

Tesis Doctoral

Título:

“Estudio del papel de los linfocitos T gamma-delta en la Enfermedad de Crohn”.



Doctorando:

Ignacio Catalán Serra

Directores del Proyecto:

Dr. Juan Carlos Andreu Ballester
Dr. Miguel Bixquert Jiménez

***Programa de Medicina. Departamento de Medicina.
Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia
2015***

Miguel Bixquert Jiménez, Profesor Titular del Departamento de Medicina y Jefe del Servicio de Digestivo

Juan Carlos Andreu Ballester, Doctor por la Universidad de Valencia y Jefe de la Unidad de Investigación del Hospital Arnau de Vilanova

CERTIFICAMOS

Que la tesis doctoral titulada: **“Estudio del papel de los linfocitos gamma-delta en la Enfermedad de Crohn”** ha sido realizada bajo nuestra dirección por **Ignacio Catalán Serra**, Licenciado/a en Medicina por la Universidad de Valencia, y reúne, a nuestro juicio, todos los requisitos para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor/a por la Universidad de Valencia.

En Valencia, a 20 de Octubre de 2015

Prof. Miguel Bixquert Jiménez

Dr. Juan Carlos Andreu Ballester

Agradecimientos

A mis padres, por su entrega y amor incondicional, por su amor a la cultura, por su ejemplo inspirador de bondad; por enseñarnos a distinguir lo importante de lo accesorio y que ningún conocimiento es útil si no sirve para hacernos más libres y mejores personas.

A mis hermanos por ser mis compañeros de vida y de juegos, y mis pilares e inspiración todos estos años. Por su amor y respeto.

A mi mujer Åshild por ser mi alegría de cada día. Siempre.

A mis abuelos y abuelas, por ser el origen de la bondad.

A mis amigos por enseñarme la humildad, la nobleza y apoyo incondicional.

A Juan Carlos Andreu por su inspiración y guía en la investigación y por despertar mi interés en la inmunología. A Miguel Bixquert por inculcarme su pasión por la gastroenterología, el respeto y amor a los pacientes y el disfrute de enseñar.

A todos mis profesores del colegio y años de formación, a todos los que plantaron con paciencia la semilla del interés por conocer, aprender y entender el mundo. A mis maestros de sabiduría, por su luz en momentos de confusión y por guiarme en el camino de la compasión y el amor, a disfrutar ligero, con mirada de niño.

A mis pacientes que me enseñan la fortaleza y la debilidad del ser humano, por su paciencia y confianza, por sus sonrisas, sus lágrimas y sus abrazos. Por su ejemplo de humildad y superación de las circunstancias adversas. Por darle sentido a lo que hacemos.

A mi perro Miles, compañero de largas noches de estudio y paseos en el bosque, por su mirada.

Gracias.

“ Es necesario albergar caos dentro de sí, para poder engendrar una estrella danzarina”

Friedrich Nietzsche

*“El cambio no se puede entender. La única manera de darle sentido es conectarse a él,
moverse con él... disfrutar del baile”*

Alan Watts

1.Introducción

1.1.Aspectos generales de la Enfermedad inflamatoria Intestinal

(EII).....15-16

1.2.La Enfermedad de Crohn16-28

- 1.2.1.Epidemiología de la Enfermedad de Crohn e impacto socioeconómico.....16-18
- 1.2.2.Diagnóstico y Clasificación de la EC.....18-20
- 1.2.3.Tratamiento de la EC.....20-21
- 1.2.4.Patogenia de la EC.....21-28

1.3.Los linfocitos T gamma-delta (LT $\gamma\delta$)29-50

- 1.3.1.Aspectos generales de los LT $\gamma\delta$29-30
- 1.3.2.Origen de los LT $\gamma\delta$31
- 1.3.3.Distribución anatómica.....32
- 1.3.4.Subtipos y clasificación fenotípica.....33
- 1.3.5.Reconocimiento antigénico: el TCR $\gamma\delta$33-34
- 1.3.6.Acciones específicas.....35-36
- 1.3.7.Papel de los LT $\gamma\delta$ en la defensa contra las infecciones36-38
- 1.3.8.Papel de defensa antineoplásica de los LT $\gamma\delta$ 38-39
- 1.3.9.Papel de los LT $\gamma\delta$ en las enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias.....39-40
- 1.3.10.Posibilidades terapéuticas de los LT $\gamma\delta$40-42
 - 1.3.10.a.LT $\gamma\delta$ en la terapia antitumoral.....40-42
 - 1.3.10.b.LT $\gamma\delta$ en la terapia anti-infecciosa.....42
- 1.3.11.Los LT $\gamma\delta$ en la patogenia de la EC.....44-50
 - 1.3.11.a.Estudios que atribuyen a los LT $\gamma\delta$ un papel protector de la inflamación intestinal.....44-47
 - 1.3.11.b.Estudios que atribuyen a los LT $\gamma\delta$ un papel activador de la inflamación intestinal47-48
 - 1.3.11.c.Niveles séricos linfocitarios y de LT $\gamma\delta$ en Enfermedad de Crohn.....49-50

1.4.La IL-7.....	51-63
1.4.1.Aspectos generales de la IL-7.....	51-52
1.4.2.Acciones de la IL-7.....	52-55
1.4.3.Prosibilidades terapéuticas de la IL-7	55-58
1.4.4.Papel en la patogenia de la Ell.....	58-62
1.4.5.Niveles séricos de IL-7.....	62-63

2.Justificación del estudio

2.1.Justificación del estudio.....	64-67
---	--------------

3.Hipótesis y objetivos

3.1.Hipótesis.....	70
3.2. Objetivos.....	70

4.Material y Métodos

4.1.Tipo de estudio	73
4.2.Población a estudio.....	73-77
4.2.1.Pacientes.....	73-77
4.2.2.Controles.....	77
4.3. Variables a estudio.....	77-78
4.4. Métodos de análisis de las muestras.....	78-79
4.5 Análisis estadístico	79
4.6. Aspectos ético-legales	80

5.Resultados

5.1.Demográficos.....	83
5.2.Características de los pacientes.....	83-89

5.2.1.Escenarios clínicos.....	83-85
5.2.2.Tiempo de evolución.....	85
5.2.3.Manifestaciones extraintestinales.....	85
5.2.4.Cirugía previa.....	86
5.2.5. Hábito tabáquico.....	86
5.2.6.Actividad de la enfermedad.....	86-87
5.2.7.Datos endoscópicos.....	87-88
5.2.8.Datos histológicos.....	88
5.2.9.Tratamiento farmacológico.....	89

5.3.Determinaciones analíticas: análisis de las subpoblaciones

linfocitarias.....90-117

5.3.1.Hemograma.....	90-91
5.3.2.Comparación de subpoblaciones linfocitarias entre casos y controles.....	91-93
5.3.3.Comparación de subpoblaciones linfocitarias entre grupos de actividad.....	93-99
5.3.4.Comparación de subpoblaciones linfocitarias con respecto a la clasificación de Montreal.	90-107
5.3.5.Comparación de subpoblaciones linfocitarias con respecto a los índices de actividad clínica.....	107-110
5.3.6.Comparación de subpoblaciones linfocitarias con respecto a la actividad endoscópica.....	110
5.3.7.Comparación de subpoblaciones linfocitarias con respecto a la presencia de granulomas.....	110-111
5.3.8.Comparación de subpoblaciones linfocitarias con respecto al hábito tabáquico.....	111
5.3.9.Comparación de subpoblaciones linfocitarias con respecto a la presencia de enfermedad perianal y manifestaciones gastrointestinales	111-112
5.3.10. Influencia de los distintos tipos de tratamiento en las distintas subpoblaciones linfocitarias y en el hemograma.....	113-117

5.4. Análisis de la IL-7.....118-122

5.4.1. Valores séricos medios de IL-7 en casos y controles.....	118
5.4.2. Valores séricos medios de IL-7 en los grupos de actividad.....	118-119

5.4.3. Valores séricos medios de IL-7 respecto a la clasificación de Montreal.....	119-120
5.4.5. Valores séricos medios de IL-7 respecto a la actividad clínica.....	120
5.4.6. Valores séricos medios de IL-7 respecto a la actividad endoscópica.....	120
5.4.7. Valores séricos medios de IL-7 respecto al hábito tabáquico y la presencia de enfermedad perianal, manifestaciones extraintestinales y granulomas.....	120-121
5.4.8. Valores séricos medios de IL-7 respecto al tratamiento empleado.....	121-122
5.4.9. Correlación entre los niveles de IL-7 y las poblaciones leucocitarias.....	122
5.4.10. Correlación entre los niveles de IL-7 y las subpoblaciones linfocitarias.....	122

6. Discusión

6.1. Discusión.....	125-165
---------------------	---------

7. Conclusiones

7.1. Conclusiones.....	166-167
------------------------	---------

8. Bibliografía

8.1. Bibliografía.....	168-201
------------------------	---------

9. Anexos

Anexo 1. Hoja de recogida de datos del estudio.....	203-206
Anexo 2. Hoja de consentimiento informado.....	207
Anexo 3. Estudio previo de valores de LT γ δ en la EC.....	208-217
Anexo 4. Estudio previo de niveles de IL-7 en la EC.....	218-219

Lista de abreviaturas y siglas

- **AZA:** azatioprina
- **CPA:** Célula Presentadora de Antígeno.
- **CU:** Colitis ulcerosa
- **EC:** Enfermedad de Crohn
- **EII:** Enfermedad Inflamatoria Intestinal
- **HSP:** Proteínas del Shock Térmico.
- **IFN- γ :** Interferón gamma
- **Ig:** Inmunoglobulina.
- **IL:** Interleuquina
- **IP:** Inmunodeficiencia primaria
- **IPP:** Isopentenil pirofosfato.
- **LB:** Linfocito B.
- **LIEs:** Linfocitos Intraepiteliales.
- **LT:** Linfocito T
- **LT $\alpha\beta$:** Linfocito T alfabeta.
- **LT $\gamma\delta$:** Linfocito T gammadelta..
- **MHC** (Major Histocompatibility Complex): Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
- **SP:** sangre periférica
- **TCR:** Receptor de Células T.
- **Th:** T helper (LT colaboradores).
- **TNF- α :** Factor de Necrosis Tumoral alfa.
- **Treg:** Linfocito T regulador

Índice de Tablas y Figuras

Tablas

Tabla 1. Funciones específicas de los $LT\gamma\delta$	35
Tabla 2. Principales efectos inmunomoduladores antiinflamatorios de los $LT\gamma\delta$ en estudios preclínicos	45
Tabla 3. Posibilidades terapéuticas de la activación o inhibición de la IL-7.....	58
Tabla 4. Clasificación de los tratamientos empleados.....	76
Tabla 5. Resumen de las principales variables estudiadas en pacientes.....	77
Tabla 6. Número, edad y sexo de los pacientes y los controles.....	83
Tabla 7. Características generales de los pacientes.....	84
Tabla 8. Distribución de los pacientes según la clasificación de Montreal.....	85
Tabla 9. Índices de actividad clínica media en pacientes.....	87
Tabla 10. Puntuaciones del SES-CD totales y por localización.....	88
Tabla 11. Puntuaciones SES-CD total por grupos de actividad.....	88
Tabla 12. Resultados del estudio histológico de los pacientes.....	88
Tabla 13. Tratamiento farmacológico en los pacientes, dosis y tiempo.....	89
Tabla 14. Tratamiento farmacológico en los distintos grupos.....	90
Tabla 15. Cifras medias de series celulares en el hemograma en casos y controles.....	91
Tabla 16. Diferencias entre las subpoblaciones linfocitarias totales en los grupos de actividad.....	94
Tabla 17. Diferencias entre las subpoblaciones de $LT\alpha\beta$ en los grupos.....	95
Tabla 18. Diferencias entre las subpoblaciones de $LT\gamma\delta$ en los grupos.....	96
Tabla 19. Valores medios de las subpoblaciones linfocitarias con respecto a la actividad.....	98
Tabla 20. Cifras medias de subpoblaciones de LT totales con respecto a los grupos de edad.....	100

Tabla 21. Cifras medias de subpoblaciones de LT $\alpha\beta$ con respecto a los grupos de edad.....	101
Tabla 22. Cifras medias de subpoblaciones de LT $\gamma\delta$ con respecto a los grupos de edad.....	101
Tabla 23. Cifras medias de subpoblaciones de LT totales con respecto a la localización de la enfermedad.....	102
Tabla 24. Cifras medias de subpoblaciones de LT $\alpha\beta$ con respecto a la localización de la enfermedad.....	103
Tabla 25. Cifras medias de subpoblaciones de LT $\gamma\delta$ con respecto a la localización de la enfermedad.....	104
Tabla 26. Cifras medias de subpoblaciones de LT totales con respecto al patrón.....	105
Tabla 27. Cifras medias de subpoblaciones de LT $\alpha\beta$ con respecto al patrón.....	105
Tabla 28. Cifras medias de subpoblaciones de LT $\gamma\delta$ con respecto al patrón.....	106
Tabla 29. Cifras medias de linfocitos B con respecto a la edad.....	106
Tabla 30. Cifras medias de linfocitos B con respecto a la localización.....	107
Tabla 31. Cifras medias de Linfocitos B con respecto al patrón.....	107
Tabla 32. Correlación entre las subpoblaciones linfocitarias e índices clínicos.....	109
Tabla 33. Valores medios de las poblaciones del hemograma en función de la presencia o no de tratamiento farmacológico, y su significación estadística (p).....	116
Tabla 34. . Valores medios de las subpoblaciones linfocitarias en función de la presencia o no de tratamiento farmacológico, y su significación estadística (p).....	117
Tabla 35. . Valores medios de la IL-7 según la clasificación fenotípica de EC.....	120
Tabla 36. Valores medios de la IL-7 según el tratamiento empleado.....	122

Figuras

Figura 1. Patogenia de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal: modelos y puntos de vista propuestos.....	16
Figura 2. Clasificación de Montreal y manifestaciones extraintestinales de la EC.....	19
Figura 3. Mecanismos patogénicos de la EC.....	22
Figura 4. Imagen comparativa de la estructura del TCR- $\alpha\beta$ y el TCR- $\gamma\delta$	29
Figura 5. Interacción entre LT $\gamma\delta$ y bacterias.....	31
Figura 6. Regulación de los LT $\gamma\delta$	31
Figura 7. Esquema de las funciones específicas de los LT $\gamma\delta$	36
Figura 8. Esquema de los mecanismo de activación de los LT $\gamma\delta$ para su uso en inmunoterapia.....	42
Figura 9. Esquema de las principales acciones inmunomoduladoras de la IL-7.....	52
Figura 10. Clasificación de Montreal de la EC.....	73
Figura 11. Índice CDAI de gravedad de la EC.....	74
Figura 12. Índice endoscópico SES-CD de gravedad de la EC	75
Figura 13. Subpoblaciones de linfocitos T. Diferencias entre casos y controles: A)LT totales, B) LT $\alpha\beta$ (B) y C) LT $\gamma\delta$	92
Figura 14 Cifras medias de LT en grupos de actividad.....	93
Figura 15. Cifras medias de LT $\alpha\beta$ en grupos de actividad.....	94
Figura 16. Cifras medias de LT $\gamma\delta$ en grupos de actividad.....	95
Figura 17. Estudio por citometría de flujo de los subtipos de LT $\gamma\delta$ en un control.....	96
Figura 18. Estudio por citometría de flujo de los subtipos de LT $\gamma\delta$ en un paciente.....	97
Figura 19. Valores medios de linfocitos B en los grupos de actividad.....	99

Figura 20. Valores medios de las subpoblaciones en las que se encontraron diferencias significativas con respecto al tratamiento o no, y su significación.....	113
Figura 21. . Valores medios de las subpoblaciones en las que se encontraron diferencias significativas con respecto al tratamiento con azatioprina, y su significación.....	114
Figura 22. . Valores medios de las subpoblaciones en las que se encontraron diferencias significativas con respecto al tratamiento con antibiótico, y su significación.....	115
Figura 23. . Valores medios de las subpoblaciones en las que se encontraron diferencias significativas con respecto al tratamiento con corticoides, y su significación.....	116
Figura 24. Niveles medios de IL-7 en EC y controles.....	118
Figura 25. Niveles medios de IL-7 en grupos de actividad de EC y controles.....	119

Anexos

Anexo 1. Hoja de recogida de datos del estudio.....	203
Anexo 2. Hoja de consentimiento informado.....	207
Anexo 3. Estudio previo de valores de $LT\gamma\delta$ en la EC.....	208
Anexo 4. Estudio previo de niveles de IL-7 en la EC.....	218

1. Introducción

Introducción

1.1.Aspectos generales de la Enfermedad inflamatoria Intestinal (EII)

La **EII** es un proceso inflamatorio **crónico y recidivante de carácter sistémico** que afecta predominantemente al **tracto gastrointestinal**, asociándose frecuentemente con manifestaciones extraintestinales ^(Abraham C_ 2009). Existen **dos subtipos** principales de EII: la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). La **EC** puede afectar cualquier parte del tracto digestivo, es de carácter transmural (pudiendo producir fístulas y abscesos) y suele presentarse clínicamente como dolor abdominal, diarrea crónica con o sin sangre, astenia, pérdida de peso y fiebre ^(Baumgart DC_ 2012). Sin embargo, la **CU** afecta típicamente al colon (más frecuentemente el recto y el sigma), presenta afectación submucosa no transmural, y suele presentarse como diarrea de larga duración, generalmente sanguinolenta y con mucosidad, tenesmo y dolor abdominal hipogástrico ^(Kornbluth A_ 1997).

Ambas se caracterizan por afectar predominantemente a **individuos jóvenes** y por **alternar periodos de remisión clínica y brotes** de actividad ^(Podolsky DK_ 2002). El control clínico de estos brotes recidivantes requiere el empleo de **fármacos antiinflamatorios** no exentos de efectos secundarios (corticoides, inmunosupresores, agentes biológicos etc.) siendo frecuente la necesidad de **hospitalizaciones e incluso de cirugía** para el tratamiento de las complicaciones (estenosis, abscesos, megacolon tóxico etc.)^(Baumgart DC_2012). Ello conlleva una importante afectación de la **calidad de vida** tanto de los pacientes como de su entorno, así como un elevado coste sanitario asociado ^(Rocchi A_2012). Globalmente, se calcula que la EII afecta a más de 3.6 millones de personas en todo el mundo, habiéndose constatado un espectacular **aumento de su incidencia** en las últimas décadas ^(Lakatos PL_2006). A pesar de los grandes avances en el conocimiento de los mecanismos que subyacen en la EII, la etiopatogenia de la enfermedad es en muchos aspectos desconocida. Actualmente se considera la EII como un **trastorno poligénico inmunitario de causa multifactorial** en el que intervienen: **1)** factores

genéticos individuales; **2)** factores ambientales; **3)** la flora intestinal (microbioma) y **4)** la respuesta inmunitaria. Una combinación de estos factores produce una respuesta inmunitaria inadecuada y excesiva contra la flora comensal en sujetos genéticamente predispuestos ^(Xavier RJ_2007) .

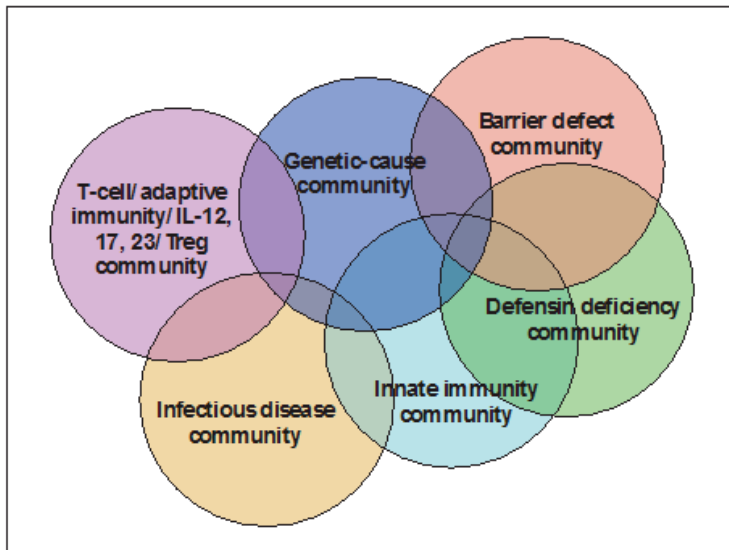


Fig. 1. Patogenia de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal: modelos y puntos de vista propuestos ^(Rogler G_2013) .

1.2. La Enfermedad de Crohn (EC)

1.2.1. Epidemiología de la Enfermedad de Crohn e impacto socioeconómico

La **incidencia de la EII ha aumentado** de manera significativa en los últimos años, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo (como regiones asiáticas y del este de Europa), lo que sugiere un papel importante de los factores ambientales en la patogenia de la enfermedad ^{(Loftus EV_2004) (Kostic AD_2014)} . De hecho, ha pasado de ser un trastorno poco frecuente a llegar a duplicar su incidencia cada década en Norteamérica y Europa en la segunda parte del siglo XX ^(Molodecky NA_2012) .

La exhaustiva revisión de los últimos estudios epidemiológicos europeos sobre EII y EC de Burish et al ^(Burisch J_2013) señala algunos datos importantes:

- Se calcula que el 0.3% de la población europea padece EII.
- Hasta un 30-40% de los pacientes presentan ya al diagnóstico una enfermedad complicada.
- Las tasas de hospitalización en EC son altas, aunque han disminuido

ligeramente.

- Aproximadamente el 50% de los pacientes con EC requerirá cirugía en los 10 años que siguen al diagnóstico. De ellos aproximadamente el 20% requerirá una nueva intervención quirúrgica en ese tiempo.
- Las manifestaciones extraintestinales se producen en el 20-40% de los pacientes con EC.
- El riesgo de cáncer colorrectal (CCR) en pacientes con EC es casi igual al de la población general. Sin embargo el riesgo relativo de cáncer de intestino delgado está significativamente aumentado, aunque su riesgo absoluto es bajo.
- Los pacientes con EC sufren un riesgo elevado de ciertos cánceres extraintestinales como el esófago-gástrico, pulmón, piel o vejiga.

Clásicamente la EI presenta un gradiente Norte-Sur, con una mayor prevalencia en países del Norte y en zonas urbanas *(Shivananda S_1996)*. Sin embargo estudios recientes han constatado una disminución éstas diferencias, en gran parte por el aumento de la incidencia en países del sur de Europa (Francia o España, por ejemplo) *(Saro C_2003)*. Estudios epidemiológicos realizados en **España** muestran una incidencia de la EC de 7.8 por 100.000 habitantes/año, con una prevalencia de 87.5 por 100.000 habitantes, muy similar a otros países centroeuropeos *(López-Serrano P_2009) (Saro C_2003)*.

La incidencia de la EC es similar en ambos géneros, y se da con mayor frecuencia en individuos de raza caucásica y en ciertas poblaciones como los judíos Ashkenazi *(Yang H_1993)*.

La edad de aparición de la EC presenta una **distribución bimodal**, con un mayor pico de incidencia entre los 15 y los 35 años y un segundo pico menos acusado entre los 55 y los 65 años (conocido como EC de presentación tardía o “late onset”) *(Baumgart DC_2012)*. Existe un aumento de la incidencia también en edades pediátricas, tanto de CU como de EC. Un reciente estudio multicéntrico español revela un incremento de la prevalencia de la EC en edad pediátrica del 0.53 al 1.7 por 100.00 habitantes/año entre 1996 y 2009. Datos de un estudio realizado en nuestro centro en 2008-2009 en el área del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia arrojan una incidencia de 4.43 y 7.44 por 100.000 habitantes/año para la EC y la CU

respectivamente ^(Durban L_2010) .

A pesar de que las tasas de cirugía han disminuido en la EC principalmente debido al empleo de fármacos más efectivos desde el inicio de la enfermedad, la tasa de mortalidad se encuentra aumentada hasta en un 40% en pacientes con EC con respecto a población sana ^(Burisch J_2013) . Entre el 25 y el 50% de las muertes en estos enfermos están relacionadas con complicaciones de la enfermedad como malnutrición, complicaciones postoperatorias y cáncer colorrectal (CCR). Factores como la edad temprana al diagnóstico, la persistencia de inflamación activa, la coexistencia de colangitis esclerosante primaria o la historia familiar de CCR incrementan la predisposición a padecer CCR ^(Burisch J_2015) .

En los últimos años se ha estudiado extensamente el **impacto socioeconómico** de la EII, tanto en costes directos como indirectos. Un amplio estudio en pacientes canadienses cifró en 2.8 billones de dólares el coste de la enfermedad en 2012 (unos 12.000 dólares por paciente en ese período), con unos costes directos anuales 1.2 billones de dólares (principalmente derivados de medicinas, hospitalizaciones y visitas médicas), y unos costes indirectos de 1.6 billones de dólares (sobretudo derivados de las largas bajas laborales) ^(Rocchi A_2012) .

Un estudio europeo multicéntrico publicado en 2015 cifra el coste del primer año de tratamiento de un paciente con EC en 1.803 euros por pruebas diagnósticas, 11.489 euros por cirugía, 1.027 euros por tratamiento estándar y 7.376 euros en tratamientos biológicos (anti-TNF), dando una idea de su impacto económico ^(Burisch J_2015) .

1.2.2. Diagnóstico y Clasificación de la EC

La EC debe sospecharse en todo paciente (especialmente entre los 20 y 40 años) que presente **diarrea crónica** (ocasionalmente con moco o sangre), dolor abdominal, síntomas de enfermedad perianal (sobre todo fístulas y abscesos de repetición), fiebre y síntomas sistémicos -como anorexia, astenia o pérdida de peso- ^{(Baumgart DC_2012) (Van Assche G_2010)} . Asimismo debe investigarse la presencia de **manifestaciones extraintestinales**, que se dan hasta en un 20% de pacientes. Destacan las afecciones cutáneas (como eritema nodoso y pioderma gangrenoso),

las osteomusculares (poliartralgias, artritis), las oculares (uveítis/iritis), o las hepatobiliares (colecistitis o colangitis esclerosante primaria) ^(Ott C_2012). Los criterios de Lennard-Jones siguen siendo ampliamente aceptados para el diagnóstico de la enfermedad, a pesar de su baja sensibilidad ^(Lennard-Jones JE_1997). Actualmente se emplea internacionalmente la **Clasificación de Montreal** de la EC que tiene en cuenta la edad (**A**=”age”), la localización (**L**=localization), el patrón o comportamiento de la enfermedad (**B**=behaviour) y la presencia de enfermedad perianal ^(Silverberg MS_2005).

La EC puede afectar a **cualquier tramo** del tracto digestivo y es de carácter **transmural** (a diferencia de la CU, que sólo afecta al colon y con afectación submucosa) y esta localización suele mantenerse estable en tiempo ^(Peyrin-Biroulet L_2010). Sin embargo el patrón de la enfermedad (inflamatorio, fistulizante y estenosante) varía en el transcurso de la enfermedad. Estudios de largas series de pacientes demuestran que más de la mitad los casos se diagnostican entre los 17 y los 40 años (Montreal A2) y presentan una localización ileal o ileocolónica (Montreal L1 o L3). El patrón inflamatorio (“no-estenosante-no fistulizante”, Montreal B1) el más frecuente -hasta el 80% del total en algunas series- ^{(Thia KT_2010) (Cosnes J_2002)}.

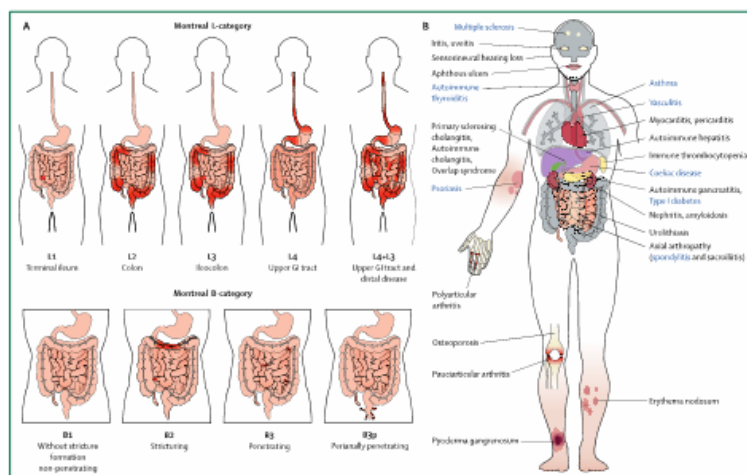


Fig. 2. Clasificación de Montreal y manifestaciones extraintestinales de la EC ^(Baumgart DC_2012).

La **ileocolonoscopia** con toma de biopsias sigue siendo el patrón oro para el diagnóstico de la EC, observándose característicamente lesiones mucosas como aftas, úlceras o estenosis, con mucosa sana entre ellas ^(Carter D_2014). Actualmente el

estudio de las lesiones en intestino delgado y perianales puede completarse con el empleo de la cápsula endoscópica ^(Kopylov U_2014) y otras **técnicas de imagen** como: la ecografía abdominal con contraste, la ecoendoscopia transrectal ^(Panés J_2011), la tomografía axial computerizada (TAC) ^(Al-Hawary MM_2013) y la resonancia magnética con enteroclis (RM) ^(Allen BC_2014). Estas pruebas han demostrado su eficacia en el diagnóstico inicial, la detección de **complicaciones** -como abscesos, fístulas o estenosis- y como predictoras del curso de la enfermedad ^{(Dambha F_2014) (D'Inca R_2014)}.

Aunque existen **alteraciones histológicas** sugestivas de la EC (como la afectación transmural y discontinua, fisuras, agregados linfoides, o la presencia de granulomas), no existe ninguna alteración patognomónica ^(Feakins RM_2014). De hecho, los granulomas sólo están presentes en el 30-40% de los pacientes, variando mucho según la localización y el número de biopsias obtenido en la colonoscopia ^(Schmitz-Moormann P_1984).

El **diagnóstico diferencial** debe establecerse con las infecciones gastrointestinales enteroinvasivas (especialmente por *Yersinia enterocolitica*, *Campilobacter yeyuni*, y tuberculosis intestinal), el síndrome de intestino irritable, la colitis isquémica (sobre todo en formas colónicas en pacientes de edad avanzada), la enteropatía por antiinflamatorios no esteroideos (AINE), las vasculitis (como la enfermedad de Behçet), o ciertos tumores (linfoma intestinal, o cáncer de colon en las formas estenosantes) ^{(Almadi MA_2009) (Vaipoulos AG_2014) (Baumgart DC_2012)}. Los principales **factores pronósticos** que indican mayor probabilidad de complicaciones y enfermedad incapacitante son: la necesidad de corticoides y edad temprana al diagnóstico, la presencia de enfermedad perianal, el patrón estenosante, y la necesidad de resección intestinal previa ^(Beaugerie L_2006).

La proteína C reactiva (PCR) y la determinación de calprotectina fecal son los biomarcadores más empleados para el control de la enfermedad, con una buena correlación con la actividad inflamatoria endoscópica y un potencial papel predictivo de brotes y complicaciones ^{(Lewis JD_2011) (D'Inca R_2014)}.

1.2.3. Tratamiento de la EC

El objetivo del **tratamiento** es intentar conseguir la remisión clínica y endoscópica (curación mucosa) prolongada, para evitar las complicaciones de la progresión de

la enfermedad (sobre todo las hospitalizaciones e intervenciones quirúrgicas), mejorando la calidad de vida del paciente con EC y de su entorno.

En primer lugar debe aconsejarse el abandono del hábito tabáquico por su efecto deletéreo en la progresión ^{(Cosnes J_1996) (Cosnes J_2001)}, así como una nutrición adecuada y el empleo de técnicas de control del estrés ^(Mawdsley JE_2005).

La elección del tipo de tratamiento dependerá del estadio de la enfermedad (inducción o mantenimiento de la remisión), de sus factores pronósticos y de las características individuales del paciente; y debe equilibrar la eficacia con los efectos secundarios ^{(Louis E_2009) (Dignass A_2010)}.

De manera general, se emplean tratamientos de acción rápida (corticoides, anti-TNF, o antibióticos) en el brote, seguidos de fármacos de control de la remisión (tiopurínicos, metotrexate o anti-TNF) ^(Baumgart DC_2012). El tratamiento quirúrgico no está exento de complicaciones y su indicación debe valorarse de manera consensuada con los cirujanos digestivos de forma individualizada ^(Huang W_2015).

1.2.4. Patogenia de la EC

A pesar de los avances de los últimos años, la etiopatogenia de la EC es en gran medida desconocida. Sin embargo existen **factores genéticos, ambientales, de la microflora y alteraciones inmunitarias** que han sido ampliamente estudiados.

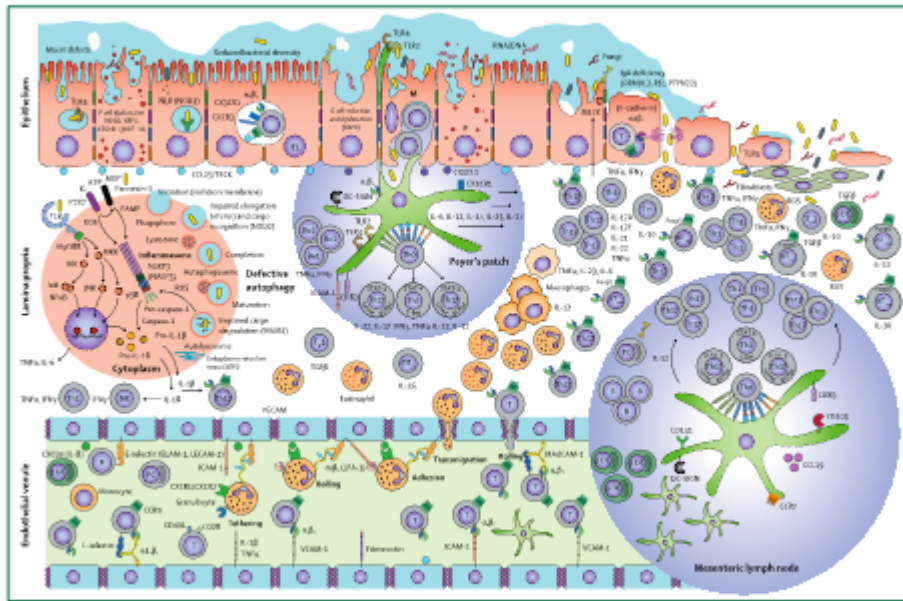


Fig. 3. Mecanismos patogénicos de la EC (Baumgart DC_2012).

-Factores genéticos

La EC se considera una enfermedad poligénica. Se ha demostrado que existe agregación familiar (Bengtson MB_2009) y anticipación genética (Bengtson MB_2009) (es decir, que los descendientes presentan la enfermedad en edades más tempranas que los progenitores). De hecho existe concordancia fenotípica en el 50-75% gemelos monocigóticos con la enfermedad (Halme L_2006).

Los **estudios de asociación genética (GWAS)** han confirmado **30 loci** de susceptibilidad para la EC en 17 cromosomas (Barrett JC_2008).

Aunque algunos son compartidos con la CU, otros revelan alteraciones **específicas** de la EC como los que codifican los receptores NOD (NOD2), los implicados en la autofagia (ATG16L1, IRGM), o los de las intelectinas (ITLN1) (Budarf ML_2009).

Sin embargo esta susceptibilidad tiene escasa traducción clínica y explica tan sólo en un 20% aproximadamente la herencia genética (Park JH_2010), lo que enfatiza el papel clave de los factores ambientales y epigenéticos (Zhang YZ_2014).

-Factores ambientales

EL medio ambiente se ha sugerido como un factor importante en el desarrollo de la EC (Baumgart DC_2012). Amplios estudios epidemiológicos describen un aumento de la incidencia de la enfermedad en inmigrantes procedentes de áreas de baja prevalencia a países industrializados o en etnias con baja prevalencia tras emigrar (como asiáticos o hispanos) (Hou JK_2009).

Algunos autores apuntan a que la “**dieta occidental**” basada en grasas saturadas e hidratos de carbono refinados, podría modificar la microflora y contribuir a la enfermedad en sujetos predispuestos (Leone V_2013).

El **tabaco** es el factor ambiental más estudiado y existen numerosos estudios y metanálisis que demuestran su efecto deletéreo en la enfermedad (Cosnes J_1996) (Cosnes J_2001). **Otros factores** que se han relacionado con la aparición de la EC son los niveles bajos de vitamina D (Leslie WD_2008) (Cantorna MT_2014) el consumo en edades tempranas de antibióticos (Shaw SY_2010) o el empleo de anticonceptivos orales (Cornish JA_2008).

El consumo de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (Ananthakrishnan AN_2012) y el estrés se consideran factores desencadenantes de brotes de actividad (Bitton A_2008) (Mawdsley JE_2005).

-Factores relacionados con la flora intestinal

-La hipótesis infecciosa de la EC

El posible papel de la **infección por microorganismos** como agente causal de la EC sigue en estudio. El hecho de que las lesiones típicas ocurran en las zonas de mayor densidad bacteriana (íleon y recto), la mejoría de la inflamación en zonas sin tránsito fecal, la presencia de mayor cantidad de bacterias intramucosas o la presencia de granulomas, hacen plausible la **hipótesis infecciosa** (Bosca-Watts M_2015). De hecho, la EC se asemeja a la ileitis granulomatosa producida por el bacilo de la tuberculosis y a la enfermedad de Johne causada por el *Micobacterium avium paratuberculosis* (Mendoza JL_2010), incluso en el tipo de respuesta inmune que generan (Lee JS_2009). Sin embargo, aunque se han identificado micobacterias en tejido y sangre de pacientes con EC (Di Sabatino A_2011), el tratamiento con antituberculosos no se ha mostrado eficaz en ensayos clínicos controlados (Selby W_2007). En los últimos años ha

crecido el interés por el hallazgo de *Escherichia coli adherente-invasiva* (AIEC) en el colon e íleon ^{(Masseret E_2001) (Darfeuille-Michaud A_2004)} y en los granulomas de los pacientes con EC ^(Ryan P_2004). Recientemente otro microorganismo de la familia de los hongos, el Microsporidio, se ha relacionado con la enfermedad ^(Andreu-Ballester JC_2013).

Alteraciones en la flora bacteriana en EC

Existe evidencia de que existe una **desregulación de la respuesta inmune a la flora intestinal normal** en la EC. Ciertos ratones transgénicos no desarrollan colitis en medios estériles y se ha observado que la alteración de la carga antigénica producida por la microflora mediante una nutrición elemental, el empleo de antibióticos o la realización una ileostomía de derivación del flujo fecal mejoran la inflamación ^(Merga Y_2014).

Existen principalmente **4 especies bacterianas en la flora intestinal** de individuos sanos -*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria*-, principalmente anaerobias y con una concentración creciente desde el estómago al recto ^(Kostic AD_2014).

Estudios metagenómicos demuestran una **diversidad reducida** en pacientes con EC en comparación con controles (disbiosis) ^(Joossens M_2011). Concretamente se ha detectado una disminución de las especies *Firmicutes* y *Bacteroidetes* y un aumento de *Proteobacteria* y de *Enterobacteria*, en concreto de *Escherichia coli* ^(Morgan XC_2012).

Este fenómeno puede tener un reflejo en la clínica. Por ejemplo, la reducción del ***Faecalibacterium prausnitzii*** (de la especie *Firmicutes*) se asocia a mayor riesgo de recurrencia postoperatoria y su restitución experimental presenta efecto antiinflamatorio ^(Sokol H_2008).

-Factores inmunitarios

Se han descrito alteraciones tanto en la inmunidad innata (inespecífica) como de la inmunidad adquirida (o específica) en la patogénesis de la EC, aunque en la actualidad los primeros se consideran mayor importancia ^(Zhang YZ_2014).

Alteraciones en la inmunidad innata

Existen varios defectos en la primera línea de defensa formada por el epitelio intestinal y la capa de moco protector en superficie secretado por las células caliciformes:

1. Disminución de la capa mucosa protectora:

Se han descrito variaciones en el espesor, la continuidad y la composición de la capa de moco. Las zonas de mucosa inflamada en íleon de pacientes con la enfermedad presentan una expresión disminuida del gen encargado de la producción de mucina MUC-1 ^(Visione MP_1999), circunstancia que ha sido corroborada por los estudios de asociación genética (GWAS) que corroboran la asociación de alteraciones de MUC-1 y MUC-19 y la enfermedad ^(Frank A_2010).

2. Aumento de la permeabilidad intestinal

Existe un aumento patológico de la permeabilidad intestinal que permite el paso de patógenos a la lámina propia donde contactan con las células inmunitarias desencadenando una respuesta inflamatoria alterada ^(Antoni L_2014).

Inicialmente se describió un incremento de permeabilidad en niños con EC hace ya más de 30 años ^(Pearson AD_1982). Estudios recientes han comprobado que los enfermos presentan un descenso del número de uniones celulares (“tight junctions”), una disminución de la expresión de Claudina 5 y 8 ^(Zeissig S_2007) y una mayor densidad de espacios entre células (“epithelial gaps”) por endomicroscopía laser confocal ^(Goetz M_2010).

Algunos estudios relacionan este aumento de la permeabilidad con la probabilidad de presentar brotes de actividad ^{(Wyatt J_1993) (Arnott ID_2000)}.

3. Alteraciones en las células de Paneth

Las células de Paneth son las encargadas de secretar sustancias antimicrobianas como la lisozima, la fosfolipasa A2 y las defensinas α y β ^(Antoni L_2014).

Las células de Paneth de los pacientes con ciertas mutaciones en el gen de la autofagia ATG16L presentan menor número de gránulos y alteraciones funcionales

en su secreción ^(Cadwell K_2008).

Otros estudios han descrito una disminución de defensinas α en el íleon de pacientes con EC portadores de la mutación NOD2-SNP13 ^(Wehkamp J_2005) y una disminución de la expresión de defensinas β HDB-1 en la mucosa colónica en EC ^(Peyrin-Biroulet L_2010), aumentando la susceptibilidad a las invasiones microbianas.

4.Mecanismo de estrés del retículo endoplásmico

Una respuesta adecuada al estrés del retículo endoplásmico de las células secretoras (caliciformes y células de Paneth) es necesaria para mantener la homeostasis y el adecuado reconocimiento de la composición de la microbiota ^(Kaser A_2010). Alteraciones en este proceso producen la acumulación de proteínas no desplegadas, lo que desencadena estrés celular e inflamación ^(Kaser A_2010).

Las deleciones en modelos experimentales de uno de los componentes principales de esta respuesta, el X-box-binding-protein 1 (XBP1) del epitelio intestinal –cuya asociación se ha comprobado con la EC–, produce enteritis espontánea en el intestino delgado, un aumento de susceptibilidad a la colitis murina por DSS y una reducción de las células de Paneth y caliciformes ^{(Kaser A_2010) (Kaser A_2008)}.

5.Migración y retención leucocitaria

Los pacientes con EC presentan un reclutamiento débil y lento de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y, contrariamente, una retención prolongada de los mismos en el epitelio mucoso, contribuyendo al daño tisular (erosiones, úlceras, edema etc.) ^(Brazil J_2013).

6.Alteraciones en el gen NOD2

En 2001 se describió por primera vez la relación entre los polimorfismos en el gen NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2) y la susceptibilidad a padecer EC ^{(Hugot JP_2001) (Ogura Y_2001)}.

EL NOD2 codifica un receptor PRR (Pattern Recognition Receptor) que se expresa intracelularmente en macrófagos, células dendríticas, células epiteliales, e incluso en los linfocitos T (LT), y que es activado por el N-acetyl muramyl dipéptido, un componente del peptidoglicano bacteriano, y otros ligandos de micobacterias y

virus (Kanneganti TD_2007).

NOD 2 juega un papel fundamental en la defensa inmunitaria. Las alteraciones en este gen producen una respuesta exagerada ante lipopolisacáridos, que se traduce en un aumento de la reacción inflamatoria y disminución de la producción de agentes antimicrobianos (Kobayashi KS_2005).

Las alteraciones en NOD2 resultan en un aumento de la activación de $\text{NF}\kappa\beta$, un aumento de la producción de citosinas Th1, y una disminución de IL-10 (Noguchi E_2009) (Tsay TB_2009).

Además el NOD2 participa en la regulación de la microflora (Rehman A_2011), en procesos de autofagia (Travassos LH_2010), en la modulación de los Toll-like receptors – TLR- (sobre todo en la vía de producción de $\text{NF}\kappa\beta$ activada por el TLR2) (Watanabe T_2004) y en la producción de α -defensinas (disminuida en pacientes con la mutación) (Wehkamp J_2005). Algunos autores han asociado estos defectos fenotípicamente con formas ileales (Montreal L1), patrón estenosante y peor pronóstico (Jensen SR_2011).

7.Alteraciones en la Autofagia

La autofagia es un proceso de degradación fundamental para reciclar componentes celulares dañados, agregados proteicos y microorganismos invasivos, mediante la formación de autofagosomas y autolisosomas (Levine B_2008).

Se han descrito dos polimorfismos en genes relacionados con la autofagia en la EC:

1) Alteraciones en el gen de autofagia ATG16L1(T300A). (Hampe J_2007) (Rioux JD_2007). Esta proteína se expresa en los macrófagos, las células epiteliales y los linfocitos y es fundamental en la autofagia selectiva (Xavier RJ_2008). Los pacientes homocigóticos para la mutación presentan fallos en la formación de autofagosomas para la degradación de productos microbianos (Kuballa P_2008), alteraciones en la presentación antigénica a los LT CD4⁺ (Cooney R_2010) y defectos en la formación de gránulos por las células de Paneth (Cadwell K_2008), lo que produce una exocitosis anormal.

2) Alteraciones en el IRGM (immunity-related GTPase M). Este mecanismo es clave en las fases iniciales de la autofagia y para la destrucción de microorganismos intracelulares (Singh SB_2006) como *Mycobacterium tuberculosis* y otras bacterias como

Salmonella typhimurinum (Gutierrez MG_2004).

3) Alteraciones del NOD2 que producen defectos en la autofagia. La activación del NOD2 recluta ATG16L1 hacia la membrana en el sitio de entrada bacteriano (Travassos LH_2010) lo que sugiere su papel regulador en la interiorización de los patógenos y la formación de autofagosomas. En segundo lugar, esta activación de NOD2 en pacientes con alteraciones en ATG16L1 produce un aumento de especies reactivas del oxígeno (ERO), y un aumento de IL-1 β con la consiguiente reacción inflamatoria (Saitoh T_2008).

En conjunto estos defectos en genes que intervienen en la autofagia se traducen en la clínica en alteraciones de la composición de la microbiota (ecosistemas más proinflamatorios) y en una respuesta alterada ante la flora comensal y los patógenos enteroinvasivos (Fritz T_2011).

Alteraciones en la inmunidad adquirida

La EC ha sido clásicamente considerada como una enfermedad en la que predomina la **respuesta tipo Th1**, con un aumento de producción de citoquinas proinflamatorias (sobre todo IFN- γ , TNF- α e IL-2) en la mucosa con respecto a sujetos sanos (Breesse E_1993).

Se ha propuesto que los antígenos de la luz intestinal activan a los LT CD4+ y los macrófagos mediante mecanismos no bien conocidos, generándose un círculo vicioso con un aumento continuado de la secreción de citoquinas proinflamatorias y radicales libres que producirán daño tisular (Hibi T_2003). El papel del TNF- α en la EC está asimismo avalado por la buena respuesta terapéutica en la clínica a los agentes anti-TNF (influximab, adalimumab o certolizumab) (Mandel MD_2014).

En los últimos años se ha estudiado extensamente la importancia de la hiperestimulación de los LT Th17 en la patogenia de la enfermedad (Gálvez J_2014). Estas células son estimuladas por TGF- β e IL-23 y producen IL-17A, IL17F, IL-21 e IL-22 (Korn T_2009). Estos linfocitos y las citoquinas Th17 que producen (así como su expresión genómica RNA) se hallan aumentados de manera significativa en la mucosa inflamada (Seiderer J_2008) (Kobayashi T_2008). Los estudios GWAS han revelado la asociación de varios polimorfismos de genes relacionados con los Th 17 (como

STAT3 o IL-23R) en pacientes con EII, sugiriendo su papel en la patogénesis (Franke A_2010).

Estudios en mucosa inflamada han encontrado niveles altos de LT reguladores (Treg) productores de citoquinas antiinflamatorias (IL-10 y TGF β) indicando su posible participación en los mecanismos inmunitarios de la enfermedad (Saruta M_2007) (Buckner JH_2010).

Se ha demostrado asimismo que los LT efectores (Tef) de la lámina propia no responden a la acción inmunoreguladora de los Treg, perpetuando la respuesta inflamatoria (Fantini MC_2009).

1.3. Los linfocitos T gammadelta ($LT\gamma\delta$)

1.3.1. Aspectos generales de los $LT\gamma\delta$

Los LT pueden dividirse en dos grandes subpoblaciones según el receptor para antígeno que expresan en la membrana de superficie (TCR): los **linfocitos T $\alpha\beta$ ($LT\alpha\beta$)** y los **linfocitos T $\gamma\delta$ ($LT\gamma\delta$)**, que expresan el **TCR- $\alpha\beta$** y el **TCR- $\gamma\delta$** respectivamente (Wu YL_2014). Desde el descubrimiento de los $LT\gamma\delta$ en 1984 por Saito et al. (Saito H_1984) ha habido un interés creciente en conocer las funciones de este tipo celular. Actualmente se consideran una pieza clave en la primera línea de defensa contra la invasión de patógenos invasivos (los epitelios), así como en la homeostasis de la respuesta inmune (Zheng J_2013).

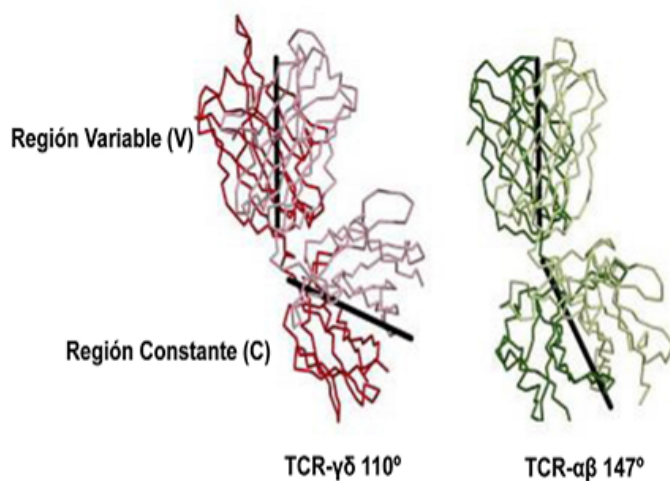


Fig. 4. Imagen comparativa de la estructura del TCR- $\alpha\beta$ y el TCR- $\gamma\delta$ (Allison TJ_2001).

La función principal de los $LT\alpha\beta$ es responder a los diversos antígenos ajenos presentados como péptidos en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de las células presentadoras de antígeno (CPA). Sin embargo, hay **tres características fundamentales que diferencian a los $LT\gamma\delta$ de los $LT\alpha\beta$** :

1) los $LT\gamma\delta$ **se localizan fundamentalmente en las mucosas** -entre las células epiteliales- constituyendo hasta el 50% de los linfocitos intraepiteliales (LIE) y actuando como la primera línea de defensa inmunitaria; y son escasos en sangre periférica y órganos linfoides secundarios, donde predominan los $LT\alpha\beta$ *(Chien Y_2014)*.

2) los $LT\gamma\delta$ **reconocen proteínas directamente sin el procesamiento antigénico previo por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)** *(Schild H_1994) (Chien YH_1996)*. De hecho, no reconocen (o solo raramente) péptidos procesados por las Células Presentadoras de Antígeno (CPA).

3) **Son potentemente estimuladas directamente por metabolitos microbianos fosforilados** (como el E-4-metil-butenil-pirofosfato, HMBPP) y antígenos lipídicos. *(Tanaka Y_1995)*. Estos fosfoantígenos fueron de los primeros ligandos relacionados con el reconocimiento antigénico de los $TCR-\gamma\delta$ *(Pfeffer K_1990)*.

Por tanto, los $LT\gamma\delta$ combinan de manera única su potencial como célula parte de los mecanismos de inmunidad adquirida (inherente a su TCR), con acciones de más propias de otras células de la inmunidad innata, como la respuesta rápida contra patógenos sin necesidad de procesamiento antigénico, su actividad citolítica -e incluso fagocítica directa- o su capacidad para actuar como células presentadoras de antígeno (CPA) y regular la actividad de los propios $LT\alpha\beta$ *(Born WK_2006) (Vantourout P_2013)*.

Se consideran por tanto una célula “puente” entre la inmunidad innata (o inespecífica) y adquirida (o específica) *(Kabelitz D_2011)*.

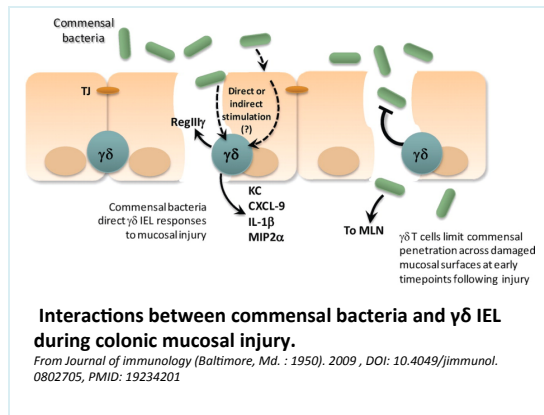


Fig. 5. Interacción entre $LT_{\gamma\delta}$ y bacteria

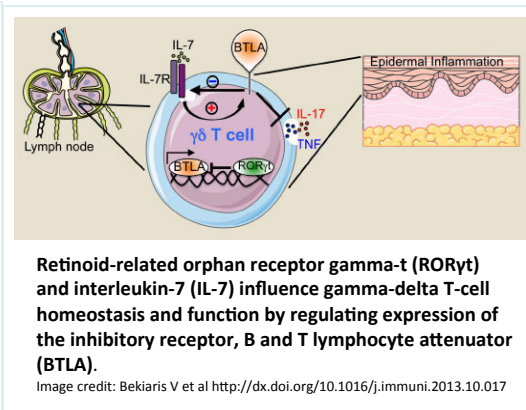


Fig 6. Regulación de los $LT_{\gamma\delta}$

Estas características específicas de los $LT_{\gamma\delta}$ han multiplicado los estudios en las últimas dos décadas tratando de dilucidar su papel de defensa ante las infecciones, anti-tumoral y como reguladores de la respuesta inmunitaria en enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunitarias ^{(Bonneville M_2010) (Vantourout P_2013)}.

De hecho, y más importante para la práctica clínica, ya existen varias líneas de investigación **empleando estas células como diana terapéutica** antineoplásica y anti infecciosa con resultados prometedores *(ver apartado de aplicaciones terapéuticas de los LTGD)* ^{(Chiplunkar S_2009) (Wu YL_2014)}.

1.3.2. Origen de los $LT_{\gamma\delta}$:

Los $LT_{\gamma\delta}$ son las primeras células T que se desarrollan en los vertebrados y las primeras en aparecer en el timo fetal ^(Chien Y_2014). Constituyen la subpoblación mayoritaria de LT durante el primer año de vida, lo que sugiere su papel clave en la protección neonatal mientras el sistema de protección de la IgA no está completamente desarrollado ^{(Kagnoff MF_1998) (Vantourout P_2013)}.

Los $LT_{\gamma\delta}$ derivan de células madre hematopoyéticas pluripotenciales presentes en el hígado fetal o la médula ósea del adulto y, tal y como sucede con los $LT_{\alpha\beta}$, deben seguir un proceso de diferenciación y selección en el timo. Existen paralelismos en este proceso entre los $LT_{\alpha\beta}$ y los $LT_{\gamma\delta}$. Por ejemplo, a nivel genético el locus $TCR\delta$ se encuentra englobado dentro del locus $TCR\alpha$ ^(Chien YH_1987) y se ha comprobado que existe un precursor tímico común que puede dar lugar a ambas subpoblaciones ^(Dudley EC_1995).

Los $LT\gamma\delta$ fetales abandonan el timo en “oleadas” para asentarse en los epitelios, constituyéndose en linfocitos intraepiteliales (LIEs) donde jugarán un papel fundamental como primera línea de defensa ^(Peaudecerf L_2011). La primera de ellas coloniza la epidermis, donde dan lugar a las células T dendríticas epidermales (DETC); la segunda asienta en los epitelios pulmonar, genitourinario, hepático y peritoneal; finalmente, previo al parto y en los primeros años de vida estas células migran a los órganos linfoides y el intestino ^(Kisielow J_2013).

De manera característica estas células pueden realizar también una maduración extratímica en la mucosa intestinal ^{(Bandeira A_1991) (Parker CM_1990)}.

1.3.3. Distribución anatómica

Los $LT\alpha\beta$ son más frecuentes en **sangre periférica (SP)** (90-95%), bazo y nódulos linfoides. Sin embargo, los $LT\gamma\delta$ constituyen sólo una pequeña proporción (1-5%) de los linfocitos circulantes y en los órganos linfoides secundarios, encontrándose **fundamentalmente en los epitelios**, donde pueden constituir hasta el 50% de los linfocitos intraepiteliales (LIE) en la mucosa (10-20% en el epitelio genitourinario, 40-50% en el intestinal y hasta el 60% de las células T en la dermis) ^{(Haas W_1993) (Chien Y_2014) (Bonneville M_1988)}.

Sin embargo, durante las infecciones la proporción de $LT\gamma\delta$ en SP puede aumentar considerablemente hasta llegar a suponer el 60% de los LT circulantes ^{(Hara T_1992) (Perera MK_1994)}, pudiendo permanecer aumentados hasta cuatro meses tras algunas **infecciones** ^(Bertotto A_1993).

1.3.4. Subtipos y clasificación fenotípica

Los $LT\gamma\delta$ pueden clasificarse en **dos poblaciones** principales según la expresión del TCR: **$V\delta 1+$ y $V\delta 2+$** (también conocidos como $V\gamma 9V\delta 2$ por ser su fenotipo predominante). Los $V\delta 1+$ predominan en la piel ($V\gamma 5\delta 1$), el intestino ($V\gamma 7\delta 1$) y el aparato genitourinario ($V\gamma 6\delta 1$), mientras que los $V\delta 2+$ ($V\gamma 9V\delta 2$), son las células predominantes en sangre periférica ^{(Ferreira LM_2013) (Paul S_2015)}.

La mayoría de los $LT\gamma\delta$ periféricos son dobles negativos para CD4 y CD8 (CD4-CD8-); sin embargo, los $LT\gamma\delta$ intestinales (LIEi $\gamma\delta$) expresan con frecuencia el

marcador CD8+ (50 % de LI $\gamma\delta$), siendo común la expresión del homodímero CD8 $\alpha\alpha$, un marcador de diferenciación extratímica ^(Lefrançois L_1990).

Un porcentaje variable de LT $\gamma\delta$ periféricos expresan CD28 (coestimulador de los LT $\alpha\beta$) ^(Sperling AI_1993), CD40L (lo que implica su capacidad para interactuar con linfocitos B) ^(Homer AA_1995), o receptores de células NK como el NKG2D (que es un mediador de actividad citolítica) ^(Bauer S_1999).

