	LEVE	-4,79278	<,0001*	-0,302986

#### Tablas de valores descriptivos (media y mediana) de extensión y mTOR

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
PROCTITIS	7	0,056506	0,050298	0,00999	0,10302
C.IZQUIERDO	15	0,053021	0,043192	0,02910	0,07694
PANCU	23	0,076567	0,054778	0,05288	0,10025
CONTROL	10	0,207188	0,131212	0,11333	0,30105

Mediana	RI
0,034106	0,107445
0,045241	0,066891
0,083334	0,094921
0,180239	0,204895

#### Tablas de valores descriptivos (media ± error estándar) de gravedad y mTOR

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
SILENTE	13	0,065664	0,060686	0,02899	0,10234
LEVE	15	0,086468	0,040016	0,06431	0,10863
MODERADA-ALTA	17	0,047131	0,046156	0,02340	0,07086
CONTROL	10	0,207188	0,131212	0,11333	0,30105

Mediana	RI
0,045241	0,10076
0,09878	0,054405
0,031138	0,061912
0,180239	0,204895

Nivel	- Nivel	Z	Valor p	Diferencia de medianas
CONTROL	MODERADA-ALTA	3,82226	0,0008*	0,134998
CONTROL	SILENTE	3,00018	0,0162*	0,081459
CONTROL	LEVE	1,91428	0,3335	0,149101
LEVE	SILENTE	1,25690	1,0000	0,053539
MODERADA-ALTA	SILENTE	-0,69626	1,0000	-0,014103
MODERADA-ALTA	LEVE	-2,08220	0,2239	-0,067642

#### Tablas de valores descriptivos (media y mediana) de extensión y Beclin1

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
PROCTITIS	5	0,521567	0,274382	0,18088	0,86226
C.IZQUIERDO	8	0,598778	0,202660	0,42935	0,76821
PANCU	14	0,450813	0,181777	0,34586	0,55577
CONTROL	8	0,359555	0,065711	0,30462	0,41449

Nivel	Mediana	RI
PROCTITIS	0,479167	0,54656
C.IZQUIERDO	0,587679	0,35415
PANCU	0,511563	0,283011
CONTROL	0,382243	0,125137



Tablas de valores descriptivos (media  $\pm$  error estándar) de gravedad y Beclin1

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
SILENTE	9	0,408584	0,161137	0,28472	0,53245
LEVE	9	0,504287	0,219940	0,33523	0,67335
MODERADA-ALTA	9	0,610400	0,209962	0,44901	0,77179
CONTROL	8	0,359555	0,065711	0,30462	0,41449
Mediana		RI			
	0,464628	0,299612			
	0,558499	0,412113			
	0,616858	0,386612			
	0,382243	0,125137			

Tablas de valores descriptivos (media y mediana) de extensión y PIK3CA

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
PROCTITIS	4	0,063718	0,045211	-0,0082	0,13566
C.IZQUIERDO	9	0,069358	0,036603	0,0412	0,09749
PANCU	4	0,069130	0,033184	0,0163	0,12193
CONTROL	8	0,061908	0,018517	0,0464	0,07739
Mediana		RI			
	0,043239	0,072313			
	0,047271	0,059944			
	0,06449	0,060598			
	0,059485	0,028772			

Tablas de valores descriptivos (media  $\pm$  error estándar) de gravedad y PIK3CA

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
SILENTE	3	0,089324	0,016368	0,04867	0,12998
LEVE	5	0,059254	0,039802	0,00983	0,10867
MODERADA-ALTA	9	0,065708	0,038051	0,03646	0,09496
CONTROL	8	0,061908	0,018517	0,04643	0,07739
Mediana		RI			
	0,087831	0,032633			
	0,04115	0,049285			
	0,046649	0,05942			
	0,059485	0,028772			

**ANEXO:** Correlación de la expresión de proteínas de la ruta de autofagia según extensión y gravedad.

Tabla con coeficientes de correlación (CC) entre proteínas en el grupo Proctitis

	p62	BECLIN1	TRAF6	LC3	mTOR	PIK3CA
p62	1,0000	-0,3654	-0,4999	-0,1797	0,6243	0,3106
BECLIN1	-0,3654	1,0000	0,6040	0,7734	-0,1378	-0,2589
TRAF6	-0,4999	0,6040	1,0000	0,4823	0,0619	-0,2180
LC3	-0,1797	0,7734	0,4823	1,0000	-0,0351	0,3188
mTOR	0,6243	-0,1378	0,0619	-0,0351	1,0000	0,4659
PIK3CA	0,3106	-0,2589	-0,2180	0,3188	0,4659	1,0000

Tabla con coeficientes de correlación (CC) entre proteínas en el grupo *Colitis Izquierda*

	p62	BECLIN1	TRAF6	LC3	mTOR	PIK3CA
p62	1,0000	0,1315	-0,3453	0,2499	0,2404	-0,5961
BECLIN1	0,1315	1,0000	0,2564	-0,0870	0,1237	-0,5201
TRAF6	-0,3453	0,2564	1,0000	0,0408	0,1429	0,5745
LC3	0,2499	-0,0870	0,0408	1,0000	-0,1383	0,2815
mTOR	0,2404	0,1237	0,1429	-0,1383	1,0000	-0,3105
PIK3CA	-0,5961	-0,5201	0,5745	0,2815	-0,3105	1,0000

Tabla con coeficientes de correlación (CC) entre proteínas en el grupo *Pancolitis*.

	p62	BECLIN1	TRAF6	LC3	mTOR	PIK3CA
p62	1,0000	-0,4088	-0,0677	0,0505	-0,0447	-0,3997
BECLIN1	-0,4088	1,0000	-0,1605	0,2912	0,4378	0,6875
TRAF6	-0,0677	-0,1605	1,0000	0,2919	-0,0539	-0,4704
LC3	0,0505	0,2912	0,2919	1,0000	0,1326	-0,4820
mTOR	-0,0447	0,4378	-0,0539	0,1326	1,0000	0,3532
PIK3CA	-0,3997	0,6875	-0,4704	-0,4820	0,3532	1,0000

Tabla con coeficientes de correlación (CC) entre proteínas en el grupo *Control*.

	p62	BECLIN1	TRAF6	LC3	mTOR	PIK3CA
p62	1,0000	-0,0792	-0,1475	-0,7472	-0,0668	0,2126
BECLIN1	-0,0792	1,0000	0,8341	-0,1125	-0,2953	0,7686
TRAF6	-0,1475	0,8341	1,0000	0,0463	-0,3348	0,7563
LC3	-0,7472	-0,1125	0,0463	1,0000	-0,0584	-0,2336
mTOR	-0,0668	-0,2953	-0,3348	-0,0584	1,0000	-0,2806
PIK3CA	0,2126	0,7686	0,7563	-0,2336	-0,2806	1,0000

Tabla con coeficientes de correlación (CC) entre proteínas en el grupo *en remisión*

	p62	BECLIN1	TRAF6	LC3	mTOR	PIK3CA
p62	1,0000	0,5754	0,0306	-0,0757	0,5245	0,5120
BECLIN1	0,5754	1,0000	0,4322	0,4778	0,7259	0,0704
TRAF6	0,0306	0,4322	1,0000	0,2812	0,3672	0,2610
LC3	-0,0757	0,4778	0,2812	1,0000	0,6108	0,1344
mTOR	0,5245	0,7259	0,3672	0,6108	1,0000	0,1281
PIK3CA	0,5120	0,0704	0,2610	0,1344	0,1281	1,0000