Como otras células T existen diferentes subtipos de LT V γ 9V δ 2 según sus marcadores de superficie, sus acciones efectoras y su tendencia migratoria. Así los LT $\gamma\delta$ Naïve (**T-naïve** CD45RA+ CD27+) y los LT $\gamma\delta$ de memoria central (**T-cm** CD45RA-CD27+) suelen migrar hacia los órganos linfoides secundarios y carecen de funciones efectoras; mientras que los LT $\gamma\delta$ de memoria efectora (**T-em** CD45RA-CD27-) y los LT $\gamma\delta$ terminal diferenciados (**T-emra** CD45RA+ CD27-) son los encargados de acudir a los sitios de inflamación para desplegar su acción citotóxica y de producción de citoquinas ^(Dieli F_2003).

En los últimos años se han descrito otras subpoblaciones de LT $\gamma\delta$, como los LT $\gamma\delta$ productores de IL-17 que parecen tener un papel fundamental en la patogenia de ciertas enfermedades inmunitarias ^(Kisielow J_2013) y los LT δ 2 CD 56+, con mayor capacidad citolítica y de defensa frente a las infecciones ^(Qin G_2012).

1.3.5.Reconocimiento antigénico: el TCR $\gamma\delta$

El receptor de las células **T (TCR) es un heterodímero**, que puede ser formado por dos cadenas α y β , o γ y δ . Su expresión es **excluyente**, es decir, un LT sólo puede expresar una de esas dos variantes fenotípicas (LT $\alpha\beta$ o LT $\gamma\delta$). Este heterómero se asocia al complejo CD3 (marcador de los LT) en la membrana celular ^{(Li H_1998) (Allison TJ_2001)}.

Cada una de las cadenas de este heterodímero presenta una región constante (C) anclada a la membrana celular, y otra región variable (V). Las cadenas γ y δ del TCR (como el LT $\alpha\beta$) son codificadas mediante reordenamiento genético durante la maduración intratímica a partir de un “pool” de genes que codifican segmentos variables (V), de diversidad (D), de unión (J) y constantes (C) ^(Davis MM_1988). La diversidad de repertorio de los segmentos V γ y V δ es sin embargo mucho más pequeña que en los LT $\alpha\beta$ ^(Beetz S_2008).

Una característica estructural fundamental del TCR de los linfocitos T $\gamma\delta$ es su similitud a un anticuerpo ^(Rock EP_1994), lo que explicaría su capacidad de reconocer ciertos antígenos directamente de manera similar a estos ^(Chien YH_1996).

Además de reconocer antígenos proteicos no procesados, pueden reconocer **ligandos no peptídicos** como: proteínas virales ^(Bukowski JF_1994), superantígenos bacterianos como la enterotoxina A del estafilococo ^(Tanaka Y_1994), proteínas del shock térmico (HSP) ^(Multhoff G_1998), o moléculas MICA/B (MHC-class I related molecules) inducibles por estrés celular ^(Groh V_1998).

Esta plasticidad de los LT $\gamma\delta$ en el reconocimiento antigénico sin necesidad de procesamiento les confiere la capacidad de responder de manera rápida y amplia, reforzando su papel fundamental en la inmunidad innata.

1.3.6. Acciones específicas

Recientemente han sido descritas una serie de **funciones específicas** de los LT $\gamma\delta$ en la inmunoregulación: ^{(Vantourout P_2013) (Born WK_2006)}

Funciones específicas de los LT $\gamma\delta$ ^{(Vantourout P_2013)(Born WK_2006)}

- Respuesta rápida ante agentes microbianos en las mucosas
- Acción citotóxica directa
- Secreción de citoquinas proinflamatorias
- Activación de la respuesta inmune
- Estimulación y regulación de la inmunidad innata
- Actuación como células presentadoras de antígeno (CPA)
- Regeneración epitelial y curación de heridas

Tabla 1. Funciones específicas de los LT $\gamma\delta$

1) Capacidad de **respuesta rápida contra agentes microbianos en la primera línea de defensa** mediante el reconocimiento de fosfoantígenos, lípidos y proteínas no procesadas por el CMH ^{(Tanaka Y_1994) (Chien YH_1996)}.

2) **Acción citotóxica directa** ante células infectadas o tumorales mediante la secreción de perforinas y granzima B ^(Qin G_2009), independiente de anticuerpos ^(Alexander AA_2008). Incluso pueden opsonizar y fagocitar directamente células infectadas ^(Himoudi N_2012).

3) **Secreción de citosinas proinflamatorias**, sobretodo TH1, fundamentales para para el control de virus y bacterias intracelulares (como el IFN- γ o el TNF- α), o bacterias extracelulares y hongos (como la IL-17)^{(Tsuji M_1994)(Sutton CE_2012)}.

4) **Activación de la respuesta inmune** a nivel local promoviendo la maduración de las células dendríticas y la respuesta anti infecciosa de los macrófagos y las células NK ^{(Wands JM_2005) (Maniar A_2010)} y aumentando la capacidad de resistencia a la invasión de las células epiteliales ^(Jameson J_2007).

5) **Estimulación y regulación de la inmunidad innata**. Los LT $\gamma\delta$ pueden regular a otras las células implicadas en la respuesta inmunitaria innata mediante la producción de citoquinas inmunosupresoras como el TGF- β , o la IL-10 ^(Bonneville M_2010). Además pueden migrar a los órganos linfoides secundarios y colaborar con los linfocitos B en la producción de anticuerpos mediante la producción de CXCR5 (CXC chemokine receptor 5) ^{(Ansel KM_2000), (Schaerli P_2000)}; regular la actividad de los LT $\alpha\beta$ ^(Hayday A_2003) (de hecho los ratones deficientes en LT $\gamma\delta$, presentan una respuesta exagerada de LT $\alpha\beta$) ; o eliminar LT reguladores (T-reg) ^(Huber SA_2010).

6) Pueden actuar como **células presentadoras de antígeno**. Los LT $\gamma\delta$ pueden procesar y presentar antígenos de patógenos (células infectadas, virus) a otras células inmunitarias, como los LT $\alpha\beta$ ^{(Cheng L_2008) (Brandes M_2009)}.

7) **Regeneración epitelial y de curación de heridas**, estimulando la producción de hialurónico por las células epiteliales (que se deposita en la matriz extracelular y atrae a los monocitos y macrófagos) ^(Jameson JM_2005) o mediante la producción de factores de crecimiento epitelial -como el insulin-like growth factor (IGF-1), o el keratinocyte growth factor 1 y 2 (KGF-1, KGF-2) ^(Jameson JM_2004).

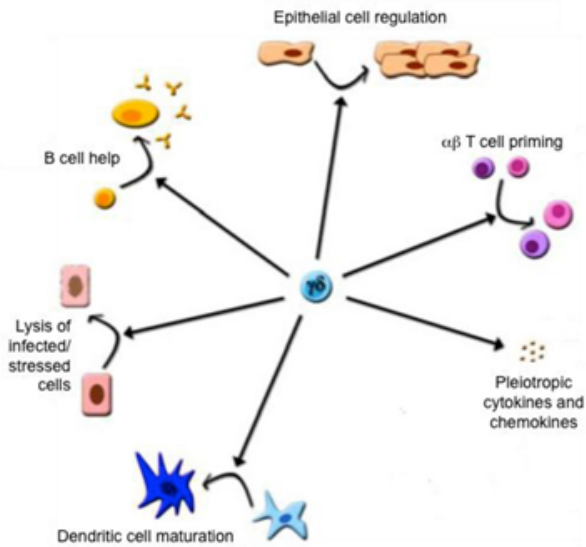


Fig. 7. Esquema de las funciones específicas de los $LT\gamma\delta$ (Vantourout P_2013)

1.3.7. Papel de los $LT\gamma\delta$ en la defensa contra las infecciones

Existen múltiples evidencias del papel fundamental de los $LT\gamma\delta$ en la respuesta inmune contra patógenos (Zhang J_2013) (Vedets S_2008).

a) Virus:

Aunque los mecanismos patogénicos no son totalmente conocidos, los efectos antivirales de estas células han sido confirmados en diversas infecciones víricas agudas y crónicas, tanto mediante el ataque de células infectadas como por la producción de citoquinas antivirales, especialmente el $IFN-\gamma$ (Picia F_2005).

Modelos murinos deficientes en $LT\gamma\delta$ han demostrado su importancia en el control de la infección aguda previa a la respuesta inmunológica adaptativa (Selin LK_2001).

Los pacientes post-trasplantados de riñón con infección por CMV presentan una importante reactividad contra las células infectadas y una expansión duradera de los $V\delta 2- LT\gamma\delta$. Varios trabajos han confirmado el papel protector de los $LT\gamma\delta$ en la infección por el virus influenza (Sin G_2012)(Qin G_2011), así como su capacidad para alcanzar inmunoprotección en pacientes infectados por el virus del Nilo occidental (West Nile Virus) a través de la estimulación de las células dendríticas (Fang H_2010).

También se ha estudiado su papel en la infección por el HIV. Los $V\gamma 1$ sufren una significativa expansión durante la infección por el HIV (De Paoli P_1991), y se ha

demostrado que estos pueden estimular a las células NK y ejercer acción catalítica directa sobre células infectadas (Wallace M_ 1996).

Los $LT\gamma\delta$ también actúan en el control de la infección por el virus de Epstein Barr (VEB) (De Paoli P_1990) y en la supresión del crecimiento tumoral inducido por el virus del papiloma humano (Mishra R_ 2010).

En el caso de la infección crónica por el virus de la hepatitis C, aunque existe una disminución de la población de $V\gamma9V\delta2$ en sangre periférica (Pár G_ 2002), se ha sugerido que la infiltración por linfocitos $V\gamma1$ activados en el tejido hepático podría acelerar la progresión de la enfermedad (Agrati C_ 2001).

b) Bacterias:

Los $LT\gamma\delta$ pueden reconocer múltiples antígenos bacterianos e iniciar una respuesta inmunitaria rápida contra ellos (Ferreira LM_ 2013).

Se ha demostrado su participación en la regulación de la respuesta inmune en múltiples infecciones bacterianas, incluyendo salmonelosis, brucelosis, legionelosis, tularemia, listeria, e infecciones por *Escherichia coli* (Zheng J_ 2013).

Además, la transferencia de $LT\gamma\delta$ activados ha mostrado efectos protectores frente a la infección por bacterias tanto Gram positivas (*Estafilococo aureus*), como Gram negativas (*E. coli* y *Morganella morganii*) en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (Wang L_ 2001).

La infección por algunas bacterias intracelulares, como *Mycobacterium tuberculosis* producen una expansión y activación de los $LT V\gamma9V\delta2$ mediante el aumento de la producción de metabolitos (como el IPP) en las células infectadas (Kabelitz D_1990).

Es más, los ratones carentes de $LT\gamma\delta$ sufren una respuesta inflamatoria granulomatosa aumentada y sostenida tras la infección tuberculosa por aerosol (D'Souza CD_ 1997), lo que refuerza su importancia en la patogenia de la enfermedad.

Recientemente se ha publicado un amplio estudio que demuestra el déficit de $LT\gamma\delta$ en SP de pacientes con sepsis, con una correlación significativa entre niveles bajos y mortalidad, especialmente relacionada con la depleción los $LT\gamma\delta$ con el fenotipo NK (CD56+) (Andreu-Ballester JC_ 2013).

c) Otros patógenos:

Aunque existe menos evidencia científica de la acción sobre otros patógenos, se ha constatado el papel protector de los $LT\gamma\delta$ en la malaria ^(Costa G_2011) y en la infección por *Toxoplasma Gondii*, protegiendo de la producción de ileítis ^(Egan CE_2005).

Los $LT\gamma\delta$ también parecen ofrecer protección frente a otros parásitos, como la afectación hepática por el *Trypanosoma cruzi* mediante la producción de interferón- γ ^(Sardinha LR_2006) o el *Cryptosporidium parvum* ^(Sardinha LR_2006).

También se ha demostrado su papel frente a hongos, como lo demuestra un aumento temprano y significativo de los $LT\gamma\delta$ tras la infección por *Encephalitozoon cuniculi* ^(Moretto M_2001).

1.3.8. Papel de defensa antineoplásica de los $LT\gamma\delta$

Los $LT\gamma\delta$, poseen una potente capacidad citotóxica independiente del CMH que les permite actuar **contra células tumorales hematopoyéticas y tumores sólidos** ^(Chiplunkar S_2009). De hecho, $LT\gamma\delta$ han sido aislados de entre los linfocitos intratumorales (LIT) de pacientes con tumores colorrectales, renales, prostáticos, ováricos, pulmonares así como de pacientes con neoplasias hematológicas como la leucemia o el mieloma múltiple ^(Beetz S_2007).

El mecanismo de reconocimiento y lisis de células tumorales no es totalmente conocido pero parece ser dependiente del TCR, y se encuentra modulado por la participación de otros receptores NK, como el NKG2D ^(Rincon-Orozco B_2005). Ligandos del NKG2D, como MICA o MICB y una ATPasa, expresados en células tumorales y no sanas, se unirían al TCR de los $LT\gamma\delta$ activando su acción antitumoral ^(Dieli F_2007).

Tras este reconocimiento, los $LT V\gamma9V\delta2$ secretan citoquinas pro-inflamatorias con acción antitumoral como el interferón gamma (IFN- γ) o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o incluso segregan citotóxicos como granzima B y perforinas contra células tumorales de epitelio de carcinoma escamoso ^{(Qin G_2009) (Alexander AA_2008)}.

La activación de los $LT\gamma\delta$ aumenta la expresión del ligando Fas (FasL) y del TRAIL (TNF -related apoptosis-induced ligand), por lo que pueden eliminar células tumorales Fas+ y TRAIL+ ^(Kondo M_2008).

Además son capaces de activar la actividad citotóxica dependiente de anticuerpos mediante la expresión de CD16 (que es un receptor para la fracción FC de las

inmunoglobulinas) (Gertner-Dardenne J_ 2009) y de estimular potentemente la actividad citotóxica de las células NK (Maniar A_ 2010).

Parece que los distintos subtipos de los $LT\gamma\delta$ desempeñan un papel distinto frente a tumores. Los $V\gamma 1+$ juegan un papel predominante en los tumores epiteliales, mientras que los $V\delta 2+$ se han relacionado más directamente con la defensa inmunitaria contra el carcinoma renal (Groh V_ 1999) (Kobayashi H_ 2001).

Modelos con ratones deficientes en $TCR\delta$ (carentes de $LT\gamma\delta$) presentan un aumento en la tasa de tumores cutáneos tras la exposición a carcinógenos químicos; y se ha demostrado su papel en la inmunovigilancia y control del desarrollo de linfomas de células B (Street SE_ 2004). Además, la adición de $LT\gamma\delta$ estimulados mejora la supervivencia tras el trasplante de carcinoma nasofaríngeo, melanoma, cáncer renal, pancreático o linfoma de Burkitt en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (Beetz S_ 2007).

1.3.9. Papel de los $LT\gamma\delta$ en las enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias

Los $LT\gamma\delta$ pueden jugar tanto un papel regulador y protector como deletéreo de las enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias (Su D_ 2013) (Paul S_ 2015).

Por ejemplo, un subtipo de $LT\gamma\delta$ (los $CD27+CD45RA-$) se encuentran disminuidos en pacientes con **lupus eritematoso** sistémico (LES), y se relacionan inversamente con los marcadores de actividad de la enfermedad, sugiriendo su papel inmunoregulador (Li X_ 2011) (Ponomarev ED_ 2005).

Sin embargo, los $LT\gamma\delta$ productores de IL-17 pueden agravar e inducir la inflamación en modelos de **artritis reumatoide** (AR). Esto se ha relacionado con su capacidad con su acción como CPA y la secreción de citoquinas proinflamatorias como el IFN- γ y la propia IL-7 (Hu C_ 2012).

Este subtipo también se ha relacionado con la patogenia de la **psoriasis** (Cai Y_ 2011) (Pantelyushin S_ 2012) y la **espondilitis anquilopoyética** (Kenna TJ_ 2012) como agentes proinflamatorios.

Contrariamente, los $LT\gamma\delta$ productores de IL-17 han demostrado un papel protector del desarrollo de **diabetes** en ratones NOD mediante la producción de TGF- β (Han, G_ 2010). Algunos autores, como Paul et al. proponen que la exposición de los

diferentes tipos de $LT\gamma\delta$ en diferentes microambientes de citoquinas en los tejidos inflamados, producirían la activación de distintos genes, con efectos opuestos (Paul S_2015).

El papel de los $LT\gamma\delta$ también ha sido estudiado en **enfermedades alérgicas**. Cairo et al comprobaron un aumento significativo de los $LT V\gamma9V\delta2$ en pacientes con dermatitis atópica que se correlacionó directamente con la gravedad de la enfermedad (Cairo C_2005) y existe evidencia de su papel inductor de la producción de IgE y la respuesta inflamatoria mediada por linfocitos B en el asma (Svensson L_2003).

Además, niveles altos de $LT\gamma\delta$ en el injerto del donante se han asociado a la aparición de la enfermedad de injerto contra huésped en el trasplante de células madre alogénico de sangre periférica (Pabst C_2005).

Los niveles séricos de $LT\gamma\delta$ en pacientes adultos con **enfermedad celíaca** también se encuentran disminuidos (Dunne MR_2013). Estudios en el modelo experimental de la **esclerosis múltiple** (EM) muestran resultados interesantes sobre el papel regulador de la gravedad y la duración de la inflamación de los $LT\gamma\delta$, indicando su potencial como posible diana terapéutica en la enfermedad (Ponomarev ED_2005).

1.3.10.a. $LT\gamma\delta$ en la terapia antitumoral

Es bien conocido que los tumores pueden ser controlados de manera natural por el sistema inmune. La mayoría de las terapias inmunológicas contra el cáncer se basan en inducir o aumentar las respuestas adaptativas contra tumores específicos de los linfocitos B y de los linfocitos T $\alpha\beta$ (sobre todo los CD8+) restringidas por el CMH (Smyth MJ_2006) (Gattinoni L_2006).

Sin embargo, a pesar de los avances en este campo las respuestas sostenidas son infrecuentes, y los tumores despliegan mecanismos de inmune-evasión como la disminución de la producción de antígenos asociados, del CMH, o de moléculas coestimuladoras (Gattinoni L_2006).

El hecho de que los $LT\gamma\delta$ puedan reconocer péptidos no antigénicos sin necesidad del CMH, su menor dependencia de moléculas coestimuladoras (como el CD28) y su potente **acción antitumoral** demostrada en modelos murinos, los hacen candidatos muy interesantes para el desarrollo de terapias inmunológicas contra el

cáncer *(Bonneville M_2010)*. Ello ha estimulado el estudio del empleo de los $LT\gamma\delta$, especialmente la subpoblación $V\gamma9V\delta2$, como terapia inmunológica antitumoral en humanos.

Los $LT\gamma\delta$ son estimulados por pequeños metabolitos no fosforilados producidos por diversos microorganismos conocidos como **fosfoantígenos (FA)** *(Gomes AQ_ 2010)*. De entre ellos, el HMBPP (E-4-metil-butenil-pirofosfato), un subproducto de la síntesis de isoprenoide por vía no mavelonato sintetizado por bacterias y protozoos, es su más potente activador, pudiendo estimular a los $LT\gamma\delta$ a concentraciones nanomolares *(Tanaka Y_1995)*. Estas células son también activadas a mucho mayores concentraciones por el isoprentenil pirofosfato (IPP), un derivado producido por células eucariotas de la vía metabólica del mavelonato *(Nedellec S_ 2010)* *(Tanaka Y_ 1995)*. Se ha demostrado que las células tumorales presentan una mayor concentración de IPP, lo que permite el reconocimiento por los $LT\gamma\delta$ y el inicio de la respuesta antitumoral *(Gober HJ_2003)* *(Bonneville M_ 2006)*.

Los aminobifosfonatos (ABF) como el Alendronato (Fosamax®), Pamidronato (Aredia®) o el Zolendronato (Zometa®), (de actual empleo en la clínica para el tratamiento y prevención de la osteoporosis), y las alquilaminas, se han empleado para la activación de estos linfocitos en vivo y en vitro, aumentando su capacidad antitumoral *(Dieli F_ 2007)*. Este efecto lo consiguen mediante la activación indirecta de los $LT\gamma\delta$ aumentando la concentración intracelular de los FA, como consecuencia de la inhibición de la enzima de la vía del mavelonato farnesil-difosfato-sintasa *(Thompson K_ 2006)**(Chiplunkar_2009)*. También existen derivados de fosfoantígenos sintéticos como el bromohidrin-pirofosfato BrHPP (Phosphostim®) o el cHDMAPP (Picostim®), que se han empleado con éxito para estimular directamente los $LT\gamma\delta$ *ex-vivo* *(Bennouna J_2008)*.

Se han empleado **dos estrategias** distintas para el empleo de los $LT\gamma\delta$ como inmunoterapia antitumoral: 1) transferencia de $V\gamma9V\delta2$ autólogos activados *ex vivo*; y 2) inducción de la expansión de $V\gamma9V\delta2$ *in vivo*.

Transferencia de V γ 9V δ 2 autólogos activados ex vivo:

Bennouna et al. activaron los LT V γ 9V δ 2 de carcinoma renal metastásico in vitro y comprobaron que la inyección de nuevo de estos en los pacientes carecía de efectos secundarios importantes (Bennouna J_2008). En otro estudio piloto con pacientes de cáncer renal avanzado, la expansión de LT V γ 9V δ 2 activados con fosfoantígeno sintético 2M3B1PP e IL-2 recombinante (teceleucina) fue bien tolerado e indujo efectos antitumorales en el 50% de los pacientes (Kobayashi H_2007). Resultados similares se reprodujeron en otro ensayo clínico fase II/III en con cáncer renal avanzado empleando LT V γ 9V δ 2 activados con 2M2B1PP, e inyectándolos de nuevo junto a zolendronato y teceleucina (Kobayashi H_2011).

Inducción de la expansión de V γ 9V δ 2 in vivo

El empleo de pamidronato con IL-2 intravenoso logró una remisión parcial en 3 de 9 pacientes con mieloma múltiple y linfomas no Hodgkin de bajo grado (Wilhelm M_2003).

El uso de zolendronato y dosis bajas de IL-2 en pacientes con cáncer de mama metastásico y en cáncer prostático metastásico fue bien tolerado y produjo una activación y maduración sostenida de los LT $\gamma\delta$, que además se correlacionó con mejores respuestas clínicas (Meraviglia S_2010) (Dieli F_2007).

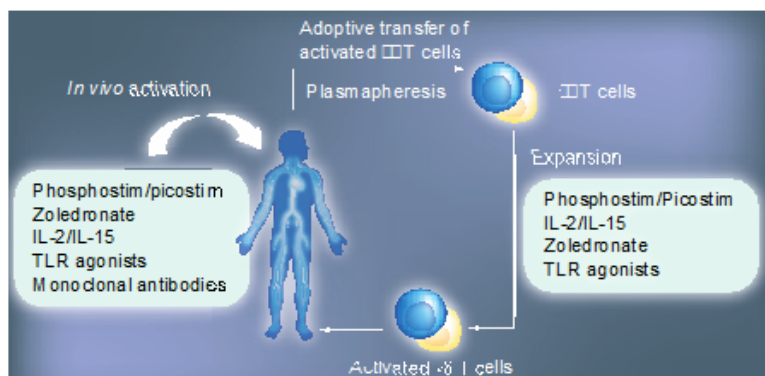


Fig. 8. Esquema de los mecanismos de activación de los LT $\gamma\delta$ para su uso en inmunoterapia (Chiplunkar S_2009).

1.3.10.b. LT $\gamma\delta$ en la terapia anti-infecciosa.

Aunque la mayoría de estudios con V γ 9V δ 2 con intención terapéutica se han llevado a cabo en cáncer, estas células también se han empleado con éxito en el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas.

Los LT $\gamma\delta$ activados han demostrado actividad contra varias cepas del virus influenza mediante la lisis directa de células infectadas y la producción de citoquinas específicas ^(Qin G_2009), que además pueden ser estimuladas por medio de bifosfonatos ^(Tu W_2011).

Además, estas células activadas pueden mejorar la inmunocompetencia en pacientes infectados por el HIV naive a antiretrovirales, abriendo nuevas posibilidades terapéuticas en la infección ^(Poccia F_2009).

En un reciente estudio fase II el tratamiento repetido con fosfoantígenos redujo hasta el 50% de la carga viral en pacientes con infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC), probablemente por el aumento de la producción de IFN gamma por los LT $\gamma\delta$ activados ^(Zarski J_2009).

Las propiedades antibacterianas de estas células también han sido también empleadas. En un estudio realizado en macacos se ha demostrado que la administración de activadores de estas células logra la migración de LT $\gamma\delta$ activados a los alveolos previniendo la formación de hemorragias y placas neumónicas tras la inoculación de *Yersinia Pestis* ^(Huang D_2009).

1.3.11. Los LT $\gamma\delta$ en la patogenia de la EC

Modelos animales de colitis inducida en ratones, así como estudios en sangre periférica y mucosa de pacientes han revelado la importancia de los LT $\gamma\delta$ en la enfermedad ^(Boismenu R_1999). Sin embargo no existe consenso sobre su papel, habiéndose descrito tanto efectos protectores como inductores de la inflamación.

1.3.11.a. Estudios que atribuyen a los LT $\gamma\delta$ un papel protector de la inflamación intestinal

Estudios preclínicos:

Varios estudios atribuyen a los $LT\gamma\delta$ un papel protector de la inflamación intestinal (Chan Y_2002) (Nagaki-Ohara K_2004) (Egan CE_2011).

Este papel protector se basa en la demostración de ciertas características específicas: 1) su capacidad **reparadora del tejido epitelial** mediante la producción de KGF (keratin growth factor, que estimula la proliferación de células epiteliales, su regulación y diferenciación) (Boismenu R_1994)(Komano H_1995) ; 2) sus efectos **inmunoreguladores** -como la producción de TGF- β - (Chen Y_2002); 3) la disminución de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad **MHC II** (Komano H_1995); 4) su papel en la **tolerancia oral** tras la administración de antígenos (Ke Y_1997); 5) su capacidad de potenciación de las respuestas mediadas por **IgA** (Fujihashi K_1999); 6) su papel inmunoregulador protector de la mucosa en las infecciones -como *Micobacterium tuberculosis*, *Listeria spp.* o *Nocardia spp.*- (Hayday A_2003) ; y 7) su efecto supresor de los $LT\alpha\beta$ (Peng SL_1997).

Funciones antiinflamatorias de los $LT\gamma\delta$

- Capacidad reparadora del tejido epitelial mediante la producción de KGF (Boismenu_R_1994)
- Efectos inmunoreguladores (producción de TGF- β) (Chen_Y_2002)
- Disminución de la expresión MHC II (Komano_H_1995)
- Papel en la tolerancia oral tras la administración de antígenos (Ke_Y_1997)
- Potenciación de las respuestas mediadas por IgA (Fujihashi_K_1999)
- Inmunoregulación y protección de la mucosa en las infecciones (Hayday_A_2003)
- Efecto supresor de los efectos proinflamatorios de los $LT\alpha\beta$ (Peng_SL_1997)

Tabla 2. Principales efectos inmunomoduladores antiinflamatorios de los $LT\gamma\delta$ en estudios preclínicos.

Chen Y et al. demostraron por primera vez el papel de los linfocitos intraepiteliales (LIE) $\gamma\delta$ como protectores de la colitis en un modelo murino de colitis inducida por DSS (dextran sodium sulfate). Se observó que grandes cantidades de $LT\gamma\delta$ (pero no de $LT\alpha\beta$) podían localizarse en los lugares de daño intestinal, y que eran capaces de proteger de la colitis estimulando la reparación tisular por vía de la expresión de KGF *(Chen Y_2002)*. Trabajos posteriores confirman su papel protector en colitis inducida por DSS mediante el control de la infiltración por neutrófilos *(Tsuchiya T_2003)*.

Empleando ratones deficientes en $LT\gamma\delta$ ($C\delta^{-/-}$), **Inagaki-Ohara** et al. confirmaron que los (LIE) $\gamma\delta$, juegan un papel protector del desarrollo de colitis *(Inagaki-Ohara K_2004)*. Su ausencia aumenta la susceptibilidad a la colitis inducida por TNBS (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid), y más importante, la transferencia de $LT\gamma\delta$ disminuye la gravedad de la colitis y la mortalidad.

Otros estudios experimentales como el de **Szczepanik** et al. en modelos murinos de EII también sugieren que son los $LT\alpha\beta$ y no los $LT\gamma\delta$ los responsables de inducir colitis tras su transferencia selectiva *(Szczepanik M_2000)*.

Existen 4 trabajos clave del grupo alemán de **Hoffmann y Kühn** et al. que apuntan a un papel protector de la inflamación de los $LT\gamma\delta$ en diferentes modelos murinos de EII. Primero demostraron que la depleción de $LT\gamma\delta$ con anticuerpos monoclonales (y no de $LT\alpha\beta$ o LT colaboradores) aumentaba la severidad e incluso la mortalidad de la colitis inducida por TNBS *(Hoffmann JC_2001)*. En un segundo trabajo se emplearon dos modelos de ratones, uno de colitis distal inducida por TNBS intrarrectal y otro con ratones $TNF\Delta ARE/+$ que presentan una ileítis transmural similar a la EC con manifestaciones extraintestinales (artritis). Al depleción los ratones de $LT\gamma\delta$ mediante anticuerpos monoclonales se producía un agravamiento claro de la colitis y la mortalidad inducida por TNBS, sin clara mejoría de la aleítis en ratones $TNF\Delta ARE/+$ (aunque se observó un empeoramiento histológico –no estadísticamente significativo- y niveles menores de $TGF-\beta$) *(Kühn AA_2002-2003)*.

Un trabajo posterior comprobó su papel protector de la colitis en 2 modelos murinos similares a CU (DSS y ratones IL-2 k.o.), y una mejoría histológica clara en un modelo similar a EC ($TNF\Delta ARE/+$). Los autores demuestran que los $LT\gamma\delta$ son

capaces además de controlar la producción de IFN- γ por los LT $\alpha\beta$ (Kühl A_2007).

Por último Hoffman et al. abrieron la puerta al empleo de los LT $\gamma\delta$ como terapia inmunológica en la EII al demostrar que la infusión de estos linfocitos producía una mejoría histológica y disminuía la mortalidad en un modelo murino de colitis inducida por TNBS –como ya describió Inagaki-Ohara et al. (Inagaki-Ohara K_2004), a través de la disminución de la producción de TNF- α y el aumento de IL-10 y TGF- β (Hoffmann JC_2008).

Estudios en pacientes con EII

Tres estudios han comprobado un descenso de los LT $\gamma\delta$ en la mucosa intestinal de pacientes con EC (Fukushima K_1991) (Bucht A_1995) (Lee HB_1997).

Fukushima et al. observaron una disminución significativa de LT $\gamma\delta$ en la mucosa de los pacientes con EC y CU con respecto a controles. El ratio de los linfocitos intraepiliales (LIE) LT $\gamma\delta$ fue de 13% en EC vs 36% en controles, y el de linfocitos de la lámina propia (LPL) de 4% en EC vs 15% en controles. La mayoría de los LPL fueron CD4(-)CD8(-) (Fukushima K_1991).

Bucht et al. describieron una disminución de los LT $\gamma\delta$ en la mucosa inflamada con respecto a la mucosa sana en 4 pacientes con EC y 2 con CU. Los autores interpretan que estos hallazgos pueden deberse a la destrucción de la barrera epitelial o a una expansión local en la mucosa inflamada de los LT $\alpha\beta$ (Bucht A_1995).

Lee et al. demostraron un descenso significativo de las subpoblaciones CD3+, TCR $\alpha\beta$, y TCR $\gamma\delta$ en la mucosa de los pacientes con EC con respecto a controles. Se comprobó además un descenso significativo de los LT $\gamma\delta$ en pacientes con EC en comparación con los pacientes con CU, lo que sugeriría un papel diferente de esta subpoblación en ambas enfermedades (Lee HB_1997).

Un **reciente trabajo** estudió por primera vez las moléculas encargadas de la migración intestinal de los LT $\gamma\delta$ de sangre periférica de pacientes con EC y CU activa vs controles. Se demostró que tanto los LT $\gamma\delta$ de sujetos sanos como de EII activa expresan la molécula $\beta 7$, encargada de la migración al intestino, y que los pacientes con EII presentan una expresión aumentada la expresión de CCR9 (corresponding chemokine receptor-9), un marcador de migración específica hacia

el intestino delgado. Estos datos parecen indicar que, efectivamente, existe un reclutamiento desde la sangre periférica a las zonas inflamadas ^(Mann ER_2012).

1.3.11.b. Estudios que atribuyen a los LT $\gamma\delta$ un papel activador de la inflamación intestinal

Estudios preclínicos:

Simpson et al. sugirieron la posibilidad de que los LT $\gamma\delta$ pudieran contribuir a la inflamación en EII al demostrar que su infusión de los mismos en ratones carentes de LT (ratones tg ϵ 26), era capaz de producir colitis mediante una respuesta Th1, fundamentalmente mediante la producción de IFN- γ ^(Simpson SJ_1997).

En la misma línea, estudios en ratones TCR α -/- que desarrollan espontáneamente una colitis similar a la UC mejoraron la inflamación tras la eliminación de los LT $\gamma\delta$ ^(Kawaguchi-Miyashita M_2001).

Otros trabajos han demostrado el papel de los LT $\gamma\delta$ en la diferenciación hacia Th17 de linfocitos colitogénicos CD4+, pudiendo contribuir a la colitis en ratones inmunodeficientes ^(Do JS_2011). Este fenómeno ya se había comprobado previamente en modelos de encefalomiелitis autoinmune ^(Sutton CE_2009) y en artritis colágena inducida ^(Ito Y_2009). Este subtipo de los LT $\gamma\delta$ podría empeorar la colitis mediada por la IL-7 por falta de supresión por los Treg ^(Park SG_2010).

Estudios en pacientes con EII

Yeung et al. demostraron la presencia significativa de LT $\gamma\delta$ activados en los agregados linfoides de los pacientes con UC, que existía una relación directa entre su número y la gravedad de la inflamación ^(Yeung MM_2000). La mayoría expresaban V δ 1 y eran CD4(-)CD8(-). Los autores argumentan que estos hallazgos ponen en evidencia su papel deletéreo en la UC, probablemente por su capacidad citotóxica. Hallazgos similares se han descrito en otras enfermedades: los LT $\gamma\delta$ V δ 1 se encuentran elevados en la enfermedad celíaca activa ^(Halstensen TS_1989), en las lesiones cutáneas de la lepra ^(Uyemura K_1992) o en el tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide ^(Söderström K_1994).

Otros estudios han demostrado que existe un aumento de LT $\gamma\delta$ V δ 1+ capaces de

producir IFN- γ e interactuar con los fibroblastos en las áreas inflamadas y de lesión tisular con respecto a áreas no inflamadas en una amplia serie de muestras quirúrgicas en EC, en CU y diverticulitis. Los autores se inclinan a pensar que estos linfocitos pueden derivar de los LT $\gamma\delta$ V δ 1+ circulantes en sangre periférica con propiedades migratorias a través del endotelio ^(McVay LD_1997).

1.3.11.c. Niveles séricos linfocitarios y de LT $\gamma\delta$ en Enfermedad de Crohn

Los primeros estudios de poblaciones linfocitarias se llevaron a cabo en los años 70. **Strickland et al.** en 1974 empleó antisuero contra timocitos humanos y observó una disminución del porcentaje de LT en SP en pacientes con EC y una proporción normal en CU ^(Strickland RG_1974). **Sorensen** et al. empleando la técnica de roseta de eritrocitos de carnero informaron resultados similares -niveles normales de LT en CU y niveles bajos de todas las subpoblaciones T en EC- ^(Sorensen S_1977).

El primer estudio con anticuerpos monoclonales para identificar subpoblaciones en 54 pacientes con EII (28 UC y 26 EC) fue publicado en Gut en 1983 ^(Selby WS_1983). En él, **Selby** et al. demuestran que :1) la proporción de LT está disminuida tanto en EC como en CU, tanto en actividad como en remisión; 2) el número de linfocitos OKT3+ (CD3+) fue significativamente menor en pacientes con CU activa y EC activa; 3) los linfocitos OKT4+ (CD4+) fueron significativamente más bajos en pacientes con CU activa y en remisión y EC activa ; 4) los linfocitos OKT8+ (CD8+) fueron menores significativamente sólo en EC; 5) la proporción CD4+/CD8+ no difirió con respecto a controles; 6) ninguno de los parámetros estudiados se relacionó con variables clínicas como la localización, la actividad o el tratamiento.

Otros autores confirmaron la disminución de los LTCD3+ y CD4+ en EC, aunque no encontraron diferencias en los niveles de LT CD8+ ^(Pallone F_1983).

El estudio de **Senju** et al. , que incluyó exclusivamente pacientes no tratados con inmunosupresores –corticoides o inmunosupresores- (91 pacientes, 60 UC y 31 EC), mostró niveles normales de LT en EC, y tan sólo niveles bajos en CU activa, con proporciones normales de CD4+/CD8+ en ambas enfermedades ^(Senju M_1991). En la misma línea, **Giacomelli** et al. también encontraron niveles normales de LT en

una población pequeña de pacientes con EII (15 UC y tan sólo 9 con EC) ^(Giacomelli R_1994). No hubo diferencias en los LT CD4+, pero los LT CD8+ estaban reducidos en los pacientes. En este estudio se analizó por primera vez la subpoblación de LT $\gamma\delta$ (subtipo TCR δ 1) en sangre periférica, detectándose un aumento de su porcentaje en pacientes con enfermedad activa vs pacientes en remisión y controles. Este incremento significativo se mantuvo en pacientes con EC en actividad vs remisión.

Bucht et al. constataron un aumento de los LT $\gamma\delta$ en SP en un subestudio con sólo 3 pacientes ^(Bucht A_1995). En un estudio posterior del mismo grupo con una muestra mayor se comprobó que los niveles séricos seguían aumentados en EC con respecto a controles ^(Söderström K_1996).

Nuestro grupo publicó un estudio previo en el que se comparaban los niveles séricos de diferentes poblaciones linfocitarias en 40 pacientes con EC y 40 controles ^{(Andreu-Ballester JC_2011) (Anexo X)}. Se llegó a las siguientes conclusiones: 1) Existe un descenso global de los linfocitos en pacientes con EC; 2) Se constata un descenso significativo de los LT $\gamma\delta$, especialmente los CD8+; 3) Este descenso se constata independientemente de la actividad de la enfermedad (remisión o enfermedad activa), y de los tratamientos empleados. Estos datos plantearon por primera vez la posibilidad de que exista una alteración inmunitaria en EC que afecte a esta subpoblación, corroborando los datos obtenidos en estudios experimentales en ratones ^{(Fukushima K_1991) (Bucht A_1995) (Lee HB_1997)}.

1.4. La interleuquina 7 (IL-7)

1.4.1. Aspectos generales de IL-7

La IL-7 (peso molecular de 25 KDa) se identificó por primera vez como factor estimulador de los linfocitos en **1989** (Goodwin RG_ 1989) (Goodwin RG_ 1989). El gen que la codifica se localiza en el cromosoma **8q12-13** (Sutherland GR_1989) y pertenece a la familia de **hematopoyetinas de clase 1** que comparten la señalización mediante las cadenas γ (γ C) -junto a IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-15, IL-21 y el factor estimulador de colonias granulocíticas y macrófagos GM-SCF (Fry TJ_2002).

Es una mal llamada interleucina ya que se produce fundamentalmente por las células del estroma no hematopoyéticas y por las células epiteliales de la médula ósea y el timo; y fuera de los órganos linfoides en las células epiteliales hepáticas e intestinales, fibroblastos, queratinocitos y células musculares lisas (Capitini CM_2009). Las células dendríticas y los macrófagos producen también IL-7, pero en menores cantidades (Fry TJ_2002). IL-7 se expresa en la mayoría de órganos corporales, incluyendo el cerebro (Michaelson MD_ 1996).

Para actuar se une al **receptor de IL-7 (IL-7R)**, que es un heterodímero formado por una cadena alfa (IL-7R α o CD 127) y otra gamma que es común al grupo 1 de citoquinas (γ C o CD 132) (Lundström W_ 2012). El CD127 es compartido con la linfopoyetina del estroma tímico (TSLP). Este receptor se expresa abundantemente en los LT maduros, en las células dendríticas y los macrófagos, y en algunas subpoblaciones de linfocitos B (pero no en linfocitos B maduros) (Capitini CM_2009). Su estimulación activa la señalización intracelular por vía de las tirosin-kinasas (como JaK/STAT) (Palmer MJ_ 2008).

Los mecanismos reguladores de IL-7 son poco conocidos. Se sabe que tras su producción por las células estromales y epiteliales se une a la matriz extracelular - glucosaminglicanos, heparan-sulfato y fibronectina- lo que parece regular su disponibilidad y modular sus efectos en el microambiente tisular (Clarke D_ 1995) (Ariel A_1997).

(Fry TJ_2005), y que el transforming growth factor (TGF- β) es capaz de inhibir su expresión (Tang J_1997) y viceversa (Dubinett SM_ 1995). Sin embargo la significación y los mecanismos de esta regulación recíproca no se han esclarecido totalmente (Fry TJ_2002). La **deficiencia de IL-7** se asocia con **linfopenia y disfunción de los LT naïve y memoria** (Mazzucchelli R_ 2007), lo que da una idea de su importancia en la regulación linfocitaria. De hecho, actualmente la IL-7 se considera el factor más importante para la estimulación y homeostasis de los LT (Bekiaris V_2014).

1.4.2. Acciones de IL-7

Activación y desarrollo de los linfocitos B

La IL-7 se descubrió inicialmente como estimulador del desarrollo de linfocitos B (LB) inmaduros en modelos murinos (Goodwin RG_1989). Parece que su papel es menos importante en humanos, como lo demuestra el hecho de que los pacientes con inmunodeficiencia combinada grave (SCID), que sufren mutaciones en el IL-7R α , tienen cifras normales de LB (Puel A_ 1998). Otros trabajos han mostrado sin embargo que los linfocitos pro-B proliferan en respuesta a IL-7 (Dittel BN_ 1995).

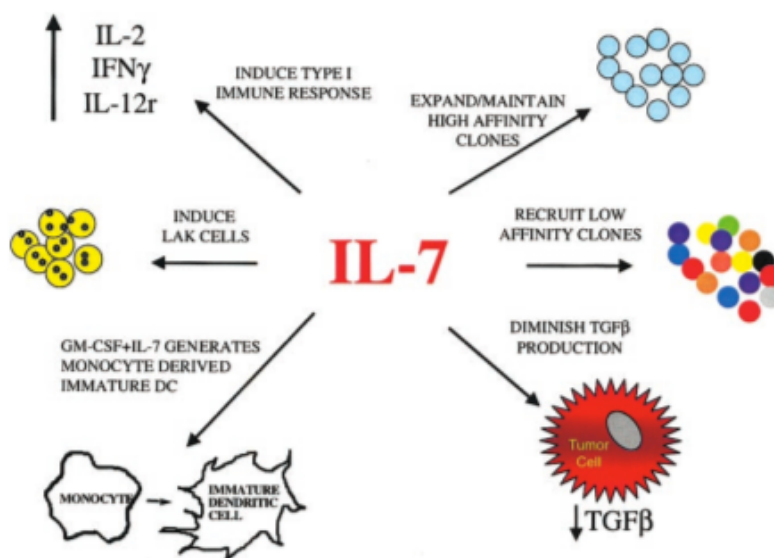


Fig. 9. Esquema de las principales acciones inmunomoduladoras de la IL-7 (Fry

Desarrollo, activación y homeostasis de los linfocitos T

1. Activación y desarrollo de LT inmaduros:

La IL-7 juega un papel importante en el desarrollo intratímico de los LT, y puede inducir la **supervivencia y la proliferación de timocitos** en cultivo (Watson JD_ 1989) (Conlon PJ_1989). Bhatia et al demostraron que el empleo de un anticuerpo recombinante anti-IL-7 durante 12 semanas en ratones producía una disminución de la celularidad en el timo de casi el 99% (Bhatia SK_ 1995), mientras que el empleo de IL-7 recombinante exógena produce un aumento significativo de la celularidad tímica tras el trasplante singénico de médula ósea (incluyendo los LT maduros) (Abdul-Hai A_ 1996) (Mackall CL_ 2001). También se ha comprobado su efecto antiapoptótico en los timocitos en ratones IL-7 -/- (von Freeden-Jeffry U_1997), lo que da una idea de sus múltiples mecanismos efectores en la linfopoyesis.

2. Activación de los LT maduros

IL-7 modula también la función de los LT maduros, **umentando la supervivencia de poblaciones naïve y memoria**, pero no efectoras, y regulando el “pool” de linfocitos (Seddon B_2003). Además estimula la producción de citoquinas, sobretudo TH1 (IFN- γ e IL-2), inhibe la apoptosis, y produce un incremento de la actividad lítica de los LTCD8+, las células NK, las células NKT y los LT $\gamma\delta$ (Kittipatarin C_2007)(Fry TJ_2002). Otros trabajos demuestran que también puede activar una respuesta Th2, con aumento de citoquinas “antiinflamatorias” como IL-10 (Sin J-I_2000).

3. Regulación de la homeostasis de los LT

La IL-7 es un factor clave para la supervivencia de los LT, ya que estimula su **producción tímica** y es capaz de modular su **expansión periférica homeostática (HPE)** regulando la actividad pro y anti-apoptótica de los miembros de la familia

Bcl-2 (Jiang Q_ 2005) (Capitini CM_ 2009). En situaciones de linfopenia su producción es estimulada e inducida por antígenos de baja afinidad (Fry TJ_ 2001).

Los LT expresan el receptor para IL-7 (IL-7R) y consumen la IL-7 del sistema. Cuando se establece un equilibrio entre la producción y el consumo de IL-7 se estabiliza el pool de LT. Por tanto, la disminución del consumo de IL-7 por los LT produce un aumento de su producción en un mecanismo de feedback recíproco (Mazzucchelli R_ 2007) (Fry TJ_ 2001).

Esta regulación se ha verificado en estudios preclínicos. Los ratones que no son capaces de producir IL-7 sufren una inmunodeficiencia severa (von Freeden-Jeffry U_ 1997), y los niveles elevados de IL-7 en condiciones de linfopenia produce la transformación de LT naive en LT efectores memoria (Tem) que causan inflamación intestinal (Totsuka T_ 2007) (Tomita T_ 2009).

Por tanto, La rIL-7 puede emplearse para aumentar las poblaciones T en situaciones de linfopenia. De hecho, su administración incrementa la expansión de los LT tras el trasplante de médula ósea o la quimioterapia en ratones (Morrissey PJ_ 1991).

Este efecto sobre los LT se ha estudiado también en situaciones clínicas que cursan con linfopenia. Bolotin et al demostraron una elevación en los niveles de IL-7 circulante en niños tras un **trasplante alogénico de médula ósea** (Bolotin E_ 1999), y otros estudios constatan un aumento de IL-7 en el suero de pacientes con **VIH** y niveles bajos de LTCD4+, con una relación inversa entre ambos (Fry TJ_ 2001). Esto también ocurre tras el tratamiento antiviral o en la linfopenia post-quimioterapia con una tendencia a normalizar los niveles de IL-7 a medida que se recuperan los niveles de los LTCD4+ (Napolitano LA_ 2001) (Fry TJ_ 2001). No se conoce en la actualidad si la depleción de LTCD8+ por sí sola es suficiente para incrementar los niveles de IL-7.

Es interesante la observación de que algunos pacientes con linfopenia idiopática y VIH presentan niveles anormalmente bajos de IL-7 en comparación con los niveles de LTCD4+ presentes (Teixeira L_ 2001), lo que sugiere que los niveles de IL-7 bajos podrían ser la causa primaria de esa linfopenia.

4. Papel en el desarrollo de los LT $\gamma\delta$

IL-7 juega un papel crucial en el desarrollo de los LT $\gamma\delta$. De hecho, en ratones deficientes en IL7R α (en los que el efecto de la IL-7 está completamente inhibido) , los LT $\gamma\delta$ no se detectan ^{(Maki K_1996). (He YW_1996)}. Además la IL-7 es necesaria en estadios tempranos para la producción de los LT $\gamma\delta$, ya que controla la accesibilidad del locus del TCRT γ a la V(D)J recombinasa ^(Schlissel MS_2000). Baccala et al. demostraron que, además de en la diferenciación, la IL-7 es junto a la IL-15 clave en su mantenimiento y homeostasis ^(Baccala R_2005) y Laky et al. corroboraron que la IL-7 expresada por las células epiteliales intestinales es capaz de inducir el desarrollo de los LT $\gamma\delta$ intestinales, demostrando su papel en la maduración extratímica de estas células ^(Laky K_2000).

La IL-7 también es capaz de estimular el desarrollo de las células dendríticas tímicas ^(Varas A_1998), y de movilizar progenitores hematopoyéticos de monocitos de la médula ósea al bazo ^(Grzegorzewski KJ_1995).

1.4.3. Posibilidades terapéuticas de la IL-7 recombinante

Las amplias acciones efectoras e inmunomoduladoras sobre los LT reseñadas anteriormente hacen de la IL-7, y especialmente del empleo clínico de la IL-7 recombinante una estrategia novedosa para el tratamiento de las alteraciones clínicas que cursan con linfopenia. Los principales escenarios clínicos posibles han sido resumidos recientemente por Capitini et al. ^(Capitini CM_2009) e incluyen :

1. "Rejuvenecer" el repertorio de LT en población anciana que va a ser sometida a procesos que comprometan las poblaciones linfocitarias como un tratamiento con quimioterapia, inmunosupresores, trasplante de médula ósea o que sufran infecciones víricas crónicas ^(Aspinall R_2006). Para ello podría aprovecharse su capacidad única de expandir los LT naïve.

2. Tratamiento del HIV. Por su capacidad de aumentar los LT CD4+, diana de la infección (Nunnari G_ 2005). De hecho, en macacos infectados por el SIV (simian immunodeficiency virus), el tratamiento con IL-7 produce un aumento significativo de las subpoblaciones LTCD4+, particularmente de el subtipo naive (Fry TJ_ 2003). Además IL-7 puede potenciar la respuesta citolítica de los LTCD8+ contra el virus, proteger contra la depleción de poblaciones LTCD4+ (Vassena L_ 2007) y potenciar los efectos del IFN- α contra la replicación del VIH (Audigé A_2005). Una de las posibilidades que se han apuntado de que los niveles altos de IL-7 observados en pacientes VIH no sean eficaces es la disminución de la expresión del IL-7R en los LTCD4+ y CD8+ durante la infección (Boutboul F_ 2005).

Se han publicado dos ensayos clínicos con IL-7 recombinante (rIL-7) en VIH. En el primero se estudió su seguridad y eficacia en pacientes VIH tras tratamiento con terapia antiviral HAART que no habían logrado restaurar los valores normales de linfocitos tras el tratamiento (Levy Y_ 2009). La rIL-7 se administró por vía subcutánea 3 veces a la semana en 16 días y en 2 diferentes dosis. Se comprobó que rIL-7 fue bien tolerada, con sólo efectos secundarios menores, además de objetivar un aumento significativo de los niveles de LT CD4+ y CD8+ de los subtipos naïve y memoria. En el caso de los LT CD4+ este aumento se mantuvo hasta 45 semanas tras el tratamiento.

En el segundo, un ensayo fase 1 para valorar dosis de rIL-7 en pacientes con HIV, tras sólo una dosis subcutánea se observó un aumento de los niveles circulantes de LTCD4+ y LTCD8+ (predominantemente del tipo central-memoria), sin alteración de los LT reguladores (Sereti I_ 2009).

Otros trabajos sin embargo alertan de la posibilidad de que niveles elevados de IL-7 puedan ser deletéreos produciendo una disminución de los CD4+ por aumento de la apoptosis por vía Fas (Fluur C_2007), aunque es posible que la disminución transitoria de los LTCD4+ 1-2 días tras la inyección se deba a la migración de linfocitos a los órganos periféricos. Este proceso de “homing” se ha descrito recientemente en

macacos rhesus ^(Beq S_2009).

3. Trasplante de médula ósea. Estudios preclínicos han demostrado la capacidad de IL-7 de restaurar los niveles y la función de los LT periféricos, especialmente los LTCD4+, tras el trasplante de médula ósea ^(Alpdogan O_1996). Cabe señalar que se ha implicado a IL-7 y su señalización en la aparición de la enfermedad de injerto contra huésped ^(Chung B_2007), aspecto que debe sopesarse como posible efecto secundario de su empleo en la clínica.

4. Tratamiento del cáncer. Se ha utilizado con éxito la capacidad de la IL-7 como reconstituyente de la inmunidad celular tras el tratamiento con quimioterapia ^(Fry TJ_2001). Otra estrategia prometedora es su empleo en la inmunoterapia para la expansión de LT “ex vivo” con infusión posterior de las células en el paciente, aumentando su capacidad antitumoral ^(Chen HW_2006). Estudios preclínicos han demostrado también su utilidad para aumentar la supervivencia de los LT “en vivo” o mejorar la efectividad de otras terapias inmunológicas contra el cáncer. Resultados positivos se han obtenido en modelos de melanoma ^(Wu B_1993), cáncer de colon ^(Murphy WJ_1993) y neuroblastoma ^(Otto M_2005).

No debe olvidarse que la IL-7 puede jugar un papel deletéreo en la patogénesis de algunos trastornos linfoproliferativos, como se ha demostrado en la leucemia linfática aguda en niños ^(Brown VI_2003). En este caso el bloqueo de la IL-7 con anticuerpos podría ser una opción terapéutica.

De los ensayos clínicos publicados con rIL-7 pueden extraerse las siguientes conclusiones: 1) rIL-7 es **bien tolerada en humanos**, con efectos secundarios leves (febrícula, síntomas pseudogripales, diarrea o hipertransaminasemia transitoria) y poco frecuentes; 2) tiene un **efecto importante, dosis-dependiente rápido y duradero sobre el número de LT CD4+ y CD8+** -sobretudo subtipo naïve-; 3) existe un efecto mínimo sobre los linfocitos T reguladores ^(Fewkes NM_2010) ^(Sportès C_2010) ^(Rosenberg SA_2006) ^(Sportès C_2008) ^(Lévy Y_2012) ^(Sereti I_2014).

5. Bloqueo de la IL-7 en enfermedades autoinmunes. La IL-7 se ha implicado en el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias. Los pacientes con esclerosis múltiple y niveles altos de IL-7 presentan mayor reactividad de los LT contra la proteína básica de la mielina ^(Traggiai E_ 2001) y su bloqueo reduce la incidencia de diabetes tipo 1 inducida con ciclofosfamida en un modelo murino ^(Calzascia T_ 2008). Los pacientes con artritis reumatoide presentan niveles altos de IL-7 en sangre periférica y en líquidos sinoviales ^(Churchman SM_2008), y ratones transgénicos con niveles altos mantenidos de IL-7 desarrollan fenómenos autoinmunes como dermatitis y colitis ^(Uehira M_ 1993). En este contexto el bloqueo de la IL-7 también podría representar una alternativa terapéutica.

Actualmente están en marcha dos ensayos clínicos en esclerosis múltiple (NCT02045732) y en diabetes tipo 1 (NCT02038764), empleando un anticuerpo contra el receptor de IL-7.

Posibilidades terapéuticas de IL-7 ^(Capitini_CM_2009)

- Rejuvenecer el repertorio linfocitario de la población anciana.
- Tratamiento del HIV.
- Trasplante de médula ósea.
- Tratamiento del cáncer.
- Tratamiento de las enfermedades autoinmunes.

Tabla 3. Posibilidades terapéuticas de la activación o inhibición de la IL-7.

1.4.4. Papel de IL-7 en la patogenia de la EII.

El papel inmunoregulador de la IL-7 en la homeostasis linfocitaria de las mucosas y su relación con los linfocitos intraepeliales (LIEs) y de la lámina propia (LLPs) fue inicialmente descrita en estudios experimentales.

Estudios en ratones demuestran que el receptor alfa de la IL-7 (IL7R) es esencial para la formación de las placas de Peyer ^(Adachi S_ 1998), y se ha comprobado que la expresión de IL-7 por los enterocitos induce el desarrollo de los LT $\gamma\delta$ “in situ”, en el epitelio intestinal ^(Laky K_2000).

Watanabe et al. confirmaron la producción local de IL-7 por las células epiteliales intestinales (especialmente las células caliciformes), la expresión de IL-7R en la superficie de los linfocitos de la mucosa y su estimulación con la adición de IL-7 recombinante *(Watanabe M_ 1995)*.

Poco después el mismo grupo demostró dos hechos clave para dilucidar el papel de la IL-7 en la inflamación intestinal. Primero comprobaron con suero de pacientes con CU que la IL-7 era efectivamente el agente estimulador de la producción de LT en el timo. Además se comprobó que los pacientes de CU presentaban niveles séricos aumentados de IL-7 por ensayo de inmunoenzimología, con una expresión de IL-7 mRNA baja en la mucosa colónica *(Watanabe M_1997)*. También se observó una disminución de la expresión de IL-7 en la mucosa inflamada con respecto a la mucosa colónica normal.

En un segundo trabajo se constató que los ratones IL-7 transgénicos desarrollan colitis crónica similar a la CU humana, con una expresión aumentada de IL-7 mRNA en los LT colónicos, y la presencia de LTCD4⁺ Th1 en los infiltrados linfoides. Curiosamente, los LT $\gamma\delta$ no se encontraban aumentados en las biopsias colónicas *(Watanabe M_ 1998)*.

Okada et al. pusieron de manifiesto el papel patogénico de los LTCD4⁺ con alta expresión del receptor de IL-7 (IL-7R high), y vieron que la administración in vivo de IL-7 en ratones aumentaba su expresión y exacerbaba la colitis *(Okada E_ 2005)*.

En 2003 **Yamaki** et al. exploraron por primera vez la actuación terapéutica sobre los LT de la mucosa y la vía de la IL-7/IL-7R para el tratamiento de la colitis con ratones transgénicos. Demostraron que la eliminación selectiva de los LT con alta expresión de IL-7 (IL-7R high) mediante la infusión de un anticuerpo monoclonal contra IL-7R mejoraba significativamente la colitis activa en ratones TCR α -/- *(Yamazaki M_ 2003)*.

Los autores señalan la posibilidad de emplear tratamientos selectivos contra los estos LT con alta expresión, como la proteína de fusión recombinante DAB389 IL-7 *(Sweeney EB_1998)*, o fármacos biológicos contra la IL-7 en pacientes con CU *(Tomita T_ 2008)*.

Trabajos posteriores han demostrado que la IL-7 es esencial para el desarrollo y la persistencia de la colitis crónica en ratones inmunodeficientes. El hecho de que exista una depleción de células caliciformes en las lesiones intestinales productoras de IL-7, y por tanto una disminución de su producción a nivel local, parece indicar que la producción extraintestinal (fundamentalmente en la médula ósea) es la que contribuiría a la persistencia de la inflamación. Por tanto concluyen que actuar contra la IL-7 sistémica podría ser una abordaje razonable ^{(Tomita T_2008) (Totsuka T_2007)}.