Tabla con coeficientes de correlación (CC) entre proteínas en el grupo *Leve*

	p62	BECLIN1	TRAF6	LC3	mTOR	PIK3CA
p62	1,0000	-0,1031	-0,4546	0,3080	-0,0204	-0,0973
BECLIN1	-0,1031	1,0000	0,3651	0,2963	0,5725	-0,4954
TRAF6	-0,4546	0,3651	1,0000	0,0526	0,6018	0,5404
LC3	0,3080	0,2963	0,0526	1,0000	-0,1433	0,1332
mTOR	-0,0204	0,5725	0,6018	-0,1433	1,0000	-0,0991
PIK3CA	-0,0973	-0,4954	0,5404	0,1332	-0,0991	1,0000

Tabla con coeficientes de correlación (CC) entre proteínas del grupo *Moderado-grave*.

	p62	BECLIN1	TRAF6	LC3	mTOR	PIK3CA
p62	1,0000	0,0729	-0,1854	0,2034	0,2726	-0,1036
BECLIN1	0,0729	1,0000	0,6498	-0,2377	-0,2815	-0,7913
TRAF6	-0,1854	0,6498	1,0000	-0,2960	-0,2393	-0,5747
LC3	0,2034	-0,2377	-0,2960	1,0000	-0,0568	0,2964
mTOR	0,2726	-0,2815	-0,2393	-0,0568	1,0000	0,7117
PIK3CA	-0,1036	-0,7913	-0,5747	0,2964	0,7117	1,0000

**ANEXO:** Correlación de la expresión de proteínas de la ruta de autofagia según actividad inflamatoria medida por UCDAI

Variable	por variable	$\rho$ de Spearman, $\rho$	Prob > $ \rho $ ,!Prob> $ \rho $
p62	UCDAI15	-0,2075	0,1214
BECLIN1	UCDAI15	0,4235	0,0112*
T6/actina	UCDAI15	0,6309	<,0001*
LC3	UCDAI15	0,6984	<,0001*
mTOR	UCDAI15	-0,4732	0,0003*
PIK3CA	UCDAI15	-0,1640	0,4335

**ANEXO:** Relación entre la evolución en cambios de actividad y la expresión de proteínas de autofagia.

LC3 y cambio de actividad. Se han detectado diferencias estadísticamente significativas (p-valor=0,002). Las diferencias se han detectado entre los siguientes grupos:

Level	- Level	Score Mean Difference	Std Err Dif	Z	p-Value
-1	0	16,9495	5,365629	3,15891	0,0095*
-1	>=1	2,3854	8,083853	0,29508	1,0000
-1	<=-2	-2,1187	6,807214	-0,31125	1,0000
>=1	<=-2	-4,5667	8,720212	-0,52369	1,0000
0	>=1	-14,3974	7,648132	-1,88248	0,3586
0	<=-2	-19,1308	6,283582	-3,04456	0,0140*

TRAF6 y cambio actividad. Se han detectado diferencias estadísticamente significativas (p-valor=0,01). Las diferencias se han detectado entre los siguientes grupos:

Level	- Level	Score Mean Difference	Std Err Dif	Z	p-Value
-1	>=1	13,2500	8,083729	1,63910	0,6072
-1	0	13,0769	5,365547	2,43720	0,0888
0	>=1	0,1346	7,648015	0,01760	1,0000
-1	<=-2	-4,1875	6,807109	-0,61517	1,0000
0	<=-2	-17,3269	6,283485	-2,75753	0,0349*
>=1	<=-2	-17,5000	8,720078	-2,00686	0,2686

**ANEXO:** Valores obtenidos de la cuantificación de la expresión de proteínas de la ruta de autofagia en muestras tisulares de pacientes con CU y controles sanos.