Aunque los **mecanismos** por los que la IL-7 contribuye a la perpetuación de la colitis no son totalmente conocidos, estudios en ratones inmunodeficientes (SCID) han comprobado que ésta interviene en la conservación de LT CD4+ de memoria en la médula ósea, incluso en la ausencia de estímulos de la flora bacteriana ^(Nemoto Y_2007). Estos LTCD4+ de memoria extraintestinales (en la médula ósea) son capaces de producir colitis al ser transferidos a ratones inmunodeficientes y se han señalado como un elemento importante para la perpetuación y cronificación de la colitis ^(Nemoto Y_2009). Algunos autores han propuesto incluso que podrían actuar como “reservorio de memoria de la enfermedad” extraintestinal, y diseminarse de forma hematogena recirculando de la lámina propia a la médula ósea ^(Nemoto Y_2011) a lo largo de la vida produciendo brotes de la enfermedad ^(Kanai T_2009).

Recientemente **Nemoto** et al. demostraron que las células estromales mesenquimales de la médula ósea son las principales productoras de IL-7, y que de hecho podrían jugar un papel patológico en la enfermedad, ya que serían las responsables de formar el nicho de esos LT CD4+ colitogénicos, contribuyendo a la perpetuación de la inflamación intestinal crónica ^(Nemoto Y_2013). Este estudio confirma el cambio de paradigma de la EII de enfermedad localizada a enfermedad sistémica, y vuelve a sugerir la posibilidad de actuar contra la IL-7 derivada de las células mesenquimales como abordaje terapéutico. Sin embargo apuntan que más estudios son necesarios antes de emplear el bloqueo de IL-7 en la clínica, ya que por ejemplo, la IL-7 también es necesaria para la proliferación de otras células con propiedades antiinflamatorias como los LT reguladores ^(Nemoto Y_2013).

Willis et al. contribuyeron recientemente a dilucidar el papel de IL-7 en la EII en un modelo experimental de colitis. Para ello infectaron a ratones inmunodeficientes *Mdr1a*^{-/-} con *Helicobacter bilis* produciéndoles una colitis, y los trataron posteriormente con un anticuerpo monoclonal anti-IL7R. Vieron que el tratamiento mejoraba la inflamación mediante el control de la expansión de los leucocitos y la reducción del número y la actividad de los macrófagos y las células dendríticas ^(Willis CR_2012).

Otro aspecto importante de la IL-7 descubierto recientemente es su capacidad para regular la homeostasis, no sólo de los LT, sino también de las células epiteliales intestinales (CEI), **regulando la integridad de la barrera intestinal**. Shalapur et al esclarecieron este mecanismo en un modelo murino ^(Shalapur S_2012).

En este estudio se pudo demostrar que las CEI, además de producir IL-7 por sí mismas, expresan IL-7R y se expanden en respuesta a IL-7 in vivo, produciéndose una acumulación de estas células en el colon de los ratones linfopénicos (hiperplasia) protegiéndolos de la colitis inducida por DSS. Sin embargo ese efecto protector se inhibe si los LTCD8⁺ naïve consumen la IL-7 o la señalización del IL-7R está inactiva. Esto sugiere que existe un mecanismo de feedback homeostático mediado por la IL-7 entre las CEI y los LT, que controla la integridad del epitelio intestinal. Es decir, en condiciones fisiológicas, IL-7 ejercería un efecto protector del epitelio intestinal y en condiciones de inflamación, con un mayor consumo de IL-7 por los linfocitos (cuya afinidad por esta citoquina es mayor que las células epiteliales) este efecto protector de la mucosa está inhibido. El mecanismo exacto por el cual IL-7 ejerce este efecto protector de la colitis en estados de linfopenia es desconocido.

Este mecanismo competitivo descrito por Shalapur et al. podría explicar los efectos deletéreos sobre el colon del aumento de los niveles de IL-7 observados en diversos escenarios clínicos que cursan con linfopenia, como la infección por VIH que cursan frecuentemente con diarrea y colitis ^(Gougeon ML_2008).

Estudiando la expresión génica de los LTCD8⁺ en EII, **Lee** et al demostraron una **sobreexpresión de la vía de señalización** de IL-7 en EC y CU. Diferencias en la

esta expresión génica de los LTCD8+ es capaz además de distinguir pacientes con peor pronóstico ^(Lee JC_2011). En un reciente trabajo se ha constatado que al activar el receptor aryl-hidrocarbono con ciertos ligandos se reduce la producción de IL-7 por las células epiteliales intestinales en un modelo preclínico de colitis inducida por DSS en ratones, sugiriendo una nueva potencial diana terapéutica ^(Ji T_2015).

Una de las mayores contribuciones para entender el papel de IL-7 en la inflamación de la mucosa intestinal ha sido revelado de manera indirecta en un reciente ensayo clínico con **rIL-7 en pacientes con HIV** tratados con terapia antiretroviral HAART en los que los niveles de LTCD4+ no se pudieron normalizar ^(Sereti I_2014). Para ello se emplearon 3 inyecciones subcutáneas de rIL-7 a dosis de 20 µg/kg. Esto resultó en una expansión de los LT CD4+ y CD8+ en sangre periférica, con una importante expansión de los LT que expresaban la integrina necesaria para la migración al intestino $\alpha 4\beta 7$. Se tomaron biopsias de colon por rectosigmoidoscopia antes y después del tratamiento y se observó: **1)** un aumento de los LT en la mucosa; **2)** una disminución de la infiltración por neutrófilos en la lámina propia; **3)** un descenso del TNF- α y mieloperoxidasa en la lámina propia y **4)** un aumento del número de LT FOXP3+ (Treg), que se encontraban bajos en los pacientes antes del tratamiento. Por tanto una mejoría de la inflamación mucosa mediada por varios mecanismos. Además, el aumento de los LT en la mucosa se correlacionó con una disminución de la activación de los monocitos –disminución de sCD14-, de la producción de IL- $\beta 1$ y del dímero-D.

1.4.5. Niveles séricos de IL-7.

Existen pocos estudios sobre los niveles séricos de IL-7 en EII y su posible papel en la etiopatogenia de la enfermedad.

Watanabe et al. demostraron en 1997 por primera vez que los pacientes con CU presentaba niveles séricos superiores de IL-7 que los sujetos control y con EC. No hubo correlación entre la concentración sérica de IL-7 con la duración o localización de la colitis. Este mismo estudio mostró otros dos aspectos interesantes: 1) la expresión de IL-7 mRNA en el timo de los pacientes con CU (en

sujetos sanos no se detecta) ; y 2) la expresión de IL-7mRNA se encuentra disminuida en la mucosa inflamada de los pacientes con CU y es normal en la mucosa sana ^(Watanabe M_ 1997).

Kader et al. realizaron un amplio estudio de citoquinas en suero de pacientes con EII en edad pediátrica ^(Kader HA_ 2005). Se incluyeron 12 pacientes con CU y 41 pacientes con EC, y se comparó el perfil de citoquinas por “microarray” entre pacientes con enfermedad activa y en remisión. No hubo diferencias significativas en los niveles de IL-7 con respecto a la actividad en CU. Sin embargo los pacientes con EC en remisión presentaron niveles mayores de IL-7 que los pacientes con enfermedad activa, sugiriendo una relación inversa entre IL-7 y la actividad.

Recientemente se han estudiado los niveles séricos de IL-7 comparando 17 pacientes con EC, 17 pacientes con CU y 18 pacientes con disbacteriosis ^(Toptygina AP_ 2014). Aunque los niveles de IL-7 en suero no fueron significativamente diferentes en los 3 grupos se aprecia que el grupo con EC presentó los niveles más bajos, seguido de grupo de CU y el de disbacteriosis. En este estudio se analizaron muestras fecales con salino, e IL-7 no se encontró en los extractos. Los autores apuntan al consumo de IL-7 por los LT activos en la mucosa inflamada por su mayor afinidad como una de las posibles explicaciones de este hecho. También se han constatado niveles menores de IL-7 en pacientes con formas exclusivamente colónicas de EC con respecto a controles, sin diferencias con los pacientes con CU ^(Korolkova OY_2015). **Kleiner** et al. en un estudio pediátrico con 26 pacientes con EII demostraron niveles séricos significativamente superiores de IL-7 en enfermos, aunque en el estudio no se diferencian los niveles entre CU y EC ^(Kleiner G_2015).

Nuestro grupo publicó la serie más larga con niveles séricos de IL-7 en EC con 36 pacientes. En este estudio se observó que tanto los pacientes en remisión como con enfermedad activa presentaban niveles bajos de IL-7 ^{(Andreu-Ballester JC_ 2013) (Anexo X)}.

Ponchel et al han corroborado que los niveles séricos de IL-7 son menores de lo normal en la EII activa, y tienden a normalizarse en la remisión (datos no publicados) ^(Ponchel F_2011).

2. Justificación del estudio.

2. Justificación del estudio.

La **EC** es una enfermedad crónica cada vez más prevalente en nuestro medio *(Molodecky NA_2012)*. Afecta a individuos jóvenes *(Podolsky DK_2002)* y requiere el empleo de fármacos agresivos, hospitalizaciones e incluso cirugía para el tratamiento de sus complicaciones *(Baumgart DC_2012)*. Esto conlleva una importante afectación de la calidad de vida tanto de los pacientes como de su entorno, así como un elevado coste sanitario asociado *(Rocchi A_2012)*.

A pesar de los importantes avances en el estudio de los diversos mecanismos implicados en la enfermedad -factores genéticos, ambientales, inmunitarios y del microbioma-, aspectos importantes que expliquen la **respuesta inmunitaria alterada frente a la microbiota en sujetos predispuestos** siguen sin estar totalmente aclarados. *(Xavier RJ_2007)*

Desde el descubrimiento de los **LT γ δ** hace tres décadas ha crecido exponencialmente el interés científico por desvelar su función en el **control de las infecciones, los tumores y las enfermedades autoinmunitarias** *(Bonneville M_2010)* *(Zheng J_2013)*. Su posición clave como primera línea de defensa en los epitelios, y sus características únicas –como la respuesta rápida contra patógenos sin necesidad de procesamiento antigénico, su actividad citolítica e inmunoreguladora, o su capacidad para reparar la integridad de la mucosa- han hecho que se consideren un **“puente” entre la inmunidad innata y adquirida** *(Born WK_2006)* *(Vantourout P_2013)*. Actualmente existen varias líneas de investigación empleando estas células como **diana terapéutica** aprovechando estas características con resultados prometedores *(Chiplunkar S_2009)* *(Wu YL_2014)*.

Sin embargo, su **papel** en la patogenia de la EII sigue siendo **controvertido** *(ver Introducción)*. Existen diversos trabajos que apoyan su papel protector de la inflamación intestinal tanto en modelos murinos, como de estudio de mucosa intestinal o en sangre periférica (SP) *(Fukushima K_1991)* *(Bucht A_1995)* *(Lee HB_1997)* *(Chen Y_2002)* *(Inagaki-Ohara K_2004)* *(Kühl AA_2007)*. Sin embargo otros autores han puesto en evidencia su papel

potencial como inductor de la colitis (Simpson SJ_1997) (Yeung MM_2000) (Kawaguchi-Miyashita M_2001) (Söderström K_1996).

La **IL-7** pertenece a la familia de hematopoyetinas de clase 1 (γc), se produce fundamentalmente por las células del estroma no hematopoyéticas y por las células epiteliales de la médula ósea y el timo y se considera como el factor más importante para la **estimulación y homeostasis** de los LT en general, y en particular de los linfocitos intraepiteliales (LIEs) y los LT $\gamma\delta$ de la mucosa intestinal (Capitini CM_2009) (Fry T.J. 2002) (Bekiaris V_2014).

De hecho, en ratones deficientes en su receptor (IL7R- α), los LT $\gamma\delta$ no se detectan (Maki K_1996) (He YW_1996) y su intervención es necesaria en estadios tempranos para la producción de los LT $\gamma\delta$, ya que controla la accesibilidad del locus del TCRT γ a la V(D)J recombinasa (Schlissel MS_2000).

El papel de la IL-7 **no está totalmente aclarado en la EC**. Se han informado niveles bajos en mucosa y en suero, sugiriendo que un déficit de su producción sería responsable de los fenómenos inflamatorios (Sereti I_2014)(Toptygina AP_2014); contrariamente otros autores han descrito niveles elevados de esta interleuquina, sugiriendo una acción proinflamatoria estimuladora de los linfocitos activados (Watanabe M_1997) (Yamazaki M_2003) (Willis CR_2012).

En un **estudio previo** con 40 pacientes con EC nuestro grupo comprobó una disminución significativa de los LT $\gamma\delta$ en SP en enfermos, sugiriendo su papel en la patogenia de la enfermedad (Andreu-Ballester JC_2011). (Anexo X). En un segundo estudio inicial con 34 pacientes se observó una disminución significativa de los niveles séricos de IL-7, que contrasta con la linfopenia observada (en otras situaciones con linfopenia se detecta un aumento compensatorio) (Andreu-Ballester JC_2013), (Anexo X), lo que apuntaría a una posible inmunodeficiencia en EC causada por una disminución o una alteración funcional de estas células.

La importancia de esta nueva vía patogénica en la enfermedad podría tener un impacto directo sobre el **desarrollo de nuevos tratamientos** que podrían ser efectivos en estos pacientes. Es más, actualmente disponemos de métodos sencillos para estimular la producción de $LT\gamma\delta$ (como el empleo de zolendronato) ^{(Tu W_2011) (Meraviglia S_2010) (Dieli F_2007)} o la IL-7 recombinante (rIL-7), que es bien tolerada en humanos y ha sido testada en varios ensayos clínicos en otras enfermedades, como el VIH, con buenos resultados ^{(Sereti I_2009). (Levy Y_2009). (Alpdogan O_2001)}.

El presente trabajo amplía significativamente la población de estudio de nuestros 2 trabajos anteriores (*Anexos 3 y 4*), lo que permitirá evaluar con mayor potencia las subpoblaciones linfocitarias $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ en sangre periférica de pacientes con EC comparándolos con sujetos sanos, y evaluar la relación entre estas y la IL-7 por grupos de actividad, en relación a la gravedad clínica, a la gravedad endoscópica, al tratamiento y a otras variables clínicas, para dilucidar su papel en la EC.

3. Hipótesis y objetivos.

3. Hipótesis y objetivos.

3.1. HIPÓTESIS:

Nuestra **hipótesis** es que la población de $LT\gamma\delta$ puede estar disminuida en la sangre periférica de los pacientes con EC, produciendo una disfunción de la inmunidad innata que contribuya al desarrollo y mantenimiento de la enfermedad. Es posible que el déficit de la IL-7 en sangre periférica contribuya a esta disminución patológica.

3.2. OBJETIVOS:

Objetivo principal:

Evaluar y comparar los valores séricos de linfocitos y las distintas subpoblaciones de los LT en pacientes con EC y sujetos sanos.

Objetivos secundarios:

- 3.2.1. Evaluar y comparar estas poblaciones linfocitarias en pacientes con EC y controles y su variación según las distintas variables clínicas estudiadas.
- 3.2.2. Medir y comparar los niveles de IL-7 sérica en pacientes con EC y controles, y su variación según las distintas variables clínicas estudiadas.

4. Material y Métodos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1. Tipo de estudio

Estudio transversal, descriptivo, prospectivo, de casos y controles.

4.2. Población a estudio:

4.2.1. Pacientes

Se incluyeron prospectivamente pacientes diagnosticados de EC que acudieron al servicio de Urgencias, en control en consultas externas de Digestivo e ingresados en el servicio de Digestivo del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia, durante el período comprendido entre Febrero de 2008 y Marzo de 2015. Para el diagnóstico de la EC se emplearon los criterios de Lennard-Jones ^(Lennard-Jones JE_1989).

Se consideraron **criterios de exclusión** la edad menor de 14 años o mayor de 85 años, la presencia de enfermedades neoplásicas concomitantes, aquellos pacientes con dudas en el seguimiento sobre la certeza diagnóstica de EC, y la negativa a participar en el estudio.

La hoja de recogida de datos se presenta en el *Anexo 1*.

4.2.1.1. Clasificación fenotípica

Los pacientes fueron clasificados según la clasificación de Montreal, según la edad (A), la localización (L), y el patrón (B), y la presencia o no de enfermedad perianal (p)

^(Silverberg MS_2005)

Tabla 25-2 Clasificación de Montreal de la enfermedad de Crohn

Edad al diagnóstico	Localización	Patrón evolutivo
A1: ≤ 16 años	L1: ileal	B1: no obstructivo-no fistulizante (inflamatorio)
A2: 17-40 años	L2: cólica	B2: obstructivo (fibroestenósante)
A3: > 40 años	L3: ileocólica	B3: fistulizante
	L4: gastrointestinal alta (se añade a cualquiera de las anteriores si está presente)	Añadir "p" a cualquiera de las anteriores si existe participación perianal

Fig. 10. Clasificación de Montreal de la EC ^(Nos P_2011).

4.2.1.2. Índices de gravedad clínica empleados.

Para evaluar la actividad de la enfermedad los pacientes se emplearon dos índices clínicos: el CDAI (Crohn's disease activity index) ^(Best WR_1976) y el índice de Harvey-Bradshaw ^(Harvey RF_1980).

Tabla 25-3 Cálculo del índice de actividad de la enfermedad de Crohn (Crohn's Disease Activity Index [CDAI])										
	Días	1	2	3	4	5	6	7	Suma × factor	Subtotal
1. Número de heces líquidas o muy blandas		-	-	-	-	-	-	-	× 2 =	
2. Dolor abdominal (no = 0, leve = 1, moderado = 2, grave = 3)		-	-	-	-	-	-	-	× 5 =	
3. Estado general (bueno = 0, regular = 1, malo = 2, muy malo = 3, terrible = 4)		-	-	-	-	-	-	-	× 7 =	
4. Número de las siguientes 6 manifestaciones clínicas										
Artritis/artralgia										
Iritis/uveítis										
Eritema nudoso/pioderma/aftas										
Fisura anal/fístula/absceso										
Otras fístulas										
Fiebre > 38,5 °C en la última semana									× 20 =	
5. Toma de antidiarreicos (no = 0, sí = 1)									× 30 =	
6. Masa abdominal (no = 0, dudosa = 2, sí = 5)									× 10 =	
7. Hematocrito (47%: hematocrito actual en varones) (43%: hematocrito actual en mujeres)									× 6 =	
8. Peso corporal = ? Peso estándar = ? Porcentaje por debajo del peso estándar									× 1 =	

Los apartados 1, 2 y 3 hacen referencia a lo ocurrido al paciente durante los 7 días previos a la consulta.
Para la inclusión en ensayos clínicos, se consideran "activos" los pacientes con CDAI ≥ 220.
Se considera remisión un CDAI < 150 y se considera respuesta una disminución en el CDAI ≥ 100 puntos.
Se considera recidiva un CDAI > 150 con un incremento de 100 puntos respecto al valor basal.

Fig. 11. Índice CDAI de gravedad de la EC ^(Nos P_2011).

4.2.1.3. Definición de los Grupos de Actividad.

Según la situación clínica y la puntuación del CDAI de los pacientes en el momento de la inclusión se definieron 3 grupos de análisis:

- **“Pacientes nuevos”**: pacientes diagnosticados en el momento de la inclusión o en un período de máximo de 30 días previo a la misma y que no han

recibido tratamiento previo para la EC.

- **“Pacientes en remisión”**: pacientes ya diagnosticados de EC, en remisión clínica y con una puntuación de CDAI menor o igual a 150 puntos durante al menos 12 meses previos a la inclusión.
- **“Pacientes en actividad”**: aquellos ya diagnosticados de EC con una puntuación de CDAI mayor o igual a 150 y con signos o síntomas de actividad clínica.

Para algunos subanálisis se empleará también el grupo “actividad global”, que incluye a todos aquellos pacientes con actividad clínica (es decir el grupo “nuevos” más el grupo “actividad”), en contraposición a aquellos en remisión clínica (sin actividad).

4.2.1.4. Estudio endoscópico.

Se revisaron los resultados de la colonoscopia más cercana al momento de la inclusión en todos los pacientes, y se empleó para valorar la gravedad endoscópica el índice de gravedad endoscópico SES-CD (*simplified endoscopic activity score for Crohn’s disease*). (Daperno M_2004)

Tabla II. SES-CD (*Simplified Endoscopic Activity Score for Crohn’s Disease*).

Variable	0	1	2	3
Tamaño úlcera	No	Úlcera aftosa (0,1-0,5 cm)	Úlceras grandes (0,5-2 cm)	Úlceras muy grandes (<2 cm)
Superficie ulcerada	No	<10%	10-30%	>30%
Superficie afectada	Ninguna	<50%	50-75%	>75%
Estenosis	No	Única con paso	Múltiple franqueable	Infranqueable
SES-CD : ILEON + C. DCHO + C. TRANSVERSO + C. IZQDO + RECTO (0-15)				

Fig. 12. Índice endoscópico SES-CD de gravedad de la EC (Nos P_2011).

4.2.1.5. Estudio histológico

Se analizaron todas las muestras histológicas de biopsias o quirúrgicas de las que se disponía de informe anatomopatológico. Los hallazgos se clasificaron atendiendo al criterio del patólogo en: 1) Inflamación crónica inespecífica; 2) Criterios de EII sin poder determinar si se trata de EC o CU; 3) Probable EC; 4) EC con presencia de granulomas.

4.2.1.6. Hábito tabáquico, cirugía previa y manifestaciones extraintestinales

Se recogió la presencia o no de hábito tabáquico activo, así como el estado de exfumador, y el número de cigarrillos/día aproximado según el paciente.

Se recogieron los antecedentes de intervenciones quirúrgicas previas (fecha y tipo) y la presencia o no de manifestaciones extraintestinales relevantes en el último año y el tipo.

4.2.1.7. Tratamientos

Se recogieron los **fármacos** empleados por los pacientes en el momento de la inclusión.

Tipo de tratamiento médico.

- Mesalazina.
- Salazopirina.
- Corticoides (Prednisona/Prednisolona).
- Corticoides no absorbibles (Budesonida).
- Antibióticos (ciprofloxacino y metronidazol u otros).
- Inmunosupresores (azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexate u otros).
- Anticuerpos monoclonales anti-TNF (infliximab, adalimumab, certolizumab).

Tabla 4. Clasificación de los tratamientos empleados.

Se registró la fecha de inicio de cada tratamiento, y la dosis empleada en el momento de la inclusión.

4.2.1.8. Determinaciones analíticas

Se analizaron los valores en sangre periférica en el hemograma de las 3 series sanguíneas (hematíes/hemoglobina, leucocitos totales y plaquetas), así como las subpoblaciones leucocitarias.

Se estudiaron las siguientes subpoblaciones linfocitarias: CD3+, CD4+, CD8+, CD56+, CD19+, $\alpha\beta$ CD3+, $\alpha\beta$ CD4+, $\alpha\beta$ CD8+, $\alpha\beta$ CD56+, $\gamma\delta$ CD3+, $\gamma\delta$ CD4+, $\gamma\delta$ CD8+, $\gamma\delta$ CD56+. (Ver 5.4. *Métodos de análisis de las muestras*).

4.2.2. Controles

Se reclutaron personas sanas para el grupo control, apareadas por edad (± 5 años) y sexo.

Los **criterios de exclusión** para el grupo control fueron: ser familiares de hasta segundo grado de un paciente con EC, la presencia de infecciones activas, padecer alguna otra enfermedad inflamatoria crónica o autoinmune y el empleo de antibióticos durante los últimos 3 meses y de fármacos inmunosupresores o vacunas en el último año.

4.3. Variables a estudio:

Principales variables estudiadas en pacientes de EC.

- Edad y sexo.
- Fecha de diagnóstico.
- Escenario clínico definido según la actividad. (nuevos/remisión/activos)
- Clasificación de Montreal la EC (A, B, L).
- Presencia de enfermedad perianal.
- Variables clínicas de actividad: CDAI e índice de Harvey-Bradshaw.
- Fecha de la endoscopia y variables endoscópicas de actividad: SES-CD.
- Estudio histológico: fecha, hallazgos y presencia de granulomas.

- Hábito tabáquico.
- Tratamientos empleados al diagnóstico: dosis y tiempo de uso en meses,
- Hemograma y recuento total de linfocitos.
- Poblaciones linfocitarias: CD3+, CD4+, CD8+, CD56+, CD19+, $\alpha\beta$ CD3+, $\alpha\beta$ CD4+, $\alpha\beta$ CD8+, $\alpha\beta$ CD56+, $\gamma\delta$ CD3+, $\gamma\delta$ CD4+, $\gamma\delta$ CD8+, $\gamma\delta$ CD56+.
- Valores de los reactantes de fase aguda en sangre (VSG, PCR)

Tabla 5. Resumen de las principales variables estudiadas en pacientes.

4.4. Métodos de análisis de las muestras

Se extrajo sangre periférica obtenida por venopunción en recipientes con anticoagulante K3-EDTA y las muestras se procesaron en las primeras 6 horas. Para los recuentos celulares se empleó el Coulter LH750 Automated Hematology Analyzer (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Se emplearon los siguientes anticuerpos monoclonales para la determinación de las subpoblaciones: CD3+, CD4+, CD8+ y CD19+ para las subpoblaciones de sangre periférica y el TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$ para cada uno de estos subtipos linfocitarios.

Las poblaciones de LT $\gamma\delta$ se analizaron con el anticuerpo anti-TCR $\gamma\delta$ PC5 conjugado (Beckman Coulter, Miami, USA [clone: IMMU 510]). Este anticuerpo IgG1 murino permite la identificación y recuento de las poblaciones celulares que expresan el antígeno TCR $\gamma\delta$ presente en muestras biológicas usando la citometría de flujo. IMMU 510 reconoce todas las poblaciones de LT $\gamma\delta$ independientemente de la variabilidad genómica que expresen. Los LT $\alpha\beta$ se analizaron con el anticuerpo anti-TCR $\alpha\beta$ PC5 conjugado (Beckman Coulter [clone: IP26A]).

Los niveles de proteína C reactiva (PCR) en suero se determinó por técnicas estándar de inmunoensayo con un método de lectura final por inmunofluorescencia (Vitros Chemistry Products).

La velocidad de sedimentación globular (VSG) se determinó con el TEST 1 (Alifax, Padova, Italy) empleando técnicas de fotometría capilar cuantitativa.

Para la determinación sérica de IL-7 se empleó el kit de detección humana IL-7 instant ELISA (eBioscience, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del

fabricante. Las muestras de suero se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su determinación analítica.

De acuerdo con la información del producto, la detección límite de IL-7 se consideró 9.5 pg/ml, media de seis ensayos diferentes. Para el análisis simple de la IL-7 se empleó una curva estándar obtenida con 10 puntos con diferentes concentraciones de 0 a 1000 pg/ml.

4.5. Análisis estadístico

Calculo tamaño muestral con Epidat 4.0

Se trata de una comparación de medias en poblaciones emparejadas, para una diferencia de medias a detectar de $LT\gamma\delta = 0,020 \times 10^9/L$.

Tomando una desviación estándar esperada en los valores de $LT\gamma\delta$ de los pacientes de $EC=0,025 \times 10^9/L$, una desviación estándar esperada en los valores de $LT\gamma\delta$ de los controles sanos $=0,067 \times 10^9/L$, un coeficiente de correlación de Spearman de 0,517 y teniendo en cuenta una potencia del 80% con un nivel de confianza del 95%, se estimó un tamaño muestral de $n=67$ en cada grupo.

Procedimientos de análisis

El análisis descriptivo se realizó empleando procedimientos estadísticos estándar. La asunción de una distribución normal de la muestra se verificó empleando test gráficos y el *test de Kolmogorov-Smirnov*. Cuando se asumió la normalidad se empleó la *t de Student* para comparar las medias de variables cuantitativas y el test no paramétrico *U de Mann-Whitney* para las variables cuantitativas sin distribución normal. Para analizar las correlaciones entre los valores de los LT y los valores de IL-7 se empleó el test *Rho de Spearman*.

Se consideró significativa para el análisis una $p \leq 0.05$. Los datos se analizaron mediante el programa de software estadístico SPSS versión 19.

4.6. Aspectos ético-legales

Todos los participantes en el estudio firmaron un consentimiento informado (*Ver Anexo X*). Este trabajo de investigación ha sido aprobado por la Comisión de Bioética e Investigación del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia.

5. Resultados.

5.Resultados.

5.1.Demográficos.

Se reclutaron un total de 102 pacientes con EC y 102 controles sanos. De los pacientes con EC, 57 (55,9%) fueron hombres y 45 (44,1%) mujeres, con el mismo número de hombres y mujeres en los controles.

La edad media de los pacientes de EC fue de $39,1\pm 13,9$ años (rango de 15 a 80) vs $39,5\pm 14,7$ años de los sujetos control (rango de 8 a 78), $p=0,815$. En los pacientes con EC, la edad media de los hombres fue de $40,5\pm 15$ vs $37,8\pm 13,3$ en las mujeres, $p=0,187$. En los sujetos sanos, la edad media de los hombres fue de $40,4\pm 14,9$ años y de $38,4\pm 13,1$ en las mujeres, $p=0,501$. (Tabla 6)

No hubo diferencias significativas en la edad por sexos entre EC y controles.

Características	EC	Controles	p
N	102	102	
Nº hombres	57 (55,9%)	57 (55,9%)	NS
Nº mujeres	45 (44,1%)	45 (44,1%)	NS
Edad media	$39,1\pm 13,9$	$39,5\pm 14,7$	NS
Edad media hombres	$40,5\pm 15$	$40,4\pm 14,9$	NS
Edad media mujeres	$37,8\pm 13,3$	$38,4\pm 13,1$	NS

N=nº de sujetos; p=significación; NS=no significativa

Tabla 6. Número, edad y sexo de los pacientes y los controles.

5.2.Características de los pacientes con EC.

5.2.1.Escenarios clínicos.

De los 102 pacientes con EC: 34 (33,4%) fueron incluidos en el debut de la enfermedad (grupo “nuevos”); 32 (31,4%) se encontraban en remisión clínica (grupo “remisión”); y 36 (35,2%) presentaban signos activos de enfermedad (grupo “actividad”).

En total, 70 pacientes (68,6%) se encontraban en actividad clínica y 32 (31,4%) en remisión. (Tabla 7)

El porcentaje de pacientes fumadores, con antecedentes de cirugía previa y enfermedad perianal se muestran en la Tabla 7.

Características		N	%
Fumador	Si	42/90	46.7
Grupos de actividad	<i>Nuevos</i>	34/102	33.3
	<i>Remisión</i>	32/102	31.4
	<i>Actividad</i>	36/102	35.3
Cirugía previa	Si	16/102	15.7
Perianal	Si	24/102	23.5

N=nº de sujetos; %=porcentaje

Tabla 7. Características generales de los pacientes.

5.2.1. Características fenotípicas de los pacientes: Clasificación de Montreal.

5.2.1.1. Edad: La distribución por edad (A) se refleja en la Tabla 8.

5.2.1.2. Localización: La distribución según la localización (L) se refleja en la Tabla 8.

5.2.1.3. Patrón: La distribución según el patrón (B) de la enfermedad se refleja en la Tabla 8.

5.2.1.4. Afectación perianal: 24 pacientes (23,5%) presentaban afectación perianal (p).

Montreal	ABL	Tipo	N	%
A (edad)	A1	<17	7	7,0
	A2	17-40	71	69,5
	A3	>40	24	23,5
L (localización)	L1	ileal	42	41,1
	L2	colon	15	14,7
	L3	ileocolónica	44	43,1
	L4	Digestivo superior	1	0,9
B (patrón)	B1	inflamatorio	64	62,7
	B2	Estenosante	20	19,6
	B3	fistulizante	18	17,6

N=n° de pacientes; %=porcentaje

Tabla 8. Distribución de los pacientes según la clasificación de Montreal.

5.2.2. Tiempo de evolución.

El tiempo medio de evolución desde el diagnóstico de la enfermedad hasta la inclusión en este estudio fue de 27,74 meses (DT=41,5).

En el grupo de pacientes “actividad” (N=32) fue de 46,91 meses (DT=53,7) y en el grupo “remisión” (N=36) de 35,6 meses (DT=35,6), sin diferencias significativas entre ellos ($p=0,360$).

5.2.3. Manifestaciones extraintestinales.

10 pacientes (9,8%) presentaban manifestaciones extraintestinales en la inclusión. De ellos 7 (70%) pacientes de tipo articular, 2 (2%) de tipo ocular 1 (1%) bucales. Ningún paciente incluido presentó manifestaciones cutáneas ni hepáticas relacionadas con la enfermedad en el último año.

5.2.4.Cirugía previa.

21 pacientes (20.5%) tenían antecedentes de intervenciones quirúrgicas previas relacionadas con la enfermedad. De ellos, 15 pacientes (71,4%) sufrieron resecciones intestinales y 6 (28,5%) intervenciones relacionadas con su enfermedad perianal. 2 pacientes (1,96%) presentaron 2 resecciones quirúrgicas previas.

El tiempo medio desde la realización de la cirugía hasta la inclusión fue de 92,1 ±80,6 meses.

5.2.5.Hábito tabáquico.

Se registró el consumo de tabaco en 90 pacientes. 42 pacientes (46,7%) presentaban hábito tabáquico activo en el momento de la inclusión, con una media de consumo diario de 12,6 ±7.7 cigarrillos.

5.2.6.Actividad clínica de la enfermedad.

5.2.6.1.Crohn's disease activity index (CDAI)

Las puntuaciones medias del CDAI en los pacientes y por grupos se reflejan en la *Tabla 9*. Los valores fueron significativamente mayores en el grupo “nuevo” vs. el grupo “remisión” ($p<0,001$), y en el grupo “actividad” vs. “remisión” ($p<0,001$). No hubo diferencias significativas entre los 2 grupos con actividad clínica (nuevos y actividad).

5.2.6.2.Índice de Harvey Bradshaw.

Las puntuaciones medias del CDAI en los pacientes y por grupos se reflejan en la *Tabla 9*. Los valores fueron significativamente mayores en el grupo “nuevo” vs. el grupo “remisión” ($p<0,001$), y entre el grupo “actividad” vs. “remisión” ($p<0,001$). No hubo diferencias significativas entre los 2 grupos con actividad clínica (nuevos y actividad).

Grupos	CDAI	Harvey-Bradshaw
Total	199,87 ±110	6,98 ±3,8
Nuevo	243,91 ±100	8,44 ±3,8
Remisión	94,03 ±56	3,76 ±1,7
Actividad	252,35 ±86	8,35 ±3,2

Tabla 9. Índices de actividad clínica media en pacientes.

5.2.7.Datos endoscópicos.

Pudieron obtenerse datos endoscópicos de los informes de colonosopia en 90 pacientes (88,2%).

5.2.7.1.Tiempo de realización con respecto a la inclusión.

El tiempo medio de la realización de la endoscopia con respecto al momento de inclusión del paciente fue de $\pm 6,82 \pm 11,4$ meses.

5.2.7.2.Tipo de endoscopia.

Se pudieron obtener datos de una ileocolonosopia completa en 64 pacientes (65,6%), en 18 (17,6%) de una colonosopia sin intubación ileocecal y en 8 (7,8%) de una rectosigmoidoscopia.

5.2.7.3.Actividad endoscópica.

La media del SES-CD (*simplified endoscopic activity score for Crohn's disease*) en el conjunto de pacientes fue de $9,38 \pm 9,4$. Las puntuaciones en las distintas localizaciones se recogen en la *Tabla 10*.

En el grupo “nuevo” (n=33) fue de $12,21 \pm 10,5$; en el grupo “remisión” (n=30) fue de $5,70 \pm 8,5$; y en el grupo “actividad” (n=28) fue de $10 \pm 7,9$. *Tabla 11*.

No hubo diferencias significativas entre los 2 grupos de pacientes con actividad clínica “nuevos” y “actividad”.

SES-CD Puntuación	N	Media	DT
SES-CD total	90	9.38	9.4
<i>SES-CD Recto</i>	90	1.53	2.6
<i>SES-CD colon izquierdo</i>	90	2.02	2.9
<i>SES-CD colon transverso</i>	90	1.59	2.7
<i>SES-CD colon derecho</i>	90	1.48	2.5
<i>SES-CD íleon</i>	90	2.80	2.7

N=n° de pacientes; DT=desviación típica

Tabla 10. Puntuaciones del SES-CD totales y por localización.

Grupos pacientes	N	SES-CD media	SES-CD DT
Nuevos	33	12.21	10.5
Remisión	30	5.70	8.5
Actividad	28	10.00	7.9

N=n° de pacientes; DT=desviación típica

Tabla 11. Puntuaciones SES-CD total por grupos de actividad.

5.2.8. Datos histológicos.

Se pudo obtener datos del estudio histológico de biopsias intestinales en 97 pacientes (95,1%). Las distintas posibilidades de diagnóstico anatomopatológico de los pacientes, así como la presencia de granulomas se reflejan en la *Tabla 12*

	Diagnóstico histológico	N	%
Tipo diagnóstico	EC confirmada	42	43.3
	Compatible (dudosa)	2	2.1
	Inflamación crónica inespecífica	49	50.5
	normal	4	4.1
Granulomas	Granulomas presentes	10/88	9.8

N=n° de pacientes; %=porcentaje

Tabla 12. Resultados del estudio histológico de los pacientes.

5.2.9.Tratamiento farmacológico.

73 pacientes (71,6%) empleaban tratamiento farmacológico para la EC en el momento de la inclusión.

Los porcentajes de pacientes que emplearon cada tratamiento, la dosis media empleada, y el tiempo medio de uso previo se incluyen en la *Tabla 13*. Los grupos farmacológicos por grupos de actividad se incluyen en la *Tabla 14*.

TRATAMIENTO	N	%	DOSIS (mg)	DT	TIEMPO (m)	DE
Mesalazina	46	45,1	2.570	853	43,7	51,7
Salazopirina	2	2	1.250	0,0	36,2	16,3
Antibióticos	24	23,5	D.S.	0,0	0,92	0,27
Corticoides	19	18,6	46.075	1.36	0,58	1,05
Budesonida	3	2,9	4,35	2,14	4,75	4,85
Azatioprina	40	39,2	200	49,7	30,6	34,87
Metotrexate	4	3,9	15	0,0	5,0	3,9
Infliximab	4	3,92	5**	0,0	14,0	11,1
Adalimumab	7	6,9	62,8***	21,3	31,4	21,5

*N=n° de pacientes; %=porcentaje; DT=desviación típica; mg=miligramos; m=meses; DS=dosis estándar (metronidazol 1.5g/24h y cirpofloxacino 500 mg/8h); **= mg/kg/8 semanas; ***=dosis media/2 semanas.*

Tabla 13. Tratamiento farmacológico en los pacientes, dosis y tiempo.

Tratamientos empleados		Nuevos		Remisión		Actividad	
		N	%	N	%	N	%
Tratamiento	SI	17	50.0	27	84.4	29	80.6
Azatioprina	SI	6	17.6	15	46.9	19	52.8
Anti-TNF	SI	0	0	6	18.8	8	22.2
a) Infliximab	SI	0	0	2	6.3	2	5.6
b) Adalimumab	SI	0	0	1	3.1	6	16.7
Mesalazina	SI	10	29.4	19	59.4	17	47.2
Salazopirina	SI	0	0	0	0	2	5.6
Antibiótico	SI	11	32.4	2	6.3	11	30.6
Corticoides S	SI	9	26.5	0	0	10	27.8
Corticoides NA	SI	0	0	1	3.1	2	5.6
Metotrexate	SI	0	0	2	6.3	2	5.6

N=nº de pacientes; %=porcentaje; DT=desviación típica; Corticoides S=sistémicos (prednisona oral o intravenosa); Corticoides NA=Budesonida.

Tabla 14. Tratamiento farmacológico en los distintos grupos.

5.3.Determinaciones analíticas: análisis de las poblaciones linfocitarias

5.3.1.Hemograma

Los valores medios del hemograma de los pacientes con respecto a los sujetos controles sanos se describe en la *Tabla 15*.

Los pacientes con EC presentaron valores significativamente mayores de leucocitos ($p=0,001$), neutrófilos ($p<0,001$), monocitos ($p=0,032$), y plaquetas ($p<0,001$), y menor de linfocitos totales ($p<0,001$), y de hemoglobina ($p<0,001$). Las cifras de eosinófilos y basófilos no fueron significativamente diferentes en ambos grupos.

Hemograma en pacientes y controles					
Células	Crohn		Control		Sig. (p)
	Media	DT	Media	DT	
Leucocitos	8,1	2,9	6,9	2,0	0,003*
Neutrófilos	5,5	2,5	3,9	1,7	< 0,001*
Linfocitos	1,7	0,7	2,2	0,6	< 0,001*
Monocitos	0,6	0,3	0,5	0,2	0,032*
Eosinófilos	0,2	0,3	0,2	0,1	NS
Basófilos	0,0	0,1	0,0	0,1	NS
Plaquetas	318	112	242	74	< 0,001*
Hemoglobina	12,8	2,2	14,4	1,4	< 0,001*

Unidades en células x 10⁹/L; *diferencia estadísticamente significativa

Tabla 15. Cifras medias de series celulares en el hemograma en casos y controles.

5.3.2.Comparación de subpoblaciones linfocitarias entre casos y controles.

5.3.2.1.Valores medios de los linfocitos T totales entre casos y controles.

Las cifras séricas medias de los linfocitos T totales fueron de 1,719 ±0,72 en los pacientes y 2,185 ±0,63 en los controles ($p < 0,001$).

5.3.2.2.Valores medios de las subpoblaciones de linfocitos T entre casos y controles.

Las diferencias entre los niveles séricos de las subpoblaciones linfocitarias totales (gráfica A), LT $\alpha\beta$ (gráfica B) y LT $\gamma\delta$ (gráfica C) entre pacientes y controles se muestran en la *Figura 13*.

Los pacientes presentaron cifras significativamente menores de LTCD3+ ($p < 0,001$), de LT CD4+ ($p = 0,003$), LT CD8+ ($p < 0,001$), y LT CD56+ ($p = 0,001$).

En cuanto a los $LT\alpha\beta$, los pacientes presentaron niveles significativamente menores de $LT\ CD3+\alpha\beta$ ($p<0,001$), $LT\ CD4+\alpha\beta$ ($p<0,014$) y $LTCD8+\alpha\beta$ ($p<0,001$). No hubo diferencias estadísticamente significativas en los $LT\ CD56+\alpha\beta$.

En cuanto a los $LT\gamma\delta$, los pacientes presentaron niveles significativamente menores ($p<0,001$) de todas las subpoblaciones, incluyendo los $LT\ CD3+\gamma\delta$, $LTCD4+\gamma\delta$, $LT\ CD8+\gamma\delta$, y $LTCD56+\gamma\delta$

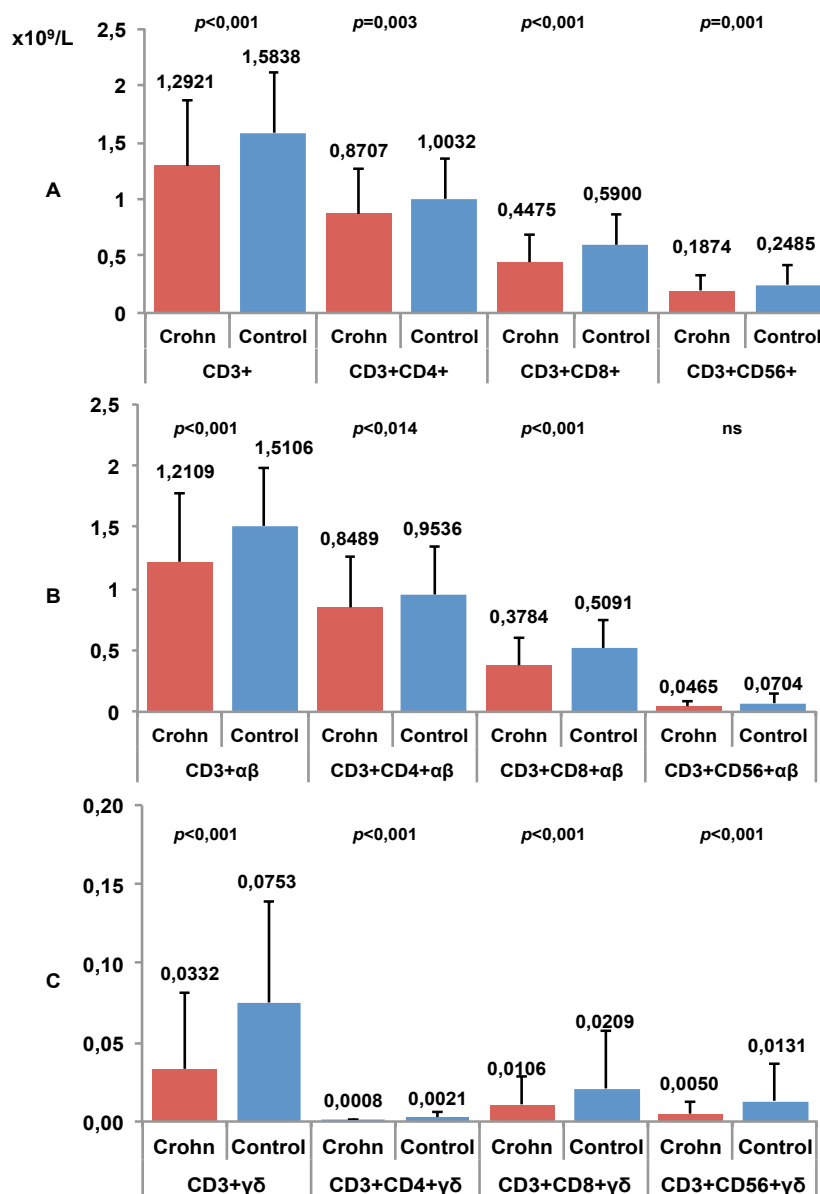


Fig. 13. Subpoblaciones de linfocitos T. Diferencias entre casos y controles: A) LT totales, B) $LT\alpha\beta$ (B) y C) $LT\gamma\delta$.

5.3.2.2.Valores medios de los linfocitos B entre casos y controles

Las cifras séricas medias de los linfocitos B totales fueron de $0,2027 \pm 0,13$ en los pacientes y $0,263 \pm 0,15$ en los controles ($p < 0,001$).

5.3.3.Comparación de subpoblaciones linfocitarias entre grupos de actividad.

5.3.3.1.Relación de los linfocitos T totales con grupos de actividad.

Las cifras séricas medias de los linfocitos T totales según grupos de actividad fueron: 1) “nuevos” (n=34): $1,829 \pm 0,67$; 2) “remisión” (n=32): $1,725 \pm 0,81$; y 3) “actividad” (n=36): $1,611 \pm 0,68$.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de linfocitos T totales en los distintos grupos de actividad.

5.3.3.2.Subpoblaciones de linfocitos T totales con respecto a grupos de actividad.

5.3.3.2.1.Subpoblaciones de LT totales.

Los valores de las subpoblaciones linfocitarias en los grupos de actividad se expresa en la *Figura 14*. El análisis de diferencias entre grupos se expresa en la *Tabla 13*.

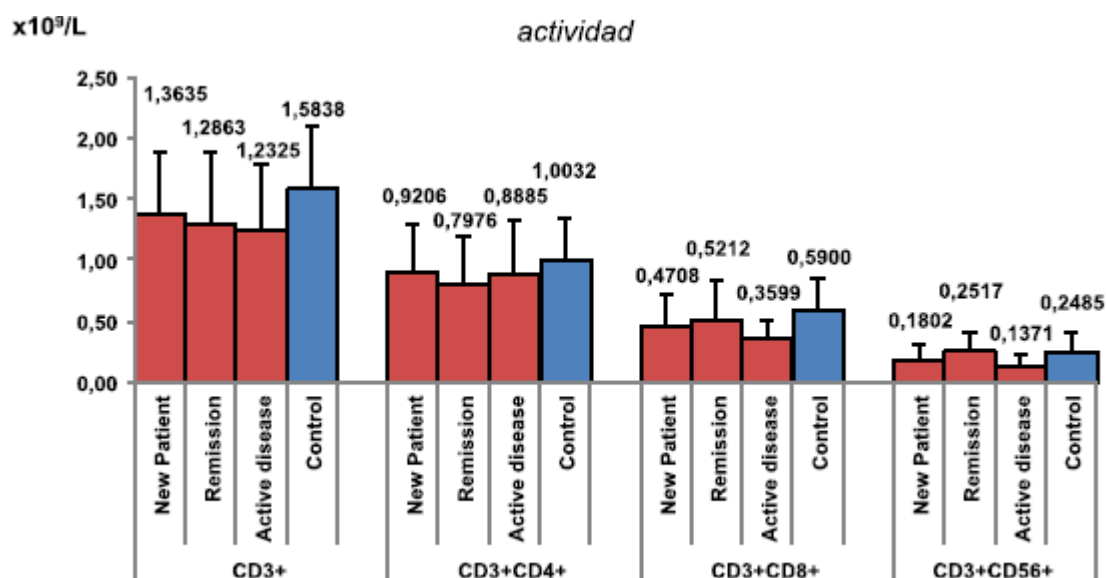


Fig. 14. Cifras medias de LT en grupos de actividad.

GRUPOS DE PACIENTES	CD3+	CD4+	CD8+	CD56+
Control vs Nuevos	p=0,045*	NS	p=0,019*	p=0,009*
Control vs Remisión	p=0,002*	P=0,001*	NS	NS
Control vs Actividad	p<0,001*	NS	p<0,001*	p<0,001*
Remisión vs Nuevos	NS	NS	NS	NS
Remisión vs Actividad	NS	NS	p=0,028*	p=0,005*
Nuevos vs Actividad	NS	NS	NS	NS

* Diferencia estadísticamente significativa (p<0,005)

Tabla 16. Diferencias entre las subpoblaciones linfocitarias totales en los grupos de actividad.

5.3.3.2.1. Subpoblaciones de LT $\alpha\beta$.

Los valores de las subpoblaciones de LT $\alpha\beta$ en los grupos de actividad y sus diferencias se expresa en la *Figura 15* y la *Tabla 17*.

**New patient="nuevos"; remission=remisión; active disease=actividad

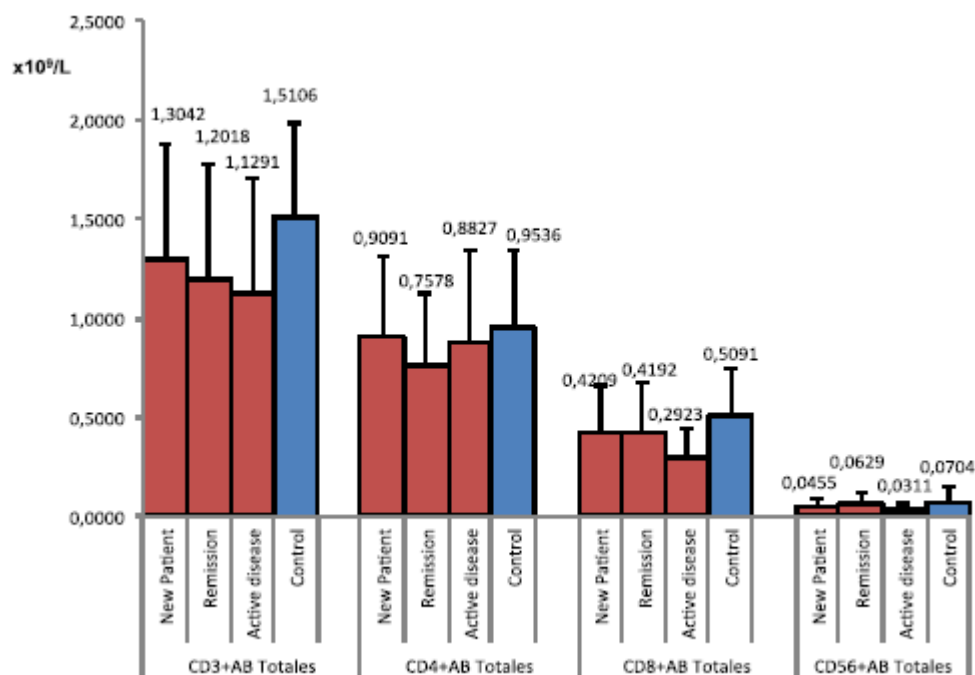


Fig. 15. Cifras medias de LT $\alpha\beta$ en grupos de actividad.

GRUPOS DE PACIENTES	$\alpha\beta$ CD3+	$\alpha\beta$ CD4+	$\alpha\beta$ CD8+	$\alpha\beta$ CD56+
Control vs Nuevos	p=0,03*	NS	NS	NS
Control vs Remisión	p=0,001*	p=0,002*	p=0,03*	NS
Control vs Activos	p<0,001*	NS	p<0,001*	NS
Remisión vs Nuevos	NS	NS	NS	NS
Remisión vs Activos	NS	NS	p=0,024*	NS
Nuevos vs Activos	NS	NS	p=0,032	NS

* Diferencia estadísticamente significativa (p<0,005)

**New patient="nuevos"; remission="remisión"; active disease="actividad"

Tabla 17. Diferencias entre las subpoblaciones de $LT\alpha\beta$ en los grupos.

5.3.3.2.1. Subpoblaciones de $LT\delta\gamma$.

Los valores de las subpoblaciones linfocitarias $\delta\gamma$ en los grupos de actividad y sus diferencias se expresan en la *Figura 16* y en la *Tabla 19*.

**New patient="nuevos"; remission="remisión"; active disease="actividad"

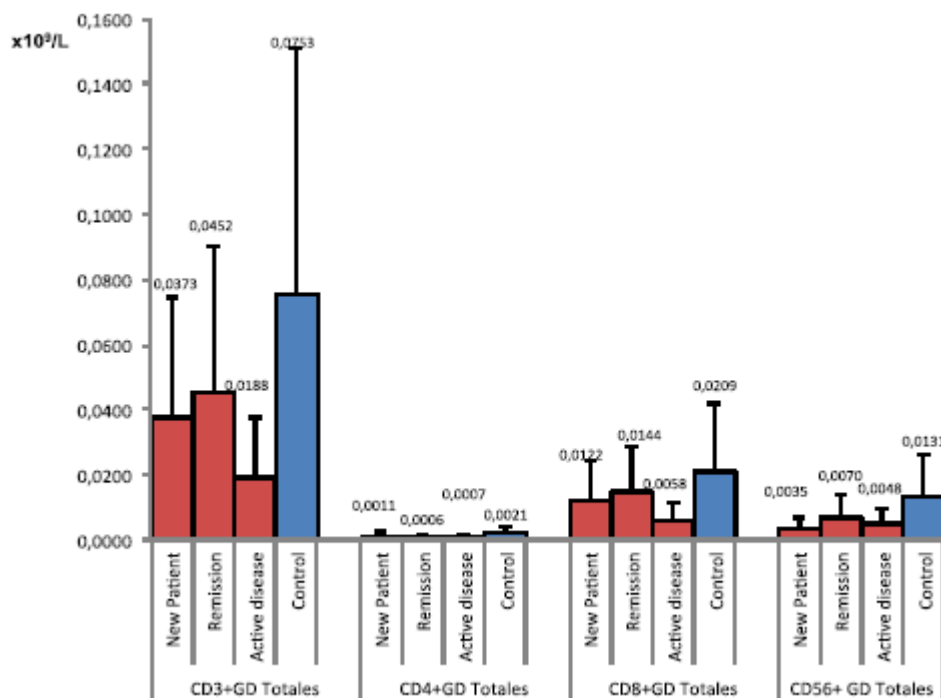


Fig.16. Cifras medias de $LT\gamma\delta$ en grupos de actividad.

GRUPOS DE PACIENTES	$\gamma\delta$ CD3+	$\gamma\delta$ CD4+	$\gamma\delta$ CD8+	$\gamma\delta$ CD56+
Control vs Nuevos	$p < 0,001^*$	NS (0,06)	NS	NS
Control vs Remisión	$p < 0,001^*$	$p = 0,002^*$	NS	NS
Control vs Actividad	$p < 0,001^*$	$p = 0,006^*$	$p < 0,001^*$	$p = 0,007^*$
Remisión vs Actividad	NS	NS	NS	NS
Remisión vs Actividad	$p = 0,035$	NS	$p = 0,012^*$	NS
Nuevos vs Actividad	NS	NS	NS	NS

* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,005$)

***New patient="nuevos"; remission=remisión;active disease=actividad*

Tabla 18. Diferencias entre las subpoblaciones de $LT\gamma\delta$ en los grupos.

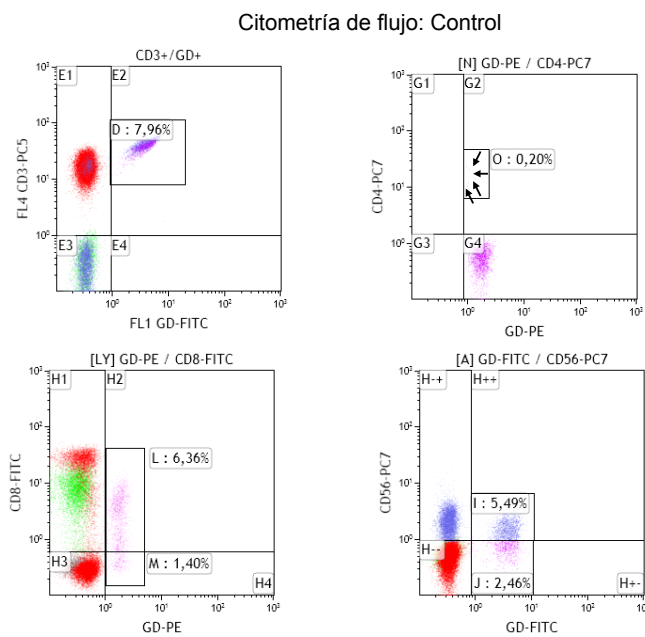


Fig.17. Estudio por citometría de flujo de los subtipos de $LT\gamma\delta$ en un control.

Citometría de flujo: Caso

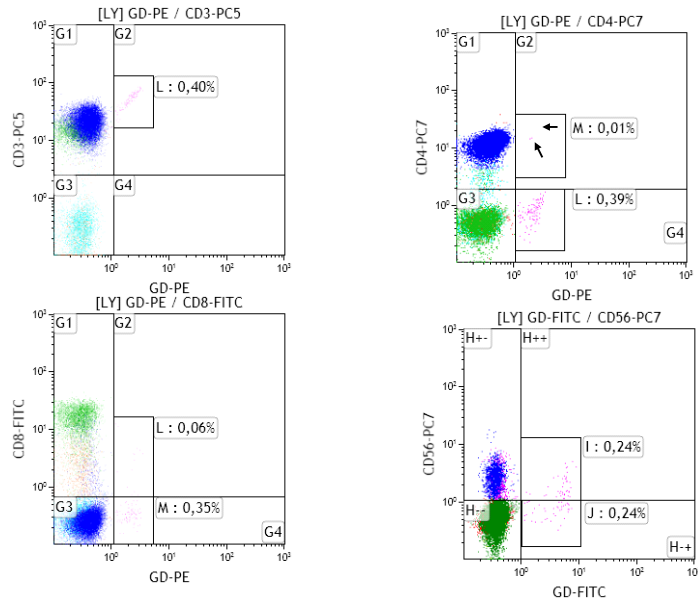


Fig. 18. Estudio por citometría de flujo de los subtipos de LT $\gamma\delta$ en un paciente.

Se realizó un estudio de las subpoblaciones linfocitarias agrupando a los pacientes “nuevos” y “actividad” en la variable “**actividad global**”. En la *Tabla 19* se reflejan los valores medios en ambos grupos.

Sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en los LT totales CD56+ ($p=0,008$) y en los LT CD8+ $\gamma\delta$ ($p=0,029$).

Subpoblaciones	ACTIVIDAD			
	No		ACTIVIDAD Global	
	Media	DT	Media	DT
CD3+ Totales	1,2863	0,620	1,2950	0,548
CD4+ Totales	0,7976	0,399	0,9041	0,407
CD8+ Totales	0,5212	0,308	0,4138	0,210
CD56+ Totales *	<u>0,2517</u>	<u>0,172</u>	<u>0,1580</u>	<u>0,119</u>
CD3+ αβ	1,2018	0,569	1,2153	0,579
CD4+ αβ	0,7578	0,362	0,8959	0,426
CD8+αβ	0,4192	0,248	0,3576	0,208
CD56+αβ	0,0629	0,056	0,0388	0,041
CD3+γδ	0,0452	0,062	0,0278	0,039
CD4+γδ	0,0006	0,007	0,0009	0,001
CD8+γδ *	<u>0,0144</u>	<u>0,017</u>	<u>0,0089</u>	<u>0,016</u>
CD56+ γδ	0,0070	0,009	0,0042	0,006
CD19+ γδ	0,1725	0,139	0,2166	0,136

Actividad Global = "nuevos" más "actividad"; DT=desviación típica; Unidades= nº cel. x10 ⁻⁶/L; * diferencias estadísticamente significativa.

Tabla 19. Valores medios de las subpoblaciones linfocitarias con respecto a la actividad

5.3.3.3.Linfocitos B en los grupos de actividad.

Las cifras séricas medias de los linfocitos B totales según grupos de actividad fueron: 1) "nuevos" (n=34): 0,225 ±0,13; 2)"remisión" (n=32):0,172 ±0,14; y 3)"actividad" (n=36): 0,208 ±0,13). **Figura 19.**

En el análisis de correlaciones entre grupos sólo fue estadísticamente significativa la diferencia entre pacientes del grupo "remisión" y los controles ($p<0,001$) y entre los pacientes del grupo "actividad" y los controles ($p=0,017$).

Figura 3.5. Cifras medias de Linfocitos B en los distintos grupos

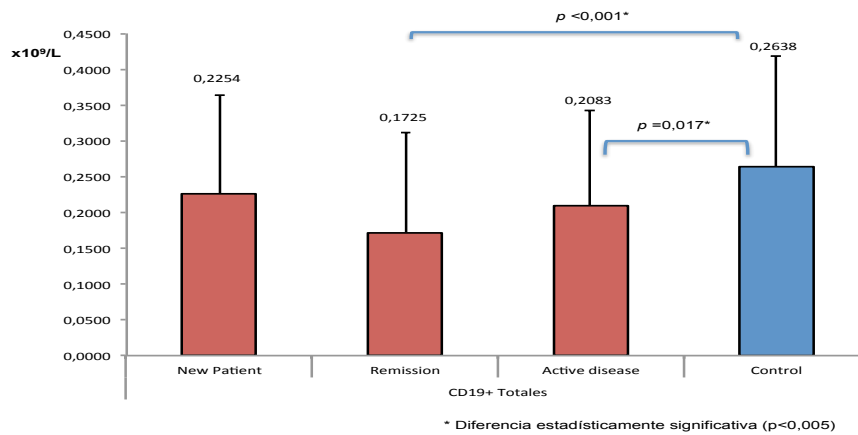


Fig. 19. Valores medios de linfocitos B en los grupos de actividad.

5.3.4.Comparación de subpoblaciones linfocitarias con respecto a la clasificación de Montreal.

5.3.4.1.Valores de linfocitos T totales con respecto a la clasificación de Montreal.

5.3.4.1.1. Correlación de linfocitos T totales con la edad (A).

Grupo A1 (<16 años) (n=7): 1,457 ±0,61; grupo A2 (17-40 años) (n=62): 1,821 ±0,76; grupo A3 (>40 años)(n=24):1,558 ±0,75.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de edad y las cifras de linfocitos T totales.

5.3.4.1.2. Correlación de linfocitos T totales con la localización (L).

Grupo L1 (ileal) (n=35): 1,651 ±0,77; grupo L2 (colónica) (n=15):1,820 ±0,99; grupo L3 (ileocolónica) (n=42):1,769 ±0,64; L4 (tracto digestivo superior) (n=1): 0,100. No hubo diferencias estadísticamente significativas en los linfocitos T totales entre los distintos grupos según la localización.

3.3.4.1.3. Correlación de linfocitos T totales con el patrón (B).

Grupo B1 (inflamatorio) (n=57): 1,708 ±0,71; grupo B2 (estenosante)(n=18):1,966 ±0,73; grupo B3 (fistulizante): 1,538 ±0,84. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los valores de linfocitos T en los distintos grupos según el patrón de enfermedad.

5.3.4.2.Subpoblaciones de linfocitos T con respecto a la clasificación de Montreal.

5.3.4.2.1.Correlación de las subpoblaciones de linfocitos T con la edad (A)

Los valores medios de las subpoblaciones de linfocitos T (totales, LT $\alpha\beta$ y LT $\gamma\delta$) con respecto a la edad se expresan en la *Tabla 20*, *Tabla 21* y *Tabla 22*.

Los pacientes de entre 17 y 40 años (A2) presentaron valores significativamente mayores de LT $\gamma\delta$ CD3+ que los pacientes mayores de 40 años (A3) ($p=0,037$). Se observaron diferencias -sin alcanzar significación estadística- entre las cifras de LT $\gamma\delta$ CD8+ de los pacientes más jóvenes (A1) y los pacientes de entre 17 y 40 años (A2)

Subpoblaciones	Montreal A (edad)	N	Media	DT
CD3+ Totales	A1 (<17)	7	1,0635	0,482
	A2 (17-40)	65	1,3549	0,587
	A3 (>40)	30	1,2115	0,631
CD4+ Totales	A1 (<17)	7	0,7225	0,321
	A2 (17-40)	65	0,9170	0,409
	A3 (>40)	30	0,8335	0,465
CD8+ Totales	A1 (<17)	7	0,3665	0,160
	A2 (17-40)	65	0,4659	0,270
	A3 (>40)	30	0,3925	0,230
CD56+ Totales	A1 (<17)	7	0,1226	0,079
	A2 (17-40)	65	0,2111	0,160
	A3 (>40)	30	0,1460	0,091

N=n° de pacientes; DT: desviación típica; cifras en células x10⁶/L

Tabla 20. Cifras medias de subpoblaciones de LT totales con respecto a la edad.

Subpoblaciones	Montreal A (edad)	N	Media	DT
CD3+ $\alpha\beta$	A1 (<17)	7	1,0002	0,458
	A2 (17-40)	65	1,3008	0,579
	A3 (>40)	30	1,0664	0,656
CD4+ $\alpha\beta$	A1 (<17)	7	0.6771	0,331
	A2 (17-40)	65	0.8993	0,410
	A3 (>40)	30	0.8123	0,483
CD8+ $\alpha\beta$	A1 (<17)	7	0.3315	0,157
	A2 (17-40)	65	0.3928	0,239
	A3 (>40)	30	0.3295	0,220
CD56+ $\alpha\beta$	A1 (<17)	7	0.0296	0,030
	A2 (17-40)	65	0.0556	0,055
	A3 (>40)	30	0.0222	0,017

N=n° de pacientes; DT: desviación típica; cifras en células x10 ⁻⁶/L

Tabla 21. Cifras medias de subpoblaciones de LT $\alpha\beta$ con respecto a los grupos de edad.

Subpoblaciones	Montreal A (edad)	N	Media	DT
CD3+ $\gamma\delta$	A1 (<17)	7	0,0344	.0298
	A2 (17-40)	65	0,0345	.0464
	A3 (>40)	30	0,0311	.0639
CD4+ $\gamma\delta$	A1 (<17)	7	0,0006	.0007
	A2 (17-40)	65	0,0008	.0010
	A3 (>40)	30	0,0009	.0014
CD8+ $\gamma\delta$	A1 (<17)	7	0,0058	.0041
	A2 (17-40)	65	0,0112	.0190
	A3 (>40)	30	0,0102	.0166
CD56+ $\gamma\delta$	A1 (<17)	7	0,0039	.0021
	A2 (17-40)	65	0,0050	.0078
	A3 (>40)	30	0,0035	.0058

N=n° de pacientes; DT: desviación típica; cifras en células x10 ⁻⁶/L

Tabla 22. Cifras medias de subpoblaciones de LT $\gamma\delta$ con respecto a los grupos de edad.

5.3.4.2.2. Correlación de las subpoblaciones de linfocitos T con la localización (L).

Los valores medios de las subpoblaciones de linfocitos T (totales, LT $\alpha\beta$ y LT $\gamma\delta$) con respecto a la localización se expresan en la *Tabla 23*, *Tabla 24* y *Tabla 25*.

Los pacientes con localización colónica presentaban cifras medias significativamente menores de LT $\gamma\delta$ CD3+ que los pacientes con localización ileocolónica ($p=0,035$).

Subpoblaciones	Montreal L (localización)	N	Media	DT
CD3+ Totales	L1 (ileal)	36	1,2182	0,587
	L2 (colónica)	18	1,3666	0,772
	L3 (ileocolónica)	43	1,3434	0,536
	L4 (digestivo superior)	1	0,8277	-
CD4+ Totales	L1 (ileal)	36	0,8659	0,468
	L2 (colónica)	18	0,8714	0,483
	L3 (ileocolónica)	43	0,9043	0,358
	L4 (digestivo superior)	1	0,5607	-
CD8+ Totales	L1 (ileal)	36	0,3917	0,199
	L2 (colónica)	18	0,5171	0,364
	L3 (ileocolónica)	43	0,4560	0,249
	L4 (digestivo superior)	1	0,2487	-
CD56+ Totales	L1 (ileal)	36	0,1515	0,102
	L2 (colónica)	18	0,1696	0,123
	L3 (ileocolónica)	43	0,2265	0,171
	L4 (digestivo superior)	1	0,0920	-

N=n° de pacientes; DT: desviación típica; cifras en células x10⁶/L

Tabla 23. Cifras medias de subpoblaciones de LT totales con respecto a la localización de la enfermedad.

Subpoblaciones	Montreal L (localización)	N	Media	DT
CD3+ $\alpha\beta$	L1 (ileal)	36	1,1358	0,637
	L2 (colónica)	18	1,2856	0,705
	L3 (ileocolónica)	43	1,2764	0,524
	L4 (digestivo superior)	1	0,7924	.
CD4+ $\alpha\beta$	L1 (ileal)	36	0,8542	0,478
	L2 (colónica)	18	0,7996	0,436
	L3 (ileocolónica)	43	0,9012	0,377
	L4 (digestivo superior)	1	0,5524	-
CD8+ $\alpha\beta$	L1 (ileal)	36	0,3333	0,184
	L2 (colónica)	18	0,4296	0,283
	L3 (ileocolónica)	43	0,3888	0,244
	L4 (digestivo superior)	1	0,2341	-
CD56+ $\alpha\beta$	L1 (ileal)	36	0,0370	0,052
	L2 (colónica)	18	0,0740	0,062
	L3 (ileocolónica)	43	0,0419	0,033
	L4 (digestivo superior)	1	0,0022	-

N=n° de pacientes; DT: desviación típica; cifras en células x10⁻⁶/L

Tabla 24. Cifras medias de subpoblaciones de LT $\alpha\beta$ con respecto a la localización de la enfermedad.

Subpoblaciones	Montreal L (localización)	N	Media	DT
CD3+ $\gamma\delta$	L1 (ileal)	36	1,2182	0,587
	L2 (colónica)	18	1,3666	0,772
	L3 (ileocolónica)	43	1,3434	0,536
	L4 (digestivo superior)	1	0,8277	-
CD4+ $\gamma\delta$	L1 (ileal)	36	0,8659	0,468
	L2 (colónica)	18	0,8714	0,483
	L3 (ileocolónica)	43	0,9043	0,358
	L4 (digestivo superior)	1	0,5607	.
CD8+ $\gamma\delta$	L1 (ileal)	36	0,3917	0,199
	L2 (colónica)	18	0,5171	0,364
	L3 (ileocolónica)	43	0,4560	0,249
	L4 (digestivo superior)	1	0,2487	.
CD56+ $\gamma\delta$	L1 (ileal)	36	0,1515	0,102
	L2 (colónica)	18	0,1696	0,123
	L3 (ileocolónica)	43	0,2265	0,171
	L4 (digestivo superior)	1	0,0920	-

N=n° de pacientes; DT: desviación típica; cifras en células $\times 10^{-6}/L$.

Tabla 25. Cifras medias de subpoblaciones de LT $\gamma\delta$ con respecto a la localización de la enfermedad.

5.3.4.2.2. Correlación de las poblaciones de linfocitos T con el patrón (B)

Los valores medios de las subpoblaciones de linfocitos T con respecto al patrón de enfermedad se reflejan en la *Tabla 26*, *Tabla 27*, y *Tabla 28*.

No se encontraron diferencias significativas entre las subpoblaciones linfocitarias con respecto al patrón de enfermedad. Sin embargo los pacientes con patrón fistulizante presentaban valores medios menores que los pacientes con patrón estenosante de LT $\gamma\delta$ CD3+ (0,148 vs 0,564, respectivamente) y LT $\gamma\delta$ CD8+ (0,003 vs 0,020, respectivamente), sin diferencias significativas.

Subpoblaciones	Montreal B (patrón)	N	Media	DT
CD3+ Totales	B1 (inflamatorio)	60	1,2709	0,545
	B2 (estenosante)	21	1,4933	0,628
	B3 (fistulizante)	21	1,1564	0,677
CD4+ Totales	B1 (inflamatorio)	60	0,8555	0,395
	B2 (estenosante)	21	1,0380	0,507
	B3 (fistulizante)	21	0,8038	0,377
CD8+ Totales	B1 (inflamatorio)	60	0,4494	0,249
	B2 (estenosante)	21	0,4482	0,240
	B3 (fistulizante)	21	0,3991	0,293
CD56+ Totales	B1 (inflamatorio)	60	0,1945	0,139
	B2 (estenosante)	21	0,2193	0,182
	B3 (fistulizante)	21	0,1342	0,010

N=n° de pacientes; DT: desviación típica; cifras en células x10⁶/L.

Tabla 26. Cifras medias de subpoblaciones de LT totales con respecto al patrón.

Subpoblaciones	Montreal B (patrón)	N	Media	DT
CD3+ αβ	B1 (inflamatorio)	60	1,2355	0,547
	B2 (estenosante)	21	1,3000	0,692
	B3 (fistulizante)	21	1,0645	0,655
CD4+ αβ	B1 (inflamatorio)	60	0,8444	0,400
	B2 (estenosante)	21	1,0213	0,524
	B3 (fistulizante)	21	0,7444	0,352
CD8+ αβ	B1 (inflamatorio)	60	0,3877	0,229
	B2 (estenosante)	21	0,3768	0,194
	B3 (fistulizante)	21	0,3119	0,269
CD56+ αβ	B1 (inflamatorio)	60	0,0503	0,051
	B2 (estenosante)	21	0,0346	0,049
	B3 (fistulizante)	21	0,0341	0,038

N=n° de pacientes; DT: desviación típica; cifras en células x10⁶/L.

Tabla 27. Cifras medias de subpoblaciones de LT αβ con respecto al patrón

Subpoblaciones	Montreal B (patrón)	N	Media	DT
CD3+ $\gamma\delta$	B1 (inflamatorio)	60	0.0323	0.035
	B2 (estenosante)	21	0.0564	0.090
	B3 (fistulizante)	21	0.0148	0.016
CD4+ $\gamma\delta$	B1 (inflamatorio)	60	0.0009	0.001
	B2 (estenosante)	21	0.0005	0.000
	B3 (fistulizante)	21	0.0007	0.001
CD8+ $\gamma\delta$	B1 (inflamatorio)	60	0.0094	0.011
	B2 (estenosante)	21	0.0205	0.033
	B3 (fistulizante)	21	0.0039	0.004
CD56+ $\gamma\delta$	B1 (inflamatorio)	60	0.0043	0.006
	B2 (estenosante)	21	0.0054	0.004
	B3 (fistulizante)	21	0.0051	0.009

N=n° de pacientes; DT: desviación típica; cifras en células $\times 10^6/L$

Tabla 28. Cifras medias de subpoblaciones de LT $\gamma\delta$ con respecto al patrón.

5.3.4.3. Valores de linfocitos B con respecto a la clasificación de Montreal.

5.3.4.3.1. Correlación de linfocitos B con la edad (A).

Los valores medios de los linfocitos B en cada grupo de edad se reflejan en la *Tabla 29*.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de edad y las cifras de linfocitos B, aunque existe una tendencia a la baja en el grupo A3 (>40 años).

Subpoblaciones	Montreal A (edad)	N	Media	DT
CD19+ Totales	A1 (<17)	7	0.2003	0.112
	A2 (17-40)	62	0.2180	0.157
	A3 (>40)	24	0.1678	0.099

N=n° de pacientes; DT: desviación típica; cifras en células $\times 10^6/L$.

Tabla 29. Cifras medias de linfocitos B con respecto a la edad.

5.3.4.3.2. Correlación de linfocitos B con la localización (L).

Los valores medios de los linfocitos B con respecto a la localización (L) se reflejan en la *Tabla 30*.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos según la localización.

Subpoblaciones	Montreal L (localización)	N	Media	DT
CD19+ Totales	L1 (ileal)	36	0,2118	0,136
	L2 (colónica)	18	0,2331	0,181
	L3 (ileocolónica)	43	0,1875	0,134
	L4 (digestivo superior)	1	0,1625	-

N=nº de pacientes; DT: desviación típica; cifras en células x10⁶/L.

Tabla 30. Cifras medias de linfocitos B con respecto a la localización.

5.3.4.3.3. Correlación de linfocitos B con el patrón (B).

Los valores medios de los linfocitos B en cada grupo de pacientes según el patrón de la enfermedad se reflejan en la *Tabla 31*.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los valores de linfocitos B en los distintos grupos según el patrón de enfermedad. Se observó una tendencia no significativa entre los patrones B1 (inflamatorio) a presentar valores menores.

Subpoblaciones	Montreal B (patrón)	N	Media	DT
CD 19+	B1 (inflamatorio)	60	0,187996	0,1247
	B2 (estenósante)	21	0,249829	0,1499
	B3 (fistulizante)	21	0,207701	0,1794

N=nº de pacientes; DT: desviación típica; cifras en células x10⁶/L.

Tabla 31. Cifras medias de Linfocitos B con respecto al patrón

5.3.5. Comparación de subpoblaciones linfocitarias con respecto a los índices de actividad clínica

5.3.5.1. Valores medios de linfocitos T totales con respecto a criterios clínicos de actividad clínica

No se halló ninguna correlación significativa entre los valores de linfocitos T totales y los criterios clínicos de actividad (CDAI y Harvey-Bradshaw).

5.3.5.2.Subpoblaciones de linfocitos T con respecto a criterios clínicos de actividad

Las correlaciones entre las subpoblaciones linfocitarias y los índices clínicos de gravedad (CDAI y Harvey-Bradshaw) se expresan en la *Tabla 32*.

Hubo una correlación inversa significativa entre los LT CD56+ totales, LT $\delta\gamma$ CD3+, LT $\delta\gamma$ CD8+ y ambos índices clínicos. No se encontró ninguna correlación significativa entre las subpoblaciones de LT $\alpha\beta$ y los mismos.

No se halló correlación entre las subpoblaciones linfocitarias y los valores de proteína C reactiva (PCR). Sin embargo hubo una correlación inversa significativa con la velocidad de sedimentación globular (VSG) (LT $\delta\gamma$ CD3+ CC:-0,292, $p=0,013$; LT $\delta\gamma$ CD8+ CC:-0,319, $p=0,006$; LT $\delta\gamma$ CD56+ CC:-0,495, $p=0,001$).

Las correlaciones significativas entre las subpoblaciones linfocitarias y las puntuaciones obtenidas en los distintos apartados del CDAI fueron:

- El número de deposiciones se correlacionó inversamente con las cifras de LT $\delta\gamma$ CD 56+.
- El dolor abdominal se correlacionó inversamente con las cifras de LT $\alpha\beta$ CD8+
- El estado general se correlacionó inversamente con las cifras de LT CD56+ totales y los LT $\delta\gamma$ CD3+.
- Las cifras medias del hematocrito se correlacionaron inversamente con las cifras de LT $\alpha\beta$ CD56+

Sub poblaciones	N	CDAI CC	CDAI (p)	Harvey-Bradshaw CC	Harvey-Bradshaw (p)
CD3+ Totales	102	0,113	NS	0,86	NS
CD4+ Totales	102	0,185	NS	0,103	NS
CD8+ Totales	102	-0,004	NS	0,20	NS
CD56+ Totales	102	-0,196	p=0,002*	-0,156	p=0,006*
CD3+ $\alpha\beta$	102	0,018	NS	0,016	NS
CD4+ $\alpha\beta$	102	0,170	NS	0,100	NS
CD8+ $\alpha\beta$	102	0,53	NS	0,91	NS
CD56+ $\alpha\beta$	102	0,46	NS	0,75	NS
CD3+ $\gamma\delta$	102	-0,304	p=0,014*	-0,286	p=0,040*
CD4+ $\gamma\delta$	102	-0,150	NS	0,12	NS
CD8+ $\gamma\delta$	102	-0,273	p=0,007*	-0,249	p=0,022*
CD56+ $\gamma\delta$	102	-0,114	NS	-0,333	p=0,019*

CC= coeficiente de correlación; *p<0,005=estadísticamente significativo

Tabla 32. Correlación entre las subpoblaciones linfocitarias e índices clínicos.

5.3.5.3. Valores medios de linfocitos B con respecto a criterios clínicos de actividad.

No se halló ninguna correlación significativa entre los valores de linfocitos B y los criterios clínicos de actividad (CDAI y Harvey-Bradshaw).

5.3.6.Comparación de subpoblaciones linfocitarias con respecto a la actividad endoscópica

5.3.6.1.Valores de linfocitos T totales con respecto a la actividad endoscópica.

No se halló ninguna correlación significativa entre los valores de linfocitos B y el índice de gravedad endoscópicos SES-CD.

5.3.6.2.Subpoblaciones de linfocitos T totales con respecto a la actividad endoscópica.

Se halló una correlación inversa estadísticamente significativa entre la gravedad endoscópica y las subpoblaciones de $LT\gamma\delta$ $CD3+$ (Coeficiente de correlación -0,275 y $p=0,008$) y los $LT\gamma\delta$ $CD8+$ (Coeficiente de correlación -0,249 y $p=0,017$). No se encontraron correlaciones significativas entre la gravedad endoscópica y las subpoblaciones $LT\alpha\beta$.

5.3.6.3.Valores de linfocitos B con respecto a la actividad endoscópica

No se halló ninguna correlación significativa entre los valores de linfocitos B y el índice de gravedad endoscópico SES-CD.

5.3.7.Comparación de subpoblaciones linfocitarias con respecto a la presencia de granulomas.

5.3.7.1. Valores de linfocitos T totales con respecto a la presencia de granulomas.

No se halló ninguna diferencia significativa entre los valores de linfocitos T totales y la presencia o no de granulomas en el estudio histológico.

5.3.7.2.Subpoblaciones de linfocitos T totales respecto a presencia de granulomas.

No se halló ninguna diferencia significativa entre las subpoblaciones de LT y la presencia o no de granulomas en el estudio histológico.

5.3.7.3. Valores de linfocitos B con respecto a la presencia de granulomas.

No se halló ninguna diferencia significativa entre los valores de linfocitos B y la presencia o no de granulomas en el estudio histológico.

5.3.8.Comparación de subpoblaciones linfocitarias con respecto al hábito tabáquico

5.3.8.1. Valores de linfocitos T totales con respecto al hábito tabáquico activo

Se observó una diferencia significativa a presentar cifras superiores de linfocitos T totales en pacientes fumadores ($p=0,002$).

5.3.8.2.Subpoblaciones de linfocitos T totales con respecto al hábito tabáquico

Los pacientes fumadores presentaron valores séricos medios de LT CD4+, LT CD56+, LT $\alpha\beta$ CD3+ y LT $\alpha\beta$ CD4+ significativamente mayores que los pacientes no fumadores. No hubo diferencias significativas en los LT $\gamma\delta$.

5.3.8.3. Valores de linfocitos B con respecto al hábito tabáquico activo

No se halló ninguna diferencia significativa entre los valores de linfocitos B y el hábito tabáquico activo.

Se observó una tendencia no significativa a presentar cifras superiores de linfocitos B en pacientes fumadores ($p=0,71$).

5.3.9.Comparación de subpoblaciones linfocitarias con respecto a la presencia de enfermedad perianal y manifestaciones gastrointestinales.

5.3.9.1. Valores de linfocitos T totales con respecto a la presencia de enfermedad perianal y manifestaciones extraintestinales.

No se halló ninguna diferencia significativa entre los valores de linfocitos T y la presencia o no de enfermedad perianal ni de manifestaciones extraintestinales.

5.3.9.2.Subpoblaciones de linfocitos T totales con respecto a la presencia de enfermedad perianal y manifestaciones extraintestinales.

Los pacientes con enfermedad perianal 24/102 (23,5%), presentaban valores medios menores de LT $\gamma\delta$ CD3+ ($p=0,047$) y los LT $\gamma\delta$ CD8+ ($p=0,017$). No hubo diferencias significativas en las subpoblaciones de LT $\alpha\beta$.

No hubo diferencias entre las subpoblaciones linfocitarias según la presencia o no de manifestaciones extraintestinales.

5.3.9.3. Valores de linfocitos B con respecto a la presencia de enfermedad perianal y manifestaciones extraintestinales.

No se halló ninguna correlación significativa entre los valores de linfocitos B y la presencia o no de enfermedad perianal ni de manifestaciones extraintestinales.

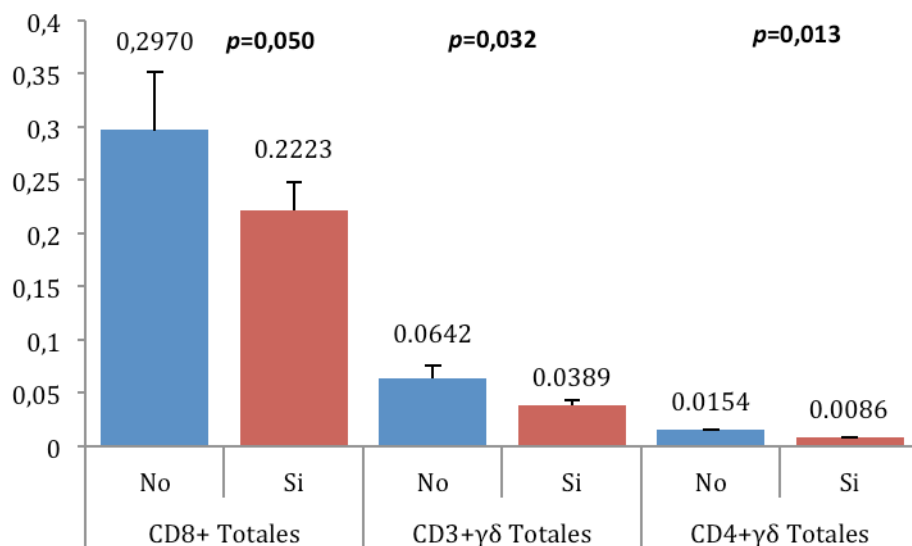
5.3.10. Comparación de subpoblaciones linfocitarias con respecto al tratamiento farmacológico.

5.3.10.1. Influencia de la presencia o no de tratamiento en las distintas subpoblaciones linfocitarias y en el hemograma.

Se analizaron los valores medios séricos celulares con respecto al empleo de fármacos para el control de la enfermedad. *Tabla 33 y Tabla 34.*

No se encontraron diferencias significativas en los valores medios del hemograma entre pacientes que recibían o no tratamiento farmacológico.

Aquellos con tratamiento farmacológico mostraron cifras significativamente menores de $LT\gamma\delta CD3+$ ($p=0,032$) y $LT\gamma\delta CD4+$ ($p=0,013$). Los $LT CD8+$ totales rozaron la significación ($p=0,05$). *Figura 20.*



Valores en cel x10⁶/L

Fig. 20. Valores medios de las subpoblaciones en las que se encontraron diferencias significativas con respecto al tratamiento o no, y su significación.

5.3.10.2. Influencia de los distintos tipos de tratamiento en las distintas subpoblaciones linfocitarias y en el hemograma.

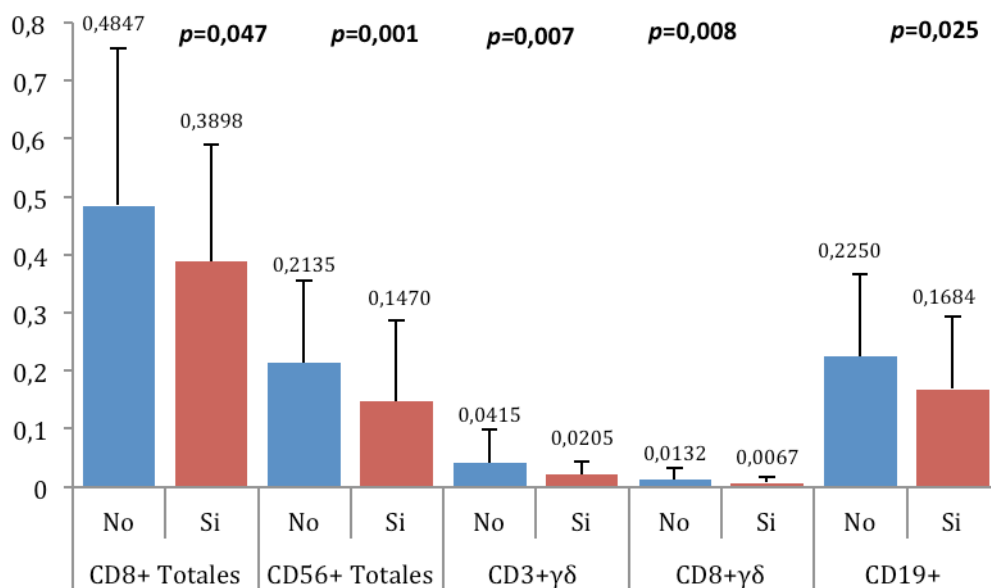
5.3.10.2.3. Mesalazina.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores medios del hemograma ni en las subpoblaciones linfocitarias entre pacientes que recibían o no mesalazina.

5.3.10.2.4. Azatioprina.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores medios del hemograma entre pacientes que recibían o no azatioprina (AZA).

Sin embargo, aquellos que recibían AZA presentaba cifras significativamente menores de LT CD8+ totales ($p=0,047$), LT CD56+ totales ($p=0,001$), LT $\gamma\delta$ CD3+ ($p=0,007$), LT $\gamma\delta$ CD8+ ($p=0,008$) y LT CD19+ ($p=0,025$). *Figura 21*



Valores en cel x10⁶/L

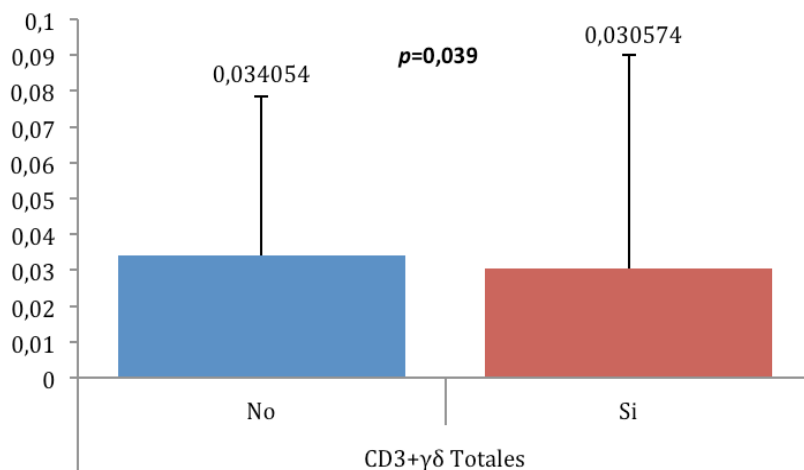
Fig. 21. Valores medios de las subpoblaciones en las que se encontraron diferencias significativas con respecto al tratamiento con azatioprina, y su significación.

5.3.10.2.5. Anti-TNF.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores medios del hemograma ni en las subpoblaciones linfocitarias entre pacientes que recibían o no anti-TNF.

5.3.10.2.6. Antibiótico.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores medios del hemograma ni en los LT totales entre pacientes que recibían o no antibiótico. Las cifras de $LT_{\gamma\delta} CD3+$, fueron significativamente menores ($p=0,039$) en aquellos que recibían antibiótico. *Fig. 22.*



Valores en cel x10⁶/L

Fig. 22. Valores medios de las subpoblaciones en las que se encontraron diferencias significativas con respecto al tratamiento con antibiótico, y su significación.

5.3.10.2.7. Corticoides.

Sólo se encontraron diferencias significativas entre los niveles de $LT_{CD4+\alpha\beta}$ entre los tratados y no tratados con corticoides. *Figura 23.*

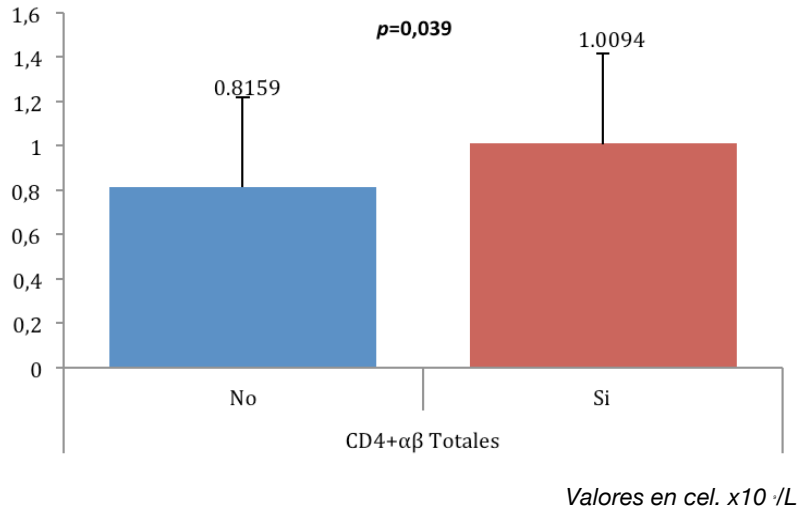


Fig. 23. Valores medios de las subpoblaciones en las que se encontraron diferencias significativas con respecto al tratamiento con corticoides, y su significación.

5.3.10.2.9. Corticoides no absorbibles (budesonida), sulfasalazina y metotrexate.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores medios del hemograma ni en las subpoblaciones linfocitarias entre pacientes que recibían o no dichos tratamientos.

Hemograma	Tratamiento	N	Media	DT	p
<i>Leucocitos</i>	No	29	8,293	2,463	NS
	Si	73	7,964	3,110	
<i>Neutrófilos</i>	No	29	5,607	2,083	NS
	Si	73	5,512	2,679	
<i>Linfocitos</i>	No	29	1,755	0,692	NS
	Si	73	1,644	0,711	
<i>Monocitos</i>	No	29	0,690	0,310	NS
	Si	73	0,605	0,309	
<i>Eosinófilos</i>	No	29	0,238	0,306	NS
	Si	73	0,159	0,232	
<i>Basófilos</i>	No	29	0,038	0,072	NS
	Si	73	0,032	0,046	

Plaquetas	No	29	337,03	119,53	NS
	Si	73	310,79	108,93	
Hemoglobina	No	29	12,739	1,717	NS
	Si	73	12,760	2,365	

N=n° de pacientes; DT: desviación típica; cifras en células $\times 10^9/L$; NS=no estadísticamente significativa.

Tabla 33. Valores medios de las poblaciones del hemograma en función de la presencia o no de tratamiento farmacológico, y su significación estadística (p).

Subpoblaciones	Tratamiento	N	Media	DT	p
CD3+ Totales	No	29	1,3575	0,640	NS
	Si	73	1,2681	0,545	
CD4+ Totales	No	29	0,8884	0,467	NS
	Si	73	0,8636	0,382	
CD8+ Totales	No	29	0,5212	0,296	p=0,05*
	Si	73	0,4181	0,222	
CD56+ Totales	No	29	0,2043	0,146	NS
	Si	73	0,1807	0,143	
CD3+ $\alpha\beta$	No	29	1,3056	0,659	NS
	Si	73	1,1739	0,536	
CD4+ $\alpha\beta$	No	29	0,8766	0,471	NS
	Si	73	0,8376	0,384	
CD8+ $\alpha\beta$	No	29	0,4294	0,278	NS
	Si	73	0,3580	0,196	
CD56+ $\alpha\beta$	No	29	0,0407	0,045	NS
	Si	73	0,0494	0,048	
CD3+ $\gamma\delta$	No	29	0,0482	0,064	p=0,032*
	Si	73	0,0272	0,038	
CD4+ $\gamma\delta$	No	29	0,0014	0,001	p=0,013*
	Si	73	0,0006	0,000	
CD8+ $\gamma\delta$	No	29	0,0142	0,017	NS
	Si	73	0,0091	0,017	

CD56+ $\gamma\delta$	No	29	0,0036	0,004	NS
	Si	73	0,0056	0,008	
CD19+	No	29	0,2280	0,144	NS
	Si	73	0,1927	0,135	

*N=n° de pacientes; DT: desviación típica; cifras en células $\times 10^6/L$; NS=no estadísticamente significativa; *=-diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,005$)*

Tabla 34. Valores medios de las subpoblaciones linfocitarias en función de la presencia o no de tratamiento farmacológico, y su significación estadística (p).

5.4. Análisis IL-7.

5.4.1. Valores séricos medios de IL-7 en casos y controles.

Se analizaron 120 sujetos. De ellos 62 eran enfermos de EC y 58 controles. El valor medio de IL-7 en casos fue de $20,20 \pm 10,5$ y de $18,05 \pm 12,3$ en EC. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos ($p=0.306$).

Los varones presentaron cifras menores de IL-7 que las mujeres ($17,18 \pm 8,72$ vs $20,8 \pm 13,3$), aunque sin diferencias estadísticas ($p=0.075$). Estas diferencias se invierten en el grupo de EC ($20,74 \pm 11,55$ vs $15,83 \pm 9,30$), sin alcanzar diferencias significativas ($p=0.075$).

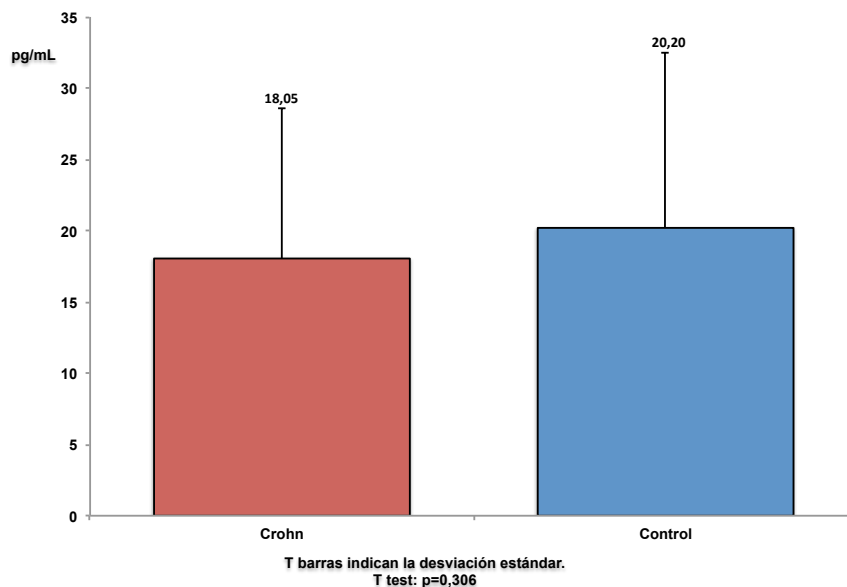


Fig. 24. Niveles medios de IL-7 en EC y controles.

5.4.2. Valores séricos medios de IL-7 en los grupos de actividad.

Los valores medios de IL-7 en cada grupo de actividad se reflejan en la *Tabla 35*.

El grupo “nuevos” presento los niveles más bajos. Sin embargo, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos.

Los pacientes del grupo “actividad” –que incluye al grupo “nuevos” y “activos”- presento niveles menores de IL-7 que el grupo de remisión ($17,66\pm 10,6$ vs $18,90\pm 10,7$), sin alcanzar diferencias significativas ($p=0.67$)

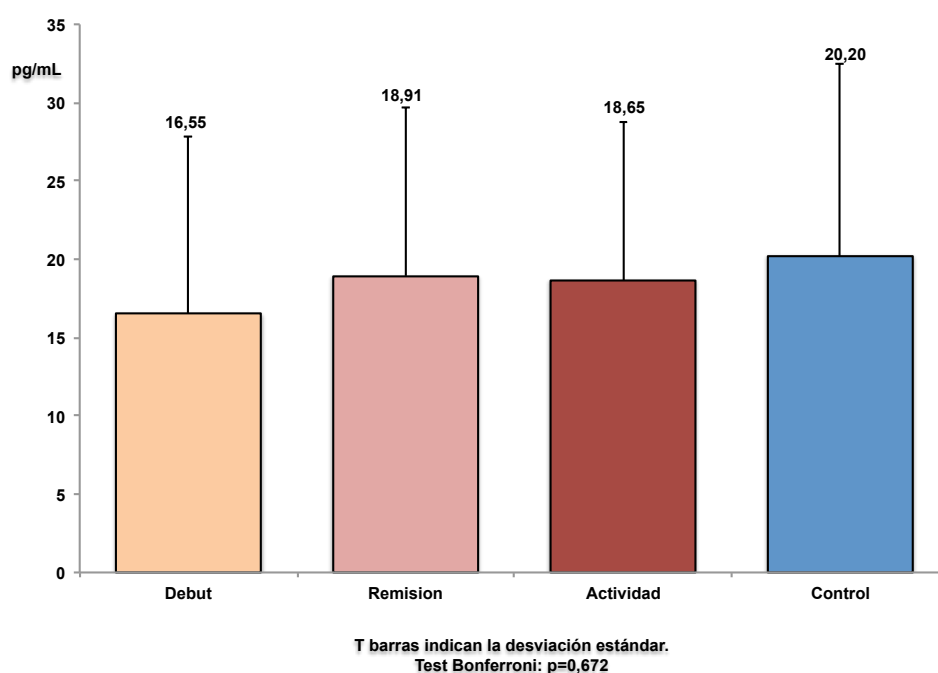


Fig. 25. Niveles medios de IL-7 en grupos de actividad de EC y controles.

5.4.3. Valores séricos medios de IL-7 respecto a la clasificación de Montreal.

Los pacientes más jóvenes (A1, menores de 17 años) presentaron valores significativamente menores que los pacientes mayores (A2 y A3), siendo la diferencia estadística entre A1 y A2 $p=0.014$ y entre A1 y A3 $p=0.008$.

Los enfermos con patrón estenosante (B2) presentaron los menores niveles de IL-7, sin diferencias significativas con respecto a los patrones inflamatorio (B1) o fistulizante (B3)

El grupo de EC de localización ileocolónica (L3) presentó los menores niveles de IL-7, sin diferencias significativas con respecto a las localizaciones ileal (L2) e ileocolónica (L3).

IL-7	Montreal	N	Media	DT
Edad	A1 (<17)	2	40,203	3,95
	A2 (17-40)	41	18,485	11,18
	A3 (>40)	19	16,287	7,43
Patrón	B1 (inflamatorio)	33	18,715	13,17
	B2 (estenosante)	17	17,782	7,07
	B3 (fistulizante)	12	19,578	7,41
Localización	L1 (ileal)	25	20,223	10,87
	L2 (colónico)	15	19,812	13,67
	L3 (ileocolónico)	32	17,013	9,84
	L4 (TD superior)	-	-	-

Tabla 35. Valores medios de la IL-7 según la clasificación fenotípica de EC

5.4.5. Valores séricos medios de IL-7 respecto a la actividad clínica.

No se halló una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de IL-7 y las variables de actividad clínica analizadas (CAI, $p=0.98$; Harvey-Bradshaw, $p=0.45$; VSG, $p=0.97$; PCR, $p=0.92$; y LDH, $p=0.14$).

5.4.6. Valores séricos medios de IL-7 respecto a la actividad endoscópica.

No se encontró una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de IL-7 y la gravedad endoscópica medida por el SES-CD ($p=0.56$)

5.4.7. Valores séricos medios de IL-7 respecto al hábito tabáquico y la presencia de enfermedad perianal, manifestaciones extraintestinales y granulomas.

Los pacientes fumadores presentaron valores medios de IL-7 mayores que los no fumadores, sin diferencias significativas ($10,41 \pm 7,8$ vs $17,36 \pm 10,5$), $p=0.80$.

No hubo diferencias significativas con respecto a la presencia o no de manifestaciones extraintestinales.

El grupo de pacientes con enfermedad perianal y aquellos con presencia de granulomas en las biopsias presentaron niveles menores de IL-7 sérica, sin alcanzar diferencias significativas ($17.84 \pm 7,6$ vs $18,07 \pm 11,2$ $p=0.96$; y $10,41 \pm 7,8$ vs $18,07$ $p=0.21$, respectivamente).

Cabe señalar, que tan solo 3 pacientes presentaron granulomas en las biopsias en grupo de estudio de IL-17.

5.4.8. Valores séricos medios de IL-7 respecto al tratamiento empleado.

Aquellos pacientes que recibían algún tratamiento en el momento de la inclusión presentaron niveles mayores de IL-7, sin diferencias significativas con respecto a los no tratados ($19,07 \pm 9,1$ vs $16,04$, $p=0.34$).

Los valores de IL-7 según el tratamiento empleado se refleja en la *Tabla 36*.

Los pacientes tratados con mesalazina, salazopirina, azatioprina y metotrexate presentaban valores menores de IL-7 con respecto a sus controles, mientras que los tratados con antibióticos, corticoides (no absorbibles o sistémicos) o anti-TNF presentaban niveles mayores.

Sin embargo, tan solo el grupo en el que se emplearon antibióticos presentó niveles mayores con significación estadística ($p=0.036$)

Tratamiento		N	IL-7 Media	DT
Mesalazina (*)	SI	30	16,432	10,06
	NO	32	19,565	10,98
Salazopirina (*)	SI	2	12,266	8,11
	NO	60	18,248	10,65
Antibioticos (+)	SI	15	22,503	9,69
	NO	47	16,621	10,55
Azatioprina (*)	SI	24	17,231	9,08
	NO	38	18,567	11,51
Metotrexate (*)	SI	2	16,534	7,02
	NO	60	18,093	10,71

Anti-TNF (+)	SI	7	18,577	7,77
	NO	55	17,989	10,94
Corticoides (+)	SI	11	22,757	9,89
	NO	51	17,032	10,54
Corticoides NA	SI	2	18,800	3,11
	NO	60	18,021	10,75

Tabla 36. Valores medios de la IL-7 según el tratamiento empleado. (*) señala los tratamientos que se correlacionaron con cifras menores de IL-7 y (+)señala los tratamientos que se correlacionaron con cifras mayores.

5.4.9. Correlación entre los niveles de IL-7 y las poblaciones leucocitarias.

En el conjunto de pacientes (n=120) no se halló correlación estadística entre los niveles de IL-7 y los leucocitos ($p=0,71$), ni los neutrófilos ($p=0,67$), los linfocitos totales ($p=0.69$), los monocitos, eosinófilos o los basófilos ($p=0.10$, $p=0.45$, $p=0.17$, respectivamente).

Tomando sólo los enfermos (n=62) tampoco se encontró correlación estadísticamente significativa entre los niveles séricos de IL-7 y los leucocitos ($p=0,75$), ni los neutrófilos ($p=0,85$), los linfocitos totales ($p=0.32$), los monocitos, eosinófilos o los basófilos ($p=0.79$, $p=0.71$, $p=0.54$, respectivamente).

5.4.10. Correlación entre los niveles de IL-7 y las subpoblaciones linfocitarias.

Se correlacionaron los niveles de IL-7 sérica con los linfocitos totales y las distintas subpoblaciones linfocitarias en el total de sujetos (N=120), en controles (N=58) y en enfermos (N=62).

No se halló ninguna correlación significativa en el **total de pacientes** ni con los linfocitos totales ni con las subpoblaciones.

En los **controles** se encontró una correlación débil con los LTCD8+ totales (Rho Spearman 0.234, $p=0.010$), con los LT $\alpha\beta$ CD56+ (Rho Spearman 0.272, $p= 0.043$), los LT $\gamma\delta$ CD3 (Rho Spearman 0.206, $p= 0.024$) y con los linfocitos B (Rho Spearman 0.186, $p= 0.041$).

No se encontró ninguna una correlación significativa en el **grupo de pacientes** ni con los linfocitos totales ni con las subpoblaciones.

6. Discusión

DISCUSIÓN

El presente trabajo confirma la hipótesis inicial de que los pacientes con enfermedad de Crohn (EC) presentan **linfopenia y una disminución significativa del número de L γ δ en sangre periférica** en comparación con sujetos sanos, y **niveles menores (no significativos) de IL-7**, lo que describe una alteración inmunitaria novedosa, en línea con la hipótesis patogénica de la inmunodeficiencia en la EC ^{(Glocker _ 2012) (Zhang YZ 2014) (Antoni L_ 2014)}.

Se han analizado una amplia muestra de 102 pacientes con EC y sus respectivos controles apareados por sexo y edad, ampliando significativamente la muestra de nuestros trabajos previos (ver *Anexos 3 y 4*) y permitiendo a su vez estudiar en profundidad la relación entre los distintos subtipos linfocitarios y factores clave como el fenotipo de la enfermedad, la actividad clínica y endoscópica o el empleo de tratamiento específico.

Para ello se reclutaron consecutivamente pacientes desde el servicio de Urgencias, las consultas externas e ingresados en el servicio de Digestivo y se clasificaron en **3 grupos de actividad** (nuevos, actividad y remisión). Los hombres supusieron algo más de la mitad de los pacientes, con una edad media global en torno a los 40 años.

La mayoría de ellos, como en otras series, presentan edades medias (17-40 años) (69%), localización preferente ileocolónica (43%) y patrón inflamatorio (62%) ^{(Thia K_ 2010). (Cosnes J_ 2002)}, con tiempos de seguimiento medios de entre 3 y 4 años desde el diagnóstico, actividad clínica “moderada” (CDAI medio 252 en el grupo actividad) y un 20% de pacientes con antecedentes de intervenciones quirúrgicas relacionadas con la enfermedad. Aproximadamente 1 de cada 4 pacientes presentaba enfermedad perianal (comparable a otras series en nuestro país) ^(Repiso A _ 2006), y más de un 40% era fumador activo en el momento de la inclusión.

Pensamos que se trata de una **muestra representativa** de los pacientes manejados cotidianamente en un servicio de Digestivo con atención especializada a la EII en distintos momentos evolutivos de la enfermedad.

La adición de datos de actividad endoscópica (de importante valor pronóstico) ^(FerranteM _ 2013) permite asimismo evaluar de manera más completa la actividad de la enfermedad. Es de destacar la inclusión de un número importante de pacientes en el momento del diagnóstico (34 pacientes nuevos), de gran valor para estudiar el estado inmunitario previo al empleo crónico de fármacos inmunosupresores.

Este trabajo demuestra que los pacientes EC presentan **valores séricos medios de linfocitos T (LT) totales significativamente menores que los controles**. Esta dismunición se mantuvo tanto en los LT CD3+totales, los LT CD4+, LT CD8+, y LT CD56+.

Las primeras **evidencias de la presencia de linfopenia en pacientes con EC** datan de los años 70. Strickland et al. y Sorensen et al. empleando antisuero contra timocitos humanos y la técnica de roseta de eritrocitos de carnero respectivamente, reportaron por primera vez una disminución de los LT en sangre periférica (SP) de pacientes con EC (en todas las subpoblaciones estudiadas), mientras que los pacientes con CU presentaban niveles normales ^{(Strickland R_ 1974) (Sorensen S_ 1977)}. Los autores apuntan a diferencias en la patogenia de ambas enfermedades como posible explicación de estas diferencias. Sin embargo este hecho no se ha corroborado en estudios posteriores ^(Selby WS 1983).

Selby et al emplearon por primera vez anticuerpos monoclonales para identificar subpoblaciones linfocitarias en 54 pacientes con EII (28 CU y 26 EC), y encontraron una disminución significativa de los LT tanto en EC como en CU activa (con niveles menores tanto de LT CD4+ y LT CD8+ en EC con respecto a controles). Sin embargo los valores de los LT no se correlacionaron con variables clínicas como la localización, la actividad o el tratamiento ^(Selby WS_1983). Este descenso de los LT se corroboró en un estudio posterior que incluyó exclusivamente 43 pacientes con EC ^(Pallone F_1983).

Nuestro grupo publicó un estudio en el que se comparaban los niveles séricos de diferentes poblaciones linfocitarias en 40 pacientes con EC y 40 controles, comprobándose un descenso significativo de los valores de LT totales (incluyendo los LTCD4+ y los LTCD8+) *(Andreu-Ballester JC_2011) (Anexo 3)*.

Sin embargo, existen 2 estudios que incluyeron un total de 40 pacientes de EC que encontraron niveles séricos de LT normales *(Senju M_1991), (Giacomelli R_1994)*. Cabe señalar sin embargo que en el estudio de Giacomelli et al los niveles de LT fueron ligeramente menores (aunque no significativos) en EC.

El presente trabajo incluye por tanto la mayor serie publicada para el estudio linfocitario sérico de pacientes con EC (n=102) y **confirma la presencia de linfopenia**, en consonancia con la mayoría de estudios publicados con anterioridad, lo que apuntaría a una posible inmunodeficiencia celular primaria *(Glocker E_2012)*.

Otro aspecto interesante que apuntan estos trabajos previos es la disminución de los niveles linfocitarios en pacientes con EC en actividad clínica *(Selby WS_1983)*. El presente estudio no confirma esta observación, ya que **no se hallaron diferencias entre los distintos grupos de actividad**, ni entre los pacientes con actividad o en remisión. Una posible explicación de este hecho es el alto porcentaje de pacientes en tratamiento inmunosupresor (sobre todo azatioprina, que como es conocido induce linfopenia) en el grupo en remisión (54%). De hecho, este grupo presentó niveles significativamente menores de LT CD8+ y LT CD56+, independientemente de la actividad.

Todos los subtipos de LT totales analizados (LT CD4+, LT CD8+, LT CD56+) se hallaron significativamente disminuidos en los pacientes, confirmando nuestros resultados preliminares *(Andreu-Ballester JC_2011) (Anexo 3)*.

Sin embargo, en nuestro estudio previo con 40 pacientes, los LT CD56+ no se encontraron significativamente disminuidos, lo que podría deberse a una falta de potencia estadística. Es llamativo asimismo que sólo los **LT CD56+** se encontraron significativamente disminuidos en pacientes en actividad (nuevos y activos) con respecto a aquellos en remisión. Es más, únicamente los niveles de LT CD56+

fueron inversamente proporcionales a los dos índices de actividad clínica estudiados (CC=-0,196, $p=0,002$ para el CDAI y CC=-0,156, $p=0,006$ para el Harvey-Bradshaw), no siendo significativos para los LT CD4+ y LT CD8+.

Este tipo de linfocitos natural killer T (NKT) comparte características fenotípicas con los LT (expresan el TCR) y las células natural killer (NK), como el marcador CD56+. Reconocen glúcidos y lípidos presentados por las moléculas CD1d, y se consideran de importancia para el control de ciertas infecciones, en especial del *Micobacterium tuberculosis* (Kaser A_2004). El papel de este tipo celular en la patogenia de la EI es poco conocido. Un estudio ha relacionado las células NKT mucosas con la producción local de IL-13, contribuyendo a la respuesta proinflamatoria (Fuss IJ_2004) y otros autores han descrito un descenso de células NKT NKG2 positivas en la mucosa intestinal de pacientes con colitis ulcerosa (Katsurada T_2012).

Pensamos que es la primera vez que se describe la relación entre los niveles bajos de las células NKT (LTCD56+) en SP y la correlación con actividad clínica en la EC. Podría conjeturarse una posible relación entre este hallazgo y la infección por micobacterias (como el *Micobacterium avium paratuberculosis* –MAP-) demostrada en algunos pacientes con EC (Di Sabatino A_2011). Este hallazgo debe confirmarse con estudios específicos para dilucidar esta asociación y su posible importancia fisiopatológica y clínica.

Además se confirma una disminución más marcada de LTCD8+ (descenso del 25% con respecto a controles), ya puesta de manifiesto en el anterior estudio y por otros autores (Giacomelli_1994), y que requiere de estudios específicos para dilucidar su traducción clínica.

La presencia de **linfopenia independientemente de la actividad y del empleo de tratamiento**, así como su comprobación en el grupo de pacientes “nuevos” parece indicar que se trata de un fenómeno intrínseco a la enfermedad.

El impacto de la presencia de **linfopenia en la EC** y su posible efecto sobre la **aparición de fenómenos autoinmunes secundarios** (que pudieran explicar por ejemplo la aparición de manifestaciones extraintestinales) deben ser considerados.

La existencia de una **asociación entre linfopenia y autoinmunidad** es bien conocida. De hecho se ha descrito un déficit de LT en pacientes en otras enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico o la enfermedad de Sjögren, y la inducción de linfopenia se emplea en varios modelos animales de autoinmunidad ^{(Atkinson TP_2012) (Schulze-Koops H_2004)}.

En la actualidad se piensa que los estados de linfopenia producen un fenómeno de **proliferación linfocitaria homeostática periférica (PLHP)** para mantener estable la población periférica de LT, lo que conllevaría una pérdida de diversidad del repertorio TCR y la aparición de LT efectores autorreactivos. Dos estudios animales en ratones, sobre la generación de diabetes autoinmune ^(King C_2004) y otro de pancreatitis autoinmune ^(Le Saout C_2008) apoyan esta hipótesis. En humanos también se ha confirmado que esta proliferación compensatoria de linfocitos (PLHP) produce fenómenos autorreactivos en pacientes con esclerosis múltiple en estados de linfopenia inducida farmacológicamente ^(Jones JL_2013).

Algunas revisiones sobre los mecanismos patogénicos que correlacionan inmunodeficiencia y autoinmunidad apuntan al hecho de que ciertos defectos genéticos que afectan a los LT podrían desencadenar fenómenos de pérdida de tolerancia que iniciaría fenómenos autoinmunes. ^(Maggadottir SM_2014)

Recientemente se ha propuesto que los estados de **linfopenia podrían alterar el equilibrio entre los LT reguladores (Treg) y los LT efectores (Tef)**, induciendo estados de autorreactividad vía IL-2 e IL-21, sugiriendo los autores la actuación sobre esta vía como posible nuevo abordaje terapéutico de enfermedades autoinmunes. ^{(Chevalier N_2014)(Maggadottir SM_2014)}.

Krupica y Mackall proponen un modelo de doble impacto (“two hit model”), en el que la linfopenia predispondría a la aparición de autoinmunidad, pero necesitaría de un segundo evento, como la depleción de LT reguladores demostrada en modelos de gastritis y colitis murina, para hacerse efectiva ^(Krupica T Jr_2006).

Nuevos estudios son necesarios para verificar si la corrección de esta linfopenia en estadios iniciales de la enfermedad mediante la estimulación linfocitaria (por ejemplo mediante interleuquinas –como IL-2 o IL-7- in vivo o ex vivo) podría

minimizar la aparición de fenómenos autoinmunes secundarios y mejorar el curso de la enfermedad.

Los resultados de este estudio confirman una **disminución significativa de los valores séricos de L γ δ en una amplia muestra de pacientes con EC**. Este descenso se comprobó en todos los subtipos estudiados (L γ δ CD4+, L γ δ CD8+ y L γ δ CD56+).

Existen algunos **trabajos previos** en la literatura que analizan los **valores séricos de los L γ δ en la EC**. Giacomelli et al. analizaron por primera vez en 1994 una pequeña muestra de 9 pacientes, observándose un aumento significativo de los L γ δ séricos en EC sólo en actividad, especialmente por expansión del subtipo LT V δ 1+ ^(Giacomelli R_1994). Bucht et al. encontraron valores superiores en 8 pacientes con EC con respecto a controles ^(Bucht A_1995), hallazgo que fue confirmado en un estudio posterior del mismo grupo de trabajo ^(Söderström K_1996).

Un reciente trabajo mostró sin embargo resultados similares a los nuestros, con niveles significativamente menores de LT V δ 2+ (la subpoblación mayoritaria de L γ δ en sangre periférica) en 12 pacientes pediátricos con EC moderada sin tratamiento inmunosupresor ^(McCarthy_2015). Resultados similares se han notificado en pacientes con EC en tratamiento con infliximab, que presentaban niveles menores de L γ δ en sangre que los controles (1,6% del total de LT vs 2,6% en controles), aunque sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas ^(Kelsen J_2011).

Estos resultados confirman los obtenidos en nuestro estudio previo en el que se comparaban los niveles séricos de diferentes poblaciones linfocitarias en 40 pacientes con EC y 40 controles que también describía una disminución de los L γ δ , en todos los subtipos estudiados (L γ δ CD4+, L γ δ CD8+ y L γ δ CD56+), especialmente significativa en los L γ δ CD8+ ^{(Andreu-Ballester JC_2011) (Anexo 3)}.

Este es el primer estudio que investiga los subtipos (CD4+, CD8+ y CD56+) de L γ δ en SP en una amplia población de enfermos. La confirmación de la disminución de todos estos subtipos en el presente estudio con mayor muestra parece confirmar que se trata de un defecto de clase, ya que se estudiaron los L γ δ en global, que incluye las dos subpoblaciones predominantes que existen en sangre periférica

V δ 1+ y V δ 2+.

EL subtipo V δ 2+ (también conocido como V γ 9V δ 2) es el predominante en sangre periférica ^(Brunner MB_1987), y posee mayor capacidad citotóxica tipo natural killer (NK) y mediada por anticuerpos ^{(Sturm E_1990)(Dastot H_1990)}. El subtipo V δ 1+ predomina en los epitelios (en el intestino predomina la fracción V γ 8V δ 1) ^(Soderstrom K_1994), suelen expresar el marcador CD8+ ^(Deusch K_1991), y posee menor capacidad citotóxica (aunque pueden desencadenar respuestas Th1). Juegan un papel crucial en la regeneración epitelial ^(Toulon A_2009) y presentan características de motilidad y migración a las mucosas (adherencia, emisión de largos filopodia, etc.) ^{(Grossi CE_1989)(Kabelitz D_1992)}.

Nuestros resultados concuerdan con el estudio de Giacomelli et al. que muestra valores menores de LT $\gamma\delta$ en SP, aunque sin significación estadística ^(Giacomelli R_1994). Sin embargo los autores encontraron un aumento significativo de LT $\gamma\delta$ con la actividad clínica no corroborado en nuestro estudio. Se objetivó además un aumento específico de la subpoblación V δ 1+, aspecto que **no** pudimos corroborar en nuestro estudio (ya que se midieron ambas subpoblaciones en conjunto). En la misma línea están los resultados del reciente trabajo de McCarthy et al. que mostraron niveles menores en SP en población pediátrica, con un detalle destacable. A pesar de presentar menores niveles de V δ 2+, se trata de células más activadas y con depleción selectiva del subtipo CD27+ (relacionado con la respuesta Th1, y con alta expresión de integrinas de migración intestinal β 7), que se encontraba paralelamente aumentado en las biopsias colónicas. ^(McCarthy NE_2013). De esta manera proponen la atractiva hipótesis de que a pesar de tener una deficiencia de LT $\gamma\delta$ en SP, células con un alto grado de activación (capaces de producir TNF- α , IL-17A y estimular la producción de IFN- β por los LT $\alpha\beta$) ^(McCarthy NE_2013) pudieran migrar a las zonas de inflamación.

El grupo del Instituto Karolinska de Bucht y Soderstrom et al. encontraron sin embargo **niveles mayores** de LT $\gamma\delta$ en SP en EC en dos estudios con 8 y 16 pacientes respectivamente ^{(Bucht A_1995)(Söderström K_1996)}. Los autores no dan información

en el trabajo sobre si se trataba de enfermos en remisión o en actividad, y confirman que esta expansión es a expensas de la fracción V δ 1+ (que supone el 28% de los LT γ δ en sangre en sujetos sanos y el 43% en pacientes). La subpoblación V δ 1+ también fue la mayoritaria en las biopsias de los enfermos, con una disminución de los LT γ δ en la mucosa inflamada en comparación con la mucosa sana. Los autores postulan que, o bien existe una proliferación periférica de LT γ δ secundaria a la alteración de la barrera intestinal, o bien podría producirse una migración de estos linfocitos (sobre todo V γ 8V δ 1) estimulados por antígenos bacterianos desde la mucosa inflamada secundaria a la disrupción mucosa ^{(Bucht A_1995) (Söderström K_1996)}.

Los V δ 1+ son también la población mayoritaria en los tejidos inflamados de otras enfermedades que cursan con inflamación crónica como la artritis reumatoide (AR) ^(Soderstrom K_1994), la enfermedad celíaca ^(Rust C1992), o la esclerodermia ^(Yurovsky VV_1994), lo que es congruente con su posible papel pro-inflamatorio en la EC.

Llama la atención que en ninguno de los estudios previos se observó un aumento de los V δ 2+ en SP en pacientes en actividad. Sabemos que esta subpoblación aumenta significativamente tras las infecciones, llegando a constituir hasta el 40-50% de los LT totales ^(Morita CT_2007), por lo que sería de esperar una expansión secundaria en las fases activas (con un aumento de la permeabilidad y microinfecciones de repetición). Esta falta de expansión de los LT γ δ en la EC activa es congruente con la deficiencia observada en nuestro estudio y apunta a una respuesta inmunitaria alterada de los LT γ δ en la EC ^{(Kelsen J_2011) (McCarthy NE_2013)}.

Nuevos estudios analizando ambas subpoblaciones de LTGD V δ 1+ y V δ 2+ (y el estudio de sus subtipos: naive, efector o memoria) ^(Pang DJ_2012) en distintos momentos evolutivos de la enfermedad y su correlato con la expresión en la mucosa intestinal son necesarios a comprobar estas hipótesis.

Otro hallazgo interesante del estudio es la comprobación de que es el **subtipo LT γ δ CD4+** el que presenta valores menores, con una disminución media de más del 60% con respecto a controles (en el estudio preliminar fueron los LT γ δ CD8+ la

subpoblación con valores inferiores) ^{(Andreu-Ballester JC_2011) (Anexo 3)}. Actualmente se dispone de poca información sobre los LT $\gamma\delta$ CD4+, que es una subpoblación muy minoritaria en SP. De hecho, fue recientemente cuando se describió por primera vez específicamente ^(Andreu-Ballester JC_2012). Estudios preclínicos apuntan a que podrían participar ayudando a los linfocitos B en la producción de Inge ^(Núñez-Cruz _ 2009). En humanos, esta subpoblación se pudo aislar de hígados fetales, comprobando que no eran capaces de producir IL-2 y que carecían de la capacidad lítica de los LT $\gamma\delta$ CD8+. Los autores apuntan a la posibilidad de que se trata de un linaje celular independiente de estos, con diferenciación estratégica a nivel local y funciones desconocidas. Futuros trabajos deberán definir su función y la significación de este marcado déficit en sangre periférica en la EC ^{(Aparicio P_1989) (Wucherpfennig KW_1993)}.

Un aspecto novedoso del presente trabajo es el estudio de la **correlación entre los niveles séricos de LT $\gamma\delta$ y los parámetros de actividad clínica y endoscópica** de la enfermedad para tratar de dilucidar su influencia clínica.

En primer lugar, se comprobó que la deficiencia de LT $\gamma\delta$ fue **independiente de la actividad clínica**, ya que los 3 grupos estudiados (nuevos, actividad y remisión) presentaban valores significativamente menores que el grupo control, corroborando hallazgos previos ^{(Andreu-Ballester JC_2011) (Anexo 3)}.

Además destaca la presencia de valores **más elevados en los pacientes en remisión** que en actividad (nuevos y activos), tanto para los LT $\gamma\delta$ CD4+, LT $\gamma\delta$ CD8+ y LT $\gamma\delta$ CD56+. Sin embargo sólo en los LT $\gamma\delta$ CD3+ totales y los LT $\gamma\delta$ CD8+ se alcanzaron diferencias significativas. Estos datos apuntan a una posible correlación inversa entre la actividad y los niveles de LT $\gamma\delta$. Contrariamente, otros estudios con muestras menores (n=9) encontraron valores mayores en actividad ^(Giacomelli R_1994).

Para dilucidar este hecho se analizaron dos índices fiables de actividad clínica de amplio uso (CDAI y Harvey-Bradshaw), comprobándose una **correlación inversa significativa entre los niveles de LT $\delta\gamma$ CD3+, y de LT $\delta\gamma$ CD8+ y ambos índices clínicos**. Esta observación refuerza la hipótesis sobre el papel protector de la inflamación de los LT $\gamma\delta$. Sin embargo, otros grupos no encontraron correlación

entre los $LT\gamma\delta$ en SP y los índices de actividad clínicos ^(Kelsen J_2011).

Destaca que no se encontró ninguna correlación significativa entre las subpoblaciones de $LT\alpha\beta$ y estos índices de actividad en nuestra muestra, lo que subraya la especificidad de la relación inversa entre los valores de la subpoblación $\gamma\delta$ y la actividad clínica.

Para completar estos datos se **correlacionaron los datos de actividad endoscópica** –de gran importancia pronóstica- ^(Ferrante M_2013) medida por un índice endoscópico específico (SES-CD) con los niveles de $LT\gamma\delta$. Se halló una correlación inversa estadísticamente significativa entre la gravedad endoscópica y las subpoblaciones de $LT\gamma\delta$ CD3+. No se encontraron correlaciones significativas entre la gravedad endoscópica y las subpoblaciones $LT\alpha\beta$, corroborando la especificidad de la subpoblación $\gamma\delta$.

Es la primera vez que se describe esta correlación inversa entre niveles de $LT\gamma\delta$ e índices endoscópicos en la EC, lo que complementa la correlación encontrada en los índices clínicos y refuerza (dada la conocida importancia de los hallazgos endoscópicos en la historia natural) ^{(Ferrante M_2013) (Gonzalez-Lama Y_2014)} la importancia de este tipo celular en la enfermedad. Debe señalarse que se incluyeron datos de la endoscopia más reciente al momento de la inclusión (media de 6 meses entre ambos), por lo que pensamos que un estudio prospectivo con datos endoscópicos y de niveles séricos seriados en el mismo momento temporal podría confirmar definitivamente esta correlación inversa. Es destacable que un análisis post-hoc de nuestro estudio teniendo en cuenta sólo aquellos pacientes con endoscopia simultánea a la inclusión confirma esta correlación inversa ($CC= -0,301, p=0,0017$).

No existe ningún estudio prospectivo hasta la fecha que evalúe el valor de los niveles séricos de $LT\gamma\delta$ y la historia natural de la enfermedad (número de recidivas, ajustes de dosis, visitas no programadas o cirugía). Nuestro grupo está analizando estos datos en la actualidad. La confirmación de la utilidad de los $LT\gamma\delta$ como herramienta pronóstica sería de gran impacto para la toma de decisiones clínicas en fases precoces de la enfermedad.

Las mujeres con EC presentaron niveles menores de $LT\gamma\delta$ que los hombres, aunque sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas. Esto difiere de otros estudios en población sana que constataron niveles mayores que se mantienen elevados mayor tiempo en mujeres ^(Caccamo N_2006).

Se realizó también un **análisis de las subpoblaciones de $LT\gamma\delta$ con respecto al fenotipo** de la enfermedad (clasificación de Montreal). De hecho, este es el primer trabajo que hemos encontrado que lo analiza de forma sistemática.

Llama la atención la presencia de valores significativamente mayores en pacientes en edades medias (entre 17 y 40 años) con respecto los mayores de 40 años, aspecto que podría deberse a una atenuación de la respuesta inmunológica en edades avanzadas por la degeneración tímica o inmunosenescencia ^{(Bisset LR_2004) (Andreu-Ballester JC_2012)}, ya que también el subgrupo mayoritario, los $LT\alpha\beta$, se encuentran disminuidos en el grupo A3. Otros autores han descrito este efecto de disminución específica de niveles de $LT\gamma\delta$ con la edad ^{(Caccamo N_2006) . (McCarthy NE_2013)}. Los pacientes jóvenes (grupo A1) presentaron sin embargo niveles menores (aunque sin significación estadística) de $LT\ CD8+ \gamma\delta$ que los pacientes en edades medias. Pensamos que estas diferencias podrían deberse a una mayor agresividad de la enfermedad descrita en edades tempranas ^(Romberg-Camps MJ_2009), aunque este extremo necesita ser confirmado en una muestra más amplia (solo 8 enfermos presentaban fenotipo A1), tal vez con pacientes en edades pediátricas (no incluidos en la muestra actual).

En cuanto a la localización y el patrón de la enfermedad, aquellos pacientes con formas colónicas o patrón fistulizante presentaban valores significativamente menores de $LT\gamma\delta$ que las formas ileocecales o estenosantes (con diferencias significativas sólo en cuanto a la localización colónica).

No se dispone de estudios prospectivos que caractericen adecuadamente (inmunológicamente y con respecto a su historia natural) cada uno de los fenotipo de EC de. Sin embargo las características específicas de la EC de localización exclusivamente colónica han sido estudiadas ^{(Morpurgo E_2003). (Soucy_ 2012)}. Dos amplias series (73 y 135 pacientes respectivamente) realizaron un estudio clínico y

patológico de las formas exclusivamente colónicas (Montreal L2), confirmando presentan mayor edad al diagnóstico, son mayoritariamente mujeres, no fumadoras y presentan una prevalencia mayor del alelo DRB1*0103 (Soucy G_2012;). (Hancock L_2008). No hubo diferencias en nuestro estudio en cuanto al número de mujeres o el hábito tabáquico. Otros trabajos no hallaron en los diferencias LT $\gamma\delta$ en cuanto a la localización (Giacomelli_R1994).

Se requieren nuevos estudios para conocer la posible asociación entre el déficit de LT $\gamma\delta$ en las formas colónicas y su importancia para el curso evolutivo y el eventual empleo de nuevas terapias inmunológicas.

La **enfermedad perianal** se asocia a un peor pronóstico y se ha incluido por muchos autores en la denominada “EC complicada”, con mayor necesidad de tratamientos inmunosupresores agresivos, hospitalizaciones e intervenciones quirúrgicas en su curso evolutivo (Beaugerie L_2006) (Dias CC_2013). Por ello hemos considerado interesante el estudio de su asociación con los niveles séricos de LT $\gamma\delta$ de manera independiente. El 23,5% (24/102) de los enfermos presentaban alteraciones perianales. Este subgrupo presentó niveles inferiores de todas las subpoblaciones linfocitarias estudiadas, con significación estadística para los LT $\gamma\delta$ totales y los LT $\gamma\delta$ CD8+. De manera llamativa, no encontramos diferencias en los niveles de LT α β en los pacientes con EC perianal, por lo que parece que se trata de una correlación específica. Pensamos que la deficiencia de LT $\gamma\delta$ en esta población con peor pronóstico evolutivo apoya la tesis de su asociación con las formas agresivas de la enfermedad, con posibles implicaciones pronósticas.

Otro aspecto relacionado con peor pronóstico es el **hábito tabáquico** (Yarur AJ_2011). Un alto porcentaje (46.7%) de pacientes de nuestra muestra eran fumadores activos, con una media de 12.6 cigarrillos diarios. Sin embargo estos presentaban niveles mayores de LT (y de LT $\gamma\delta$) que los pacientes no fumadores, aunque sin diferencias significativas.

Este hallazgo ha sido ampliamente documentado, habiéndose comprobado un aumento de los valores de la serie blanca en fumadores, proporcional al número de cigarrillos consumidos, y que se mantiene durante años en exfumadores (Sunyer J_1996)

(Corre F_ 1971). Se ha propuesto que este fenómeno podría ser un marcador de estrés oxidativo y aterosclerosis (Morrow JD_ 1995).

La presencia de **granulomas** en el estudio histológico es de gran ayuda para establecer el diagnóstico de la EC. Sin embargo se trata de un hallazgo relativamente infrecuente y no patognomónico, ya que se ha descrito en otras enfermedades con afectación gastrointestinal (como la tuberculosis o la sarcoidosis) (Onorati M_2014) Esmadi M_ 2012).

Un porcentaje bajo de pacientes de la muestra (en torno al 10%) presentaban este hallazgo en las biopsias, porcentaje menor al descrito en la literatura (20-30%) (Muller KE 2013) (Turner K2014) y que pensamos podría deberse a la toma de un número escaso de biopsias en las exploraciones, ya que el hallazgo de granulomas es directamente proporcional al número de pruebas de tejido obtenidas (Heresbach D_2005). Diversos autores han relacionado este hallazgo con edades más tempranas, enfermedad más agresiva y un peor pronóstico clínico con mayor necesidad de cirugía (Turner K_2014) (Soucy G_2012). Sin embargo, la presencia de granulomas no se asoció con diferencias en los $LT\gamma\delta$ en nuestro estudio.

El 10% de los pacientes presentaban manifestaciones extraintestinales, en su mayoría de tipo articular. Tampoco se encontraron diferencias significativas en los valores de $LT\gamma\delta$ en estos pacientes. Es interesante sin embargo que tanto los enfermos con granulomas como los que asociaban manifestaciones extraintestinales presentaban valores medios inferiores de $LT\gamma\delta$ que los controles, por lo que series más amplias deben evaluar esta tendencia.

El 71,6% de los pacientes (n=73) recibían algún tipo de **tratamiento farmacológico** en el momento de la inclusión. El fármaco más empleado fue la mesalazina (MSZ) (45,1%, dosis media 2.570 mg/d, tiempo medio de uso 43 meses), seguido de la azatioprina (AZA) 39.2% (dosis media 200 mg/d, tiempo medio de uso 30,6 meses). Este porcentaje se incrementó a alrededor del 50% en el grupo de pacientes ya diagnosticados (46.8% en el grupo remisión y 52.8% en el de actividad tomaban AZA). Un 23,5% de los pacientes estaban en tratamiento con antibióticos (hasta un 32,4% en el grupo nuevos) y poco más de un 10% con

fármacos biológicos (sobre todo a expensas del grupo de pacientes ya diagnosticados en actividad). Sólo un 18,6% de pacientes recibían esteroides sistémicos (ninguno en el grupo remisión y aproximadamente un 25% de los activos).

Pensamos que esta distribución refleja adecuadamente los tratamientos empleados en una población heterogénea de pacientes con EC en la práctica clínica diaria. Llama la atención el amplio uso de mesalazina a pesar de su cuestionada eficacia en pacientes de Crohn ^(Bryant RV_ 2015) y los bajos porcentajes de empleo de fármacos anti-TNF (tal vez compensada por el amplio uso de azatioprina). De hecho ningún paciente recién diagnosticado del grupo “nuevos” estaba en tratamiento con este tipo de fármacos, lo que podría reflejar un empleo infrecuente de la estrategia de tratamiento “top-down” ^(Antunes O_2014) de inicio en nuestro centro. Un porcentaje amplio empleaba antibióticos, lo que refleja la tendencia liberal de su empleo en nuestro contexto clínico. Sólo un 6% recibían tratamiento de mantenimiento con metotrexate de los pacientes ya diagnosticados, indicativo de un uso reducido en nuestro medio a pesar de la creciente evidencia de su utilidad en este escenario ^(Akobeng AK_2005).

Aunque no encontramos diferencias significativas en las cifras de LT totales entre los pacientes que recibían o no tratamiento farmacológico, en el estudio de las subpoblaciones se observó que aquellos que lo recibían mostraban cifras significativamente menores de $LT\gamma\delta$ CD3+ totales y $LT\gamma\delta$ CD4+.

En cuanto a los distintos tratamientos y su correlación con los niveles séricos de $LT\gamma\delta$ destaca la ausencia de diferencias significativas entre aquellos que empleaban o no mesalazina, corticoides (sistémicos o no absorbibles), metotrexate o anti-TNF.

Sin embargo, los que tomaban **antibióticos o azatioprina** en la inclusión presentaron niveles significativamente menores de $LT\gamma\delta$, sin diferencias significativas en los $LT\alpha\beta$, lo que podría indicar un efecto selectivo de estos tratamientos sobre la población $\gamma\delta$.

Especialmente significativo es el caso de la azatioprina, ya que los pacientes que la empleaban presentaban niveles muy reducidos de $LT\gamma\delta$ CD3+ y $LT\gamma\delta$ CD8+, con una reducción media de más del 50% de estas dos subpoblaciones con respecto a

los que no la tomaban.

Estos hallazgos coinciden plenamente con el reciente descubrimiento de que la azatioprina es capaz disminuir selectivamente tanto el número como la actividad de los $LT\gamma\delta$, disminuyendo la producción de $TNF-\alpha$ en los $LT\gamma2+$. Los autores objetivaron además una disminución significativa del número circulante de estas células, de manera selectiva, es decir, con un efecto mucho menor sobre los $LT\alpha\beta$ (McCarthy NE_2015). Además se comprobó que se trata de un efecto exclusivo de azatioprina, ya que los pacientes en tratamiento con metotrexate presentaban niveles normales (tal y como ocurre en nuestro estudio).

Los valores normales en pacientes en tratamiento con anti-TNF (infliximab/adalimumab) en nuestros pacientes coinciden con los resultados de Kelsen et al. que notificaron que el 76% de los pacientes en tratamiento con estos fármacos presentan niveles normales de $LT\gamma\delta$ en SP (Kelsen J_2011).

Los datos sobre el efecto de los fármacos en este trabajo deben ser interpretados con cautela. En primer lugar, se trata de una población muy heterogénea de pacientes, con indicaciones y tiempos de empleo muy variables (por ejemplo en el caso de los antibióticos o los corticoides en enfermos con actividad pueden ser incluso de unos pocos días u horas). Por otro lado existe un evidente solapamiento entre tratamientos (por ejemplo es frecuente que los pacientes con enfermedad perianal sean tratados con antibióticos, azatioprina y un anti-TNF al mismo tiempo) lo que dificulta la interpretación de estos datos. Sería necesario la realización de un análisis factorial detallado para determinar la influencia de cada uno de los tratamientos en cada escenario concreto. Además no disponemos de medidas seriadas de $LT\gamma\delta$, por lo que es difícil establecer una relación con las dosis o las concentraciones séricas de los fármacos en el tiempo. Por tanto se requiere de un estudio pormenorizado del tratamiento para poder validar estas observaciones iniciales.

Los **$LT\gamma\delta$** se caracterizan por la **expresión del receptor de célula T (TCR) $\gamma\delta$** (Li H_1998)(Allison TJ_2001) y actualmente se consideran una pieza clave en la primera línea de defensa contra la invasión de patógenos invasivos en los epitelios, así como en la

homeostasis de la respuesta inmune ^(Zheng J_2013).

Los $LT\alpha\beta$ (que expresan el heterodímero del TCR $\alpha\beta$) son más frecuentes en sangre periférica (90-95%), bazo y nódulos linfoides. Sin embargo, los $LT\gamma\delta$ constituyen sólo una pequeña proporción (1-5%) de los linfocitos circulantes y en los órganos linfoides secundarios, encontrándose fundamentalmente en los epitelios, donde pueden constituir hasta el 50% de los linfocitos intraepiteliales (LIE) en la mucosa (10-20% en el epitelio genitourinario, 40-50% en el intestinal y hasta el 60% de las células T en la dermis) ^{(Haas W_1993) (Chien Y_2014) (Bonneville M_1988)}.

Sin embargo, como hemos señalado previamente, la proporción de $LT\gamma\delta$ en SP puede aumentar considerablemente hasta llegar a suponer el 60% de los LT circulantes durante las infecciones ^{(Hara T_1992). (Perera MK_1994)}, pudiendo permanecer aumentados hasta cuatro meses tras algunas infecciones bacterianas ^(Bertotto A_1993).

Además de esta diferencia en su distribución anatómica, los $LT\gamma\delta$ se **diferencian de los $LT\alpha\beta$** por su capacidad para reconocer proteínas directamente **sin el procesamiento antigénico previo por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)** ^{(Schild H_1994)(Chien YH_1996)} y por ser **potentemente estimuladas directamente por metabolitos microbianos fosforilados** (como el E-4-metil-butenil-pirofosfato, HMBPP) y antígenos lipídicos ^(Tanaka Y_1995). Además pueden reconocer directamente proteínas virales ^(Bukowski JF1994), superantígenos bacterianos como la enterotoxina A del estafilococo ^(Tanaka Y_1994), proteínas del shock térmico (HSP) ^(Multhoff G_1998), o moléculas MICA/B (MHC-class I related molecules) inducibles por estrés celular ^(Groh V_1998). Estas células son también capaces de ejercer una acción citotóxica y citolítica directa sobre células infectadas o tumorales mediante la secreción de perforinas y granzima B independiente de anticuerpos ^(Qin G_2009), o incluso opsonizar y fagocitar directamente células infectadas ^(Himoudi N_2012).

Estas características les permiten una respuesta rápida y eficaz, así como una gran plasticidad para un reconocimiento amplio de patógenos en la primera línea de defensa en las mucosas.

Se ha comprobado su papel en: **infecciones víricas**, mediante el ataque de células infectadas como por la producción de citoquinas antivirales, especialmente el IFN- γ ^(Poccia F_2005) (como el HIV ^(De Paoli P_1991), VEB ^(De Paoli P_1990), o el VHC ^(Pár G_2002)); **infecciones**

bacterianas tanto Gram positivas (*Estafilococo aureus*), como Gram negativas (*E. coli* y *Morganella morganii*) (Wang L_2001) (Zheng J 2013), o intracelulares (como *Mycobacterium tuberculosis* (Kabelitz D_1990); y en la **infección por otros patógenos** como la malaria (Costa G_2011), el *Toxoplasma Gondii*, protegiendo de la producción de ileítis (Egan CE_2005) o el *Cryptosporidium parvum*. (Sardinha LR_2006).

Tan importante como estas funciones es su papel como inmunoreguladores y en la regeneración de epitelios dañados y en la curación de heridas. Los LT $\gamma\delta$ son capaces de: **1) secretar citosinas proinflamatorias**, sobretudo TH1, fundamentales para el control de virus y bacterias intracelulares (como el IFN- γ , el TNF- α) y hongos (como la IL-17). (Tsuji M_1994) (Sutton CE_2012); **2) activar la respuesta inmune** a nivel local promoviendo la maduración de las células dendríticas y la respuesta anti infecciosa de los macrófagos y las células NK (Wands JM_2005) (Maniar A_2010); **3) estimular y regular la inmunidad innata** mediante la producción de citoquinas inmunosupresoras como el TGF- β , o la IL-10 (Bonneville M_2010), colaborando con los LB en la producción de anticuerpos (Ansel KM_2000), Schaerli P_2000) o regular la actividad de los LT $\alpha\beta$ (Hayday A_2003); **4) actuar como células presentadoras de antígeno** (Cheng L_2008) (Brandes M_2009); o **5) activar la regeneración epitelial y de curación de heridas**, estimulando la producción de hialurónico por las células epiteliales (Jameson JM_2005) o mediante la producción de factores de crecimiento epitelial -como el insulin-like growth factor (IGF-1), o el keratinocyte growth factor 1 y 2 (KGF-1, KGF-2) (Jameson JM_2004).

Existen también numerosas pruebas del papel de los LT $\gamma\delta$ en la **defensa contra tumores**. Ligandos del NKG2D, como MICA o MICB, expresados en células tumorales y no sanas, pueden unirse al TCR de los LT $\gamma\delta$ activando su acción antitumoral (Dieli F_2007). Tras este reconocimiento, los LT V γ 9V δ 2 (V δ 2) secretan citoquinas pro-inflamatorias con acción antitumoral como el IFN- γ o el TNF- α) o incluso citotóxicos como granzima B y perforinas contra células tumorales de epitelio de carcinoma escamoso (Qin G_2009) (Alexander AA_2008). Además son capaces de activar la actividad citotóxica dependiente de anticuerpos mediante la expresión de CD16 (Gertner-Dardenne J_2009) y de estimular potentemente la actividad citotóxica de las

células NK (Maniar A 2010). De hecho, LT $\gamma\delta$ han sido aislados de entre los linfocitos intratumorales (LIT) de pacientes con tumores colorrectales, renales, prostáticos, ováricos, pulmonares así como de pacientes con neoplasias hematológicas como la leucemia o el mieloma múltiple (Beetz S_2007).

Existe amplia evidencia del **papel protector de los LT $\gamma\delta$** en la inflamación intestinal que apoyarían nuestra hipótesis. (Chen Y_2002).(Inagaki-Ohara K_2004) Egan CE_2011).

A lo largo de la década de los 90 se amplió mucho el conocimiento sobre estas células, dándose a conocer su papel clave en el control de infecciones y tumores en las mucosas, inmunoregulador y de regeneración del daño epitelial, características clave para la homeostasis de la barrera intestinal, alterada en la EC. Pueden producir citoquinas inmunoreguladores como el TGF- β (Chen Y_2002), potenciar las respuestas de defensa local como la producción de IgA (Fujihashi K_1999), regular la inducción y el mantenimiento de la tolerancia oral (Ke Y_1997) o reparar del tejido epitelial intestinal mediante la producción de KGF (keratin growth factor) (Boismenu R_1994) (Komano H_1995).

Estudios preclínicos en diversos modelos murinos en la primera década de este siglo comprobaron el papel clave de los LT $\gamma\delta$ en la colitis.

Tsuchiya et al. y Chen et al. emplearon modelos de colitis inducida por DSS para probar esta hipótesis, comprobando que grandes cantidades de LT $\gamma\delta$ (pero no de LT $\alpha\beta$) podían localizarse en los lugares de daño intestinal, y que eran capaces de proteger de la colitis estimulando la reparación tisular por vía de la expresión de KGF (Chen Y_2002) y de controlar la infiltración por neutrófilos atenuando la inflamación (Tsuchiya T_2003).

Szczepanik et al. emplearon colitis inducida por TNBS (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid) intrarrectal, demostrando que la transferencia pasiva de LT $\alpha\beta$ (y de nuevo no de LT $\gamma\delta$) era capaz de inducir colitis (Szczepanik M_2000).

El grupo de Hoffmann y Kühl demostraron el papel protector de la inflamación de los LT $\gamma\delta$ en diferentes modelos murinos de EII. Empleando también un modelo de la colitis inducida por TNBS demostraron que la **depleción de LT $\gamma\delta$** con anticuerpos monoclonales (y no de LT $\alpha\beta$ o LT colaboradores) **augmentaba la severidad de la colitis e incluso la mortalidad** (Hoffmann JC_2001). En un trabajo

posterior comprobaron que la depleción de $LT\gamma\delta$ mediante anticuerpos monoclonales producía un agravamiento claro de la colitis y aumentaba la mortalidad. En este mismo estudio también se emplearon ratones $TNF \Delta ARE/+$ que presentan una ileítis transmural similar a la EC con manifestaciones extraintestinales (artritis). La depleción produjo un empeoramiento histológico –no significativo- y niveles menores de $TGF-\beta$) (Kühl AA_2002-2003). Un trabajo posterior comprobó su papel protector en un modelo similar mediante el control de la producción de $IFN-\gamma$ y activando la regeneración epitelial (Kühl AA_2007).

Dos estudios clave de Inagaki-Ohara et al. y de Hoffmann et al. abrieron la posibilidad del empleo de los $LT\gamma\delta$ como terapia inmunológica en la EII al demostrar que su la trasfencia selectiva mejora la inflamación e incluso disminuye su mortalidad en ratones, mediante de la disminución de la producción de $TNF-\alpha$ y el aumento de $IL-10$ y $TGF-\beta$ (Inagaki-Ohara K_2004)(Hoffmann JC_2008).

Sin embargo, aunque diversos estudios preclínicos han revelado la importancia de los $LT\gamma\delta$ como agentes protectores de la inflamación, no existe consenso sobre su papel pro o anti-inflamatorio, habiéndose descrito también **efectos inductores de la inflamación** en modelos murinos (Boismenu R_1999).

Simpson et al. fueron los primeros en sugerir que los $LT\gamma\delta$ podían contribuir a la inflamación en EII al demostrar que su infusión en ratones carentes de estas células (ratones $tg\epsilon 26$) era capaz de producir colitis mediante una respuesta $Th1$ mediante la producción de $IFN-\gamma$ (Simpson SJ_1997). En la misma línea, Kawaguchi-Mitsashita et al. demostraron efectos proinflamatorios de estas células en ratones $TCR \alpha-/-$ (Kawaguchi-Miyashita M_2001).

Recientemente se ha demostrado la existencia de un subtipo específico de $LT\gamma\delta$ productores de $IL-17A$ con acciones pro-inflamatorias en ratones inmunodeficientes (Do JS_2011). Este fenómeno ya se había comprobado previamente en modelos de encefalomiелitis autoinmune (Sutton CE_2009) y en artritis colágena inducida (Ito Y_2009).

Ante estos resultados contradictorios varios grupos han realizado estudios de $LT\gamma\delta$ en la mucosa de los pacientes con EC para intentar dilucidar su papel “in situ” en

humanos, e intentar relacionar estos hallazgos con los niveles circulantes. Sin embargo se han encontrado resultados dispares.

Tres estudios han comprobado un **descenso de los LT γ δ en la mucosa intestinal** de pacientes con EC (Fukushima K_1991) (Bucht A_1995) (Lee HB_1997).

Fukushima et al. observaron una disminución significativa de LT γ δ en la mucosa de los pacientes con EC (13% en EC vs 36% en controles)^(Fukushima K_1991). Resultados similares se han comunicado posteriormente, observando además un descenso significativo de los LT γ δ en EC en comparación con los enfermos con CU, lo que sugeriría un papel diferente de esta subpoblación en ambas enfermedades ^(Lee HB_1997). Estudios del grupo del instituto Karolinska de Estocolmo describieron una disminución de lo LT γ δ en la mucosa inflamada con respecto a la mucosa sana ^(Bucht A_1995).

Contrariamente, otros estudios han demostrado un aumento de LT γ δ V δ 1+ capaces de producir IFN- γ en las áreas inflamadas con respecto a áreas no inflamadas en muestras quirúrgicas de EC. Los autores se inclinan a pensar que estos linfocitos pueden derivar de los LT γ δ V δ 1+ circulantes en sangre periférica con propiedades migratorias a través del endotelio ^(McVay LD_1997).

Este aumento de LT γ δ V δ 1+ se ha demostrado también en la mucosa inflamada de pacientes con CU, con relación directa entre su número y la gravedad de la inflamación ^(Yeung MM_2000). Parece que el subtipo V δ 1+ puede jugar un papel importante en la inflamación crónica en los epitelios ya que hallazgos similares se han descrito en la enfermedad celíaca activa ^(Halstensen TS_1989), en las lesiones cutáneas de la lepra ^(Uyemura K_1992) o en el tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide ^(Söderström K_1994).

Como hemos comentado previamente otros trabajos señalan que existe un predominio en la mucosa en enfermos de EC de LT γ δ V δ 2+ activados con gran capacidad citotóxica ^{(McCarthy NE_2013) (McCarthy NE_2015)}, mientras que otros grupos no hallaron diferencias con respecto a controles ^(Cuvelier CA_1992).

Por tanto, existe evidencia del papel protector en la colitis en estudios experimentales, en línea su capacidad de defensa ante las infecciones, en la

regeneración tisular de la mucosa y como regulador de la inmunidad, mientras contrariamente otros trabajos le atribuyen un papel activo en la inflamación ^(Nanno M_2007).

Fenómenos aparentemente contradictorios, como por ejemplo su capacidad de producir IFN- γ ^(Simpson SJ_1997) y de inhibir la producción de IFN- γ por los LT $\alpha\beta$ ^(Kühl AA_2007), deben ser investigados en profundidad para comprender la plasticidad de estas células en los distintos contextos de infección o inflamación.

Por tanto parece razonable preguntarse cuales son las **posibles causas de estas discrepancias**.

En primer lugar, es posible que los **distintos subtipos de LT $\gamma\delta$, puedan tener acciones y efectos diferentes**. Además existe gran heterogeneidad en su estudio (se han estudiado los LT $\gamma\delta$ totales, los V γ 1+, y los V γ 2+ indistintamente, en SP y mucosas), con expresión variable –y en ocasiones contradictoria-. Como hemos visto, el subtipo V δ 2+ es el predominante en sangre periférica ^(Brenner MB 1987), y posee mayor capacidad citotóxica tipo natural killer (NK) y mediada por anticuerpos ^{(Sturm E_1990) (Dastot H_ 1990)}; mientras que el subtipo V δ 1+ predomina en los epitelios ^(Soderstrom K_1994), posee menor capacidad citotóxica y juega un papel crucial en la regeneración epitelial. ^{(Toulon A_2009) (Grossi CE_1989) (Kabelitz D. 1992)}. Por otro lado se han descrito los LT $\gamma\delta$ productores de IL-17, que parecen tener mayor capacidad proinflamatoria ^{(Hu C_2012) (Cai Y_2011)}.

Para ilustrar este hecho, papeles antagónicos de los subtipos de LT $\gamma\delta$ se han comprobado en un modelo experimental de esclerosis múltiple, donde los subtipos de LT $\gamma\delta$ V γ 4+ ejercen un efecto pro inflamatorio mediante la liberación de citoquinas como IL-17, mientras que los LT $\gamma\delta$ V γ 1+ producirían el efecto contrario mediante la producción de ligando CCR5 y promoviendo la diferenciación de los Treg ^(Link SE_2014).

Otro aspecto a considerar es la **heterogeneidad de los modelos murinos** empleados en los estudios experimentales de EII, y su reproducibilidad en una enfermedad tan heterogénea como la EC. En este sentido **Kohl et al.** apuntan la posibilidad de que los modelos de ratones empleados en muchos de los trabajos

no sean válidos para estudiar el comportamiento de los LT $\gamma\delta$. Argumentan que tal vez los ratones deficientes en cadenas α produzcan unos LT $\gamma\delta$ alterados -o con mayor capacidad catalítica o productora de IFN- γ (Kenya M_1999), lo que explicaría su efecto pro-inflamatorio en algunos estudios ya que, como se ha demostrado, el desarrollo y buen funcionamiento de los LT $\gamma\delta$ es dependiente en parte de los LT $\alpha\beta$ (Kensington DJ_2003).

Paul et al. Han tratado de analizar esta discrepancia en los estudios existentes y apuntan a una posible explicación: la exposición de los **diferentes tipos de LT $\gamma\delta$ en diferentes microambientes de citoquinas** en los tejidos inflamados, **producirían la activación de distintos genes, con efectos opuestos**. Es decir, las diversas interacciones de los LT $\gamma\delta$ con la micro biota, las células epiteliales y otras células del sistema inmunitario (como los macrófagos) darían como resultado una respuesta distinta inmunitaria diferente (Paul S_2015).

Para ilustrar este hecho ponen como ejemplo la comprobada necesidad de una activación previa de estas células en los órganos linfoides secundarios para producir colitis (Kawaguchi-Miyashita M_2001), o el papel supresor de los LT reguladores Foxp3+ sobre los LT $\gamma\delta$ para mantener la homeostasis intestinal (Park SG_2010). Concluyen que se necesitan más estudios para conocer la naturaleza de estas interacciones en los diferentes contextos clínicos, especialmente su interrelación con los LT Th17 y los LT reg en la mucosa intestinal.

Es llamativo el hecho de que este comportamiento tan diferente de los LT $\gamma\delta$ (como reguladores o promotores de la inflamación) no es exclusivo de la EC, sino que pueden jugar tanto un papel protector como deletéreo en **otras enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias** (Su D_2013) (Paul S_2015). Por ejemplo, un subtipo de LT $\gamma\delta$ (los CD27+CD45RA-) se encuentran disminuidos en pacientes con lupus eritematoso sistémico, y se relacionan inversamente con los marcadores de actividad de la enfermedad, sugiriendo su papel inmunoregulador. (Li X_2011)(Ponomarev ED_2005), mientras que los LT $\gamma\delta$ productores de IL-17 pueden agravar e inducir la inflamación en modelos de artritis reumatoide (Hu C_2012) psoriasis (Cai Y_2012) o espondilitis anquilopoyética (Kenna TJ_2012).

Contrariamente, estos mismos $LT\gamma\delta$ productores de IL-17 han demostrado un papel protector del desarrollo de diabetes en ratones NOD mediante la producción de TGF- β (Han, G_2010).

El siguiente objetivo de nuestro estudio era estudiar los **niveles séricos de IL-7 en la EC**. La elección de esta interleuquina se basa en su **papel clave en la estimulación y homeostasis de los LT** (Capitini CM_2009)(Bekiaris V_2014) **y concretamente en los $LT\gamma\delta$** (Laky K_2000) (Maki K_1996). (Baccala R_2005). De hecho, los ratones que no son capaces de producir IL-7 sufren una inmunodeficiencia severa (von Freeden-Jeffry U_1997) y su deficiencia se asocia con linfopenia y disfunción de los LT naive y memoria (Mazzucchelli R_2007). La IL-7 es un factor clave para la supervivencia de los LT, ya que estimula su producción tímica y es capaz de modular su expansión periférica homeostática (HPE) regulando la actividad pro y anti-apoptótica de los miembros de la familia Bcl-2 (Jiang Q_2005) (Capitini CM_2009). Se ha comprobado además que en situaciones de linfopenia su producción es estimulada e inducida por antígenos de baja afinidad (Fry TJ_2001).

IL-7 juega un papel crucial en el desarrollo de los $LT\gamma\delta$. De hecho, en ratones deficientes en su receptor $IL7R\alpha$, los $LT\gamma\delta$ no se detectan (Maki K_1996) y es, junto a la IL-15, el principal regulador de su mantenimiento y homeostasis (Baccala R_2005). Además la IL-7 expresada por las células epiteliales intestinales es capaz de inducir el desarrollo de los $LT\gamma\delta$ intestinales (Laky K_2000).

Otro aspecto interesante para elegir su estudio en pacientes con EC es que **disponemos de su análogo recombinante (rIL-7)** (Capitini CM_2009) que ha sido empleado en ensayos clínicos en otras enfermedades que cursan con linfopenia, como el HIV, con buena tolerancia y perfil de seguridad, y resultados prometedores, obteniéndose un aumento significativo y duradero en el tiempo de los LT circulantes (Levy Y_2009). Además algunos estudios preclínicos han demostrado que su bloqueo usando un anticuerpo anti-IL7 también es efectivo en otras enfermedades autoinmunitarias como la esclerosis múltiple y la diabetes tipo 1. Actualmente existen dos ensayos clínicos para explorar su uso en humanos

(NCT02045732) (NCT02038764)

En nuestra población, **los pacientes presentaron valores menores de IL-7 sérica que los controles, sin alcanzarse diferencias estadísticamente significativas.**

Existen pocos **estudios sobre los niveles séricos de IL-7 en EII** y su posible papel en la etiopatogenia de la enfermedad. El primer estudio de niveles séricos en EII fue de Watanabe et al. en 1997, comprobándose por primera vez que los pacientes con CU presentaban niveles séricos superiores de IL-7 que los controles y los pacientes con EC, sin hallar correlación con la duración o localización de la colitis ^(Watanabe M_1997).

Kader et al. realizaron un amplio estudio de citoquinas en suero de pacientes con EC en edad pediátrica (n=41), observando que los pacientes en remisión presentaban niveles mayores de IL-7 que los pacientes con enfermedad activa, sugiriendo una relación inversa entre IL-7 y la actividad ^(Kader HA_2005).

Recientemente se han estudiado los niveles séricos de IL-7 comparando 17 pacientes con EC, 17 pacientes con CU y 18 pacientes con disbacteriosis ^(Toptygina AP_2014). Aunque los niveles de IL-7 en suero no fueron significativamente diferentes en los 3 grupos, se aprecia que el grupo con EC presentó los niveles más bajos, seguido de grupo de CU y el de disbacteriosis. También se han constatado niveles menores de IL-7 en pacientes con formas exclusivamente colónicas de EC con respecto a controles, sin diferencias con los pacientes con CU. Los autores apuntan al consumo de IL-7 por los LT activos en la mucosa inflamada por su mayor afinidad como una de las posibles explicaciones de este hecho ^(Korolkova OY_2015).

En otro estudio de EII pediátrica con 26 pacientes se observaron niveles séricos significativamente superiores de IL-7 en enfermos, aunque en el estudio no se diferencian los niveles entre CU y EC ^(Kleiner G_2015).

Nuestro grupo publicó la serie más larga con niveles séricos de IL-7 en EC con 36 pacientes. En este estudio se observó que tanto los pacientes en remisión como con enfermedad activa presentaban niveles bajos de IL-7 ^{(Andreu-Ballester JC_2013) (Anexo 4)}

Ponchel et al han corroborado que los niveles séricos de IL-7 son menores de lo normal en la EII activa, y tienden a normalizarse en la remisión (datos no

publicados) (Ponchel F_2011).

Es llamativo el hecho de que en esta muestra ampliada con 62 nuevos pacientes aunque los niveles siguen siendo menores que en los controles, no se alcanzaron las diferencias significativas entre ambos grupos (sí detectadas en nuestro estudio previo) (Andreu-Ballester JC_2013) (Anexo 4), por lo que nuevos estudios deberán demostrar si se confirma esta tendencia. Sin embargo, la mayoría de estudios publicados hasta la fecha corroboran que los pacientes con EC presentan niveles anormalmente bajos de IL-7 en SP, al contrario que los pacientes con CU que suelen presentar niveles normales o altos (Kader HA_2005) (Korolkova OY_2011) (Watanabe M_1997).

Pensamos sin embargo que es de gran importancia el hecho de que **la linfopenia detectada en los pacientes (y especialmente en los LT γ δ) no se corresponde con un aumento compensatorio de IL-7 sérica**, lo que contradice los hallazgos en otras situaciones clínicas que cursan con linfopenia.

Bolotin et al demostraron una elevación en los niveles de IL-7 circulante en niños tras un trasplante alogénico de médula ósea (Bolotin E_1999); y otros estudios constatan un aumento de IL-7 en el suero de pacientes con VIH y niveles bajos de LTCD4+, con una relación inversa entre ambos (Fry TJ_2001). Esto también ocurre tras el tratamiento antiviral o en la linfopenia post-quimioterapia con una tendencia a normalizar los niveles de IL-7 a medida que se recuperan los niveles de los LTCD4+ (Napolitano LA_2001) (Fry TJ_2001).

Por tanto parece que esta deficiencia sugiere un defecto primario específico de la EC que requerirá de posteriores estudios para dilucidar su causa fundamental.

Esta **deficiencia de IL-7 en condiciones de linfopenia se ha demostrado también en artritis reumatoide (AR)**, enfermedad que presenta cierto solapamiento en estudios epidemiológicos con la EC (Bernstein CN_2005) y con características inmunológicas comunes, como demuestra el efecto terapéutico de los fármacos anti-TNF (Furst DE_2012).

Ponchel et al demostraron que los pacientes con AR presentan linfopenia prolongada tras el tratamiento inmunosupresor que puede deberse a una

producción tímica disminuida, o a una deficiente expansión periférica, ambas reguladas por la IL-7 ^(Ponchel F_2002). Ésta se midió en SP de un grupo de pacientes con AR (n=28) mostrando un descenso significativo de los niveles de IL-7 que sin embargo no se correlacionó ni con la duración de la enfermedad, la PCR, o el tratamiento ^(Ponchel F_2005). Es interesante que los autores observaron una deficiencia de la producción de IL-7 por las células estromales de la médula ósea de los pacientes. Estos datos en conjunto sugieren que el déficit de IL-7 en SP en AR de podría deberse a un fallo primario de producción de esta citoquina en la médula ósea, y que por tanto podría plantearse una abordaje terapéutico de este defecto ^(Ponchel F_2005). Sin embargo, otros autores han comunicado niveles aumentados de IL-7 sérica en los pacientes de AR, e incluso una correlación directa de los mismos con la proteína C reactiva (PCR) ^(De Benedetti F_2003).

Por tanto, existe una **discordancia entre los niveles bajos séricos de IL-7 y el aumento de la expresión demostrado en tejidos en la EC** en los trabajos publicados. Exactamente lo mismo ocurre en la AR, donde la expresión de IL-7 está aumentada en las articulaciones y los niveles en sangre periférica son bajos. De hecho, parece que no recuperar niveles normales en pacientes en remisión empeora el pronóstico. ^{(Ponchel F_2005)(Ponchel F_2005)}.

Lo que parece claro es que ni la AR ni la EC siguen el paradigma de que los niveles de IL-7 aumentan en relación a la disminución del consumo en pacientes con linfopenia ^(Mazzucchelli R_2007), que sí se da en otras enfermedades como la infección por el HIV ^(Nunnari G_2005) o la linfopenia tras quimioterapia ^(Fry TJ_2001).

Churchman et al. apuntan a **dos posibles explicaciones** de este fenómeno que podría también ser válidas para la EC. ^(Churchman SM_2014). Una de las posibilidades es que la señalización de IL-7 a través de STAT-5 es capaz de regular la expresión de FOXP3 en células humanas lo que podría explicar el aumento de la capacidad supresora de los Treg en relación a los niveles de IL-7 encontrados en su estudio ^{(Passerini L_2008) (Di Caro V_2011)}. Esto explicaría las diferencias entre el comportamiento de los LT en sangre (anergia), y en el líquido sinovial (hiperreactividad). La otra posible

explicación es que IL-7 interviene en la polarización hacia respuestas Th1 por activación directa de las células dendríticas ^(Sorg RV_1998). La falta de IL-7 podría producir una polarización hacia respuestas Th17, resultando en codificación de la inflamación ^(Annunziato F_2010). Esta capacidad de IL-7 en la diferenciación Th17 se ha puesto de manifiesto en otras enfermedades autoinmunitarias como el síndrome de Sjögren ^(Bikker A_2012).

Cabe especular por tanto que algo similar podría ocurrir en la EC, es decir, que exista un defecto genético en la expresión de la IL-7 o de su receptor que disminuya su producción a nivel local o sistémico, o que existan alteraciones en su regulación a nivel local. Esta hipótesis, así como la posibilidad de otros mecanismos que inhiban el aumento compensatorio de IL-7 deben estudiarse en profundidad.

Otra de las limitaciones en la interpretación de estos resultados es el **valor del estudio aislado de las citoquinas en sangre y su posible falta de correlación con la expresión tisular** de las mismas. En este sentido existen sin embargo estudios que muestran una buena correlación entre niveles de otras citoquinas como IL-2 ^(Matsuura T_1992) o IL-6 ^(Mitsuyama K_2006) en tejido y en suero de pacientes con EC ^{(Radford-Smith G_1994)(Neurath MF_2014)}. Es más, los niveles séricos de otras citoquinas como IL-10 se correlacionan con la actividad de la EII –tanto la CU como la EC- ^(Kucharzik T_1995) y los niveles de IL-6 son capaces de predecir el riesgo de brotes de actividad ^(Louis E_1997). IL-7 ha demostrado incluso tener valor predictivo en pacientes con AR. Goëb et al demostraron que los pacientes con niveles séricos bajos (<10 pg/ml) predicen mal pronóstico en estadios iniciales. Ponchel et al han demostrado que los enfermos con AR en remisión clínica que no recuperan los niveles normales de IL-7 presentan mayor probabilidad de recaer ^(Churchman SM_2014).

Estos estudios avalarían la fiabilidad de la medición de IL-7 en SP y su extrapolación. Sin embargo nuestros resultados deben interpretarse con precaución antes ya que es conocido que factores como la variabilidad de producción de citoquinas y su estabilidad en sangre, las condiciones de recogida y técnica de procesamiento o la localización de la inflamación, influyen de manera importante y explican, al menos en parte, las variaciones encontradas en los distintos estudios

Otro aspecto interesante del presente trabajo es la demostración de que esta disminución de IL-7 en SP se mantuvo **independientemente de la actividad**. Los tres grupos analizados (nuevos, remisión y actividad) presentaron valores menores que los controles, aunque sin diferencias significativas. Destaca que el grupo de reciente diagnóstico presentaba los niveles más bajos. En conjunto, los pacientes del grupo “actividad” –que incluye al grupo “nuevos” y “activos”- presentaron niveles menores de IL-7 que el grupo de remisión aunque sin alcanzar significación. Esta relación inversa entre actividad y niveles de IL-7 ya fue apuntada en el estudio de Kader et al. y confirma los resultados de Ponchel et al. en los que los pacientes con EC activa presentaban niveles menores, que se normalizaron al alcanzar la remisión.

No encontramos diferencias significativas en los niveles de IL-7 sérica y los distintos fenotipos de la EC, excepto en el grupo de edad más joven (A1).

Una de las hipótesis previas a este análisis era la posibilidad de que el patrón estenosante (con mayor actividad fibrogénica) tuviera niveles menores, basado en el antagonismo de la IL-7 y el TGF- β (Tang J_1997) (Dubinett SM_1995), ya que este último es un agente fibrogénico. Curiosamente los pacientes con otra enfermedad autoinmunitaria poco común, la esclerosis sistémica, que cursa con esclerosis de la piel y otros órganos también presentaba niveles bajos de IL-7 en sangre en comparación con controles, sin relación con la actividad de enfermedad (Makino T_2009).

Una de las explicaciones que aducen los autores a este hecho fue esta capacidad antifibrogénica de la IL-7 por su efecto antagónico al TGF- β (Dubinett SM_1995). Es más IL-7 ha demostrado su capacidad de inhibir la fibrosis pulmonar en un modelo experimental (Zhang L_2004). Sin embargo no encontramos diferencias respecto a la IL-7 en este grupo de EC estenosante. Es posible que los menores niveles de IL-7 en los pacientes más jóvenes puedan explicarse por su mayor agresividad y expresión inmunológica, aunque esto debe ser estudiado en muestras más amplias pediátricas.

Tampoco se encontró ninguna correlación de la IL-7 en SP con la actividad clínica ni endoscópica (a diferencia de los $LT\gamma\delta$), ni diferencias significativas con respecto a otros factores asociados a peor pronóstico como la presencia de enfermedad perianal, manifestaciones extraintestinales, granulomas o el hábito tabáquico. Llama la atención las diferencias de medias entre pacientes con **granulomas** o sin ellos (media 10,4 DE ± 4.5 vs 18,4 DE $\pm 1,38$ respectivamente) que, sin alcanzar significación, apuntan a una tendencia hacia valores menores en pacientes con este hallazgo histológico. En nuestra muestra sólo 3 pacientes presentaban granulomas, por lo que esto debe ser investigado en una muestra mayor.

No encontramos correlación entre los niveles de IL-7 y los valores de $LT\gamma\delta$ en SP. Es posible que otros factores moduladores de esta subpoblación no incluidos en este estudio (como la IL-15 ^(Colpitts SL_2015) o la propia IL-2 ^(Shibuya K_2014), jueguen un papel en este sentido.

Lógicamente estos hallazgos restan valor a esta interleuquina como factor de influencia directa de la gravedad de la enfermedad. Pensamos que tal vez pueda **influir de un modo “indirecto”, mediante el mantenimiento de linfopenia y niveles bajos de $LT\gamma\delta$** o mediado por **otros mecanismos** (como su influencia sobre los Treg o sobre la diferenciación a fenotipos más citotóxicos de los propios $LT\gamma\delta$) ^{(Passerini L_2011) (Annunziato F_2010)} que aún están por esclarecer.

Aquellos pacientes que recibían algún **tratamiento** en el momento de la inclusión presentaron niveles mayores de IL-7, **sin diferencias significativas** con respecto a los no tratados. En cuanto al estudio de cada tratamiento, sólo encontramos niveles significativamente mayores de IL-7 en los pacientes que recibían **antibióticos**. Puede conjeturarse que el probado efecto inmunomodulador de estos fármacos (metronidazol inhibe la quimiotaxis leucocitaria ^(Gnarpe_1978) y ciprofloxacino y metronidazol han demostrado disminuir la respuesta Th1 en ratones) ^(Bamias G_2002), además de la lógica alteración de la microbiota intestinal, pudiera jugar un papel modulador, aumentando los niveles.

Existen **resultados contradictorios sobre el papel de la IL-7 en la EII**, además disponemos de pocos estudios concretamente en la EC.

Algunos estudios en modelos murinos de colitis muestran su **papel protector** de la inflamación, sobre todo por el efecto regulador sobre las células epiteliales intestinales (CEI). Estas expresan IL-7R y se expanden en respuesta a IL-7 in vivo, produciéndose una acumulación de estas células en el colon de los ratones linfopénicos (hiperplasia) protegiéndolos de la colitis inducida por DSS ^(Shalapour S_2012). Ese efecto protector se inhibe sin embargo si los LT CD8+ naive consumen la IL-7 o la señalización del IL-7R está inactiva. Esto sugiere que existe un mecanismo de feedback homeostático mediado por la IL-7 entre las CEI y los LT, que controla la integridad del epitelio intestinal. En condiciones fisiológicas, IL-7 ejercería un efecto protector del epitelio intestinal y en condiciones de inflamación, con un mayor consumo de IL-7 por los LT (cuya afinidad por esta citoquina es mayor que las células epiteliales) este efecto protector de la mucosa está inhibido.

Este mecanismo podría explicar en parte que los pacientes con EC que presentan linfopenia, y el consumo de la IL-7 por los LT secundaria a la inflamación podría abolir su efecto protector de la mucosa inhibiendo la generación de hiperplasia en células epiteliales.

Una de las mayores contribuciones para entender el papel de IL-7 en la inflamación de la mucosa intestinal ha sido revelado de manera indirecta en un reciente **ensayo clínico con rIL-7 en pacientes con HIV** tratados con terapia antiretroviral HAART en los que los niveles de LTCD4+ no se pudieron normalizar ^(Sereti I_2014). 3 inyecciones subcutáneas de rIL-7 produjeron una expansión de los LT CD4+ y CD8+ en sangre periférica, con una importante expansión de los LT que expresaban la integrina necesaria para la migración al intestino $\alpha 4\beta 7$. Se tomaron biopsias de colon por rectosigmoidoscopia antes y después del tratamiento y se observó: 1) un aumento de los LT en la mucosa; 2) una disminución de la infiltración por neutrófilos en la lámina propia; 3) un descenso del TNF- α y mieloperoxidasa en la lámina propia y 4) un aumento del número de LT FOXP3+ (Treg), que se encontraban bajos en los pacientes antes del tratamiento. Por tanto una **mejoría de la inflamación mucosa** mediada por varios mecanismos inmunitarios. Estudios específicos en EC deberán

demostrar su seguridad y utilidad, dado que ambas enfermedades (aunque las dos son situaciones de inmunodeficiencia que cursan con linfopenia e inflamación intestinal), difieren en muchos de sus mecanismos patogénicos.