Tabla 29. Expresión cuantificada de la proteína p62

<i>Grupo</i>	<b>Nº caso</b>	<b>Expresión</b>	<b>Grupo</b>	<b>Nº caso</b>	<b>Expresión</b>
<i>Activa</i>	1	0,03037808	<i>Activa</i>	60	0,04716519
<i>Activa</i>	2	0,04653847	<i>Remisión</i>	5	0,05930048
<i>Activa</i>	4	0,03037808	<i>Remisión</i>	8	0,0286164
<i>Activa</i>	6	0,07437823	<i>Remisión</i>	11	0,03249573
<i>Activa</i>	7	0,05608541	<i>Remisión</i>	13	0,02687104
<i>Activa</i>	9	0,02006422	<i>Remisión</i>	15	0,02835086
<i>Activa</i>	18	0,01826012	<i>Remisión</i>	17	0,02678567
<i>Activa</i>	20	0,07249886	<i>Remisión</i>	19	0,03065334
<i>Activa</i>	22	0,03065334	<i>Remisión</i>	24	0,07182868
<i>Activa</i>	23	0,02250935	<i>Remisión</i>	31	0,07182868
<i>Activa</i>	25	0,07381265	<i>Remisión</i>	33	0,0250013
<i>Activa</i>	26	0,02284729	<i>Remisión</i>	43	0,07182868
<i>Activa</i>	32	0,02016579	<i>Remisión</i>	44	0,07182868
<i>Activa</i>	34	0,01570112	<i>Remisión</i>	46	0,05532926
<i>Activa</i>	36	0,01443861	<i>Remisión</i>	49	
<i>Activa</i>	38	0,02900629	<i>Remisión</i>	50	0,07182868
<i>Activa</i>	40	0,02862365	<i>Remisión</i>	55	0,04895904
<i>Activa</i>	42	0,07363947	<i>Remisión</i>	61	0,0099652
<i>Activa</i>	45	0,01996071	<i>Remisión</i>	68	0,05415063
<i>Activa</i>	47	0,05501844	<i>Control</i>	27	0,03037808
<i>Activa</i>	48	0,06251896	<i>Control</i>	28	0,03105828
<i>Activa</i>	51	0,04943819	<i>Control</i>	29	0,07585674
<i>Activa</i>	52	0,04943819	<i>Control</i>	30	0,04105828
<i>Activa</i>	53	0,05589417	<i>Control</i>	62	0,05998034
<i>Activa</i>	54	0,06152004	<i>Control</i>	63	0,06488569
<i>Activa</i>	56	0,04943819	<i>Control</i>	64	0,06897982
<i>Activa</i>	57	0,02835086	<i>Control</i>	65	0,10135233
<i>Activa</i>	58	0,05797945	<i>Control</i>	66	0,06361576
<i>Activa</i>	59	0,04943819	<i>Control</i>	67	0,06026663

Tabla 30. Expresión cuantificada de la proteína LC3B

<i>Grupo</i>	Nº caso	Expresión	<i>Grupo</i>	Nº caso	Expresión
<i>Activa</i>	1	1,07549072	<i>Activa</i>	60	2,69980944
<i>Activa</i>	2	1,52299519	<i>Remisión</i>	5	0,15522272
<i>Activa</i>	4	1,31228265	<i>Remisión</i>	8	0,34351588
<i>Activa</i>	6	0,97946097	<i>Remisión</i>	11	1,11445985
<i>Activa</i>	7	1,36620465	<i>Remisión</i>	13	0,95761907
<i>Activa</i>	9	2,13259146	<i>Remisión</i>	15	0,45587339
<i>Activa</i>	18	1,08113725	<i>Remisión</i>	17	0,83806884
<i>Activa</i>	20	1,4864399	<i>Remisión</i>	19	0,57673926
<i>Activa</i>	22	0,89372068	<i>Remisión</i>	24	0,82030499
<i>Activa</i>	23	0,87524441	<i>Remisión</i>	31	0,77883438
<i>Activa</i>	25	1,07179712	<i>Remisión</i>	33	0,62419265
<i>Activa</i>	26	2,14920111	<i>Remisión</i>	43	0,24798708
<i>Activa</i>	32	1,15826182	<i>Remisión</i>	44	0,47459782
<i>Activa</i>	34	1,04877079	<i>Remisión</i>	46	0,85048909
<i>Activa</i>	36	0,64735501	<i>Remisión</i>	49	0,24801874
<i>Activa</i>	38	0,73895348	<i>Remisión</i>	50	1,19546802
<i>Activa</i>	40	0,81145518	<i>Remisión</i>	55	0,70195277
<i>Activa</i>	42	1,31577787	<i>Remisión</i>	61	0,84588749
<i>Activa</i>	45	0,99787013	<i>Remisión</i>	68	0,94588749
<i>Activa</i>	47	1,44825612	<i>Control</i>	27	0,63010309
<i>Activa</i>	48	0,98984701	<i>Control</i>	28	0,63010309
<i>Activa</i>	51	2,12605899	<i>Control</i>	29	0,3125338
<i>Activa</i>	52	2,93937894	<i>Control</i>	30	0,41896573
<i>Activa</i>	53	1,95055803	<i>Control</i>	62	0,3254013
<i>Activa</i>	54	1,91277675	<i>Control</i>	63	0,5258241
<i>Activa</i>	56	1,96930286	<i>Control</i>	64	0,35553297
<i>Activa</i>	57	0,85256059	<i>Control</i>	65	0,14078669
<i>Activa</i>	58	1,82776747	<i>Control</i>	66	0,12547626
<i>Activa</i>	59	2,44902297	<i>Control</i>	67	0,56414932