Sin embargo, la mayoría de estudios preclínicos han mostrado un **papel proinflamatorio de la IL-7**. Cabe reseñar que la mayoría de estos estudios se han realizado en modelos murinos de colitis o pacientes con CU, con más difícil extrapolación a enfermos de EC (Watanabe M_1998) (Okada E_2005) (Yamazaki M_2003) (Nemoto Y_2013).

Estos datos irían más en la línea de estudios en otras enfermedades autoinmunitarias que demuestran el papel proinflamatorio de la IL-7. De hecho, los pacientes con esclerosis múltiple y niveles altos de IL-7 presentan mayor reactividad de los LT contra la proteína básica de la mielina (Traggiai E 2001) y se han detectado niveles altos de IL-7 en líquidos sinoviales de pacientes con AR (Churchman SM_2008). Ratones transgénicos con niveles altos mantenidos de IL-7 desarrollan fenómenos autoinmunes como dermatitis y colitis (Uehira M_1993) y existen pruebas de que el bloqueo de la IL-7 reduce la incidencia de diabetes tipo 1 inducida con ciclofosfamida en un modelo murino (Calzascia T_2008).

Los hallazgos de este estudio abundan en un **nuevo mecanismo de inmunodeficiencia** en la EC, pero cabe preguntarse si existe evidencia de ello.

Existen crecientes pruebas desde diferentes campos de investigación que apuntan a que **la EC es una inmunodeficiencia primaria (IP)** más que un proceso autoinmune. Este aspecto ha sido analizado en revisiones recientes (Vinh DC_ 2013) (Glocker E_2012) (Marks DJ_ 2011).

Esta hipótesis se basa en las similitudes con algunas inmunodeficiencias (defectos genéticos, susceptibilidad a las infecciones, alteraciones inmunitarias comunes en el proceso de reconocimiento y procesamiento de patógenos, o incluso expresiones fenotípicas similares), así como la falta de pruebas consistentes de verdadera “autoinmunidad”, es decir con pérdida de tolerancia frente a antígenos propios. Vinh et al. invitan a reconsiderar el concepto de clásico de IP (alteraciones genéticas típicamente descritas en edades pediátricas, con historia familiar relevante y herencia monogénica) por un concepto más amplio. Este nuevo

paradigma de la IP incluye alteraciones que no necesariamente incluyen las infecciones de repetición, ni la necesidad de la presencia de un organismo identificable causante de la susceptibilidad a las infecciones, y que contempla la presencia de que la misma mutación pueda tener diferente expresión clínica o distintas manifestaciones incluso en la misma familia (penetrancia y expresividad variable) ^(Casanova JL_2007).

Estos autores abogan por que la EC cumple las condiciones de una IP, es decir, se trata de un defecto genéticamente mediado del sistema inmunitario con un fenotipo identificable y que como consecuencia puede producir infecciones, autoinflamación, autoinmunidad o neoplasias ^(Vinh DC_2013).

Argumentan que la EC podría **clasificarse** dentro de las IP que se manifiestan como “**síndromes autoinflamatorios**” (es decir ataques inflamatorios recurrentes mediados por alteraciones inmunitarias, en ausencia de reactividad contra antígenos propios) ^(Holzinger D_2015), superando la aparente contradicción entre “deficiencia” del sistema inmunitario y “exceso” de actividad del mismo (inflamación crónica).

Es decir, los enfermos de EC con un sistema inmunitario deficiente puedan presentar infecciones de repetición no resueltas que puedan precipitar fenómenos autoinmunes secundarios (como las artropatías o las manifestaciones cutáneas u oculares) ^{(Marks DJ_2006) (Glocker E_2012) (Marks DJ_2011)}.

Son llamativos los paralelismos existentes entre la EC y otros síndromes de IP con fenómenos inflamatorios recidivantes en el tracto gastrointestinal como las **mutaciones del receptor de IL-10** (que produce clínica similar a la EC pediátrica con enterocolitis, fístulas y abscesos perianales y herencia monogénica) ^(Glocker EO_2009), la **enfermedad crónica granulomatosa (ECG)** ^(Marks DJ_2009) o la **alteración de los depósitos de glucógeno tipo IB (ADG-IB)** ^(Roe T_1984). Las dos últimas presentan signos clínicos, radiológicos y endoscópicos similares a la EC, con enterocolitis e infecciones bacterianas de repetición que sin embargo necesitan de tratamiento inmunosupresor para su control. Es más, comparten la implicación en su patogenia de alteraciones del sistema monocito macrófago que dificultan la eliminación de patógenos descritas también en la EC (como la disminución de

producción de citoquinas proinflamatorias que afectan a la formación y tráfico de vesículas intracelulares) (Smith AM_2009)(Rahman FZ_2008) y ciertos aspectos inmunológicos (como la positividad de anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* –ASCA-, anticuerpos contra la porina C de la membrana externa de *Escherichia coli* -anti-OmpC-, o antiflejelina bacteriana -anti-Cbir-) (Zholudev A_ 2004).

Los primeros trabajos que pusieron en **evidencia la presencia de alteraciones inmunológicas específicas en la EC** fueron de Segal et al. en la década de 1970. En ellos se demostró por primera vez un defecto sistémico en el reclutamiento de neutrófilos secundario a una respuesta inflamatoria débil e incompleta ante bacterias o material exógeno en el intestino, como posible causa de la inflamación crónica (Segal AW_1976). Trabajos posteriores del mismo grupo describieron un flujo de neutrófilos debilitado en EC en piel en comparación con CU o AR, con menor producción local de citoquinas proinflamatorias (IL-8 o IL-1 β) y una alteración importante de la migración neutrofílica al recto e íleon (Marks DJ_2006); así como una retención prolongada de los mismos en el epitelio mucoso, contribuyendo al daño tisular (erosiones, úlceras, edema etc.) (Brazil J_ 2013).

Smith et al demostraron recientemente que los **macrófagos** de los pacientes con EC presentan una disminución de estas citoquinas proinflamatorias y niveles intracelulares menores de TNF α , argumentando a favor de que esta falta de “inflamación inicial eficaz” produciría una eliminación de antígenos bacterianos deficiente, con la formación de granulomas mediados por los LT para “proteger” la mucosa de la invasión bacteriana, perpetuando la inflamación (Smith AM_2009;206:1883-1997) (Levine AP_2013) (Glocker E_2012).

Estas alteraciones en la función leucocitaria se acompañan a su vez de otras disfunciones propias de la EC en mecanismos pertenecientes a la inmunidad innata y que contribuyen a la aparición de infecciones de repetición y al mantenimiento de la enterocolitis como las **alteraciones de la capa mucosa** (Buisine MP_1999) (Franke A_ 2010), de la **permeabilidad intestinal** (Pearson AD_1982) (Zeissig S_2007) (Goetz M_ 2010), de la función de las **células de Paneth** (y la producción de defensinas) (Wehkamp J_ 2005) (Peyrin-Biroulet L_2010), y de los **mecanismos del estrés del retículo endoplásmico** (Kaser A_ 2010) (Kaser A_2008).

Para poder incluir a la EC entre las IP deben demostrarse **alteraciones genéticas específicas** que modifiquen la expresión fenotípica de la enfermedad, y participen en su patofisiología. La primera alteración genética con transcendencia clínica directa fue la descripción de los polimorfismos del **gen NOD2** (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2) y la susceptibilidad a padecer EC (*Hugot JP_2001*) (*Ogura Y_ 2001*). EL NOD2 codifica un receptor PRR (Pattern Recognition Receptor) intracelular que es activado por el N-acetyl muramyl dipéptido, un componente del peptidoglicano bacteriano y otros ligandos de micobacterias y virus (*Kanneganti TD_ 2007*) produciendo una respuesta exagerada con la consecuente reacción inflamatoria (*Noguchi E_2009*). (*Tsay TB_2009*) y una disminución de la producción de agentes antimicrobianos, como las α -defensinas (disminuida en pacientes con la mutación) (*Wehkamp J_2005*). (*Kobayashi KS_2005*).

El segundo grupo importante de alteraciones genéticas con importancia en la deficiencia de los mecanismos de respuesta contra patógenos enteroinvasivos son las alteraciones en los procesos de autofagia, proceso de degradación fundamental para reciclar componentes celulares dañados, agregados proteicos y microorganismos invasivos, mediante la formación de autofagosomas y autolisosomas (*Levine B_2008*). Se han descrito **dos polimorfismos en genes relacionados con la autofagia en la EC**. Los pacientes homocigotos para la mutación en el ATG16L1(T300A) (*Hampe J_2007*) (*Rioux JD_2007*) presentan alteraciones en la autofagia selectiva (*Xavier RJ_2008*) con fallos en la formación de autofagosomas para la degradación de productos microbianos (*Kuballa P_2008*), alteraciones en la presentación antigénica a los LT CD4+ (*Cooney R_2010*) y defectos en la formación de gránulos por las células de Paneth, lo que produce una exocitosis anormal (*Cadwell K_2008*). Otros autores han descrito la presencia de alteraciones en el IRGM (immunity-related GTPase M), un mecanismo clave en las fases iniciales de la autofagia y para la destrucción de microorganismos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* (*Singh SB_2006*) (*Gutierrez MG_2004*).

Estos dos grupos de alteraciones genéticas bien documentadas suponen un nexo entre genotipo y fenotipo típicos, para entender la deficiencia inmunitaria específica de la EC.

Otro de los aspectos a considerar si entendemos la enfermedad como una IP es la presencia de **infecciones de repetición** (secundarias a estas alteraciones en la defensa, reconocimiento y procesamiento de bacterias en la barrera intestinal) que puedan explicar la presencia de inflamación crónica. Estudios metagenómicos de **microbioma** demuestran una **disbiosis** con una disminución de las especies *Firmicutes* y *Bacteroidetes* y un aumento de *Proteobacteria* y de *Enterobacteria*, en concreto de *Escherichia coli* (Joossens M_ 2011)(Morgan XC_2012).

Por otro lado como hemos visto previamente existen alteraciones inmunitarias en mecanismos implicados directamente con el reconocimiento (NOD2) y el aclaramiento (ATG16L y IRGM) de organismos intracelulares y ciertas bacterias. El hecho de que las lesiones típicas ocurran en las zonas de mayor densidad bacteriana (íleon y recto), la mejoría de la inflamación en zonas sin tránsito fecal, la presencia de mayor cantidad de bacterias intramucosas o la presencia de granulomas, hacen plausible la presencia de **infecciones de repetición como mecanismo de mantenimiento de la respuesta inflamatoria** (Bosca-Watts MM_ 2015).

Tomando estos datos varios autores han planteado la siguiente hipótesis: **existe una predisposición genética a la infección crónica por un agente intracelular conocido que produce inflamación intestinal crónica** (Vinh DC_2013) (Haag LM_2015).

Uno de los organismos que podría cumplir estos requisitos es el ***Micobacterium avium paratuberculosis (MAP)*** (Mendoza JL_ 2010). Este microorganismo provoca una ileitis granulomatosa similar a la EC, incluso en el tipo de respuesta inmune que genera (Lee JS_2009). De hecho se han identificado micobacterias en en tejido y sangre de pacientes con EC (Di Sabatino A_2011), pero esta infección (o “sobreinfección”) no cumple los postulados de Koch (Lowe AM_ 2008) (Gradmann C_ 2014) y además el tratamiento antituberculoso se ha probado sin éxito en ensayos clínicos controlados (Selby W_ 2007). La demostración de ***Escherichia coli adherente-invasiva (AIEC)*** en el colon e íleon (Masseret E_2004) y en los granulomas de pacientes (Ryan P_ 2004) ha despertado creciente interés y podría explicar (al menos en parte) la buena respuesta de los pacientes a los tratamientos antibióticos durante los brotes de actividad.

Cabría pensar por tanto que la linfopenia y deficiencia de $LT\gamma\delta$ descrita en el nuestro estudio podría predisponer a la infección crónica por algún agente intracelular específico **no descrito** previamente. Recientemente nuestro grupo ha documentado la presencia un **microorganismo intracelular oportunista** de la familia de los hongos, **microsporidia**, en pacientes con **EC** (Andreu-Ballester JC_2013). Se demostró un aumento de los anticuerpos IgE contra este hongo, y lo que es más importante, se halló su presencia en tejido en el 30% de los enfermos. La inmunidad celular es esencial para la resolución de la infección por este microorganismo, especialmente los $LT\ CD8^+$ (Khan IA_ 1999), y estudios murinos demuestran un rápido aumento de los $LT\gamma\delta$ durante su infección (Moretto M_2001). En este estudio se demostró además una correlación inversa entre los anticuerpos IgE contra el *Encephalitozoon* (una subespecie de microsporidia) y los niveles de $LT\gamma\delta$, especialmente el subtipo $LT\gamma\delta\ CD8^+$ (Andreu-Ballester JC_ 2013). Pensamos que este hallazgo abre la puerta a la posibilidad de estudiar la infección por otros microorganismo intracelulares no detectables con técnicas habituales, facilitada por estas alteraciones inmunitarias. Sin embargo, la importancia clínica de este hallazgo y su relación exacta con la deficiencia de $LT\gamma\delta$ debe ser analizada en posteriores estudios.

Si se confirma la presencia de esta **deficiencia de $LT\gamma\delta$ con una alteración del aumento compensatorio de IL-7** en la EC, cabría especular sobre **la posibilidad de utilizar tratamientos inmunoreguladores** para corregir este defecto y mejorar la susceptibilidad a presentar infecciones, optimizando la respuesta inmunitaria en la mucosa intestinal. De hecho ya disponemos de ensayos clínicos que demuestran su efectividad y buena tolerancia.

La mayoría de estudios han empleado la **inmunoterapia con $LT\gamma\delta$** (especialmente la subpoblación $V\gamma9V\delta2$, mayoritaria en sangre periférica) para el tratamiento de **tumores e infecciones**, aprovechando su característica específica de actuar de manera rápida contra antígenos peptídicos sin necesidad del CMH y su capacidad para ser potentemente estimulados por **fosfoantígenos** (Gomes AQ_ 2010). Una

característica típica que podría tener consecuencias en el empleo de los $LT\gamma\delta$ en la EC es la capacidad de los aminobisfosfonatos, empleados en la clínica para el tratamiento y prevención de la osteoporosis (como el Alendronato (Fosamax®), Pamidronato (Aredia®) o el Zolendronato (Zometa®)) para la activación de esta subpoblación, tanto en vivo como in vitro, aumentando su capacidad antitumoral y antiinfecciosa (Dieli F_ 2007).

Se han empleado **dos estrategias distintas para el empleo de los $LT\gamma\delta$ como inmunoterapia**: 1) transferencia de $V\gamma9V\delta2$ autólogos activados ex vivo; y 2) inducción de la expansión de $V\gamma9V\delta2$ in vivo.

La transferencia de $V\gamma9V\delta2$ autólogos activados ex vivo ha demostrado ser bien tolerada y efectiva en su acción antitumoral, especialmente en tumores avanzados, como el cáncer renal (Kobayashi H_2007) (Kobayashi H_2011).

La otra alternativa con resultados prometedores es la inducción de la expansión de $V\gamma9V\delta2$ in vivo. El empleo de zolendronato y dosis bajas de IL-2 en pacientes con cáncer de mama metastásico y en cáncer prostático metastásico fue bien tolerado y produjo una activación y maduración sostenida de los $LT\gamma\delta$, que además se correlacionó con mejores respuestas clínicas (Meraviglia S_ 2010) (Dieli F_ 2007). Este abordaje también se ha empleado con éxito en neoplasias hematológicas (Wilhelm M_2003).

Algunos alimentos ricos en taninos también han demostrado que pueden activar la población mucosa de los $LT\gamma\delta$ (Holderness J_ 2008). En la misma línea, se ha comprobado recientemente que el bloqueo del receptor alfa de ácido retinoico (RAR- α) puede modular la respuesta inflamatoria producida por el subtipo $v2+$ en la EC (disminuyendo los niveles de TNF- α), indicando que los metabolitos de ciertas vitaminas ingeridas con la comida podrían ser de utilidad para el tratamiento de la enfermedad (McCarthy NE_2013). De hecho, un reciente estudio demuestra que el ácido retinoico procedente de la vitamina A es capaz de estimular a los $LT\gamma\delta$ vía IL-22 estimulando la reparación tisular y la atenuación de la inflamación (Mielke, L. A_ 2013).

Recientemente se ha demostrado la potente capacidad del infliximab para expandir los $LT\gamma\delta$ en SP de los pacientes con EC, hasta el punto de que los niveles aumentan significativamente en las primeras 24 horas tras sólo una infusión del

fármaco *(Kelsen J_2011)*. Es posible que este efecto poco conocido contribuya a su alta eficacia en el manejo de la EC.

Nuestros resultados apuntan a que la presencia de linfopenia no es compensada por un aumento de IL-7, por lo que existe la posibilidad de que el empleo de **IL-7 recombinante (rIL-7)** (bien tolerada y con experiencia de uso en ensayos clínicos) *(Capitini CM_ 2009)* pudiera paliar esta deficiencia en la inmunidad celular, y especialmente estimular el número y función de los LT $\gamma\delta$ en la EC. Hasta el momento la mayoría de ensayos clínicos con IL-7 se han llevado a cabo para revertir la linfopenia en pacientes con infección por HIV, con resultados prometedores *(Sereti L_ 2009) (Levy Y_2009)*.

El presente trabajo presenta algunos **puntos fuertes**. Se trata de una amplia muestra de pacientes con EC (la más larga hasta la fecha para el estudio de los LT $\gamma\delta$), en diversos escenarios clínicos, que consideramos representativa de la práctica clínica diaria. Además incluye información clave para intentar esclarecer el papel de estas células en la patogenia de la enfermedad con una recogida sistemática del fenotipo, indicadores de actividad clínica y endoscópica, datos histológicos, e información útil sobre la influencia del tratamiento. La inclusión del estudio de la IL-7, probablemente su más potente estimulador, en más de 60 pacientes y su correlación con dichas variables pensamos añade datos importantes que ayudan a esclarecer cual puede ser el origen de esta inmunodeficiencia, y sobre todo su importancia clínica, abriendo el camino a posibles nuevos abordajes terapéuticos en la EC.

Las principales **debilidades** del estudio se centran en la ausencia del estudio de estas poblaciones en la mucosa intestinal para poder correlacionar estos dos escenarios anatómicos; y la falta de caracterización de los dos subtipos principales de LT $\gamma\delta$ ($\delta 1 +$ y $\delta 2$), con funciones y características diferentes que ayudaría a definir con más exactitud la significación de estos hallazgos. Pensamos que la realización seriada de determinaciones analíticas en el seguimiento de la enfermedad y con relación a los tratamientos empleados podría ser de utilidad para

la caracterización de esta inmunodeficiencia.

Este trabajo abre nuevas incógnitas que deberán ser despejadas en **futuros estudios**. Entre ellos se incluyen: 1) las determinaciones en mucosa de LT $\gamma\delta$ e IL-7 (y su receptor IL-7R- α), o su expresión génica en biopsias y muestras quirúrgicas de pacientes, comparando las zonas inflamadas con las sanas, y relacionando estos datos con los niveles séricos; 2) el análisis de las dos subpoblaciones principales (y tal vez otras adicionales) en sangre y en mucosa; 3) datos de seguimiento de una cohorte de pacientes para evaluar su capacidad pronóstica (hospitalizaciones, cirugía, necesidad de inmunosupresión etc.); 4) el estudio adicional de otros estimuladores linfocitarios en SP como IL-15 o IL-2 y su relación con las subpoblaciones linfocitarias; 5) el estudio genético de polimorfismos en la IL-7 y su receptor para tratar de estudiar un posible defecto en su expresión; 6) estudiar la posible correlación de esta inmunodeficiencia con infecciones oportunistas (como microsporidia u otras); 6) realizar un estudio completo en SP y mucosa de pacientes con CU y evaluar las diferencias con los hallazgos en EC; 7) o estudios preclínicos en modelos murinos de EII empleando estimuladores de los LTGD y /o su transferencia para evaluar su eficacia en la prevención de la inflamación, así como tratamientos estimuladores de la IL-7 (como la rIL-7) o su bloqueo con anticuerpos monoclonales para evaluar su efectividad.

Actualmente nuestro grupo de trabajo está desarrollando algunos de estos proyectos de investigación que ayuden a profundizar en el conocimiento de este novedoso mecanismo patogénico, con buenas perspectivas de aplicabilidad en la clínica en un futuro no lejano (ya que disponemos de estrategias provadas y bien toleradas). Estos hallazgos junto a los de otros grupos inciden en la teoría de la inmunodeficiencia en la EC, e invita a un cambio de paradigma sobre la enfermedad, animando a investigadores y clínicos a buscar nuevas estrategias para prevenir y regular estos defectos como terapia alternativa o complementaria al tratamiento antiinflamatorio e inmunosupresor.

En conclusión, nuestro estudio demuestra la presencia de linfopenia con una deficiencia de $LT\gamma\delta$ en sangre periférica en pacientes con EC, corroborando estudios previos, así como su relación inversa con marcadores de actividad clínica y endoscópica, que se mantiene con independencia de la presencia o no de tratamiento y que constituye un nuevo mecanismo patogénico en la enfermedad. La ausencia de una elevación compensatoria de la IL-7 demostrada en este trabajo apunta a un posible defecto inmunitario en la regulación de estas células, con posibles implicaciones terapéuticas.

7. Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Los pacientes con EC presentan valores séricos medios de linfocitos significativamente menores que los controles. Todos los tipos linfocitarios se hallaron significativamente disminuidos y esta linfopenia fue independiente de la actividad clínica y del empleo o no de tratamiento.

2. Los valores séricos medios de linfocitos T gammadelta fueron significativamente menores en pacientes que en controles. Esta disminución significativa se mantuvo en todas las subpoblaciones de linfocitos T gammadelta y se mantuvo independientemente de la actividad clínica.

3. Los pacientes con edad media entre 17 y 40 años (A2), presentaron valores séricos significativamente mayores de linfocitos T gammadelta que los mayores de 40 años (A3). Aquellos con formas colónicas (L2), tenían niveles significativamente menores que aquellos con formas ileocolónicas (L3). Se observó asimismo un descenso significativo en enfermos con patrón fistulizante (B3), con respecto a los de patrón estenosante (B2).

4. Se encontró una correlación inversa entre los valores séricos de linfocitos T gammadelta y la actividad clínica (índices CDAI y Harvey-Bradshaw) y la actividad endoscópica (índice SES-CD).

5. Los pacientes presentaron valores menores de IL-7 sérica que los controles, sin diferencias significativas. Esta disminución se mantuvo independientemente de la actividad.

6. No se encontró una correlación significativa entre los valores de IL-7 y la actividad clínica o endoscópica, ni con la presencia de enfermedad perianal, manifestaciones extraintestinales, granulomas o el hábito tabáquico. Los valores de IL-7 sérica no se correlacionaron con los valores de los linfocitos totales ni con las subpoblaciones linfocitarias estudiadas.

8. Bibliografía

A.

Abdul-Hai A, Or R, Slavin S, Friedman G, Weiss L, Matsa D, Ben-Yehuda A. Stimulation of immune reconstitution by interleukin-7 after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *Exp Hematol.* 1996;24:1416-1422

Abraham C, Cho JH. *Inflammatory bowel disease* 2009;361:2066-2078

Adachi S, Yoshida H, Honda K, Maki K, Saijo K, Ikuta K, Saito T, Nishikawa SI. Essential role of IL-7 receptor alpha in the formation of Peyer's patch anlage. *Int Immunol.* 1998;10:1-6

Agrati C, D'Offizi G, Narciso P, Abrignani S, Ippolito G, Colizzi V, Poccia F. Vdelta1 T lymphocytes expressing a Th1 phenotype are the major gammadelta T cell subset infiltrating the liver of HCV-infected persons. *Mol Med.* 2001;7:11-91

Akobeng AK, Gardener E. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of medically-induced remission in Crohn's Disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;(1):CD003715.

Al-Hawary MM, Kaza RK, Platt JF. CT enterography: concepts and advances in Crohn's disease imaging. *Radiol Clin North Am.* 2013;51:1-16

Alexander AA, Maniar A, Cummings JS, Hebbeler AM, Schulze DH, Gastman BR, Pauza CD, Strome SE, Chapoval AI. Isopentenyl pyrophosphate-activated CD56+ gammadelta T lymphocytes display potent antitumor activity toward human squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008;14:4232-4240

Allen BC, Leyendecker JR. MR enterography for assessment and management of small bowel Crohn disease. *Radiol Clin North Am.* 2014;52:799-810

Allison TJ, Winter CC, Fournié JJ, Bonneville M, Garboczi DN. Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* 2001;411:824

Almadi MA, Ghosh S, Aljebreen AM. Differentiating intestinal tuberculosis from Crohn's disease: a diagnostic challenge. *Am J Gastroenterol.* 2009;104:1003-1012

Alpdogan O, Schmaltz C, Muriglian SJ, Kappel BJ, Perales MA, Rotolo JA, Halm JA, Rich BE, van den Brink MR. Administration of interleukin-7 after allogeneic bone marrow transplantation improves immune reconstitution without aggravating graft-versus-host disease. *Blood.* 2001;98:2256-226

Ananthakrishnan AN, Higuchi LM, Huang ES, Khalili H, Richter JM, Fuchs CS, Chan AT. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Ann Intern Med.* 2012;156:350-359

Andreu-Ballester JC, Amigó-García V, Catalán-Serra I, Gil-Borrás R, Ballester F, Almela-Quilis A, Millan-Scheidig M, Peñarroja-Otero C. Deficit of gammadelta T lymphocytes in the peripheral blood of patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* 2011;56:2613-2622 ([Anexo 3](#)).

Andreu-Ballester JC, Garcia-Ballesteros C, Benet-Campos C, Amigo V, Almela-Quilis A, Mayans J, Ballester F. Values for $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T-lymphocytes and CD4+, CD8+, and CD56+ subsets in

healthy adult subjects: assessment by age and gender. *Cytometry B Clin Cytom.* 2012;82:238-244

Andreu-Ballester JC, Pérez-Griera J, Garcia-Ballesteros C, Amigo V, Catalán-Serra I, Monforte-Albalat A, Bixquert-Jiménez M, Ballester F. Deficit of interleukin-7 in serum of patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19:E30-1. doi: 10.1002/ibd.22914 (*Anexo 4*)

Andreu-Ballester JC, Tormo-Calandín C, Garcia-Ballesteros C, Pérez-Griera J, Amigó V, Almela-Quilis A, Ruiz del Castillo J, Peñarroja-Otero C, Ballester F. Association of $\gamma\delta$ T cells with disease severity and mortality in septic patients. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20:738-746

Andreu-Ballester JC, Garcia-Ballesteros C, Amigo V, Ballester F, Gil-Borrás R, Catalán-Serra I, Magnet A, Fenoy S, del Aguila C, Ferrando-Marco J, Cuéllar C. Microsporidia and its relation to Crohn's disease. A retrospective study. *PLoS One.* 2013;8(4):e62107

Annunziato F, Romagnani S. The transient nature of the Th17 phenotype. *Eur J Immunol.* 2010;40:3312-3316

Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Förster R, Sedgwick JD, Browning JL, Lipp M, Cyster JG. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature.* 2000;406(6793):309-314

Antoni L, Nuding S, Wehkamp J, Stange EF. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20:1165-1179

Antunes O, Filippi J, Hébuterne X, Peyrin-Biroulet L. Treatment algorithms in Crohn's - up, down or something else? *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2014;28:473-483

Aparicio P, Alonso JM, Toribio ML, Marcos MAR, Pezzi L, Martinez AC. Isolation and characterization of (c,d) CD4 β T cell clones derived from human fetal liver cells. *J Exp Med* 1989;170:1009- 1013

Ariel A, Hershkoviz R, Cahalon L, Williams DE, Akiyama SK, Yamada KM, Chen C, Alon R, Lapidot T, Lider O. Induction of T cell adhesion to extracellular matrix or endothelial cell ligands by soluble or matrix-bound interleukin-7. *Eur J Immunol.* 1997;27:2562-2570

Arnott ID, Kingstone K, Ghosh S. Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn disease. *Scand J Gastroenterol.* 2000;35:1163-1169

Aspinall R. T cell development, ageing and Interleukin-7. *Mech Ageing Dev.* 2006;127:572-578

Atkinson TP. Immune deficiency and autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol.* 2012 ;24:515-521

Audigé A, Schlaepfer E, Joller H, Speck RF. Uncoupled anti-HIV and immune-enhancing effects when combining IFN-alpha and IL-7. *J Immunol.* 2005;175:3724-3736

B.

Baccala R, Witherden D, Gonzalez-Quintal R, Dummer W, Surh CD, Havran WL, Theofilopoulos AN. Gamma delta T cell homeostasis is controlled by IL-7 and IL-15 together with subset-specific factors. *J Immunol.* 2005;174:4606-4612

- Bamias G, Marini M, Moskaluk CA, Odashima M, Ross WG, Rivera-Nieves J, Cominelli F. Down-regulation of intestinal lymphocyte activation and Th1 cytokine production by antibiotic therapy in a murine model of Crohn's disease. *J Immunol.* 2002;169:5308-5314
- Bandeira A, Itohara S, Bonneville M, Burlen-Defranoux O, Mota-Santos T, Coutinho A, Tonegawa S. Extrathymic origin of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing T-cell antigen receptor $\gamma\delta$. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991;88:43-47
- Barreiro-de Acosta M, Pena AS. Clinical applications of NOD2/CARD15 mutations in Crohn's disease. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2007;37:49-54
- Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet.* 2008;40:9559-62
- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier L, Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress inducible MIC-A. *Science* 1999; 285:727-729
- Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet.* 2012;380:1590-605
- Beaugerie L, Seksik P, Nion-Larmurier I, Gendre JP, Cosnes J. Predictors of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2006;130:650-656
- Beetz S, Marischen L, Kabelitz D, Wesch D. Human gamma delta T cells: candidates for the development of immunotherapeutic strategies. *Immunol Res.* 2007;37:97-111
- Beetz S, Wesch D, Marischen L, Welte S, Oberg HH, Kabelitz D. Innate immune functions of human gammadelta T cells. *Immunobiology.* 2008;213:173-82
- Bekiaris V, Šedý JR, Ware CF. Mixing Signals: Molecular Turn Ons and Turn Offs for Innate $\gamma\delta$ T-Cells. *Front Immunol.* 2014;5:654
- Bengtson MB, Solberg C, Aamodt G, Jahnsen J, Moum B, Sauar J, Vatn MH; IbsenStudy Group. Clustering in time of familial IBD separates ulcerative colitis from Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15:1867-1874
- Bengtson MB, Solberg C, Aamodt G, Sauar J, Jahnsen J, Moum B, Lygren I, Vatn MH; IBSEN study group. Familial aggregation in Crohn's disease and ulcerative colitis in a Norwegian population-based cohort followed for ten years. *J Crohns Colitis.* 2009;3:92-99
- Bennouna J, Bompas E, Neidhardt EM, Rolland F, Philip I, Galéa C, Salot S, Saiagh S, Audrain M, Rimbart M, Lafaye-de Micheaux S, Tiollier J, Négrier S. Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57:1599-1609
- Beq S, Rozlan S, Gautier D, Parker R, Mersseman V, Schilte C, Assouline B, Rancé I, Lavedan P, Morre M, Cheynier R. Injection of glycosylated recombinant simian IL-7 provokes rapid and massive T-cell homing in rhesus macaques. *Blood.* 2009;114:816-825
- Bernstein CN, Wajda A, Blanchard JF. The clustering of other chronic inflammatory diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology.* 2005;129:827-836
- Bertotto A, Gerli R, Spinozzi F, Muscat C, Scalise F, Castellucci G, Sposito M, Candio F, Vaccaro R. Lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in acute *Brucella melitensis* infection. *Eur J Immunol.* 1993;23:1177-1180

- Best WR, Bechtel JM, Singleton JW, et al. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*. 1976;70:439-444
- Bhatia SK, Tygrett LT, Grabstein KH, Waldschmidt TJ. The effect of in vivo IL-7 deprivation on T cell maturation. *J Exp Med*. 1995;181:1399-1409
- Bikker A, Moret FM, Kruize AA, Bijlsma JW, Lafeber FP, van Roon JA. IL-7 drives Th1 and Th17 cytokine production in patients with primary SS despite an increase in CD4 T cells lacking the IL-7R α . *Rheumatology*. 2012;51:996-1005
- Bisset LR, Lung TL, Kaelin M, Ludwig E, Dubs RW. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur J Haematol*. 2004;7:203-212
- Bitton A, Dobkin PL, Edwardes MD, Sewitch MJ, Meddings JB, Rawal S, Cohen A, Vermeire S, Dufresne L, Franchimont D, Wild GE. Predicting relapse in Crohn's disease: a biopsychosocial model. *Gut*. 2008;57:1386-1392
- Blink SE, Caldis MW, Goings GE, Harp CT, Malissen B, Prinz I, Xu D, Miller SD. $\gamma\delta$ T cell subsets play opposing roles in regulating experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol*. 2014;290:39-51
- Boismenu R, Chen Y, Havran WL. The role of intraepithelial gammadelta T cells: a gut-feeling. *Microbes Infect*. 1999;1:235-40
- Boismenu R, Havran WL. Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells. *Science*. 1994;266:1253-125
- Bolotin E, Smogorzewska M, Smith S, Widmer M, Weinberg K. Enhancement of thymopoiesis after bone marrow transplant by in vivo interleukin-7. *Blood*. 1996;88:1887-1894
- Bolotin E, Annett G, Parkman R, Weinberg K. Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count. *Bone Marrow Transplant*. 1999;23:783-788
- Bonneville M, Janeway CA Jr, Ito K, et al. Intestinal intraepithelial lymphocytes are a distinct set of gamma delta T cells. *Nature*. 1988;336:479-481
- Bonneville M, Scotet E. Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. *Curr Opin Immunol* 2006;18:539-546
- Born WK, Reardon CL, O'Brien RL. The function of gammadelta T cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2006;18:31-8
- Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:467-478
- Bosca-Watts MM, Tosca J, Anton R, Mora M, Minguez M, Mora F. Pathogenesis of Crohn's disease: Bug or no bug. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2015;6:1-12
- Boutboul F, Puthier D, Appay V, Pellé O, Ait-Mohand H, Combadière B, Carcelain G, Katlama C, Rowland-Jones SL, Debré P, Nguyen C, Autran B. Modulation of interleukin-7 receptor expression characterizes differentiation of CD8 T cells specific for HIV, EBV and CMV. *AIDS*. 2005;19:1981-1986

Brandes M, Willimann K, Bioley G, Lévy N, Eberl M, Luo M, Tampé R, Lévy F, Romero P, Moser B. Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:2307-2312

Brazil J, Louis N, Parkos C. The role of polymorphonuclear leukocyte trafficking in the perpetuation of inflammation during inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2013;19:1556-1565

Breese E, Braegger CP, Corrigan CJ, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Interleukin-2- and interferon-gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology*. 1993;78:127-131

Brenner MB, McLean J, Seheft H Riberdy J, Ang SL, Seidman JG, Devlin P, Krangel MS. Two forms of T-cell receptor protein found on peripheral blood cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1987;325:689-694

Brown VI, Fang J, Alcorn K, Barr R, Kim JM, Wasserman R, Grupp SA. Rapamycin is active against B-precursor leukemia in vitro and in vivo, an effect that is modulated by IL-7-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:15113-15118

Bryant RV, Brain O, Travis SP. Conventional drug therapy for inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2015;50:90-112

Bucht A, Söderström K, Esin S, Grunewald J, Hagelberg S, Magnusson I, Wigzell H, Grönberg A, Kiessling R. Analysis of gamma delta V region usage in normal and diseased human intestinal biopsies and peripheral blood by polymerase chain reaction (PCR) and flow cytometry. *Clin Exp Immunol*. 1995;99:57-64

Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nature reviews Immunology*. 2010;10:849-859

Budarf ML, Labbe C, David G, Rioux JD. GWA studies: rewriting the story of IBD. 2009 *Trends Genet*. 25:137-46

Buisine MP, Desreumaux P, Debailleul V, Gambiez L, Geboes K, Ectors N, Delescaut MP, Degand P, Aubert JP, Colombel JF, Porchet N. Abnormalities in mucin gene expression in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 1999;5:24-32

Bukowski JF, Morita CT, Brenner MB. Recognition and destruction of virus-infected cells by human gamma delta CTL. *J Immunol*. 1994;153:5133-5140

Burisch J, Jess T, Martinato M, Lakatos PL. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J Crohns Colitis* 2013;7:322-337

Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease 2015; 17:1-10

Burisch J, Vardi H, Pederson N, Briner M, Cukovic-Cavka S, Kaimaklitis I et al. Costs and resource utilization for diagnosis and treatment during the initial year in a European inflammatory bowel disease inception cohort: an ECCO-EpiCom study. *Inflamm Bowel Dis* 2015;21:121-131

C.

Caccamo N, Dieli F, Wesch D, Jomaa H, Eberl M. Sex-specific phenotypical and functional differences in peripheral human Vgamma9/Vdelta2 T cells. *J Leukoc Biol*. 2006 ;79:663-666

Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, Kishi C, Kc W, Carrero JA, Hunt S, Stone CD, Brunt EM, Xavier RJ, Sleckman BP, Li E, Mizushima N, Stappenbeck TS, Virgin HW

4th. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*. 2008;456:259-263

Cai Y, Shen X, Ding C, Qi C, Li K, Li X, Jala VR, Zhang HG, Wang T, Zheng J, Yan J. Pivotal role of dermal IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells in skin inflammation. *Immunity*. 2011;35:596-610

Calzascia T, Pellegrini M, Lin A, Garza KM, Elford AR, Shahinian A, Ohashi PS, Mak TW. CD4 T cells, lymphopenia, and IL-7 in a multistep pathway to autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:2999-3004

Cantorna MT, McDaniel K, Bora S, Chen J, James J. Vitamin D, immune regulation, the microbiota, and inflammatory bowel disease. *Exp Biol Med*(Maywood). 2014 Nov;239:1524-1530

Capitini CM, Chisti AA, Mackall CL. Modulating T-cell homeostasis with IL-7: preclinical and clinical studies. *J Intern Med*. 2009;266:141-153

Carter D, Eliakim R. Current role of endoscopy in inflammatory bowel disease diagnosis and management. *Curr Opin Gastroenterol*. 2014;30:370-377

Casanova JL, Abel L. Primary immunodeficiencies: a field in its infancy. *Science*. 2007;317:617-619

Chen HW, Liao CH, Ying C, Chang CJ, Lin CM. Ex vivo expansion of dendritic-cell-activated antigen-specific CD4+ T cells with anti-CD3/CD28, interleukin-7, and interleukin-15: potential for adoptive T cell immunotherapy. *Clin Immunol*. 2006;119:21-23

Chen Y, Chou K, Fuchs E, Havran WL, Boismenu R. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:14338-14343

Cheng L, Cui Y, Shao H, Han G, Zhu L, Huang Y, O'Brien RL, Born WK, Kaplan HJ, Sun D. Mouse gammadelta T cells are capable of expressing MHC class II molecules, and of functioning as antigen-presenting cells. *J Neuroimmunol*. 2008;203:3-11

Chevalier N, Thorburn AN, Macia L, Tan J, Juglair L, Yagita H, Yu D, Hansbro PM, Mackay CR. Inflammation and lymphopenia trigger autoimmunity by suppression of IL-2-controlled regulatory T cell and increase of IL-21-mediated effector T cell expansion. *J Immunol*. 2014;193:4845-4858

Chien YH, Iwashima M, Kaplan KB, Elliot JF, Davis MM. A new T cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T cell differentiation. *Nature* 1987;327:677-682

Chien YH, Jores R, Crowley MP. Recognition by $\gamma\delta$ T cells. *Annu. Rev. Immunol*. 1996;14:511-532

Chien Y, Meyer C, Bonneville M. $\gamma\delta$ T cells: first line of defense and beyond. *Annu Rev Immunol* 2014;32:121-155

Chiplunkar S, Dhar S, Wesch D, Kabelitz D. gammadelta T cells in cancer immunotherapy: current status and future prospects. *Immunotherapy*. 2009;1:663-678

Chung B, Dudl EP, Min D, Barsky L, Smiley N, Weinberg KI. Prevention of graft-versus-host disease by anti IL-7R α antibody. *Blood*. 2007;110:2803-2810

Churchman SM, Ponchel F. Interleukin-7 in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47:753-759

Churchman SM, El-Jawhari JJ, Burska AN, Parmar R, Goëb V, Conaghan PG, Emery P, Ponchel F. Modulation of peripheral T-cell function by interleukin-7 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2014;16:511

Clarke D, Katoh O, Gibbs RV, Griffiths SD, Gordon MY. Interaction of interleukin 7 (IL-7) with glycosaminoglycans and its biological relevance. *Cytokine.* 1995;7:325-330

Colpitts SL, Puddington L, Lefrançois L. IL-15 receptor α signaling constrains the development of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:9692-9697

Conlon PJ, Morrissey PJ, Nordan RP, Grabstein KH, Prickett KS, Reed SG, Goodwin R, Cosman D, Namen AE. Murine thymocytes proliferate in direct response to interleukin-7. *Blood.* 1989;74:1368-1373

Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, Ferguson DJ, Campbell BJ, Jewell D, Simmons A. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med.* 2010;16:90-97

Cornish JA, Tan E, Simillis C, Clark SK, Teare J, Tekkis PP. The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2008 Sep;103(9):2394-400

Corre F, Lellouch J, Schwartz D. Smoking and leucocyte-counts. Results of an epidemiological survey. *Lancet.* 1971;2:632-634. PubMed PMID: 4105947

Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, Le Quintrec Y, Gendre JP. Effects of cigarette smoking on the long-term course of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1996;110:424-431

Cosnes J, Beaugerie L, Carbonnel F, Gendre JP. Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology.* 2001;120:1093-1099

Cosnes J, Cattan S, Blain A, Beaugerie L, Carbonnel F, Parc R, Gendre JP. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2002; 8:244-250

Costa G, Loizon S, Guenot M, Mocan I, Halary F, de Saint-Basile G, Pitard V, Déchanet-Merville J, Moreau JF, Troye-Blomberg M, Mercereau-Puijalon O, Behr C. Control of Plasmodium falciparum erythrocytic cycle: $\gamma\delta$ T cells target the red blood cell-invasive merozoites. *Blood.* 2011;118:6952-6962

Cuvelier CA, DeWever N, Mielants H, De Vos M, Veys EM, Roels H. Expression of Tc cell receptors α, β and $\gamma\delta$ in the ileal mucosa of patients with Crohn's disease and with spondylarthropathy. *Clin Exp Immunol* 1992; 90:275-279

D.

D'Incà R, Caccaro R. Measuring disease activity in Crohn's disease: what is currently available to the clinician. *Clin Exp Gastroenterol.* 2014;7:151-161

D'Souza CD, Cooper AM, Frank AA, Mazzaccaro RJ, Bloom BR, Orme IM. An anti-inflammatory role for $\gamma\delta$ T lymphocytes in acquired immunity to Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 1997;158:1217- 1221

Dambha F, Tanner J, Carroll N. Diagnostic imaging in Crohn's disease: what is the new gold standard? *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2014;28:421-436

Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, Baert F, Bulois P, Maunoury V, Sostegni R, Rocca R, Pera A, Gevers A, Mary JY, Colombel JF, Rutgeerts P. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc.* 2004;60:505-512

Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, Bringer MA, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel JF. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2004;127:412-421

Dastot H, Schmid M, Gontier C, Amiot M, Mathieu-Mahul D, Bensussan A, Bomsell L. Correlation between T cell receptor α/β isotypic forms and cytotoxic activity with human T cell clones and lines. *Cell Immunol* 1990; 125:315-325

Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature.* 1988;334:395-402

De Benedetti F, Massa M, Pignatti P, Kelley M, Faltynek CR, Martini A. Elevated circulating interleukin-7 levels in patients with systemic juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1995;22:1581-1585

De Paoli P, Gennari D, Martelli P, Cavarzerani V, Comoretto R, Santini G. Gamma delta T cell receptor-bearing lymphocytes during Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis.* 1990;161:1013-1016

De Paoli P, Gennari D, Martelli P, Basaglia G, Crovatto M, Battistin S, Santini G. A subset of gamma delta lymphocytes is increased during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol.* 1991;83:187-191

Deusch K, Luling F, Reich K, Classen M, Wagner H, Pfeffer K. A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses the gamma/delta T cell receptor, the CD8 accessory molecule and preferentially uses the V delta 1 gene segment. *Eur J Immunol.* 1991;21:1053-1059

Di Caro V, D'Anneo A, Phillips B, Engman C, Harnaha J, Lakomy R, Styche A, Trucco M, Giannoukakis N. Interleukin-7 matures suppressive CD127(+) forkhead box P3 (FoxP3)(+) T cells into CD127(-) CD25(high) FoxP3(+) regulatory T cells. *Clin Exp Immunol.* 2011;165:60-76

Di Sabatino A, Paccagnini D, Vidali F, Rosu V, Biancheri P, Cossu A, Zanetti S, Corazza GR, Sechi LA. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (MAP)-specific IS900 DNA and antibodies against MAP peptides and lysate in the blood of Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17:1254-1255

Dias CC, Rodrigues PP, da Costa-Pereira A, Magro F. Clinical prognostic factors for disabling Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2013;19:3866-3871

Dieli F, Poccia F, Lipp M, Sireci G, Caccamo N, Di Sano C, Salerno A. Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J Exp Med.* 2003;198:391-397

Dieli F, Vermijlen D, Fulfarò F, Caccamo N, Meraviglia S, Cicero G, Roberts A, Buccheri S, D'Asaro M, Gebbia N, Salerno A, Eberl M, Hayday AC. Targeting human gammadelta T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 2007;67:7450-7457

Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, Danese S, D'Hoore A, Gassull M, Gomollón F, Hommes DW, Michetti P, O'Morain C, Oresland T, Windsor A, Stange EF, Travis SP; European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J Crohns Colitis*. 2010;4:28-62

Dittel BN, LeBien TW. The growth response to IL-7 during normal human B cell ontogeny is restricted to B-lineage cells expressing CD34. *J Immunol*. 1995;154:58-67

Do JS, Visperas A, Dong C, Baldwin WM 3rd, Min B. Cutting edge: Generation of colitogenic Th17 CD4 T cells is enhanced by IL-17+ $\gamma\delta$ T cells. *J Immunol*. 2011;186:4546-4550

Dubinett SM, Huang M, Dhanani S, Economou JS, Wang J, Lee P, Sharma S, Dougherty GJ, McBride WH. Down-regulation of murine fibrosarcoma transforming growth factor-beta 1 expression by interleukin 7. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:593-597

Dudley EC, Girardi M, Owen MJ, Hayday AC. Alpha beta and gamma delta T cells can share a late common precursor. *Curr Biol* 1995;5:659-669

Dunne MR, Elliott L, Hussey S, et al. Persistent Changes in Circulating and Intestinal $\gamma\delta$ T Cell Subsets, Invariant Natural Killer T Cells and Mucosal-Associated Invariant T Cells in Children and Adults with Coeliac Disease. Sandberg JK, ed. *PLoS ONE*. 2013;8:e76008

Durban L, Herrera L, Martín L, Catalán I et al. Estudio de la incidencia de la Enfermedad Inflamatoria en el Departamento de Salud 6 de Valencia. *Rev Esp Enf Digest* 2010;102 (Supl I: 19-172)

E.

Egan CE, Dalton JE, Andrew EM, Smith JE, Gubbels MJ, Striepen B, Carding SR. A requirement for the Vgamma1+ subset of peripheral gammadelta T cells in the control of the systemic growth of *Toxoplasma gondii* and infection induced pathology. *J Immunol*. 2005;175:8191-8199

Egan CE, Maurer KJ, Cohen SB, Mack M, Simpson KW, Denkers EY. Synergy between intraepithelial lymphocytes and lamina propria T cells drives intestinal inflammation during infection. *Mucosal Immunol*. 2011;4:658-670

Esmadi M, Ahmad DS, Odum B, Diaz-Arias A, Hammad H. Sarcoidosis: an extremely rare cause of granulomatous enterocolitis. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2012;21:423-425

F.

Fang H, Welte T, Zheng X, Chang GJ, Holbrook MR, Soong L, Wang T. gammadelta T cells promote the maturation of dendritic cells during West Nile virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010;59:71-80

Fantini MC, Rizzo A, Fina D, Caruso R, Sarra M, Stolfi C, Becker C, Macdonald TT, Pallone F, Neurath MF, Monteleone G. Smad7 controls resistance of colitogenic T cells to regulatory T cell-mediated suppression. *Gastroenterology*. 2009;136:1308-1316

Feakins RM. Ulcerative colitis or Crohn's disease? Pitfalls and problems. *Histopathology*. 2014;64:317-335

Ferrante M, Colombel JF, Sandborn WJ, Reinisch W, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Rachmilewitz D, Lichtiger S, D'Haens GR, van der Woude CJ, Danese S, Diamond RH, Oortwijn AF, Tang KL, Miller M, Cornillie F, Rutgeerts PJ; International Organization for the Study of Inflammatory Bowel Diseases. Validation of endoscopic activity scores in patients with Crohn's disease based on a post hoc analysis of data from SONIC. *Gastroenterology*. 2013;145:978-986

Ferreira LM. Gammadelta T cells: innately adaptive immune cells? *Int Rev Immunol*. 2013;32:223-248

Fewkes NM, Mackall CL. Novel gamma-chain cytokines as candidate immune modulators in immune therapies for cancer. *Cancer J*. 2010;16:392-398

Fluur C, De Milito A, Fry TJ, Vivar N, Eidsmo L, Atlas A, Federici C, Matarrese P, Logozzi M, Rajnavölgyi E, Mackall CL, Fais S, Chiodi F, Rethi B. Potential role for IL-7 in Fas-mediated T cell apoptosis during HIV infection. *J Immunol*. 2007;178:5340-5350

Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, Lees CW, Balschun T, Lee J, Roberts R et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet*. 2010;42:1118-1125

Frequency and significance of granulomas in a cohort of incident cases of Crohn's disease. *Gut*. 2005;54:215-222

Fritz T, Niederreiter L, Adolph T, Blumberg RS, Kaser A. Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. *Gut*. 2011;60:1580-1588

Fry TJ, Connick E, Falloon J, Lederman MM, Liewehr DJ, Spritzler J, Steinberg SM, Wood LV, Yarchoan R, Zuckerman J, Landay A, Mackall CL. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood*. 2001;97:2983-2990

Fry TJ, Mackall CL. Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? *Trends Immunol*. 2001;22:564-571

Fry TJ, Mackall CL. Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood*. 2002;99:3892-3904

Fry TJ, Moniuszko M, Creekmore S, Donohue SJ, Douek DC, Giardina S, Hecht TT, Hill BJ, Komschlies K, Tomaszewski J, Franchini G, Mackall CL. IL-7 therapy dramatically alters peripheral T-cell homeostasis in normal and SIV-infected nonhuman primates. *Blood*. 2003;101:2294-2299

Fry TJ, Mackall CL. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J Immunol*. 2005;174:6571-6576

Fujihashi K, Dohi T, Kweon MN, McGhee JR, Koga T, Cooper MD, Tonegawa S, Kiyono H. Gammadelta T cells regulate mucosally induced tolerance in a dose-dependent fashion. *Int Immunol*. 1999;11:1907-1916

Fukushima K, Masuda T, Ohtani H, et al. Immunohistochemical characterization, distribution, and ultrastructure of lymphocytes bearing T-cell receptor gamma/delta in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1991;101:670-678

Furst DE, Keystone EC, Braun J, Breedveld FC, Burmester GR, De Benedetti F, Dörner T, Emery P, Fleischmann R, Gibofsky A, Kalden JR, Kavanaugh A, Kirkham B, Mease P, Sieper J, Singer NG, Smolen JS, Van Riel PL, Weisman MH, Winthrop K. Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatic diseases, 2011. *Ann Rheum Dis.* 2012 Apr;71 Suppl 2:i2-45

Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest.* 2004;113:1490-1497

G.

Gálvez J. Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. *ISRN Inflamm.* 2014 25;2014:9284619

Gattinoni L, Powell DJ Jr, Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6:383-393

Gertner-Dardenne J, Bonnafous C, Bezombes C, Capietto AH, Scaglione V, Ingoure S, Cendron D, Gross E, Lepage JF, Quillet-Mary A, Ysebaert L, Laurent G, Sicard H, Fournié JJ. Bromohydrin pyrophosphate enhances antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by therapeutic antibodies. *Blood.* 2009;113:4875-4884

Giacomelli R, Parzanese I, Frieri G, Passacantando A, Pizzuto F, Pimpo T, Cipriani P, Viscido A, Caprilli R, Tonietti G. Increase of circulating gamma/delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients affected by active inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* 1994;98:83-88

Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schäffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hätscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B, Klein C. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med.* 2009;361:2033-2045

Glocker E, Grimbacher B. Inflammatory bowel disease: is it a primary immunodeficiency? *Cell Mol Life Sci.* 2012;69:41-48

Gnarpe, H. Persson, S. Belsheim, J. Influence of metronidazole and tinidazole on leukocyte chemotaxis in Crohn's disease. 1978;1:107-110

Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, De Libeo G. Human T cell receptor gamma/delta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med* 2003;197:163-168

Goetz M, Kiesslich R. Advances of endomicroscopy for gastrointestinal physiology and diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;298:797-806

Gomes AQ, Martins DS, Silva-Santos B. Targeting $\gamma\delta$ T lymphocytes for cancer immunotherapy: from novel mechanistic insight to clinical application. *Cancer Res.* 2010;70:10024-10027

Gonzalez-Lama Y, Suarez CJ, Blazquez I, Calvo M, Matallana V, Vera I, Abreu L. Mucosal healing in Crohn's disease: relevance and controversies in real life clinical practice. *Rev Esp Enferm Dig.* 2014;106:459-466

Goodwin RG, Lupton S, Schmierer A, Hjerrild KJ, Jerzy R, Clevenger W, Gillis S, Cosman D, Namen AE. Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:302-306

Goodwin RG, Namen A The cloning and characterization of interleukin7. *Year Immunol* 1989;6:127

Gougeon ML, Chiodi F. Impact of gamma-chain cytokines on T cell homeostasis in HIV-1 infection: therapeutic implications. *J Intern Med*. 2010;267:502-514

Gradmann C. A spirit of scientific rigour: Koch's postulates in twentieth-century medicine. *Microbes Infect*. 2014;16:885-892

Groh V, Rhinehardt R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broas tumor associated expression an recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:6879-6884

Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science*. 1998;279:1737-1740

Grossi CE, Ciccone E, Migone el al. Human T cells expressing the y/f) T cell receptor (TcR-I). C->I- and C72-encoded forms of the receptors correlate with distinctive morphology, cytoskeleton organization and growth characteristic. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:1619-1623

Grzegorzewski KJ, Komschlies KL, Jacobsen SE, Ruscetti FW, Keller JR, Wilttrout RH. Mobilization of long-term reconstituting hematopoietic stem cells in mice by recombinant human interleukin 7. *J Exp Med*. 1995;181:369-374

Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell*. 2004;119:753-766

H.

Haag LM, Siegmund B. Intestinal Microbiota and the Innate Immune System – A Crosstalk in Crohn's Disease Pathogenesis. *Front Immunol*. 2015;6:489

Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:637–685

Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2006;12:3668-3672

Halstensen TS, Scott H, Brandtzaeg P. Intraepithelial T cells of the TcR gamma/delta+ CD8- and V delta 1/J delta 1+ phenotypes are increased in coeliac disease. *Scand J Immunol*. 1989;30:665-672

Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Günther S, Prescott NJ, Onnie CM, Häsler R, Sipos B, Fölsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet*. 2007;39:207–211

Han, G., Wang, R., Chen, G., Wang, J., Xu, R., Wang, L., Feng, J., Li, X., Guo, R., Fu, L., Shen, B., Li, Y. Interleukin-17-producing gammadelta+ T cells protect NOD mice from type 1 diabetes through a mechanism involving transforming growth factor-beta. *Immunology* 2010; 129, 197–206

Hancock L, Beckly J, Geremia A, Cooney R, Cummings F, Pathan S, Guo C, Warren BF, Mortensen N, Ahmad T, Jewell D. Clinical and molecular characteristics of isolated colonic Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:1667-1677

Hara T, Mizuno Y, Takaki K, Takada H, Akeda H, Aoki T, Nagata M, Ueda K, Matsuzaki G, Yoshikai Y, et al. Predominant activation and expansion of V gamma 9-bearing gamma delta T cells in vivo as well as in vitro in Salmonella infection. *J Clin Invest*. 1992;90:204-210

Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet*. 1980;1:514

Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:233-242

He YW, Malek TR. Interleukin-7 receptor alpha is essential for the development of gamma delta + T cells, but not natural killer cells. *J Exp Med*. 1996;184:289-293

Heresbach D, Alexandre JL, Branger B, Bretagne JF, Cruchant E, Dabadie A, Dartois-Hoguin M, Girardot PM, Jouanolle H, Kerneis J, Le Verger JC, Louvain V, Politis J, Richecoeur M, Robaszkievicz M, Seyrig JA; ABERMAD (Association Bretonne d'Etude et de Recherche sur les Maladies de l'Appareil Digestif). Frequency and significance of granulomas in a cohort of incident cases of Crohn's disease. *Gut*. 2005;54:215-222

Hibi T, Inoue N, Ogata H, Naganuma M. Introduction and overview: recent advances in the immunotherapy of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 2003;15:36-42

Himoudi N, Morgenstern DA, Yan M, Vernay B, Saraiva L, Wu Y, Cohen CJ, Gustafsson K, Anderson J. Human $\gamma\delta$ T lymphocytes are licensed for professional antigen presentation by interaction with opsonized target cells. *J Immunol*. 2012;188:1708-1716

Hoffmann JC, Pawlowski NN, Grollich K, Loddenkemper C, Zeitz M, Kühl AA. Gammadelta T lymphocytes: a new type of regulatory T cells suppressing murine 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)-induced colitis. *Int J Colorectal Dis*. 2008;23:909-920

Hoffmann JC, Peters K, Henschke S, Herrmann B, Pfister K, Westermann J, Zeitz M. Role of T lymphocytes in rat 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) induced colitis: increased mortality after gammadelta T cell depletion and no effect of alphabeta T cell depletion. *Gut*. 2001;48:489-495

Holderness J, Hedges JF, Daughenbaugh K, Kimmel E, Graff J, Freedman B, Jutila MA. Response of gammadelta T Cells to plant-derived tannins. *Crit Rev Immunol*. 2008;28 :377-402

Holzinger D, Kessel C, Omenetti A, Gattorno M. From bench to bedside and back again: translational research in autoinflammation. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11:573-585

Horner AA, Jabara H, Ramesh N, Geha RS. $\gamma\delta$ T lymphocytes express CD40 ligand and induce isotype switching in B lymphocytes. *J Exp Med* 1995; 181:1239-1245

Hou JK, El-Serag H, Thirumurthi S. Distribution and manifestations of inflammatory bowel disease in Asians, Hispanics, and African Americans: a systematic review. *Am J Gastroenterol*. 2009;104:2100-2109

Hu C, Qian L, Miao Y, Huang Q, Miao P, Wang P, Yu Q, Nie H, Zhang J, He D, Xu R, Chen X, Liu B, Zhang D. Antigen-presenting effects of effector memory V γ 9V δ 2 T cells in rheumatoid arthritis. *Cell Mol Immunol*. 2012;9:245-254

Huang D, Chen CY, Ali Z, Shao L, Shen L, Lockman HA, Barnewall RE, Sabourin C, Eestep J, Reichenberg A, Hintz M, Jomaa H, Wang R, Chen ZW. Antigen-specific Vgamma2Vdelta2 T

effector cells confer homeostatic protection against pneumonic plaque lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:7553-7558

Huang W, Tang Y, Nong L, Sun Y. Risk factors for postoperative intra-abdominal septic complications after surgery in Crohn's disease: A meta-analysis of observational studies. *J Crohns Colitis*. 2015;9:293-301

Huber SA. $\gamma\delta$ T lymphocytes kill T regulatory cells through CD1d. *Immunology*. 2010;131:202-209

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 ;411:599-603

I.

Inagaki-Ohara K, Chinen T, Matsuzaki G, et al. Mucosal T cells bearing TCR gammadelta play a protective role in intestinal inflammation. *J Immunol*. 2004;173:1390-1398

Ito Y, Usui T, Kobayashi S, Iguchi-Hashimoto M, Ito H, Yoshitomi H, Nakamura T, Shimizu M, Kawabata D, Yukawa N, Hashimoto M, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Yoshifuji H, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Mimori T. Gamma/delta T cells are the predominant source of interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;60:2294-2303

J.

Jameson J, Havran WL. Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunol Rev*. 2007 Feb;215:114-122

Jameson JM, Cauvi G, Sharp LL, Witherden DA, Havran WL. Gammadelta T cell-induced hyaluronan production by epithelial cells regulates inflammation. *J Exp Med*. 2005;20:1269-1279

Jameson JM, Sharp LL, Witherden DA, Havran WL. Regulation of skin cell homeostasis by gamma delta T cells. *Front Biosci*. 2004;9:2640-2651

Jensen SR, Nielsen OH, Brix S. Are NOD2 polymorphisms linked to a specific disease endophenotype of Crohn's disease? *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:2392-4201

Ji T, Xu C, Sun L, Yu M, Peng K, Qiu Y, Xiao W, Yang H. Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Down-Regulates IL-7 and Reduces Inflammation in a Mouse Model of DSS-Induced Colitis. *Dig Dis Sci*. 2015 ;60:1958-1966

Jiang Q, Li WQ, Aiello FB, Mazzucchelli R, Asefa B, Khaled AR, Durum SK. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16:513-533

Jones JL, Thompson SA, Loh P, Davies JL, Tuohy OC, Curry AJ, Azzopardi L, Hill-Cawthorne G, Fahey MT, Compston A, Coles AJ. Human autoimmunity after lymphocyte depletion is caused by homeostatic T-cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:20200-20205

Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, Vandamme P, Vermeire S. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*. 2011;60:631-637

K.

Kabelitz D, Bender A, Schondelmaier S, Schoel B, Kaufmann SH. A large fraction of human peripheral blood gamma/delta + T cells is activated by Mycobacterium tuberculosis but not by its 65-kD heat shock protein. *J Exp Med.* 1990;171:667-679

Kabelitz D. Function and specificity of human $\gamma\delta$ positive cells. *Crit Rev Immunol* 1992; 11:281-303

Kabelitz D. $\gamma\delta$ T-cells: cross-talk between innate and adaptive immunity. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68:2331-3

Kader HA, Tchernev VT, Satyaraj E, Lejnine S, Kotler G, Kingsmore SF, Patel DD. Protein microarray analysis of disease activity in pediatric inflammatory bowel disease demonstrates elevated serum PLGF, IL-7, TGF-beta1, and IL-12p40 levels in Crohn's disease and ulcerative colitis patients in remission versus active disease. *Am J Gastroenterol.* 2005;100:414-423

Kagnoff MF. Current concepts in mucosal immunity III, Ontogeny and function of $\gamma\delta$ T cells in the intestine. *Am J Physiol* 1998; 274:G455-458

Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Totsuka T, Watanabe M, Hibi T. Persistent retention of colitogenic CD4+ memory T cells causes inflammatory bowel diseases to become intractable. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15:926-934

Kanneganti TD, Lamkanfi M, Núñez G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity.* 2007;27:549-559

Kaser A, Nieuwenhuis EE, Strober W, Mayer L, Fuss I, Colgan S, Blumberg RS. Natural killer T cells in mucosal homeostasis. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1029:154-68

Kaser A, Lee AH, Franke A, Glickman JN, Zeissig S, Tilg H, Nieuwenhuis EE, Higgins DE, Schreiber S, Glimcher LH, Blumberg RS. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell.* 2008;134:743-756

Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:573-621

Kaser A, Blumberg RS. Endoplasmic reticulum stress and intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 2010;3:11-16

Katsurada T, Kobayashi W, Tomaru U, Baba T, Furukawa S, Ishizu A, Takeda K, Sakamoto N, Asaka M, Takeda H, Kasahara M. Decrease of peripheral and intestinal NKG2A-positive T cells in patients with ulcerative colitis. *PLoS One.* 2012;7:e44113

Kawaguchi-Miyashita M, Shimada S, Kurosu H, Kato-Nagaoka N, Matsuoka Y, Ohwaki M, Ishikawa H, Nanno M. An accessory role of TCR $\gamma\delta$ (+) cells in the exacerbation of inflammatory bowel disease in TCR α mutant mice. *Eur J Immunol.* 2001;31:980-988

Ke Y, Pearce K, Lake JP, Ziegler HK, Kapp JA. Gamma delta T lymphocytes regulate the induction and maintenance of oral tolerance. *J Immunol.* 1997;158:3610-3618

Kelsen J, Dige A, Schwindt H, D'Amore F, Pedersen FS, Agnholt J, Christensen LA, Dahlerup JF, Hvas CL. Infliximab induces clonal expansion of $\gamma\delta$ -T cells in Crohn's disease: a predictor of lymphoma risk? *PLoS One.* 2011 Mar 31;6(3):e17890

Kenna TJ, Davidson SI, Duan R, Bradbury LA, McFarlane J, Smith M, Weedon H, Street S, Thomas R, Thomas GP, Brown MA. Enrichment of circulating interleukin-17-secreting

interleukin-23 receptor-positive γ/δ T cells in patients with active ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2012 May;64(5):1420-1429

Khan IA, Schwartzman JD, Kasper LH, Moretto M. CD8+ CTLs are essential for protective immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Immunol.* 1999;162:6086-60891

King C, Ilic A, Koelsch K, Sarvetnick N. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell.* 2004;117:265-277

Kisielow J, Kopf M. The origin and fate of $\gamma\delta$ T cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2013;25:181-188

Kittipatarin C, Khaled AR. Interlinking interleukin-7. *Cytokine.* 2007;39:75-83

Kleiner G, Zanin V, Monasta L, Crovella S, Caruso L, Milani D, Marcuzzi A. Pediatric patients with inflammatory bowel disease exhibit increased serum levels of proinflammatory cytokines and chemokines, but decreased circulating levels of macrophage inhibitory protein-1 β , interleukin-2 and interleukin-17. *Exp Ther Med.*2015;9:2047-2052

Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, Toma H, Uchiyama T. Gamma/delta T cells provide innate immunity against renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2001;50:115-124

Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, Osaka Y, Nakazawa H, Uchiyama T, Minato N, Toma H. Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using gamma-delta T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56:469-476

Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, Minato N, Tanabe K. Phase I/II study of adoptive transfer of $\gamma\delta$ T cells in combination with zoledronic acid and IL-2 to patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60:1075-1084

Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, Flavell RA. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science.* 2005;307:731-734

Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, Kitazume MT, Nakazawa A, Sugita A, Koganei K, Isobe K, Hibi T. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut.* 2008;57:1682-1689

Kohyama M, Nanno M, Kawaguchi-Miyashita M, Shimada S, Watanabe M, Hibi T, Kaminogawa S, Ishikawa H. Cytolytic and IFN-gamma-producing activities of gamma delta T cells in the mouse intestinal epithelium are T cell receptor-beta-chain dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:7451-7455

Komano H, Fujiura Y, Kawaguchi M, Matsumoto S, Hashimoto Y, Obana S, Mombaerts P, Tonegawa S, Yamamoto H, Itohara S, et al. Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 ;92:6147-6151

Kondo M, Sakuta K, Noguchi A, Ariyoshi N, Sato K, Sato S, Sato K, Hosoi A, Nakajima J, Yoshida Y, Shiraishi K, Nakagawa K, Kakimi K. Zoledronate facilitates large-scale ex vivo expansion of functional gammadelta T cells from cancer patients for use in adoptive immunotherapy. *Cytotherapy.* 2008;10:842-856

Kopylov U, Seidman EG. Role of capsule endoscopy in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20:1155-1164

Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults American college of gastroenterology. Practice parameters committee. *Am J Gastroenterol* 1997;92:204-2011

Korolkova OY, Myers JN, Pellom ST, Wang L, M'Koma AE. Characterization of Serum Cytokine Profile in Predominantly Colonic Inflammatory Bowel Disease to Delineate Ulcerative and Crohn's Colitides. *Clin Med Insights Gastroenterol*. 2015;8:29-44

Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and future ahead. *Gastroenterology* 2014;146:1489-1499

Krupica T Jr, Fry TJ, Mackall CL. Autoimmunity during lymphopenia: a two-hit model. *Clin Immunol*. 2006;120:121-128

Kuballa P, Huett A, Rioux JD, Daly MJ, Xavier RJ. Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *PLoS One*. 2008;3:e3391

Kucharzik T, Stoll R, Lügering N, Domschke W. Circulating antiinflammatory cytokine IL-10 in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol*. 1995;100:452-456

Kühl AA, Loddenkemper C, Westermann J, Hoffmann JC. Role of gamma delta T cells in inflammatory bowel disease. *Pathobiology*. 2002-2003;70:150-155

Kühl AA, Pawlowski NN, Grollich K, Loddenkemper C, Zeitz M, Hoffmann JC. Aggravation of intestinal inflammation by depletion/deficiency of gammadelta T cells in different types of IBD animal models. *J Leukoc Biol*. 2007;81:168-175

L.

Lakatos PL. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down. *World J Gastroenterol* 2006;12:6102-6108

Laky K, Lefrançois L, Lingenheld EG, Ishikawa H, Lewis JM, Olson S, Suzuki K, Tigelaar RE, Puddington L. Enterocyte expression of interleukin 7 induces development of gammadelta T cells and Peyer's patches. *J Exp Med*. 2000 May 1;191:1569-1580

Le Saout C, Mennechet S, Taylor N, Hernandez J. Memory-like CD8+ and CD4+ T cells cooperate to break peripheral tolerance under lymphopenic conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:19414-19419

Lee HB, Kim JH, Yim CY, et al. Differences in immunophenotyping of mucosal lymphocytes between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Korean J Intern Med*. 1997;12:7-15

Lee JC, Lyons PA, McKinney EF, Sowerby JM, Carr EJ, Bredin F, Rickman HM, Ratlamwala H, Hatton A, Rayner TF, Parkes M, Smith KG. Gene expression profiling of CD8+ T cells predicts prognosis in patients with Crohn disease and ulcerative colitis. *J Clin Invest*. 2011;121:4170-4179

Lee JS, Shin SJ, Collins MT, Jung ID, Jeong YI, Lee CM, Shin YK, Kim D, Park YM. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein activates dendritic cells and induces a Th1 polarization. *Infect Immun*. 2009;77:2979-2988

Lefrançois L, Mayo J, Goodman T. 1990. Ontogeny of T cell receptor (TCR) $\alpha\beta^+$ and $\gamma\delta^+$ intraepithelial lymphocytes (IEL). In Lotze M.T., Finn O.J., eds. *Cellular Immunity and the Immunotherapy of Cancer*. New York. Wiley-Liss. 31-40

Lennard-Jones JE, Shivananda S. Clinical uniformity of inflammatory bowel disease a presentation and during the first year of disease in the north and south of Europe. EC-IBD Study Group. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1997;9:353-359

Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1989;170:2-6

- Leone V, Chang EB, Devkota S. Diet, microbes, and host genetics: the perfect storm in inflammatory bowel diseases. *Journal of Gastroenterology*. 2013;48:315-321
- Leslie WD, Miller N, Rogala L, Bernstein CN. Vitamin D status and bone density in recently diagnosed inflammatory bowel disease: the Manitoba IBD Cohort Study. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:1451-1459
- Levine AP, Segal AW. What is wrong with granulocytes in inflammatory bowel diseases? *Dig Dis*. 2013;31:321-327
- Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132:27-42
- Levy Y, Lacabaratz C, Weiss L, Viard JP, Goujard C, Lelièvre JD, Boué F, Molina JM, Rouzioux C, Avettand-Fénoël V, Croughs T, Beq S, Thiébaud R, Chêne G, Morre M, Delfraissy JF. Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment. *J Clin Invest*. 2009;119:997-1007
- Lévy Y, Sereti I, Tambussi G, Routy JP, Lelièvre JD, Delfraissy JF, Molina JM, Fischl M, Goujard C, Rodriguez B, Rouzioux C, Avettand-Fénoël V, Croughs T, Beq S, Morre M, Poulin JF, Sekaly RP, Thiébaud R, Lederman MM. Effects of recombinant human interleukin 7 on T-cell recovery and thymic output in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: results of a phase I/IIa randomized, placebo-controlled, multicenter study. *Clin Infect Dis*. 2012;55:291-300
- Lewis JD. The utility of biomarkers in the diagnosis and therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011;140:1817-1826
- Li H, Lebedeva MI, Llera AS, Fields BA, Brenner MB, Mariuzza RA. Structure of the Vdelta domain of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature*. 1998;29:502-6
- Li X, Kang N, Zhang X, Dong X, Wei W, Cui L, Ba D, He W. Generation of human regulatory gammadelta T cells by TCRgammadelta stimulation in the presence of TGF-beta and their involvement in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2011;186:6693-6700. 166:
- Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126:1504-1517
- López-Serrano P, Pérez-Calle JL, Carrera-Alonso E, Pérez-Fernández T, Rodríguez-Caravaca G, Boixeda-de-Miguel D, Fernández-Rodríguez CM. Epidemiologic study on the current incidence of inflammatory bowel disease in Madrid. *Rev Esp Enf Dig* 2009; 101:768-772
- Louis E, Belaiche J, van Kemseke C, Franchimont D, de Groote D, Gueenen V, Mary JY. A high serum concentration of interleukin-6 is predictive of relapse in quiescent Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1997;9:939-944
- Louis E, Belaiche J, Reenaers C. Tailoring the treatment to the individual in Crohn's disease. *Therap Adv Gastroenterol*. 2009;2:239-44
- Lowe AM, Yansouni CP, Behr MA. Causality and gastrointestinal infections: Koch, Hill, and Crohn's. *Lancet Infect Dis*. 2008;8:720-726
- Lundström W, Fewkes NM, Mackall CL. IL-7 in human health and disease. *Semin Immunol*. 2012;24:218-224

M.

Mackall CL, Fry TJ, Bare C, Morgan P, Galbraith A, Gress RE. IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. *Blood*. 2001 Mar 1;97(5):1491-7

Maeda Y, Reddy P, Lowler KP, Liu C, Bishop DK, Ferrara JL. Critical role of host gammadelta T cells in experimental acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2005;106:749-755

Maggadottir SM, Sullivan KE. The intersection of immune deficiency and autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol*. 2014 Sep;26(5):570-578

Maki K, Sunaga S, Komagata Y, Kodaira Y, Mabuchi A, Karasuyama H, Yokomuro K, Miyazaki JI, Ikuta K. Interleukin 7 receptor-deficient mice lack gammadelta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 ;93:7172-7177

Makino T, Fukushima S, Wakasugi S, Ihn H. Decreased serum IL-7 levels in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*. 2009;27(3 Suppl 54):68-69

Mandel MD, Miheller P, Müllner K, Golovics PA, Lakatos PL. Have biologics changed the natural history of Crohn's disease? *Dig Dis*. 2014;32:351-359

Maniar A, Zhang X, Lin W, Gastman BR, Pauza CD, Strome SE, Chapoval AI. Human gammadelta T lymphocytes induce robust NK cell-mediated antitumor cytotoxicity through CD137 engagement. *Blood*. 2010 Sep 9;116(10):1726-33

Mann ER, McCarthy NE, Peake ST, Milestone AN, Al-Hassi HO, Bernardo D, Tee CT, Landy J, Pitcher MC, Cochrane SA, Hart AL, Stagg AJ, Knight SC. Skin- and gut-homing molecules on human circulating $\gamma\delta$ T cells and their dysregulation in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*. 2012;170:122-130

Marks DJ, Harbord MW, MacAllister R, Rahman FZ, Young J, Al-Lazikani B, Lees W, Novelli M, Bloom S, Segal AW. Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation. *Lancet*. 2006;367:668-78

Marks DJ, Mitchison NA, Segal AW, Sieper J. Can unresolved infection precipitate autoimmune disease? *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;305:105-125

Marks DJ, Miyagi K, Rahman FZ, Novelli M, Bloom SL, Segal AW. Inflammatory bowel disease in CGD reproduces the clinicopathological features of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2009;104:117-124

Marks DJ. Defective innate immunity in inflammatory bowel disease: a Crohn's disease exclusivity? *Curr Opin Gastroenterol*. 2011;27:328-34

Masseret E, Boudeau J, Colombel JF, Neut C, Desreumaux P, Joly B, Cortot A, Darfeuille-Michaud A. Genetically related *Escherichia coli* strains associated with Crohn's disease. *Gut*. 2001;48:320-325

Matsuura T, West GA, Klein JS, Ferraris L, Fiocchi C. Soluble interleukin 2 and CD8 and CD4 receptors in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1992;102:2006-2014

Mawdsley JE, Rampton DS. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut*. 2005;54:1481-91

Mazzucchelli R, Durum SK. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:144-154

McCarthy NE, Bashir Z, Vossenkamper A, Hedin CR, Giles EM, Bhattacharjee S, Brown SG, Sanders TJ, Whelan K, MacDonald TT, Lindsay JO, Stagg AJ. Proinflammatory $V\gamma\delta^+$ T cells populate the human intestinal mucosa and enhance IFN- β production by colonic $\alpha\beta$ T cells. *J Immunol.* 2013 ;191:2752-2763.

McCarthy NE, Hedin CR, Sanders TJ, Amon P, Hoti I, Ayada I, Baji V, Giles EM, Wildemann M, Bashir Z, Whelan K, Sanderson I, Lindsay JO, Stagg AJ. Azathioprine therapy selectively ablates human $V\delta 2^+$ T cells in Crohn's disease. *J Clin Invest.* 2015;125:3215-3225

McVay LD, Li B, Biancaniello R, Creighton MA, Bachwich D, Lichtenstein G, Rombeau JL, Carding SR. Changes in human mucosal gamma delta T cell repertoire and function associated with the disease process in inflammatory bowel disease. *Mol Med.* 1997;3:183-203

Mendoza JL, San-Pedro A, Culebras E, Cies R, Taxonera C, Lana R, Urcelay E, de la Torre F, Picazo JJ, Díaz-Rubio M. High prevalence of viable *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2010;16:4558-4563

Meraviglia S, Eberl M, Vermijlen D, Todaro M, Buccheri S, Cicero G, La Mendola C, Guggino G, D'Asaro M, Orlando V, Scarpa F, Roberts A, Caccamo N, Stassi G, Dieli F, Hayday AC. In vivo manipulation of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients. *Clin Exp Immunol.* 2010;161:290-297

Merga Y, Campbell BJ, Rhodes JM. Mucosal barrier, bacteria and inflammatory bowel disease: possibilities for therapy. *Dig Dis.* 2014;32:475-483

Michaelson MD, Mehler MF, Xu H, Gross RE, Kessler JA. Interleukin-7 is trophic for embryonic neurons and is expressed in developing brain. *Dev Biol.* 1996;179:251-263

Mielke, L. A., Jones, S. A., Raverdeau, M., Higgs, R., Stefanska, A., Groom, J. R., Misiak, A., Dungan, L. S., Sutton, C. E., Streubel, G., Bracken, A. P., Mills, K. H. Retinoic acid expression associates with enhanced IL-22 production by $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells and attenuation of intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 2013.210;1117-1124

Mishra R, Chen AT, Welsh RM, Szomolanyi-Tsuda E. NK cells and gammadelta T cells mediate resistance to polyomavirus-induced tumors. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1000924

Mitsuyama K, Sata M, Rose-John S. Interleukin-6 trans-signaling in inflammatory bowel disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17:451-61

Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing prevalence and incidence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012;142:46-62

Moretto M, Durell B, Schwartzman JD, Khan IA. Gamma delta T cell-deficient mice have a down-regulated CD8+ T cell immune response against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Immunol.* 2001;166:7389-7397

Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, Reyes JA, Shah SA, LeLeiko N, Snapper SB, Bousvaros A, Korzenik J, Sands BE, Xavier RJ, Huttenhower C. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 2012;13(9):R7

Morita CT, Jin C, Sarikonda G, Wang H. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunol Rev.* 2007;215:59-76

Morpurgo E, Petras R, Kimberling J, Ziegler C, Galandiuk S. Characterization and clinical behavior of Crohn's disease initially presenting predominantly as colitis. *Dis Colon Rectum.* 2003;46:918-924

Morrissey PJ, Conlon P, Braddy S, Williams DE, Namen AE, Mochizuki DY. Administration of IL-7 to mice with cyclophosphamide-induced lymphopenia accelerates lymphocyte repopulation. *J Immunol.* 1991;146:1547-1552

Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ 2nd. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med.* 1995;332:1198-203

Muller KE, Lakatos PL, Papp M, Veres G. [Frequency and characteristics of granulomas in 368 pediatric patients with Crohn's disease]. *Orv Hetil.* 2013;154:1702-1708

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

Murphy WJ, Back TC, Conlon KC, Komschlies KL, Ortaldo JR, Sayers TJ, Witrout RH, Longo DL. Antitumor effects of interleukin-7 and adoptive immunotherapy on human colon carcinoma xenografts. *J Clin Invest.* 1993;92:1918-1924
IV-1 infection. *Blood.* 2009

Murphy WJ, Back TC, Conlon KC, Komschlies KL, Ortaldo JR, Sayers TJ, Witrout RH, Longo DL. Antitumor effects of interleukin-7 and adoptive immunotherapy on human colon carcinoma xenografts. *J Clin Invest.* 1993;92:1918-1924

N.

Nanno M, Shiohara T, Yamamoto H, Kawakami K, Ishikawa H. gammadelta T cells: firefighters or fire boosters in the front lines of inflammatory responses. *Immunol Rev.* 2007;215:103-113

Napolitano LA, Grant RM, Deeks SG, Schmidt D, De Rosa SC, Herzenberg LA, Herndier BG, Andersson J, McCune JM. Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat Med.* 2001;7:73-79

Nedellec S, Bonneville M, Scotet E. Human Vgamma9Vdelta2 T cells: from signals to functions. *Semin Immunol.* 2010;22:199-206

Nemoto Y, Kanai T, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, Takeda K, Watanabe M. Bone marrow retaining colitogenic CD4+ T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. *Gastroenterology.* 2007;132:176-189

Nemoto Y, Kanai T, Shinohara T, Ito T, Nakamura T, Okamoto R, Tsuchiya K, Lipp M, Eishi Y, Watanabe M. Luminal CD4+ T cells penetrate gut epithelial monolayers and egress from lamina propria to blood circulation. *Gastroenterology.* 2011;141:2130-2139

Nemoto Y, Kanai T, Kameyama K, Shinohara T, Sakamoto N, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sudo T, Matsumoto S, Watanabe M. Long-lived colitogenic CD4+ memory T cells residing outside the intestine participate in the perpetuation of chronic colitis. *J Immunol.* 2009;183:5059-5068

Nemoto Y, Kanai T, Takahara M, Oshima S, Nakamura T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M. Bone marrow-mesenchymal stem cells are a major source of interleukin-7 and sustain colitis by forming the niche for colitogenic CD4 memory T cells. *Gut*. 2013;62:1142-1152

Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2014;14:329-42

Noguchi E, Homma Y, Kang X, Netea MG, Ma X. A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of the nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1. *Nat Immunol*. 2009;10:471-479

Nos P, Clofent A. Enfermedad de Crohn. En Ponce J (editor). Tratamiento de las enfermedades gastroenterológicas. Barcelona. Elsevier; 2011

Núñez-Cruz S, Aguado E, Richelme S, Chetaille B, Mura AM, Richelme M, Pouvet L, Jouvin-Marche E, Xerri L, Malissen B, Malissen M. LAT regulates cd T cell homeostasis and differentiation. *Nat Immunol* 2003;4:999-1008

Nunnari G, Pomerantz RJ. IL-7 as a potential therapy for HIV-1-infected individuals. *Expert Opin Biol Ther*. 2005;5:1421-1426

O.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411:603-606

Okada E, Yamazaki M, Tanabe M, Takeuchi T, Nanno M, Oshima S, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Kanai T, Hibi T, Watanabe M. IL-7 exacerbates chronic colitis with expansion of memory IL-7R^{high} CD4⁺ mucosal T cells in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288:745-754

Onorati M, Morganti D, Bocchi M, Colombo E, Petracco G, Uboldi P, Di Nuovo F. Intestinal tuberculosis: a diagnostically-challenging case misdiagnosed as Crohn's disease at colorectal biopsy. *Pathologica*. 2014 ;106:22-25

Ott C, Schölmerich J. Extraintestinal manifestations and complications in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10:585-595

Otto M, Barfield RC, Martin WJ, Iyengar R, Leung W, Leimig T, Chaleff S, Gillies SD, Handgretinger R. Combination immunotherapy with clinical-scale enriched human gammadelta T cells, hu14.18 antibody, and the immunocytokine Fc-IL7 in disseminated neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11:8486-8491

P.

Pabst C, Schirutschke H, Ehninger G, Bornhäuser M, Platzbecker U. The graft content of donor T cells expressing gamma delta TCR⁺ and CD4⁺foxp3⁺ predicts the risk of acute graft versus host disease after transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells from unrelated donors. *Clin Cancer Res*. 2007;13:2916-2922

Pallone F, Montano S, Fais S, et al. Studies of peripheral blood lymphocytes in Crohn's disease. Circulating activated T cells. *Scand J Gastroenterol*. 1983;18:1003-1008

Palmer MJ, Mahajan VS, Trajman LC, Irvine DJ, Lauffenburger DA, Chen J. Interleukin-7 receptor signaling network: an integrated systems perspective. *Cell Mol Immunol*. 2008;5:79-89

Panés J, Bouzas R, Chaparro M, García-Sánchez V, Gisbert JP, Martínez de Guereñu B, Mendoza JL, Paredes JM, Quiroga S, Ripollés T, Rimola J. Systematic review: the use of ultrasonography, computed tomography and magnetic resonance imaging for the diagnosis, assessment of activity and abdominal complications of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34:125-145

Pang DJ, Neves JF, Sumaria N, Pennington DJ. Understanding the complexity of $\gamma\delta$ T-cell subsets in mouse and human. *Immunology*. 2012;136:283-290

Pantelyushin S, Haak S, Ingold B, Kulig P, Heppner FL, Navarini AA, Becher B. Ror γ t+ innate lymphocytes and $\gamma\delta$ T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice. *J Clin Invest*. 2012;122:2252-2256

Pár G, Rukavina D, Podack ER, Horányi M, Szekeres-Barthó J, Hegedüs G, Paál M, Szereday L, Mózsik G, Pár A. Decrease in CD3-negative-CD8dim(+) and Vdelta2/Vgamma9 TcR+ peripheral blood lymphocyte counts, low perforin expression and the impairment of natural killer cell activity is associated with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2002;37:514-522

Park JH, Wacholder S, Gail MH, Peters U, Jacobs KB, Chanock SJ, Chatterjee N. Estimation of effect size distribution from genome-wide association studies and implications for future discoveries. *Nat Genet*. 2010;42:570-575

Park SG, Mathur R, Long M, Hosh N, Hao L, Hayden MS, Ghosh S. T regulatory cells maintain intestinal homeostasis by suppressing $\gamma\delta$ T cells. *Immunity*. 2010 ;33:791-803

Parker CM, Groh V, evidence for. *J exp med* 1990

Passerini L, Allan SE, Battaglia M, Di Nunzio S, Alstad AN, Levings MK, Roncarolo MG, Bacchetta R. STAT5-signaling cytokines regulate the expression of FOXP3 in CD4+CD25+ regulatory T cells and CD4+CD25- effector T cells. *Int Immunol*. 2008;20:421-431

Paul S, Shilpi, Lal G. Role of gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells in autoimmunity. *J Leukoc Biol*. 2015;97:259-271

Pearson AD, Eastham EJ, Laker MF, Craft AW, Nelson R. Intestinal permeability in children with Crohn's disease and coeliac disease. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1982;285:20-21

Peaudecerf L, Rocha B. Role of the gut as a primary lymphoid organ. *Immunol Lett*. 2011;140:1-6

Peng SL, McNiff JM, Madaio MP, Ma J, Owen MJ, Flavell RA, Hayday AC, Craft J. alpha beta T cell regulation and CD40 ligand dependence in murine systemic autoimmunity. *J Immunol*. 1997;158:2464-2470

Pennington DJ, Silva-Santos B, Shires J, Theodoridis E, Pollitt C, Wise EL, Tigelaar RE, Owen MJ, Hayday AC. The inter-relatedness and interdependence of mouse T cell receptor gammadelta+ and alphabeta+ cells. *Nat Immunol*. 2003;4:991-998

Perera MK, Carter R, Goonewardene R, Mendis KN. Transient increase in circulating gamma/delta T cells during Plasmodium vivax malarial paroxysms. *J Exp Med*. 1994;179:311-315

Peyrin-Biroulet L, Beisner J, Wang G, Nuding S, Oommen ST, Kelly D, Parmentier-Decrucq E, Dessen R, Merour E, Chavatte P, Grandjean T, Bressenot A, Desreumaux P, Colombel JF, Desvergne B, Stange EF, Wehkamp J, Chamailard M. Peroxisome proliferator-activated

receptor gamma activation is required for maintenance of innate antimicrobial immunity in the colon. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:8772-8777

Peyrin-Biroulet L, Loftus EV Jr, Colombel JF, Sandborn WJ. The natural history of adult Crohn's disease in population-based cohorts. *Am J Gastroenterol*. 2010;10:289-297

Pfeffer K, Schoel B, Gulle H, Kaufmann SHE, Wagner H. Primary responses of human T cells to mycobacteria: a frequent set of gd T cells are stimulated by protease resistant ligands. *Eur. J. Immunol*. 1990;20:1175-1180

Poccia F, Agrati C, Martini F, Capobianchi MR, Wallace M, Malkovsky M. Antiviral reactivities of gammadelta T cells. *Microbes Infect*. 2005;7:518-528

Poccia F, Gioia C, Martini F, Sacchi A, Piacentini P, Tempestilli M, Agrati C, Amendola A, Abdeddaim A, Vlassi C, Malkovsky M, D'Offizi G. Zoledronic acid and interleukin-2 treatment improves immunocompetence in HIV-infected persons by activating Vgamma9Vdelta2 T cells. *AIDS*. 2009;23:555-565

Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347:417-429

Ponchel F, Morgan AW, Bingham SJ, Quinn M, Buch M, Verburg RJ, Henwood J, Douglas SH, Masurel A, Conaghan P, Gesinde M, Taylor J, Markham AF, Emery P, van Laar JM, Isaacs JD. Dysregulated lymphocyte proliferation and differentiation in patients with rheumatoid arthritis. *Blood*. 2002;100:4550-4556

Ponchel F, Verburg RJ, Bingham SJ, Brown AK, Moore J, Protheroe A, Short K, Lawson CA, Morgan AW, Quinn M, Buch M, Field SL, Maltby SL, Masurel A, Douglas SH, Straszynski L, Fearon U, Veale DJ, Patel P, McGonagle D, Snowden J, Markham AF, Ma D, van Laar JM, Papadaki HA, Emery P, Isaacs JD. Interleukin-7 deficiency in rheumatoid arthritis: consequences for therapy-induced lymphopenia. *Arthritis Res Ther*. 2005;7:R80-92

Ponchel F, Cuthbert RJ, Goëb V. IL-7 and lymphopenia. *Clin Chim Acta*. 2011;412:7-16

Ponomarev ED, Dittel BN. Gamma delta T cells regulate the extent and duration of inflammation in the central nervous system by a Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol*. 2005;174:4678-4687

Puel A, Ziegler SF, Buckley RH, Leonard WJ. Defective IL7R expression in T(-)B (+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat Genet*. 1998;20:394-397

Q.

Qi Q, Xia M, Hu J, Hicks E, Iyer A, Xiong N, August A. Enhanced development of CD4⁺ CD T cells in the absence of Itk results in elevated IgE production. *Blood* 2009;114:564-571

Qin G, Mao H, Zheng J, Sia SF, Liu Y, Chan PL, Lam KT, Peiris JS, Lau YL, Tu W. Phosphoantigen-expanded human gammadelta T cells display potent cytotoxicity against monocyte-derived macrophages infected with human and avian influenza viruses. *J Infect Dis*. 2009 Sep 15;200(6):858-865

Qin G, Liu Y, Zheng J, Ng IH, Xiang Z, Lam KT, Mao H, Li H, Peiris JS, Lau YL, Tu W. Type 1 responses of human Vγ9Vδ2 T cells to influenza A viruses. *J Virol*. 2011;85:10109-10116

Qin G, Liu Y, Zheng J, Xiang Z, Ng IH, Malik Peiris JS, Lau YL, Tu W. Phenotypic and functional characterization of human $\gamma\delta$ T-cell subsets in response to influenza A viruses. *J Infect Dis.* 2012;205:1646-1653

Quevrain E, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J, Miquel S, Carlier L, Bermudez-Humaron LG, Pigneur B, Lequin O, Kharrat P, Thomas G, Rainteau D, Aubry C, Breyner N, Afonso C, Lavielle S, Grill JP, Chassaing G, Chatel JM, Trugnan G, Xavier R, Langella P, Sokol H, Seksik P. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a comensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut.* 2015 Jun 4. pii: gutjnl-2014-307649

R.

Radford-Smith G, Jewell DP. The role of cytokines in inflammatory bowel disease. *Mediators Inflamm.* 1994;3:3-9

Radford-Smith G, Pandeya N. Associations between NOD2/CARD15 genotype and phenotype in Crohn's disease-Are we there yet? *World Journal of Gastroenterology: WJG.* 2006;12:7097-7103

Rahman FZ, Marks DJ, Hayee BH, Smith AM, Bloom SL, Segal AW. Phagocyte dysfunction and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:1443-1452

Rehman A, Sina C, Gavrilova O, Häsler R, Ott S, Baines JF, Schreiber S, Rosenstiel P. Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut.* 2011;60:1354-1362

Repiso A, Alcantara M, Munoz-Rosas C, Rodriguez-Merlo R, Perez-Gruoso MJ, Carrobbles JM, Martinez-Potenciano JL. Extraintestinal manifestations of Crohn's disease: prevalence and related factors. *Rev Esp Enferm Dig.* 2006;98:510-5177

Rincon-Orozco B, Kunzmann V, Wrobel P, Kabelitz D, Steinle A, Herrmann T. Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D. *J Immunol.* 2005;175:2144-2151

Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, Green T, Kuballa P, Barmada MM, Datta LW, Shugart YY, Griffiths AM, Targan SR, Ippoliti AF, Bernard EJ, Mei L, Nicolae DL, Regueiro M, Schumm LP, Steinhardt AH, Rotter JI, Duerr RH, Cho JH, Daly MJ, Brant SR. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet.* 2007;39:596-604

Rocchi A, Benchimol E, Bernstein CN, Bitton A, Feagan B, Panaccione R, Glasgow KW, Fernandes A, Ghosh S. Inflammatory bowel disease: a Canadian burden of illness review. *Can J Gastroenterol* 2012; 26: 811-817

Rock EP, Sibbald PR, Davis MM, Chien Y. CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J. Exp. Med.* 1994;179:323-328

Roe T, Schonfeld N, Thomas D, Gilsanz V, Atkinson J, Issacs H. Regional enteritis and glycogen storage disease type Ib. *Lancet.* 1984;1:1077

Rogler G. The history and philosophy of inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 2013;31:270-277

Romberg-Camps MJ, Dagnelie PC, Kester AD, Hesselink-van de Kruijs MA, Cilissen M, Engels LG, Van Deursen C, Hameeteman WH, Wolters FL, Russel MG, Stockbrugger RW. Influence of phenotype at diagnosis and of other potential prognostic factors on the course of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2009;104:371-383

Rosenberg SA, Sportès C, Ahmadzadeh M, Fry TJ, Ngo LT, Schwarz SL, Stetler-Stevenson M,

Morton KE, Mavroukakis SA, Morre M, Buffet R, Mackall CL, Gress RE. IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells. *J Immunother.* 2006;29:313-319

Rust C, Kooy Y, Pena S, Mearin ML, Kluin P, Koning F. Phenotypical and functional characterization of small intestinal TcR gamma delta + T cells in coeliac disease. *Scand J Immunol.* 1992;35:459-468

Ryan P, Kelly RG, Lee G, Collins JK, O'Sullivan GC, O'Connell J, Shanahan F. Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease--detection by laser capture microdissection and PCR. *Am J Gastroenterol.* 2004;99:1539-1543

S.

Saito H, Kranz DM, Takagaki Y, Hayday A, Eisen H, Tonegawa S. Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 1984;309:757-62

Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature.* 2008;456:264-268

Sardinha LR, Elias RM, Mosca T, Bastos KR, Marinho CR, D'Império Lima MR, Alvarez JM. Contribution of NK, NK T, gamma delta T, and alpha beta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 2006;74:2031-42

Saro C, Riestra S, Mila A, Sánchez R, Lacort M, Argüelles G, Chovac Z, Florido JI, Anton J, Altadill A, Vizoso F, López L, Lombrana JLS. Incidencia y prevalencia en enfermedad inflamatoria intestinal crónica. Estudio asturiano de 5 áreas (EIICEA). España. *An Med Interna* 2003;20:3-9

Saruta M, Yu QT, Fleshner PR, Mantel PY, Schmidt-Weber CB, Banham AH, Papadakis KA. Characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in Crohn's disease. *Clin Immunol.* 2007;125:281-290

Schaerli P, Willimann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helperfunction. *J Exp Med.* 2000;192:1553-1562

Schild H, Mavaddat N, Litzemberger C, Ehrich EW, Davis MM, Bluestone JA, Matis L, Draper RK, Chien YH. The nature of major histocompatibility complex recognition by $\gamma\delta$ T-cells. *Cell.* 1994;76:29-37 (Chien YH, Jores R, Crowley MP. Recognition by $\gamma\delta$ T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 1996;14:511-532

Schild H, Mavaddat N, Litzemberger C, Ehrich EW, Davis MM, Bluestone JA, Matis L, Draper RK, Chien YH. The nature of major histocompatibility complex recognition by $\gamma\delta$ T-cells. *Cell.* 1994;76:29-37

Schlissel MS, Durum SD, Muegge K. The interleukin 7 receptor is required for Tcell receptor gamma locus accessibility to the V(D)J recombinase. *J Exp Med.* 2000;191:1045-1050

Schlissel MS, Durum SD, Muegge K. The interleukin 7 receptor is required for Tcell receptor gamma locus accessibility to the V(D)J recombinase. *J Exp Med.* 2000;191:1045-1050

Schmitz-Moormann P, Pittner PM, Malchow H, Brandes JW. The granuloma in Crohn's disease.

- A bioptical study. *Pathol Res Pract.* 1984;178:467-476
- Schulze-Koops H. Lymphopenia and autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther.* 2004;6:178-180
- Seddon B, Tomlinson P, Zamoyska R. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol.* 2003;4:680-686
- Segal AW, Loewi G. Neutrophil dysfunction in Crohn's disease. *Lancet.* 1976.;2:219-221
- Seiderer J, Elben I, Diegelmann J, Glas J, Stallhofer J, Tillack C, Pfennig S, Jürgens M, Schmechel S, Konrad A, Göke B, Ochsenkühn T, Müller-Myhsok B, Lohse P, Brand S. Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:437-445
- Selby W, Pavli P, Crotty B, Florin T, Radford-Smith G, Gibson P, Mitchell B, Connell W, Read R, Merrett M, Ee H, Hetzel D; Antibiotics in Crohn's Disease Study Group. Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2007;132:2313-2319
- Selby WS, Jewell DP. T lymphocyte subsets in inflammatory bowel disease: peripheral blood. *Gut.* 1983;24:99-105.
- Selin LK, Santolucito PA, Pinto AK, Szomolanyi-Tsuda E, Welsh RM. Innate immunity to viruses: control of vaccinia virus infection by gamma delta T cells. *J Immunol.* 2001;166:6784-6794
- Senju M, Hulstaert F, Lowder J, Jewell DP. Flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocytes in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut.* 1991;32:779-783
- Sereti I, Dunham RM, Spritzler J, Aga E, Proschan MA, Medvik K, Battaglia CA, Landay AL, Pahwa S, Fischl MA, Asmuth DM, Tenorio AR, Altman JD, Fox L, Moir S, Malaspina A, Morre M, Buffet R, Silvestri G, Lederman MM; ACTG 5214 Study Team. IL-7 administration drives T cell-cycle entry and expansion in HIV-1 infection. *Blood.* 2009;113:6304-6314
- Sereti I, Estes JD, Thompson WL, Morcock DR, Fischl MA, Croughs T, Beq S, Lafaye de Micheaux S, Yao MD, Ober A, Wilson EM, Natarajan V, Imamichi H, Boulassel MR, Lederman MM, Routy JP. Decreases in colonic and systemic inflammation in chronic HIV infection after IL-7 administration. *PLoS Pathog.* 2014;10:e1003890
- Shalapour S, Deiser K, Kühl AA, Glauben R, Krug SM, Fischer A, Sercan O, Chappaz S, Bereswill S, Heimesaat MM, Loddenkemper C, Fromm M, Finke D, Hämmerling GJ, Arnold B, Siegmund B, Schüler T. Interleukin-7 links T lymphocyte and intestinal epithelial cell homeostasis. *PLoS One.* 2012;7:e31939
- Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2010;105:2687-2692
- Shibuya K, Nakano N. Interleukin-2 drives immature double negative thymocytes into $\gamma\delta$ T cells expressing Foxp3 on a stromal cell line in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 ;452:912-929
- Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blakenstein M. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between the north and the south? Results of the european collaborative study on inflammatory bowel diseases (EC-IBD) *Gut* 1996; 39:690-697
- Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes K, Jewell DP, Karban A, Loftus EV Jr, Peña AS, Riddell RH, Sachar DB,

Schreiber S, Steinhart AH, Targan SR, Vermeire S, Warren BF. 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*. 2005;19 Suppl A:5A-36

Simpson SJ, Holländer GA, Mizoguchi E, Allen D, Bhan AK, Wang B, Terhorst C. Expression of pro-inflammatory cytokines by TCR alpha beta+ and TCR gamma delta+ T cells in an experimental model of colitis. *Eur J Immunol*. 1997;27:17-25

Sin J-I, Kim J, Patchuk C, Weiner DB. Interleukin 7 Can Enhance Antigen-Specific Cytotoxic-T-Lymphocyte and/or Th2-Type Immune Responses In Vivo. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2000;7:751-758

Singh SB, Davis AS, Taylor GA, Deretic V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science*. 2006;313:1438-1441

Smith AM, Rahman FZ, Hayee B, Graham SJ, Marks DJ, Sewell GW, Palmer CD, Wilde J, Foxwell BM, Gloger IS, Sweeting T, Marsh M, Walker AP, Bloom SL, Segal AW. Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *J Exp Med*. 2009;206:1883-1897

Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol*. 2006; 90:1-50

Söderström K, Bucht A, Halapi E, Grönberg A, Magnusson I, Kiessling R. Increased frequency of abnormal gamma delta T cells in blood of patients with inflammatory bowel diseases. *J Immunol*. 1996;156:2331-2339

Soderstrom K, Bucht A, Halapi E, Lundqvist C, Gronberg A, Nilsson E, Orsini DL, van de Wal Y, Koning F, Hammarstrom ML, et al. High expression of V gamma 8 is a shared feature of human gamma delta T cells in the epithelium of the gut and in the inflamed synovial tissue. *J Immunol*. 1994;152:6017-6027

Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottière HM, Doré J, Marteau P, Seksik P, Langella P. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:16731-16736

Sorensen SF, Hoj L. Lymphocyte subpopulations in Crohn's disease and chronic ulcerative colitis. *Acta Pathol Microbiol Scand C*. 1977;85:41-48

Sorg RV, McLellan AD, Hock BD, Fearnley DB, Hart DN. Human dendritic cells express functional interleukin-7. *Immunobiology*. 1998;198:514-26

Soucy G, Wang HH, Farraye FA, Schmidt JF, Farris AB, Lauwers GY, Cerda SR, Dendrinos KG, Odze RD. Clinical and pathological analysis of colonic Crohn's disease, including a subgroup with ulcerative colitis-like features. *Mod Pathol*. 2012;25:295-307

Sperling AI, Linsley PS, Barrett TA, Bluestone JA. CD28-mediated costimulation is necessary for the activation of T cell receptor $\gamma\delta$ + T-lymphocytes. *J Immunol* 1993;151:6043-6050

Sportès C, Babb RR, Krumlauf MC, Hakim FT, Steinberg SM, Chow CK, Brown MR, Fleisher TA, Noel P, Maric I, Stetler-Stevenson M, Engel J, Buffet R, Morre M, Amato RJ, Pecora A, Mackall CL, Gress RE. Phase I study of recombinant human interleukin-7 administration in subjects with refractory malignancy. *Clin Cancer Res*. 2010;16:727-735

Sportès C, Hakim FT, Memon SA, Zhang H, Chua KS, Brown MR, Fleisher TA, Krumlauf MC, Babb RR, Chow CK, Fry TJ, Engels J, Buffet R, Morre M, Amato RJ, Venzon DJ, Korngold R, Pecora A, Gress RE, Mackall CL. Administration of rhIL-7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cell subsets. *J Exp Med*. 2008 ;205:1701-1714

Street SE, Hayakawa Y, Zhan Y, Lew AM, MacGregor D, Jamieson AM, Diefenbach A, Yagita H, Godfrey DI, Smyth MJ. Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and gammadelta T cells. *J Exp Med*. 2004;199:879-884

Strickland RG, Korsmeyer S, Soltis RD, Wilson ID, Williams RC Jr. Peripheral blood T and B cells in chronic inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1974;67:569-577

Sturm E, Braakman E, Fisch P, Vreugdenhil RJ, Sondel P, Bolhuis RL. Human V gamma 9-V delta 2 T cell receptor-gamma delta lymphocytes show specificity to Daudi Burkitt's lymphoma cells. *J Immunol*. 1990;145:3202-3208

Su D, Shen M, Li X, Sun L. Roles of $\gamma\delta$ T cells in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:985753

Su D, Shen M, Li X, Sun L. Roles of $\gamma\delta$ T cells in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:985753

Sunyer J, Munoz A, Peng Y, Margolick J, Chmiel JS, Oishi J, Kingsley L, Samet JM. Longitudinal relation between smoking and white blood cells. *Am J Epidemiol*. 1996;144:734-741

Sutherland GR, Baker E, Fernandez KE, Callen DF, Goodwin RG, Lupton S, Namen AE, Shannon MF, Vadas MA. The gene for human interleukin 7 (IL7) is at 8q12-13. *Hum Genet*. 1989;82:371-372

Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*. 2009;31:331-341

Sutton CE, Mielke LA, Mills KH. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells. *Eur J Immunol*. 2012;42:2221-2231

Sweeney EB, Foss FM, Murphy JR, vanderSpek JC. Interleukin 7 (IL-7) receptor-specific cell killing by DAB389 IL-7: a novel agent for the elimination of IL-7 receptor positive cells. *Bioconjug Chem*. 1998;9:201-207

Szczepanik M, Gryglewski A, Bryniarski K, Stachura J, Ptak W. Experimental inflammatory bowel disease--role of T cells. *J Physiol Pharmacol*. 2000;51:333-346

T.

T. Korn, E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo, IL-17 and Th17 cells. *Annual Review of Immunology*. 2009;27:485-517

Tanaka Y, Sano S, Nieves E, De Libero G, Rosa D, Modlin RL, Brenner MB, Bloom BR, Morita CT. Nonpeptide ligands for human $\gamma\delta$ T cells. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1994;91:8175-79

Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature* 1995;375:155-158

Tang J, Nuccie BL, Ritterman I, Liesveld JL, Abboud CN, Ryan DH. TGF-beta down-regulates stromal IL-7 secretion and inhibits proliferation of human B cell precursors. *J Immunol.* 1997;159:117-125

Teixeira L, Valdez H, McCune JM, Koup RA, Badley AD, Hellerstein MK, Napolitano LA, Douek DC, Mbisa G, Deeks S, Harris JM, Barbour JD, Gross BH, Francis IR, Halvorsen R, Asaad R, Lederman MM. Poor CD4 T cell restoration after suppression of HIV-1 replication may reflect lower thymic function. *AIDS.* 2001;15:1749-1756

Thia KT, Sandborn WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Loftus EV Jr. Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. *Gastroenterology.* 2010;139:1147-1455

Thompson K, Rojas-Navea J, Rogers MJ. Alkylamines cause Vgamma9Vdelta2 T-cell activation and proliferation by inhibiting the mevalonate pathway. *Blood.* 2006;107:651-654

Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Sakamoto N, Watanabe M. Systemic, but not intestinal, IL-7 is essential for the persistence of chronic colitis. *J Immunol.* 2008;180:383-390

Tomita T, Kanai T, Totsuka T, Nemoto Y, Okamoto R, Tsuchiya K, Sakamoto N, Ohteki T, Hibi T, Watanabe M. IL-7 is essential for lymphopenia-driven turnover of colitogenic CD4(+) memory T cells in chronic colitis. *Eur J Immunol.* 2009;39:2737-47

Toptygina AP, Semikina EL, Bobyleva GV, Miroshkina LV, Petrichuk SV. Cytokine profile in children with inflammatory bowel disease. *Biochemistry* 2014;79:1371-1375

Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Makita S, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M. IL-7 is essential for the development and the persistence of chronic colitis. *J Immunol.* 2007;178:4737-4748

Toulon A, Breton L, Taylor KR, Tenenhaus M, Bhavsar D, Lanigan C, Rudolph R, Jameson J, Havran WL. A role for human skin-resident T cells in wound healing. *J Exp Med.* 2009;206:743-750

Traggiai E, Biagioli T, Rosati E, Ballerini C, Mazzanti B, Ben Nun A, Massacesi L, Vergelli M. IL-7-enhanced T-cell response to myelin proteins in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2001;121:111-119

Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim YG, Magalhães JG, Yuan L, Soares F, Chea E, Le Bourhis L, Boneca IG, Allaoui A, Jones NL, Nuñez G, Girardin SE, Philpott DJ. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol.* 2010;11:55-62

Tsay TB, Chang CJ, Chen PH, Hsu CM, Chen LW. Nod2 mutation enhances NF-kappa B activity and bacterial killing activity of macrophages. *Inflammation.* 2009;32:372-378

Tsuchiya T, Fukuda S, Hamada H, Nakamura A, Kohama Y, Ishikawa H, Tsujikawa K, Yamamoto H. Role of gamma delta T cells in the inflammatory response of experimental colitis mice. *J Immunol.* 2003 ;171:5507-5513

Tsuji M, Mombaerts P, Lefrancois L, Nussenzweig RS, Zavala F, Tonegawa S. Gamma delta T cells contribute to immunity against the liver stages of malaria in alpha beta T-cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:345-349

Tu W, Zheng J, Liu Y, Sia SF, Liu M, Qin G, Ng IH, Xiang Z, Lam KT, Peiris JS, Lau YL. The aminobisphosphonate pamidronate controls influenza pathogenesis by expanding a gamma delta T cell population in humanized mice. *J Exp Med*. 2011;208:1511-1522

Turner K, Genta RM, Lujan G, Robiou C, Sonnenberg A. Significance of the epithelioid granuloma in biopsies of Crohn's colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20:2271-2275

U.

Uehira M, Matsuda H, Hikita I, Sakata T, Fujiwara H, Nishimoto H. The development of dermatitis infiltrated by gamma delta T cells in IL-7 transgenic mice. *Int Immunol*. 1993;5:1619-1627

Uyemura K, Ho CT, Ohmen JD, Rea TH, Modlin RL. Selective expansion of V delta 1 + T cells from leprosy skin lesions. *J Invest Dermatol*. 1992;99:848-852

V.

Vaiopoulos AG, Sfikakis PP, Kanakis MA, Vaiopoulos G, Kaklamanis PG. Gastrointestinal manifestations of Behçet's disease: advances in evaluation and management. *Clin Exp Rheumatol*. 2014;32:140-8

Van Assche G, Dignass A, Reinisch W, van der Woude CJ, Sturm A, De Vos M, Guslandi M, Oldenburg B, Dotan I, Marteau P, Ardizzone A, Baumgart DC, D'Haens G, Gionchetti P, Portela F, Vucelic B, Söderholm J, Escher J, Koletzko S, Kolho KL, Lukas M, Mottet C, Tilg H, Vermeire S, Carbonnel F, Cole A, Novacek G, Reinshagen M, Tsianos E, Herrlinger K, Oldenburg B, Bouhnik Y, Kiesslich R, Stange E, Travis S, Lindsay J; European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Special situations. *J Crohns Colitis*. 2010;4:63-101

Van Deen WK, Oikonomopoulos A, Hommes DW. Stem cell therapy in inflammatory bowel disease: which, when and how? *Curr Opin Gastroenterol*. 2013;29:384-390

Van Roon JA, Glaudemans KA, Bijlsma JW, Lafeber FP. Interleukin 7 stimulates tumour necrosis factor alpha and Th1 cytokine production in joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003;62:113-119

Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:88-100

Varas A, Vicente A, Sacedón R, Zapata AG. Interleukin-7 influences the development of thymic dendritic cells. *Blood*. 1998;92:93-110

Vassena L, Proschan M, Fauci AS, Lusso P. Interleukin 7 reduces the levels of spontaneous apoptosis in CD4+ and CD8+ T cells from HIV-1-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:2355-2360

Vinh DC, Behr MA. Crohn's as an immune deficiency: from apparent paradox to evolving paradigm. *Expert Rev Clin Immunol*. 2013;9:17-30

Von Freeden-Jeffrey U, Solvason N, Howard M, Murray R. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity*. 1997;7:147-154

W.

Wallace M, Bartz SR, Chang WL, Mackenzie DA, Pauza CD, Malkovsky M. Gamma delta T lymphocyte responses to HIV. *Clin Exp Immunol.* 1996;103:177-184

Wands JM, Roark CL, Aydintug MK, Jin N, Hahn YS, Cook L, Yin X, Dal Porto J, Lahn M, Hyde DM, Gelfand EW, Mason RJ, O'Brien RL, Born WK. Distribution and leukocyte contacts of gammadelta T cells in the lung. *J Leukoc Biol.* 2005;78:1086-1096

Wang L, Kamath A, Das H, Li L, Bukowski JF. Antibacterial effect of human V gamma 2V delta 2 T cells in vivo. *J Clin Invest.* 2001;108:1349-1357

Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Iwao Y, Tsuchiya M, Ishikawa H, Aiso S, Hibi T, Ishii H. Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J Clin Invest.* 1995;95:2945-2953

Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Okamoto S, Hayashi T, Yamazaki M, Iwao Y, Ishii H, Habu S, Uehira M, Nishimoto H, Ishikawa H, Hata J, Hibi T. Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa. *J Exp Med.* 1998;187:389-402

Watanabe M, Watanabe N, Iwao Y, Ogata H, Kanai T, Ueno Y, Tsuchiya M, Ishii H, Aiso S, Habu S, Hibi T. The serum factor from patients with ulcerative colitis that induces T cell proliferation in the mouse thymus is interleukin-7. *J Clin Immunol.* 1997;17:282-292

Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. 2004. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat. Immunol.* 5:800-808

Watson JD, Morrissey PJ, Namen AE, Conlon PJ, Widmer MB. Effect of IL-7 on the growth of fetal thymocytes in culture. *J Immunol.* 1989;143:1215-1222

Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H Jr, Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Dec 13;102:18129-18134

Wilcox CM, Saag MS. Gastrointestinal complications of HIV infection: changing priorities in the HAART era. *Gut.* 2008;57:861-870

Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, Reimer P, Weissinger F, Ruediger T, Tony HP. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood.* 2003;102:200-206

Willis CR, Seamons A, Maxwell J, Treuting PM, Nelson L, Chen G, Phelps S, Smith CL, Brabb T, Iritani BM, Maggio-Price L. Interleukin-7 receptor blockade suppresses adaptive and innate inflammatory responses in experimental colitis. *J Inflamm (Lond).* 2012;9:39

Wu B, Shen RN, Wang WX, Broxmeyer HE, Lu L. Antitumor effect of interleukin 7 in combination with local hyperthermia in mice bearing B16a melanoma cells. *Stem Cells.* 1993;11:412-421

Wu YL, Ding YP, Tanaka Y, Shen LW, Wei CH, Minato N, Zhang W. $\gamma\delta$ T cells and their potential for immunotherapy. *Int J Biol Sci.* 2014;10:119-135

Wucherpfennig KW, Liao YJ, Prendergast M, Prendergast J, Hafler DA, Strominger JL. Human fetal liver cd T cells predominantly use unusual rearrangement of the T cell receptor d and c loci expressed on both CD4^b CD8⁻ and CD4⁻ CD8⁻ cd T cells. *J Exp Med* 1993;177:425-432.

Wyatt J, Vogelsang H, Hübl W, Waldhöer T, Lochs H. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet*. 1993;341:1437-1439

X.

Xavier RJ, Huett A, Rioux JD. Autophagy as an important process in gut homeostasis and Crohn's disease pathogenesis. *Gut*. 2008;57:717-720

Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448:427-434

Y.

Yamazaki M, Yajima T, Tanabe M, Fukui K, Okada E, Okamoto R, Oshima S, Nakamura T, Kanai T, Uehira M, Takeuchi T, Ishikawa H, Hibi T, Watanabe M. Mucosal T cells expressing high levels of IL-7 receptor are potential targets for treatment of chronic colitis. *J Immunol*. 2003;171:1556-63

Yang H, McElree C, Roth MP, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: difference between jews and non-jews. *Gut* 1993;34:517-524

Yarur AJ, Strobel SG, Deshpande AR, Abreu MT. Predictors of Aggressive Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology & Hepatology*. 2011;7:652-659

Yeung MM, Melgar S, Baranov V, Oberg A, Danielsson A, Hammarström S, Hammarström ML. Characterisation of mucosal lymphoid aggregates in ulcerative colitis: immune cell phenotype and TcR-gammadelta expression. *Gut*. 2000;47:215-27

Yurovsky VV, Sutton PA, Schulze DH, Wigley FM, Wise RA, Howard RF, White B. Expansion of selected V delta 1+ gamma delta T cells in systemic sclerosis patients. *J Immunol*. 1994 ;153:881-891

Z.