Tabla 31. Expresión cuantificada de la proteína TRAF6

<i>Grupo</i>	Nº caso	Expresión	<i>Grupo</i>	Nº caso	Expresión
<i>Activa</i>	1	0,04664939	<i>Activa</i>	60	0,47270768
<i>Activa</i>	2	0,25860376	<i>Remisión</i>	5	0,06557957
<i>Activa</i>	4	0,17340635	<i>Remisión</i>	8	0,08862744
<i>Activa</i>	6	0,76012789	<i>Remisión</i>	11	0,41353331
<i>Activa</i>	7	0,13270682	<i>Remisión</i>	13	0,20877297
<i>Activa</i>	9	0,16487938	<i>Remisión</i>	15	0,39006019
<i>Activa</i>	18	0,23806886	<i>Remisión</i>	17	0,26305933
<i>Activa</i>	20	0,71974177	<i>Remisión</i>	19	0,03758903
<i>Activa</i>	22	0,85062439	<i>Remisión</i>	24	0,02399427
<i>Activa</i>	23	0,56497776	<i>Remisión</i>	31	0,09801709
<i>Activa</i>	25	0,05976757	<i>Remisión</i>	33	0,07891333
<i>Activa</i>	26	0,30964247	<i>Remisión</i>	43	0,15851753
<i>Activa</i>	32	0,90519158	<i>Remisión</i>	44	0,14778181
<i>Activa</i>	34	0,85489126	<i>Remisión</i>	46	0,10311095
<i>Activa</i>	36	0,68137795	<i>Remisión</i>	49	0,05486279
<i>Activa</i>	38	0,29924465	<i>Remisión</i>	50	0,17180344
<i>Activa</i>	40	0,32983943	<i>Remisión</i>	55	0,03083658
<i>Activa</i>	42	0,2055218	<i>Remisión</i>	61	0,0737549
<i>Activa</i>	45	0,67150806	<i>Remisión</i>	68	0,15747316
<i>Activa</i>	47	0,40695112	<i>Control</i>	27	0,02776722
<i>Activa</i>	48	0,14003021	<i>Control</i>	28	0,07094595
<i>Activa</i>	51	0,24764184	<i>Control</i>	29	0,07094595
<i>Activa</i>	52	0,21539533	<i>Control</i>	30	0,08776722
<i>Activa</i>	53	0,25968712	<i>Control</i>	62	0,03348024
<i>Activa</i>	54	0,13126783	<i>Control</i>	63	0,03680335
<i>Activa</i>	56	0,29924465	<i>Control</i>	64	0,05154754
<i>Activa</i>	57	0,67657048	<i>Control</i>	65	0,0465292
<i>Activa</i>	58	0,04291203	<i>Control</i>	66	0,02730788
<i>Activa</i>	59	0,97079433	<i>Control</i>	67	0,0280133