Zarski JP et al. Repeted administration of IPH1101 in monotherapy or combined with low dose IL-2 in patients chronically infected with hepatitis C virus:efficacy, safety and immunobiology resultsfrom a phase 2 study. *Hepatology Abstr*.2009;50.1031^a

Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*. 2007;56:61-72

Zhang L, Keane MP, Zhu LX, Sharma S, Rozengurt E, Strieter RM, Dubinett SM, Huang M. Interleukin-7 and transforming growth factor-beta play counter-regulatory roles in protein kinase C-delta-dependent control of fibroblast collagen synthesis in pulmonary fibrosis.*J Biol Chem*. 2004; 279: 28315-28319

Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2014;20:91-9

Zheng J, Liu Y, Lau YL, Tu W. $\gamma\delta$ -T cells: an unpolished sword in human anti-infection immunity. *Cell Mol Immunol.* 2013;10:50-57

Zholudev A, Zurakowski D, Young W, Leichtner A, Bousvaros A. Serologic testing with ANCA, ASCA, and anti-OmpC in children and young adults with Crohn's disease and ulcerative colitis: diagnostic value and correlation with disease phenotype. *Am J Gastroenterol.* 2004;99:2235-2241

9. Anexos

Anexo 1. Hoja de recogida de datos del estudio

Etiqueta identificativa. Nombre. NHC

Etiqueta de laboratorio
Nº de análisis

— EII: 1 = SI 2 = Control

— EII. (**EII**)

- 1. Enfermedad de Crohn
- 2. Colitis Ulcerosa

— **Escenarios**

- 1. **Nuevo Diagnostico**
- 2. **Enfermedad Activa**
- 3. **Remisión**

— **Sexo:**

- 1. Hombre
- 2. Mujer

— **Edad**.....

— Familiares con EII: (**fameii**)

Tipo de parentesco y EII:

- 0. no.
- 1. si. Indicar familiar y tipo de EII.
 - 1.
 - 2.
 - 3.
 - 4.

— Edad diagnóstico (**edaddiag**).....

— Tiempo estimado desde el comienzo de síntomas hasta el diagnóstico en **meses**
(**intvdiag**)

.....meses

— Método diagnóstico (**Metodiag**)

- 1. Apendicectomía
- 2. Tránsito EGD
- 3. Enema Opaca
- 4. Colonoscopia
- 5. Otras.....

— Localización EC (**locadiag**)

- 1. Ileal
- 2. Ileocólica
- 3. Cólica
- 4. Ano-rectal
- 5. Yeyunoileal
- 6. Duodenal
- 7. Esofágica.
- 8. Otros.....

— Clasificación Evolutiva (**clasevol**)

- 1. Inflamatoria
- 2. Fistulizante-perforante
- 3. Estenosante

— Clasificación Actividad EC (**CDAI**)
(**Crohn's disease index activity**)

- 1. Leve
- 2. Moderada
- 3. Severa

Cifra:

— Complicaciones.(**complic**)

- 0.NO
- 2.SI.....

— Manifestación extraintestinal.

-
-

— N° de exacerbaciones (**nexacerv**).....

— Tratamiento: (tipo y dosis)(**trat**)

- Antibiotico
- Sulfasalazina
- Mesalamina
- Corticoides (prednisona/prednisolona)
- Corticoides no absorbibles (budesonida)
- Azathioprina/6-MP
- Ciclosporina
- Metrotexato
- Infliximab.
- Cirugia

— Informe anatomopatológico

- Granulomas
-

— PCR.....

— VSG.....

Exitus: s/n (motivo:.....)

VARIABLES CROHN LTGD

Resumen Hª:

CDAI total: _____

- Nº dep. líquidas últimos 7 días: _____ Puntuación:x2 _____
- Dolor abdominal (0:no, 1:leve, 2: intermedio, 3: severo) _____
Puntuación:x5 _____
- Estado general: (0:normal, 1:leve, 2:moderado, 3:grave, 4: muy grave) _____
Puntuación:x7 _____
- Manifestaciones extraintestinales
Artralgias/artritis; Iritis/uveítis; Piel/boca; Perianal; Otras fístulas; fiebre
Puntuación:x20 _____
- Antidiarreicos en la última semana: si/no Puntuación:x30 _____
- Masa abdominal (no/dudosa/segura) Puntuación:x10 _____
- Hematocrito %: _____ Puntuación:x6 _____
- Peso Kg: _____ Puntuación: _____

TRATAMIENTO EN LA INCLUSIÓN:

- Salicilatos oral. Dosis _____ Tiempo m: _____
- Mesalazina tópica. Dosis _____ Tiempo m _____
- Corticoides tópicos. Dosis _____ Tiempo m _____
- Corticoides orales “no absorbibles” (budesonida/beclametasona).
Dosis _____ Tiempo m: _____
- Corticoides orales. Dosis _____ Tiempo m: _____
- Corticoides iv. Dosis _____ Tiempo m _____
- Imurel. Dosis _____ Tiempo m: _____
- 6MP. Dosis _____ Tiempo m _____
- Metotrexate. Dosis _____ Tiempo m _____
- Infliximab. Dosis _____ Tiempo m _____
- Adalimumab. Dosis _____ Tiempo m _____
- Metronidazol oral/iv. Dosis _____ Tiempo m _____
- Ciprofloxacino oral/iv. Dosis _____ Tiempo m _____
- Otros:

ENDOSCOPIA antes o después inclusión: (s/n)

Fecha: _____ Pre/simultánea/post

Nº meses desde inclusión _____ Sigmo (si/no) Ileoscopia (si/no)

Resultado:

SES-CD:

Tabla II. SES-CD [Simplified Endoscopic Activity Score for Crohn 's Disease].

Variable	0	1	2	3
Tamaño úlcera	No	Úlcera aftosa (0,1-0,5 cm)	Úlceras grandes (0,5-2 cm)	Úlceras muy grandes (>2 cm)
Superficie ulcerada	No	<10%	10-30%	>30%
Superficie afectada	Ninguna	<50%	50-75%	>75%
Estenosis	No	Única con paso	Múltiple franqueable	Infranqueable
SES-CD : ILEON + C. DCHO + C. TRANSVERSO + C. IZQDO + RECTO (0-15)				

HISTOLOGIA: (s/n)

Fecha: _____ N° meses desde inclusión

Inflam Cron Inesp/ Crohn/ Colitis/Indeterminada

Granulomas: (si/no)

ENFERMEDAD PERIANAL: (s/n)

Fístulas /abscesos/ Fisuras/hemorroides complicadas /Otras /NC

FUMADOR: (s / n): N° cigarrillos/día: _____ Dejó de fumar seguimiento (s/n). Meses tras inclusión: _____ Otros: _____**OPERADO** previo a inclusión: (s / n). **Fecha:** _____ . **N° meses:** _____
N°: _____**Tipo Operación:** (resección IC/ Estricturoplastia/Perianal: (drenaje absceso/fistulotomía/setón/otras)**FACTORES PRONÓSTICOS:**

- Tiempo seguimiento m:
- Brote (s/n):
- Visita Urgencias (s/n)/ Fecha _____ /Tiempo desde incl. m: /N° _____
- Consulta urgente IBD (s/n)/ Fecha _____ /tiempo desde incl. m: /N° _____
- Step up medicación (s/n):
MSZ oral/ MSZ tópica/ MSZ tópica new/ ATB/ Cotis no absorb /Cortis orales/Cortis IV / Inmunosupresores/ Biológicos
Nueva Medicación: MSZ o/MSZ t/ATB/Cortis no abs/Cortis o/CORTIS IV/Inmunosupres/ INfliximab/Adalimumab/Otros
- Hospitalización (s/n). Fecha: _____ . Tiempo meses desde incl. _____ . N° de días _____ . N° hospitalizaciones
- Cirugía (s/n) Fecha _____ Tiempo m _____
Tipo cirugía (resección IC/ Estricturoplastia/Perianal: (drenaje absceso/fistulotomía/setón/otras) _____
- Otra cirugía _____

OBSERVACIONES:

Anexo 2. Hoja de consentimiento informado

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estamos realizando un estudio de Investigación sobre:

“Estudio del papel de los linfocitos gamma-delta y la IL-7 en la Enfermedad de Crohn.”

Solicitamos de usted, que padece esta enfermedad, una muestra de sangre y/o de tejido de intestino (biopsia). Se le van a realizar determinaciones analíticas especiales con el fin de profundizar en el conocimiento de esta enfermedad de causa desconocida.

Si a usted se le ha realizado un estudio por problemas digestivos y no padece la enfermedad, sus datos nos serán de utilidad para compararlos con los pacientes que si la padecen.

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

Se le realizara una encuesta sobre antecedentes personales.

Muchas Gracias por su colaboración.

D/Dña.....

Con DNI :.....

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

Firma del paciente

Firma del Médico

En Hospital Arnau de Vilanova de Valencia

Fecha:

Anexo 3. Estudio previo de los valores séricos de LT gamma-delta

Dig Dis Sci

DOI 10.1007/s10620-011-1636-8

ORIGINAL ARTICLE

Deficit of Gammadelta T Lymphocytes in the Peripheral Blood of Patients with Crohn's Disease

Juan Carlos Andreu-Ballester · Victoria Amigó-García · Ignacio Catalán-Serra · Rafael Gil-Borrás · Ferrán Ballester · Amadeo Almela-Quilis · Monica Millan-Scheiding · Carlos Peñarroja-Otero

Received: 29 September 2010 / Accepted: 14 February 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract

Background Gammadelta T lymphocytes are an important component of innate immunity. Previous studies have shown their role in the development of Crohn's-like colitis in mice.

Aims The aim of this study was to measure the $\gamma\delta$ T lymphocyte levels in Crohn's disease (CD) patients.

Methods A prospective study of 40 patients with CD compared with 40 healthy subjects (control group) matched by age and sex was undertaken. Lennard-Jones criteria were used for the diagnosis of CD. Disease activity was

measured with the Crohn's disease activity index (CDAI). New patients, patients in remission, and patients with active disease were evaluated. Lymphocyte populations of CD3+, CD4+, CD8+, CD56+, CD19+, and $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ subsets were measured in the peripheral blood of all participants.

Results The levels of CD3+, CD4+, CD8+, and CD19+ lymphocytes were decreased in CD patients compared with the control group ($P = 0.002, 0.049, 0.003, \text{ and } 0.023$, respectively). Although both $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T lymphocytes were lower in patients with CD, $\gamma\delta$ T subsets showed the

J. C. Andreu-Ballester (✉) · A. Almela-Quilis
Research Unit, Emergency Department, Arnau de Vilanova Hospital, c/San Clemente 12, 46015 Valencia, Spain
e-mail: jcaudreu@ono.com

A. Almela-Quilis
e-mail: almela_ama@gva.es

V. Amigó-García
Department of Hematology, Arnau de Vilanova Hospital, Valencia, Spain
e-mail: amigo_vic@gva.es

I. Catalán-Serra · R. Gil-Borrás
Department of Gastroenterology, Arnau de Vilanova Hospital, Valencia, Spain
e-mail: ignaciocatalan76@hotmail.com

R. Gil-Borrás
e-mail: ragilbo@alumni.uv.es

F. Ballester
Center of Research in Public Health (CSISP), Valencia, Spain
e-mail: ballester_fer@gva.es

F. Ballester
Spanish Consortium for Research in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Barcelona, Spain

F. Ballester
University of Valencia, Valencia, Spain

M. Millan-Scheiding
Department of Surgery, Bellvitge University Hospital, Barcelona, Spain
e-mail: millanmonica@hotmail.com


C. Peñarroja-Otero
Department of Internal Medicine, Casa de Salud Hospital, Valencia, Spain
e-mail: carlospenyarroja@medinserv.es

C. Peñarroja-Otero
Catholic University of Valencia, Valencia, Spain

I. Catalán-Serra · R. Gil-Borrás
Digestive Department, Arnau de Vilanova Hospital, Valencia, Spain

F. Ballester
Centro Superior de Investigación en Salud Pública, CSISP, Conselleria de Sanitat, Av. de Catalunya, 21, 46020 Valencia, Spain

Published online: 05 March 2011

 Springer

lowest levels in CD patients (mean $0.0259 \times 10^9/l$) versus healthy controls (mean $0.0769 \times 10^9/l$), $P < 0.001$. In particular, $\gamma\delta$ CD8+ T subsets (mean $0.0068 \times 10^9/l$) had the largest difference compared to the control group (mean $0.0199 \times 10^9/l$), $P = 0.008$.

Conclusions There is a decrease in the global lymphocyte population in the peripheral blood of patients with CD compared to healthy controls. This decrease is more evident in $\gamma\delta$ T lymphocytes, especially $\gamma\delta$ CD8+ T subsets. Our conclusion is that these results support the theory that a complex alteration of immune responses that affects the total numbers and function of $\gamma\delta$ T cells is present in CD.

Keywords Crohn's disease · Gammadelta T lymphocytes · Immune-deficiency · Peripheral blood

Abbreviations

CD Crohn's disease

MHC Major histocompatibility complex

Introduction

The study of the immunology of Crohn's disease (CD), specifically the role of lymphocytes, is a key element for understanding the pathogenesis of the disease. There are two T lymphocyte populations that can be distinguished by the expression of $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ chains [1–4]. $\alpha\beta$ T lymphocytes are more frequent (90–95%) in the peripheral blood, spleen, and lymph nodes. On the other hand, $\gamma\delta$ lymphocytes constitute only a small proportion (1–5%) of the lymphocytes that circulate in the blood and peripheral organs, and they are present mainly in the epithelia, where they can constitute up to 50% of intraepithelial T cells (IELs) in the mucosa [5, 6]. One of the most interesting features of $\gamma\delta$ T lymphocytes is the ability to recognize antigens without the normal constraints of antigen processing/major histocompatibility complex (MHC) restriction [7–9]. In addition, they can recognize nonpeptide ligands [10].

The lack of antigen processing/MHC allows $\gamma\delta$ T lymphocytes to respond quickly, and their different ways of recognition can also provide a comprehensive response. Therefore, they are considered to have an important role in the innate or nonspecific immune responses. Furthermore, animal models of CD-like experimental colitis in mice have shown the important role of $\gamma\delta$ T lymphocytes in this disease. A decrease of $\gamma\delta$ T lymphocytes results in a deterioration of the histological lesions, as well as an increase in mortality in these mice [11–13] and, in contrast, the infusion of $\gamma\delta$ T lymphocytes in these models improves lesions and increases survival [14].

One of the hypotheses developed to explain the etiology of CD is the immune-deficiency theory. This theory considers the defects of innate immunity as the primary pathogenic factors in CD, and, therefore, considers that therapy should be aimed at bolstering innate immunity rather than suppressing it [15].

The aim of this study was to measure the different lymphocyte subsets in the peripheral blood of patients with CD, particularly $\gamma\delta$ T lymphocytes. Our hypothesis was that these lymphocyte subsets could be altered; this would reflect a deterioration of the innate immunity and contribute to the development of the disease.

Methods

Study Population

Forty patients with CD were included in this prospective study. Patients were recruited at random among CD patients who had been admitted to the emergency and gastroenterology departments (both newly diagnosed patients and patients with active disease) and among CD patients in clinical remission followed at the outpatient clinic of the Department of Gastroenterology, Arnau de Vilanova Hospital, Valencia, Spain.

Lennard-Jones criteria were used for the diagnosis of patients with CD [16]. Disease activity was measured using the Crohn's disease activity index (CDAI) [17]. Three different clinical scenarios were defined [18, 19]: "new patients" were patients with active CD presenting at, or shortly after, diagnosis with no previous treatment for CD; patients in "remission" were patients with a CDAI < 150 for at least 12 months; patients with "active disease" were patients with a CDAI > 150 and signs and symptoms of disease. In the present study, 40 patients with CD were included; 15 (37.5%) were new patients, 13 were patients in remission (32.5%), and 12 patients had active disease (30%).

Twenty-three patients (57.5%) were in treatment at the moment of the sampling. Ten of the 12 patients with active disease (83.3%) and nine of the 13 patients in remission (62.2%) were taking specific treatment for CD. Of these 23 patients with treatment, 11 were treated with one drug only (47.8%), eight with two drugs (34.8%), two with three drugs (8.7%), and two with four drugs (8.7%). Twelve patients were treated with mesalazine, nine with azathioprine, seven with metronidazole and ciprofloxacin, seven with prednisolone, three with sulfasalazine, and three with infliximab.

Forty healthy blood donors were recruited (control group), matched with the patient group by sex and age (± 5 years). CD patient's relatives were excluded.

Additional selection criteria for control subjects were: absence of acute infections, inflammatory, autoimmune, or immune-deficiency diseases, and no immunosuppressive or antibiotic treatment or any kind of vaccine during the previous year.

Each participant in the study signed an informed consent form, and the study was approved by the Ethics and Investigation Committee of the Arnau de Vilanova Hospital, Valencia, Spain.

Variables Studied

The following variables were recorded: age and gender; CDAI; clinical scenarios: remission, active disease, new patient; complete blood count and lymphocyte population: CD3+, CD4+, CD8+, CD56+, CD19+, $\alpha\beta$ CD3+, $\alpha\beta$ CD4+, $\alpha\beta$ CD8+, $\alpha\beta$ CD56+, $\gamma\delta$ CD3+, $\gamma\delta$ CD4+, $\gamma\delta$ CD8+, $\gamma\delta$ CD56+; indicators of inflammation: erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C-reactive protein (CRP).

Methods of Blood Sample Analysis

Blood cell counts were performed using the Coulter LH750 Automated Hematology Analyzer (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Monoclonal antibodies used were as follows: CD45, CD4, CD8, CD3, and CD19 for the peripheral blood subpopulations and CD4, CD8, CD56, CD2, CD3, CD19, TCR $\alpha\beta$, and TCR $\gamma\delta$ for the T $\gamma\delta$ lymphocytes study.

The $\gamma\delta$ T lymphocyte populations were analyzed with phycoerythrin-cyanine 5.1 (PC5) conjugated anti-human TCR $\gamma\delta$ (Beckman Coulter, Miami, USA [clone: IMMU 510]). This is an antibody (IgG1 mouse) that allows the identification and numeration of cell populations expressing the TCR $\gamma\delta$ antigen present in human biological samples using flow cytometry. IMMU 510 recognizes all $\gamma\delta$ T cell populations regardless of the variable genes or junction regions they express, as assessed by immunofluorescence studies on polyclonal $\gamma\delta$ T cell lines, as well as $\gamma\delta$ T cell clones.

The $\alpha\beta$ T lymphocytes were analyzed with PC5 conjugated anti-human TCR $\alpha\beta$ (Beckman Coulter [clone: IP26A]).

The level of CRP was measured in serum from patients using a heterogeneous enzymatic sandwich immunoassay with an endpoint immunofluorescence reading method (Vitros Chemistry Products®).

The ESR was measured with the TEST 1 (Alifax, Padova, Italy) using a quantitative capillary photometry-based technology. After 3 min of mixing a blood sample collected in a tube containing K3-EDTA, the erythrocyte microsedimentation was measured at 37°C by centrifuging each sample at about 20×g and simultaneously taking

1,000 readings (950 nm) during the first 20 s of sedimentation. From these readings, a sedimentation curve was plotted, and the data were converted into Westergren values by means of a linear regression model.

Statistical Analysis

Descriptive statistics were obtained using standard procedures. The assumption of a normal distribution for continuous variables was verified using graphical tests and the Kolmogorov–Smirnov test. When normality was assumed, the Student *t*-test for paired samples was used to compare the means of the quantitative variables. Wilcoxon's non-parametric test was used to study the variables that did not have a normal distribution, and the exact method was chosen. When we analyzed the differences between cases and controls according to the clinical categories, the non-parametric Wilcoxon test was always used, because of the low number of patients in each group.

The level of significance was taken as a *P*-value of less than 0.05 (bilateral contrast). The data were analyzed using the statistical software SPSS, version 15.

Results

Demographic Parameters

Eighty subjects were included in the study, 40 patients with CD (17 female and 23 male) and 40 healthy controls. The mean age of patients with CD was 40.7 years (95% confidence interval [CI], 35.9–45.6) and the mean age of controls was 41.4 years (95% CI, 36.2–46.6), *P* = 0.865.

Complete Blood Count (CBC) and Lymphocyte Subsets

The results of the CBC and lymphocyte populations are shown in Table 1. It is striking to note the low values of total lymphocytes in CD patients, although the number of leukocytes, neutrophils, monocytes, and platelets was higher in these patients. All levels of CD3+, CD4+, CD8+, and CD19+ lymphocytes, with the exception of CD56+ T lymphocytes, were decreased in CD patients compared to the control group.

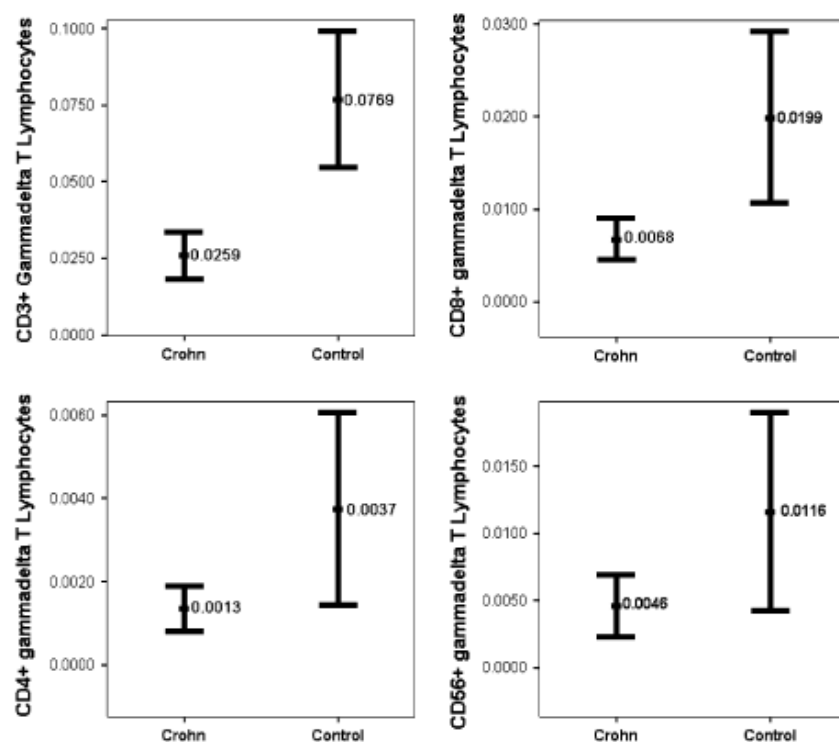
The lymphocyte $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ chain subsets in patients with CD compared to the control group are shown in Figs. 1, 2, 3, and 4. Although both $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T lymphocytes were lower in patients with CD, $\gamma\delta$ T lymphocytes had the largest decrease in CD patients (mean, $0.0259 \times 10^9/l$; 95% CI, 0.0198–0.0359) with respect to healthy controls (mean $0.0769 \times 10^9/l$; 95% CI, 0.0564–0.1011),

Table 1 Results of complete blood counts (CBCs) and lymphocyte populations. Comparison between Crohn's disease (CD) patients and control subjects

Cells (normal value)	Crohn's disease ($n = 40$), mean (95% CI)	Controls ($n = 40$), mean (95% CI)	<i>P</i> -value
Leucocytes ($4.0\text{--}11.5 \times 10^9/l$)	8.78 (7.83–9.73)	6.94 (6.17–7.70)	0.003
Neutrophils ($1.5\text{--}7 \times 10^9/l$)	6.23 (5.37–7.08)	3.88 (3.24–4.52)	<0.001
Monocytes ($0.1\text{--}1 \times 10^9/l$)	0.69 (0.59–0.79)	0.56 (0.50–0.61)	0.015
Eosinophils ($0\text{--}0.7 \times 10^9/l$)	0.16 (0.12–0.21)	0.18 (0.14–0.22)	n.s.
Basophils ($0\text{--}0.4 \times 10^9/l$)	0.03 (0.02–0.05)	0.04 (0.02–0.05)	n.s.
Platelets ($125\text{--}450 \times 10^9/l$)	357.51 (321.81–393.21)	253.90 (222.76–285.04)	<0.001
Lymphocytes ($1.0\text{--}4.0 \times 10^9/l$)	1.64 (1.47–1.82)	2.27 (2.06–2.49)	<0.001
CD3+	1.21 (1.01–1.40)	1.61 (1.41–1.81)	0.002
CD4+	0.85 (0.73–0.97)	1.02 (0.88–1.17)	0.049
CD8+	0.49 (0.41–0.58)	0.66 (0.57–0.76)	0.003
CD56+	0.19 (0.15–0.24)	0.21 (0.16–0.26)	n.s.
CD19+	0.19 (0.14–0.24)	0.27 (0.21–0.33)	0.023

CI confidence interval; n.s. not significant

Fig. 1 Peripheral blood CD3+ $\gamma\delta$ T lymphocyte subsets and CD4+ $\gamma\delta$, CD8+ $\gamma\delta$, and CD56+ $\gamma\delta$. Values are expressed as means ($\times 10^9/l$) and the *T bars* show 95% confidence interval (CIs). There was a significant difference between the Crohn's disease ($n = 40$) and control group ($n = 40$) in CD3+ $\gamma\delta$ T lymphocytes ($P < 0.001$), CD8+ $\gamma\delta$ ($P = 0.008$), and CD4+ $\gamma\delta$ ($P = 0.046$)



$P < 0.001$ (Fig. 1). In particular, $\gamma\delta$ CD8+ T lymphocytes had the greatest difference (mean $0.0068 \times 10^9/l$; 95% CI, 0.0046–0.0090) in CD patients versus the control group (mean $0.0199 \times 10^9/l$; 95% CI, 0.0106–0.0292), $P = 0.008$.

The percentages of lymphocyte $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ chain subsets in patients with CD compared to the control group are shown in Table 2. There is a small and significant increase of $\alpha\beta$ CD4+ compared to the control group, while the

proportion of $\gamma\delta$ T lymphocytes, especially $\gamma\delta$ CD8+, decrease strongly compared to the control group.

The flow cytometric analysis of subject controls (A) and patients with CD (B) is shown in Fig. 5.

Clinical Scenarios

According to the previously defined clinical scenarios, $\gamma\delta$ T lymphocytes were lower in new patients, remission

Fig. 2 Peripheral blood CD3+ $\alpha\beta$ T lymphocyte subsets and CD4+ $\alpha\beta$, CD8+ $\alpha\beta$, and CD56+ $\alpha\beta$. Values are expressed as means ($\times 10^9/l$) and the *T bars* show 95% CIs. There was a significant difference between the Crohn's disease ($n = 40$) and control group ($n = 40$) in CD3+ $\alpha\beta$ T lymphocytes ($P = 0.021$) and CD8+ $\alpha\beta$ ($P = 0.005$)

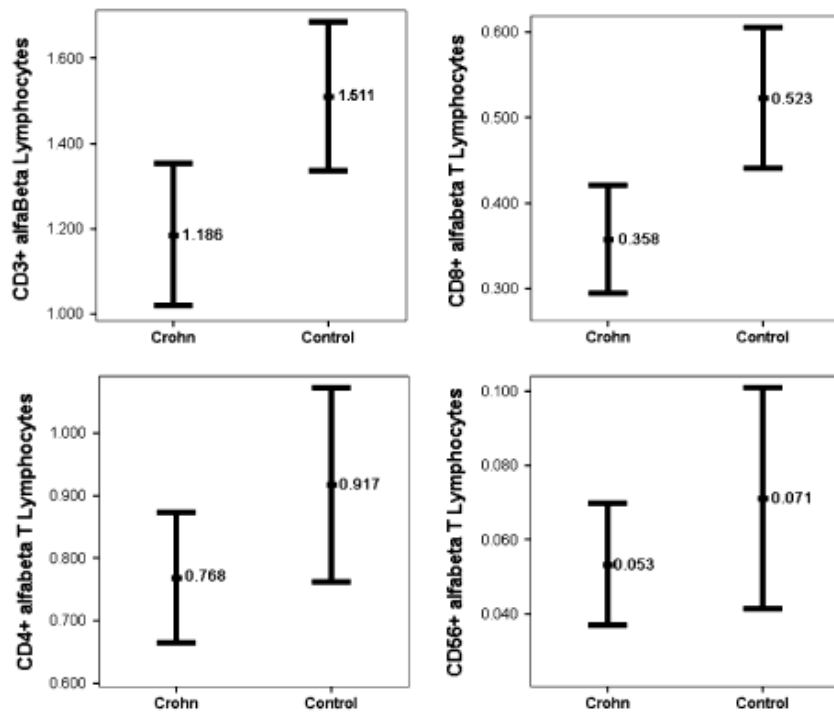


Fig. 3 Peripheral blood CD3+ $\gamma\delta$ T lymphocyte subsets and CD4+ $\gamma\delta$, CD8+ $\gamma\delta$, and CD56+ $\gamma\delta$ according to the clinical criteria for new patients ($n = 15$), remission ($n = 13$), and active disease ($n = 12$). Values are expressed as means ($\times 10^7/l$) and the *T bars* show 95% CIs. There were significant differences between new patients versus controls in CD3+ $\gamma\delta$ T lymphocytes ($P < 0.001$), CD8+ $\gamma\delta$ ($P = 0.030$), and CD4+ $\gamma\delta$ ($P = 0.030$); and remission versus controls in CD3+ $\gamma\delta$ T lymphocytes ($P = 0.002$), CD8+ $\gamma\delta$ ($P = 0.008$), and CD4+ $\gamma\delta$ ($P = 0.012$)

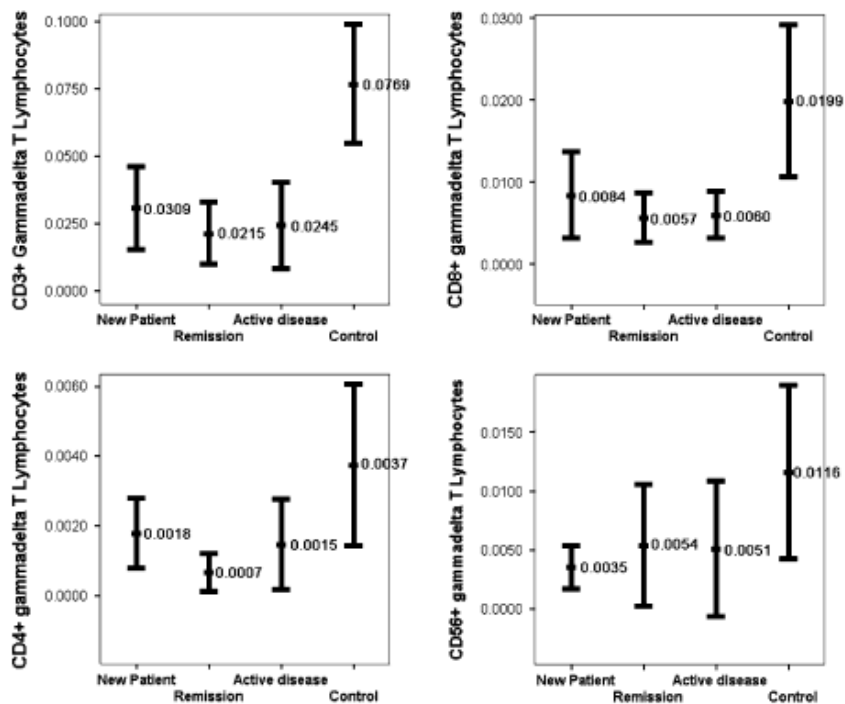


Fig. 4 Peripheral blood CD3+ $\alpha\beta$ T lymphocyte subsets and CD4+ $\alpha\beta$, CD8+ $\alpha\beta$, and CD56+ $\alpha\beta$ according to the clinical criteria for new patients ($n = 15$), remission ($n = 13$), and active disease ($n = 12$). Values are expressed as means ($\times 10^9/l$) and the *T bars* show 95% CIs. There were significant differences between new patients versus controls in CD3+ $\alpha\beta$ T lymphocytes ($P = 0.016$), CD8+ $\alpha\beta$ ($P = 0.042$), and CD4+ $\alpha\beta$ ($P = 0.049$); and active disease and controls in CD8+ $\alpha\beta$ ($P = 0.032$)

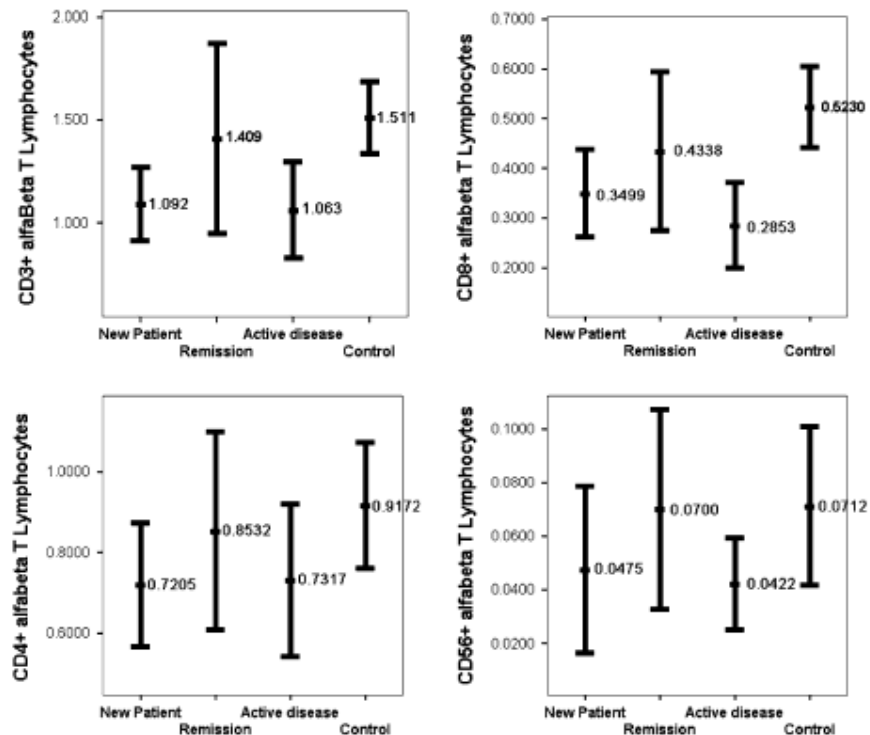


Table 2 Percentage of lymphocyte populations. Comparison between CD patients and control subjects

	Crohn's disease ($n = 40$), mean (95% CI)	Controls ($n = 40$), mean (95% CI)	<i>P</i> -value
CD3+	71.89 (68.47–75.32)	70.24 (67.46–73.01)	n.s.
CD4+	48.75 (45.43–52.06)	44.58 (41.89–47.27)	0.029
CD8+	28.33 (25.83–30.82)	28.92 (26.49–31.34)	n.s.
CD56+	10.73 (8.63–12.84)	9.31 (7.59–11.03)	n.s.
CD3+ $\alpha\beta$	66.90 (63.21–70.59)	66.85 (64.02–69.69)	n.s.
CD4+ $\alpha\beta$	46.38 (42.75–50.01)	40.06 (35.69–44.43)	0.036
CD8+ $\alpha\beta$	21.06 (18.17–23.96)	22.87 (20.21–25.52)	n.s.
CD56+ $\alpha\beta$	3.22 (2.03–4.40)	2.83 (1.68–3.99)	n.s.
CD3+ $\gamma\delta$	1.69 (1.17–2.22)	3.42 (2.44–4.41)	0.001
CD4+ $\gamma\delta$	0.09 (0.05–0.15)	0.16 (0.06–0.26)	n.s.
CD8+ $\gamma\delta$	0.42 (0.32–0.61)	0.79 (0.50–1.18)	0.026
CD56+ $\gamma\delta$	0.26 (0.17–0.41)	0.48 (0.21–0.82)	n.s.
CD19+	10.71 (8.94–12.48)	11.85 (9.99–13.71)	n.s.

patients, and in active disease patients (Fig. 3). This difference was statistically significant between pairs of new patients and their corresponding controls (P -value for exact test, bilateral contrast = 0.001) and those in remission ($P = 0.002$). The $\gamma\delta$ CD4+ and $\gamma\delta$ CD8+ T lymphocytes were also significantly lower than their controls in new patients ($P = 0.030$ in both cases) and among patients in remission ($P = 0.012$ and $P = 0.008$, respectively). In the

same way, the $\alpha\beta$ T lymphocyte populations were lower in CD patients in all of the clinical scenarios compared to controls (Fig. 4). The difference was statistically significant for the new patient group ($P = 0.016$) and was marginally significant for active disease patients ($P = 0.10$). The $\alpha\beta$ CD4+ and $\alpha\beta$ CD8+ T lymphocytes were significantly lower than their controls in new patients ($P = 0.049$ and $P = 0.042$, respectively), but not among patients in

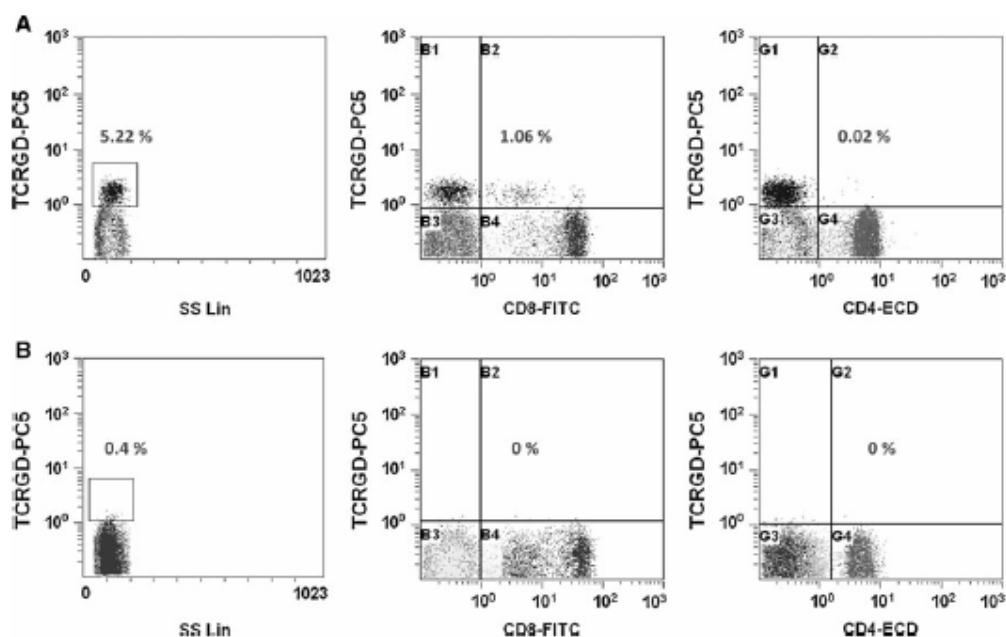


Fig. 5 Flow cytometric analysis using PCy5-labeled anti- $\gamma\delta$ TCR mAb. The squares represent peripheral blood $\gamma\delta$ T lymphocytes and subsets, CD8+ $\gamma\delta$ T cells percentages (B2), and CD4+ $\gamma\delta$ T cells percentages (G2) for controls (a) and patients with Crohn's disease (b)

remission. Also, a significant reduction in the $\alpha\beta$ CD8+ T lymphocyte population was found among patients with active disease ($P = 0.32$). The differences did not reach statistical significance in the Wilcoxon nonparametric test for the $\gamma\delta$ CD56+ T lymphocytes (although there was a marginal relation for the new patients, $P = 0.10$) or the $\alpha\beta$ CD56+ T lymphocytes in any clinical group of cases and their corresponding controls.

Patients in Treatment

Twenty-three patients with CD had had treatment (57.5%). Comparing patients with CD who had been treated and those who had not had prior treatment, there were significant differences in the CD8+ T lymphocytes and CD19+ lymphocyte population. CD8+ T lymphocytes in the treated patients group had a mean of 0.407 (95% CI, 0.332–0.480) versus 0.567 (95% CI, 0.415–0.719) in untreated patients ($P = 0.037$). The mean CD19+ lymphocyte population was 0.143 (95% CI, 0.103–0.184) in treated patients versus 0.246 (95% CI, 0.158–0.335) in untreated patients, $P = 0.035$.

Crohn's Disease Activity Index (CDAI)

The average levels of CDAI in all patients with CD were 154.3 (95% CI, 122.0–186.5); in the new patient group, 153.2 (95% CI, 112.6–193.8); in the remission group, 69.1

(95% CI, 54.2–84.1); and in the active disease group, 247.6 (95% CI, 182.6–312.9). There was no correlation between CDAI and T lymphocyte subsets.

Indicators of Inflammation

The mean levels of CRP were 44.9 (95% CI, 28.3–61.6) in CD patients versus 4.8 (95% CI, 4.1–5.5) in the control group ($P < 0.001$), while the mean levels of ESR were 46.4 (95% CI, 34.3–58.5) in CD patients and 6.1 (95% CI, 5.4–6.9) in the control group ($P < 0.001$). Although the average levels of CRP and ESR in the treatment group were lower than in the untreated group (33.7 vs. 48.8 and 35.7 vs. 40.5, respectively), they did not reach statistical significance ($P = 0.587$ and $P = 0.268$, respectively). There was a slight negative correlation between CDAI and CRP ($r = -259$, $P = 0.032$) and between CDAI and ESR ($r = -380$, $P = 0.001$).

Discussion

This study demonstrates that patients with CD have a reduced number of lymphocytes compared to healthy subjects. Moreover, there is a reduction of both $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T subsets, but the lymphocyte population with the most decreased level in peripheral blood in CD patients is the $\gamma\delta$ T subset. Interestingly, when comparing the percentages of

lymphocyte population, there is no difference between CD and the control group, except for higher levels of $\alpha\beta$ CD4+ T subsets, while the percentages of $\gamma\delta$ T subsets were low. This observation is consistent with the experimental findings in mice when an animal model of Crohn's-like experimental colitis was induced [11–14]. Colitis was induced using an intra-colonic application of 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid, and the subsequent depletion of $\gamma\delta$ T lymphocytes resulted in a significantly increased mortality and more severe histological lesions compared to controls [12]. The same event takes place when mice depleted of, or deficient in, $\gamma\delta$ T cells were exposed to dextran sodium sulfate in order to induce colitis. The reduction of $\gamma\delta$ T lymphocytes by $\gamma\delta$ -TCR antibodies is also reflected in an aggravation of colitis and terminal ileitis, particularly during the early phase of intestinal inflammation [13]. On the other hand, the transfer of $\gamma\delta$ T lymphocytes improves lesions and increases survival [14].

In the human intestinal mucosa, three studies have described a decreased level of the $\gamma\delta$ T lymphocyte population in patients with CD [20–22]. However, an article by McVay et al. [23] reported an increased level of $\gamma\delta$ T lymphocytes versus controls. Lee et al. [22] showed that CD3+, TCR $\alpha\beta$, and TCR $\gamma\delta$ populations were significantly decreased in the intestinal mucosa, comparing CD patients with control patients. Bucht et al. [21] described a decreased proportion of TCR $\gamma\delta$ -carrying T cells in the inflamed mucosa compared with a macroscopically normal area of the colon, but a significantly increased percentage of T cells bearing the TCR $\gamma\delta$ were found in the peripheral blood of patients with CD compared to healthy individuals; unfortunately, this investigation included only three patients with CD.

In our study, the CD8+ T lymphocytes were the most decreased type of cells in both $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T populations. It is known that over 50% of intraepithelial lymphocytes express CD8+ in the mucosa. Kosiewicz et al. [24] showed that intestinal inflammation in SAMP1/Yit mice was characterized by a dramatic decrease in the IEL CD8 α +TCR $\gamma\delta$ + / CD8 α +TCR $\alpha\beta$ + ratio.

There are few published studies on lymphocyte populations in the peripheral blood of patients with CD, and most of them were performed nearly 30 years ago. Therefore, there are scarce bibliographical references about both $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell populations, because of their relatively recent discovery. Global T lymphocyte population reduction has been described in patients with active CD. This reduction is directly related to CD4+ and CD8+ subsets [25–27]. However, another study did not find any differences in these subsets [28]. Our results confirm these population reductions, which primarily involves the $\gamma\delta$ T cell subset.

The decrease in global lymphocyte population also occurs in new patients, patients in remission, and patients

with active disease, but it is the $\gamma\delta$ T lymphocytes, specifically $\gamma\delta$ CD8+ T cells, that are decreased in all clinical scenarios of CD. Interestingly, patients in remission have a greater variability in the $\alpha\beta$ T subsets. It appears that, in some cases, the patients recovered these $\alpha\beta$ T subset levels, reaching levels that are similar to control subjects. Godin et al. [29] reported that patients with active disease (CD) untreated with steroids had significantly higher proportions of CD4+ T lymphocytes and lower proportions of CD8+. No alterations in absolute numbers or proportions of CD4+ or CD8+ T lymphocytes were noted in steroid-treated patients and patients with inactive disease. These findings are consistent with the findings of our study, although the treatment does not appear to be the cause of this increase, because there are no differences in lymphocyte subsets between treated and untreated patients. However, $\gamma\delta$ T lymphocytes remain low in the three clinical forms (new patients, remission, and active disease).

Selby and Jewell [25] reported that absolute numbers of T lymphocytes were reduced in patients with active CD. CD4+ T and CD8+ T lymphocytes numbers were reduced in active CD.

An increased sample size would be necessary for an in-depth study in this area. Furthermore, it would be important to determine the effects of specific treatments on lymphocyte subsets and which particular drugs may alter the lymphocyte subsets. It would be important to increase the number of cases in future studies so that, after stratifying for the different clinical scenarios (new patients, patients in remission, and patients with active disease), and distinguishing between the different treatments used for each patient, the results would have more statistical strength. This aspect is currently under study by our group.

It also seems that the decrease of lymphocytes in CD is not caused by treatment, and, therefore, it must be part of the disease pathogenesis. This lymphocyte decrease could be caused by microorganisms which perpetuate the inflammation, or, conversely, it could be a direct consequence of etiological factors. The latter could be explained by the apoptosis phenomenon that would accompany this type of infections, but this seems unlikely. Some studies suggest a resistance to apoptosis in lymphocytes of patients with CD [30–33].

These findings appear to have evident implications for clinical practice. The $\gamma\delta$ T lymphocytes are efficient at exerting antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the absence of an allogeneic response and, *in vivo*, they also respond to certain bacterial, viral, and parasitic infections. Recently, a regulatory potential for $\gamma\delta$ T lymphocytes and suppressive effect on T helper activity and proliferation has been proposed. Lymphocytes $\gamma\delta$ secreted little IL-2 but high quantities of INF- γ , IL-10, and TGF- β ; probably, CD is a complex immunological disease that

involves many different T cells, directly or via regulatory effects, where $\gamma\delta$ T cells, both intraepithelial and circulating, play a central role [14, 34]. The levels of those cytokines and the in vitro activity of $\gamma\delta$ cells in CD should be explored in new research projects.

Therefore, they could be candidates to become a cell-based immunotherapy agent [35]. Furthermore, $\gamma\delta$ T lymphocytes can be activated by natural or synthetic phosphoantigens, which offer the possibility of the development of $\gamma\delta$ T cell-based immunotherapy. Our study has shown a significant specific decrease of $\gamma\delta$ T lymphocyte population in CD, and it could be possible to use these cells as a therapeutic tool.

In summary, there is a decrease of lymphocytes in the peripheral blood of patients with CD. This decrease is more evident and significant in the $\gamma\delta$ T lymphocyte subsets, both overall and independently of the subsets of patients studied. CD8+ T lymphocytes are lowest in both the $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T subsets. Lymphocyte populations do not differ between treated and untreated patients, except in CD8+ T and CD19+ lymphocytes. Our conclusion is that these results support the theory that a complex alteration of immune responses that affects the total numbers and function of $\gamma\delta$ T cells occurs in CD.

Acknowledgments Enrique J. Andreu, PhD, Cell Therapy Area, Clinic University of Navara and Foundation for Applied Medical Research, Pamplona, Spain, Miguel Bixquert Jiménez, PhD, Head of the Department of Digestive Medicine, Arnau de Vilanova Hospital, and Professor of the University School of Medicine, Valencia, Spain, and José Mayans, PhD, Head of the Department of Hematology, Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, Spain, are acknowledged for critically reading the manuscript.

Conflict of interest None of the authors has any potential financial conflict of interest related to this manuscript.

References

- Raulet DH. The structure, function, and molecular genetics of the gamma/delta T cell receptor. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:175–207.
- Allison JP, Havran WL. The immunobiology of T cells with invariant gamma delta antigen receptors. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:679–705.
- Haas W, Kaufman S, Martinez C. The development and function of gamma delta T cells. *Immunol Today.* 1990;11:340–343.
- Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:637–685.
- Goodman T, Lefrançois L. Expression of the gamma-delta T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes. *Nature.* 1988;333:855–858.
- Bonneville M, Janeway CA Jr, Ito K, et al. Intestinal intraepithelial lymphocytes are a distinct set of gamma delta T cells. *Nature.* 1988;336:479–481.
- Schild H, Mavaddat N, Litzenger C, et al. The nature of major histocompatibility complex recognition by $\gamma\delta$ T-cells. *Cell.* 1994;76:29–37.
- Chien YH, Jores R, Crowley MP. Recognition by $\gamma\delta$ T cells. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:511–532.
- Crowley MP, Reich Z, Mavaddat N, et al. The recognition of the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule, T10, by the $\gamma\delta$ T cell, G8. *J Exp Med.* 1997;185:1223–1230.
- Tanaka Y, Sano S, Nieves E, et al. Nonpeptide ligands for human $\gamma\delta$ T cells. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 1994;91:8175–8179.
- Inagaki-Ohara K, Chinen T, Matsuzaki G, et al. Mucosal T cells bearing TCR gammadelta play a protective role in intestinal inflammation. *J Immunol.* 2004;173:1390–1398.
- Hoffmann JC, Peters K, Henschke S, et al. Role of T lymphocytes in rat 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) induced colitis: increased mortality after gammadelta T cell depletion and no effect of alphabeta T cell depletion. *Gut.* 2001;48:489–495.
- Kühl AA, Pawlowski NN, Grollich K, et al. Aggravation of intestinal inflammation by depletion/deficiency of $\gamma\delta$ T cells in different types of IBD animal models. *J Leukoc Biol.* 2007;81:168–175.
- Hoffmann JC, Pawlowski NN, Grollich K, et al. Gammadelta T lymphocytes: a new type of regulatory T cells suppressing murine 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)-induced colitis. *Int J Colorectal Dis.* 2008;23:909–920.
- Korzenik JR, Dieckgraefe BK. Is Crohn's disease an immunodeficiency? A hypothesis suggesting possible early events in the pathogenesis of Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* 2000;45:1121–1129.
- Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1989;170:2–6.
- Best WR, Beckett JM, Singleton JW, et al. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology.* 1976;70:439–444.
- Stange EF, Travis SP, Vermeire S; European Crohn's and Colitis Organisation, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut.* 2006;55:i1–i15.
- Travis SP, Stange EF, Lémann M; European Crohn's and Colitis Organisation, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut.* 2006;55:i16–i35.
- Fukushima K, Masuda T, Ohtani H, et al. Immunohistochemical characterization, distribution, and ultrastructure of lymphocytes bearing T-cell receptor gamma/delta in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1991;101:670–678.
- Bucht A, Söderström K, Esin S, et al. Analysis of gamma delta V region usage in normal and diseased human intestinal biopsies and peripheral blood by polymerase chain reaction (PCR) and flow cytometry. *Clin Exp Immunol.* 1995;99:57–64.
- Lee HB, Kim JH, Yim CY, et al. Differences in immunophenotyping of mucosal lymphocytes between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Korean J Intern Med.* 1997;12:7–15.
- McVay LD, Li B, Biancaniello R, et al. Changes in human mucosal gamma delta T cell repertoire and function associated with the disease process in inflammatory bowel disease. *Mol Med.* 1997;3:183–203.
- Kosiewicz MM, Nast CC, Krishnan A, et al. Th1-type responses mediate spontaneous ileitis in a novel murine model of Crohn's disease. *J Clin Invest.* 2001;107:695–702.
- Selby WS, Jewell DP. T lymphocyte subsets in inflammatory bowel disease: peripheral blood. *Gut.* 1983;24:99–105.
- Pallone F, Montano S, Fais S, et al. Studies of peripheral blood lymphocytes in Crohn's disease. Circulating activated T cells. *Scand J Gastroenterol.* 1983;18:1003–1008.
- James SP, Fiocchi C, Graeff AS, et al. Phenotypic analysis of lamina propria lymphocytes. Predominance of helper-inducer and cytolytic T-cell phenotypes and deficiency of suppressor-inducer

- phenotypes in Crohn's disease and control patients. *Gastroenterology*. 1986;91:1483-1489.
28. Senju M, Hulstaert F, Lowder J, et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocytes in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*. 1991;32:779-783.
 29. Godin NJ, Sachar DB, Winchester R, et al. Loss of suppressor T-cells in active inflammatory bowel disease. *Gut*. 1984;25:743-747.
 30. Ina K, Itoh J, Fukushima K, et al. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol*. 1999;163:1081-1090.
 31. Boirivant M, Marini M, Di Felice G, et al. Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology*. 1999;116:557-565.
 32. Itoh J, de La Motte C, Strong SA, et al. Decreased Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease. *Gut*. 2001;49:35-41.
 33. Doering J, Begue B, Lentze MJ, et al. Induction of T lymphocyte apoptosis by sulphasalazine in patients with Crohn's disease. *Gut*. 2004;53:1632-1638.
 34. Kühl AA, Pawlowski NN, Grollich K, et al. Human peripheral gammadelta T cells possess regulatory potential. *Immunology*. 2009;128:580-588.
 35. Lamb LS Jr, Musk P, Ye Z, et al. Human gammadelta(+) T lymphocytes have in vitro graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic response. *Bone Marrow Transplant*. 2001;27:601-606.

LETTERS TO THE EDITOR

Deficit of Interleukin-7 in Serum of Patients with Crohn's Disease

To the Editor:

We recently reported a decrease in the overall lymphocyte population in the peripheral blood of patients with Crohn's disease (CD) compared with healthy controls. This decrease was more evident in $\gamma\delta$ T cells, especially $\gamma\delta$ CD8+ T subsets. The decrease occurred in different groups of patients, i.e., new patients, patients in remission, and patients with active disease.¹

Interleukin (IL)-7 is primarily produced by stromal cells of human bone marrow and is essential for T-cell proliferation²; it is also produced by intestinal epithelial cells, which regulate the proliferation of lymphocytes in the intestinal mucosa.³ IL-7 has been recognized as a mediator of the homeostatic mechanisms that maintains a stable number of native memory T cells in the peripheral immune system.⁴

It is thus to be expected that, given the demonstrated decrease in CD T lymphocytes, the immune system would try to correct it by increasing production of IL-7 and, therefore, lymphocytes.

Watanabe et al³ showed that the expression of IL7 in the inflamed mucosa of the colon in patients with ulcerative colitis in the active phase was significantly decreased, compared with the colonic mucosa of normal subjects or patients in remission. Furthermore, a significant difference has recently been described in the expression of IL-7 in serum from pediatric patients with CD. IL-7 levels were sig-

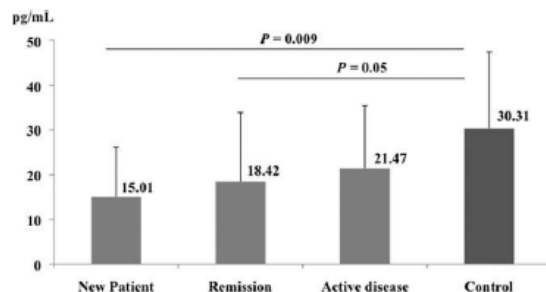


FIGURE 1. Circulating levels of IL-7 in serum from patients with CD. According to the clinical criteria for new patients ($n = 10$), remission ($n = 9$), and active disease ($n = 9$). Control group ($n = 28$). Values are expressed as means (pg/mL) and T bars denote standard deviation. P -values correspond to those obtained using the Mann-Whitney U -test.

nificantly higher in patients in remission, compared with patients with active disease.⁵

Using serum samples from our previous study,¹ we measured the IL-7 of 28 patients with CD compared with control patients (IL7: instant ELISA for human interleukin-7; eBioscience, San Diego, CA). Curiously, the IL-7 levels were significantly lower than those of controls in all the clinical scenarios of CD (Fig. 1). We found no $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ correlation between the T subsets and IL-7. When patients with CD who had been treated ($n = 15$) were compared with those who had not received prior treatment ($n = 13$), there were significant differences in the IL-7 levels.

These findings should be studied in depth, as this decrease in the expression of IL-7 could be closely related to the decrease in T lymphocytes in patients with CD.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Anselmo Villar-Grimalt, MD, PhD, Head of Internal Medicine Department, Arnau de Vilanova Hospital and President of Association for Medical-Oncology Research, Valencia Spain, and José Mayans, MD, PhD, Head of Hematology Department, for unconditional support for our work. Guarantor of the article: Dr. Juan Carlos Andreu-Ballester. Author

contributions: Andreu-Ballester: study concept and design, analysis, and interpretation of data, statistical analysis, and discussion. Pérez-Griera, García-Ballesteros, and Amigó-García: technical and material support. Catalán-Serra, Monforte-Albalat: acquisition of data. Ballester: statistical analysis, analysis, and interpretation of data. Bixquert-Jiménez: analysis and interpretation of data.

J.C. Andreu-Ballester, MD, PhD*
 J. Pérez-Griera, MD, PhD†
 Carlos Garcia-Ballesteros, MB*‡
 V. Amigo, MD‡
 I. Catalán-Serra, MD§
 A. Monforte-Albalat, MD§
 M. Bixquert-Jiménez, MD, PhD§
 F. Ballester, MD, PhD||

*Head of Research Unit
 Arnau de Vilanova Hospital
 Valencia, Spain

†Biopathology Department
 Clinic University Hospital
 Valencia, Spain

‡Hematology Department
 Arnau de Vilanova Hospital
 Valencia, Spain

§Digestive Department
 Arnau de Vilanova Hospital
 Valencia, Spain

||University of Valencia
 Spanish Consortium for Research in
 Epidemiology and Public Health
 (CIBERESP) and Center of Research
 in Public Health (CSISP)
 Valencia, Spain

REFERENCES

1. Andreu-Ballester JC, Amigó-García V, Catalán-Serra I, et al. Deficit of gammadelta T lymphocytes in the peripheral blood of patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 2011;56:2613–2622.
2. Welch PA, Namen AE, Goodwin RG, et al. Human IL-7: a novel T cell growth factor. *J Immunol*. 1989;143:3562–3567.
3. Watanabe M, Watanabe N, Iwao Y, et al. The serum factor from patients with ulcerative colitis that induces T cell proliferation in the mouse thymus is interleukin-7. *J Clin Immunol*. 1997;17:282–292.
4. Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, et al. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol*. 2000;1:426–432.
5. Kader HA, Tchernev VT, Satyaraj E, et al. Protein microarray analysis of disease activity in pediatric inflammatory bowel disease demonstrates elevated serum PLGF, IL-7, TGF-beta1, and IL-12p40 levels in Crohn's disease and ulcerative colitis patients in remission versus active disease. *Am J Gastroenterol*. 2005;100:414–423.