Tabla 32. Expresión cuantificada de la proteína mTOR

<i>Grupo</i>	Nº caso	Expresión	<i>Grupo</i>	Nº caso	Expresión
<i>Activa</i>	1	0,00863044	<i>Activa</i>	60	0,02970673
<i>Activa</i>	2	0,01322162	<i>Remisión</i>	5	0,01684732
<i>Activa</i>	4	0,04524089	<i>Remisión</i>	8	0,00812994
<i>Activa</i>	6	0,02113092	<i>Remisión</i>	11	0,10411363
<i>Activa</i>	7	0,01593391	<i>Remisión</i>	13	0,12056964
<i>Activa</i>	9	0,00570026	<i>Remisión</i>	15	0,12545524
<i>Activa</i>	18	0,00518772	<i>Remisión</i>	17	0,11454401
<i>Activa</i>	20	0,02059698	<i>Remisión</i>	19	0,00870864
<i>Activa</i>	22	0,00870864	<i>Remisión</i>	24	0,11253246
<i>Activa</i>	23	0,12556183	<i>Remisión</i>	31	0,11551781
<i>Activa</i>	25	0,14230793	<i>Remisión</i>	33	0,00710289
<i>Activa</i>	26	0,04524089	<i>Remisión</i>	43	0,04524089
<i>Activa</i>	32	0,09877967	<i>Remisión</i>	44	0,04524089
<i>Activa</i>	34		<i>Remisión</i>	46	0,06794781
<i>Activa</i>	36	0,00410202	<i>Remisión</i>	49	0,07371226
<i>Activa</i>	38	0,07559966	<i>Remisión</i>	50	0,21651553
<i>Activa</i>	40	0,06513239	<i>Remisión</i>	55	0,05543917
<i>Activa</i>	42	0,09559966	<i>Remisión</i>	61	
<i>Activa</i>	45	0,06626168	<i>Remisión</i>	68	0,03410647
<i>Activa</i>	47	0,10451291	<i>Control</i>	27	0,26936867
<i>Activa</i>	48	0,08333412	<i>Control</i>	28	0,11347518
<i>Activa</i>	51	0,03113837	<i>Control</i>	29	0,26771305
<i>Activa</i>	52	0,03113837	<i>Control</i>	30	0,15989101
<i>Activa</i>	53	0,12779577	<i>Control</i>	62	0,08178812
<i>Activa</i>	54	0,13234076	<i>Control</i>	63	0,05102116
<i>Activa</i>	56	0,03113837	<i>Control</i>	64	0,20058712
<i>Activa</i>	57	0,12545524	<i>Control</i>	65	0,10191812
<i>Activa</i>	58		<i>Control</i>	66	0,39901731
<i>Activa</i>	59	0,12066716	<i>Control</i>	67	0,42710276

Tabla 33. Expresión cuantificada de la proteína BECLIN1

<i>Grupo</i>	Nº caso	Expresión	<i>Grupo</i>	Nº caso	Expresión
<i>Activa</i>	1		<i>Activa</i>	60	0,81023973
<i>Activa</i>	2		<i>Remisión</i>	5	
<i>Activa</i>	4	0,35473717	<i>Remisión</i>	8	
<i>Activa</i>	6		<i>Remisión</i>	11	0,5584989
<i>Activa</i>	7	0,3632983	<i>Remisión</i>	13	
<i>Activa</i>	9		<i>Remisión</i>	15	
<i>Activa</i>	18	0,61685824	<i>Remisión</i>	17	0,46462779
<i>Activa</i>	20		<i>Remisión</i>	19	
<i>Activa</i>	22		<i>Remisión</i>	24	0,5584989
<i>Activa</i>	23	0,61685824	<i>Remisión</i>	31	0,5584989
<i>Activa</i>	25	0,51107186	<i>Remisión</i>	33	
<i>Activa</i>	26		<i>Remisión</i>	43	0,28620245
<i>Activa</i>	32	0,3733019	<i>Remisión</i>	44	0,5584989
<i>Activa</i>	34		<i>Remisión</i>	46	0,5584989
<i>Activa</i>	36		<i>Remisión</i>	49	0,17465872
<i>Activa</i>	38		<i>Remisión</i>	50	0,5584989
<i>Activa</i>	40	0,94866187	<i>Remisión</i>	55	0,24978518
<i>Activa</i>	42	0,24334369	<i>Remisión</i>	61	
<i>Activa</i>	45		<i>Remisión</i>	68	0,26798915
<i>Activa</i>	47	0,22245175	<i>Control</i>	27	
<i>Activa</i>	48	0,3419938	<i>Control</i>	28	0,41956882
<i>Activa</i>	51	0,80544747	<i>Control</i>	29	0,41956882
<i>Activa</i>	52		<i>Control</i>	30	
<i>Activa</i>	53	0,80544747	<i>Control</i>	62	0,39319975
<i>Activa</i>	54	0,47916667	<i>Control</i>	63	0,25721183
<i>Activa</i>	56		<i>Control</i>	64	0,41956882
<i>Activa</i>	57	0,61685824	<i>Control</i>	65	0,37128592
<i>Activa</i>	58		<i>Control</i>	66	0,29084642
<i>Activa</i>	59	0,80544747	<i>Control</i>	67	0,30518769



Tabla 34. Expresión cuantificada de la proteína PIK3CA

<i>Grupo</i>	Nº caso	Expresión	<i>Grupo</i>	Nº caso	Expresión
<i>Activa</i>	1	0,04664939	<i>Activa</i>	60	0,04727077
<i>Activa</i>	2		<i>Remisión</i>	5	
<i>Activa</i>	4	0,04664939	<i>Remisión</i>	8	
<i>Activa</i>	6		<i>Remisión</i>	11	
<i>Activa</i>	7	0,0411499	<i>Remisión</i>	13	
<i>Activa</i>	9	0,0411499	<i>Remisión</i>	15	
<i>Activa</i>	18	0,0411499	<i>Remisión</i>	17	0,08783083
<i>Activa</i>	20		<i>Remisión</i>	19	
<i>Activa</i>	22		<i>Remisión</i>	24	0,10638757
<i>Activa</i>	23	0,0411499	<i>Remisión</i>	31	
<i>Activa</i>	25		<i>Remisión</i>	33	
<i>Activa</i>	26	0,13019445	<i>Remisión</i>	43	
<i>Activa</i>	32	0,13019445	<i>Remisión</i>	44	
<i>Activa</i>	34	0,03712408	<i>Remisión</i>	46	
<i>Activa</i>	36		<i>Remisión</i>	49	
<i>Activa</i>	38		<i>Remisión</i>	50	
<i>Activa</i>	40		<i>Remisión</i>	55	
<i>Activa</i>	42		<i>Remisión</i>	61	0,0737549
<i>Activa</i>	45		<i>Remisión</i>	68	
<i>Activa</i>	47		<i>Control</i>	27	
<i>Activa</i>	48		<i>Control</i>	28	0,07094595
<i>Activa</i>	51	0,0398293	<i>Control</i>	29	0,07094595
<i>Activa</i>	52	0,07094595	<i>Control</i>	30	
<i>Activa</i>	53		<i>Control</i>	62	0,04439293
<i>Activa</i>	54	0,13126783	<i>Control</i>	63	0,0480235
<i>Activa</i>	56		<i>Control</i>	64	0,09425312
<i>Activa</i>	57		<i>Control</i>	65	0,07501336
<i>Activa</i>	58	0,04291203	<i>Control</i>	66	0,0470836
<i>Activa</i>	59		<i>Control</i>	67	0,04460483