



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Enfermedad inflamatoria intestinal: Herramientas analíticas y
metabólicas para su diagnóstico y valoración del estado
nutricional.

D.^a Fuensanta Abellán Alfocea
2023



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Enfermedad inflamatoria intestinal: Herramientas analíticas y
metabolómicas para su diagnóstico y valoración del estado nutricional.

Autor: D.^a Fuensanta Abellán Alfocea

Director/es: Dra. Natalia Arroyo Manzanares

Dr. Luis Francisco Sáenz Mateos



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Fuensanta Abellán Alfocea

doctorando del Programa de Doctorado en

TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Enfermedad inflamatoria intestinal: Herramientas analíticas y metabolómicas para su diagnóstico y valoración del estado nutricional.

y dirigida por,

D./Dña. Natalia Arroyo Manzanares

D./Dña. Luis Francisco Sáenz Mateos

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 18 de septiembre de 2023

Fdo.: Fuensanta Abellán Alfocea

ABELLAN ALFOCEA
FUENSANTA -
48693617H

Firmado digitalmente por
ABELLAN ALFOCEA FUENSANTA -
48693617H
Fecha: 2023.09.18 10:26:07
+02'00'

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia



D. Luis Francisco Saénz Mateos, Doctor de Universidad del Área de Biología en el Departamento de HURM, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL: HERRAMIENTAS ANALÍTICAS Y METABOLÓMICAS PARA SU DIAGNÓSTICO Y VALORACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL", realizada por D. Fuensanta Abellán Alfocea, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 1 de septiembre de 2023

Firmado por SAENZ MATEOS LUIS FRANCISCO - ***6043**
el día 04/09/2023 con un certificado emitido por AC
FNMT Usuarios



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. Natalia Arroyo Manzanares, Profesora Titular de Universidad del Área de Química Analítica en el Departamento de Química Analítica, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL: HERRAMIENTAS ANALÍTICAS Y METABOLÓMICAS PARA SU DIAGNÓSTICO Y VALORACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL", realizada por D^a. Fuensanta Abellan Alfocea, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 8 de septiembre de 2023

Firmado por ARROYO MANZANARES NATALIA - ***1640** el día
08/09/2023 con un certificado emitido por AC FNMT
Usuarios

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de Tesis Doctoral, Natalia Arroyo y Luis Saézn, por toda su paciencia y tiempo invertido en mi formación y la consecución de este trabajo. Por siempre animarme a seguir investigando y a ampliar el estudio, por instarme a no abandonar nunca esta carrera de fondo y sacar siempre lo mejor de mí, por explicarme tantas cosas que he tenido que aprender y, sobre todo, por ser una inspiración para los futuros investigadores y hacerme ver que el trabajo, la investigación, la docencia y la crianza son compatibles, sois unos TODOTERRENO, MIL GRACIAS.

A Pilar Viñas y Natalia Campillo por encontrar siempre una solución para cada piedra encontrada en el camino y por supuesto por ser las personas que encontraron este proyecto para mí, siempre atentas y dispuestas. Agradecer a María Jesús Periago Gastón por aceptar tutorizarme y ayudarme cuando ha sido necesario. Gracias por confiar en mí.

A las compañeras del departamento de química analítica, Marta, Ana, Rosa, Claudia, Laura y Carmen porque siempre han tenido su mano tendida para ayudarme con todo, desde las pipetas hasta la ofimática, esenciales todas ellas para la consecución de este trabajo.

A los compañeros del laboratorio del Hospital Rafael Mendez de Lorca por su constante trabajo en la recolección y análisis de todas las muestras que hemos empleado para el estudio y como no a todos los pacientes que de forma altruista y generosa han querido contribuir con la investigación.

A mis amigos, los Nurses, las ADR, los TRT, las brujas y los Beniajaneros por todas aquellas veces que he dicho “No puedo ir, tengo que terminar la Tesis”, especialmente en los últimos meses, gracias siempre por hacerme reír, por animarme a seguir formándome y como no a todos aquellos que siempre me dijeron lo de “si es que a tí te encantan esos líos” porque en vuestras palabras siempre se atisban grandes expectativas con mi futuro como enfermera, investigadora y docente. No me olvido de mis queridas Claudia y Vanesa por también guiarme cuando lo he necesitado.

A todos mis compañeros de Reanimación de Hospital Morales Meseguer lo cuales siempre me han facilitado los cambios de turno cuando lo he necesitado para poder continuar con los estudios y por algunas largas guardias que les he hecho pasar al estar ensimismada delante del ordenador escribiendo sin darles mucha conversación.

A mis padres Santi y Antonio por educarnos a mi hermana, Patri, y a mí en ser buenas personas y profesionales, por no dejar nunca que nos acomodemos en estas profesiones tan complicadas, e instarnos cada día a ser mejores enfermera y médico. Ahora te toca a ti Patri, lo harás magnífico como todo lo que has propuesto, pronto serás doctora y te unirás al Club familiar de los doctores cuyo miembro más antiguo es mi querido cuñado Luis, el cual me engañó haciéndome creer que se podía jugar al *Fortnite* y escribir una tesis al mismo tiempo, siempre serás una inspiración para nosotros.

A ti María, por ser ese motor incansable en mi vida, en esta tesis y espero que para el resto de mis días. Eres mi mayor fuente de inspiración y la persona que siempre saca lo mejor de mí. Por todos esos días que me encontrado agobiada y siempre me has ayudado y gracias por compartir siempre tu excelencia con los que te rodean y por ayudarnos a ser igual de excelentes que tú, lo sabes, esto como todo lo demás, también es tuyo.

“The knowledge that you have emerged wiser and stronger from setbacks means that you are, ever after, secure in your ability to survive. You will never truly know yourself, or the strength of your relationships, until both have been tested by adversity. Such knowledge is a true gift, for all that it is painfully won, and it has been worth more than any I ever earned.”

J.K.Rowling

ÍNDICE



RESUMEN	1
OBJETIVOS	3
INTRODUCCIÓN	5
I.1. ASPECTOS GENERALES DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	5
I.2. CONTEXTO HISTORICO DE LA EII.....	8
I.3. EPIDEMIOLOGÍA	9
I.4. ETIOLOGÍA Y PATOGENIA	10
I.4.1. Inmunidad alterada.....	10
I.4.2. Factor genético.....	12
I.4.3. Infecciones	12
I.4.4. Microbiota intestinal.....	13
I.4.5. Nutrición	14
I.4.5. Factores ambientales	14
I.5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	15
I.5.1. Manifestaciones extraintestinales	17
I.6. DIAGNÓSTICO DE LA EII	19
I.6.1. Criterios clínicos	21
I.6.2. Pruebas de laboratorio, datos analíticos.....	21
I.6.2.1. Hemograma	22
I.6.2.2. Bioquímica	23
I.6.2.3. Serología	23
I.6.2.4. Muestra fecal	24
I.6.2.5. Otros biomarcadores de interés	26
I.6.3. Pruebas diagnósticas	28
I.6.4. Endoscopia	29
I.7. TRATAMIENTO DE LA EII.....	31
I.7.1. Aminosalicilatos.....	32
I.7.2. Corticoides	33
I.7.3. Inmunomoduladores.....	34

I.7.4. Agentes biológicos	34
I.7.5. Tratamiento quirúrgico.....	35
I.8. CLASIFICACIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD	36
I.9. NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	42
I.9.1. Metabolómica dirigida y no dirigida.....	44
I.10. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTOMETRÍA DE MASAS O ESPECTROMETRÍA DE MOVILIDAD IÓNICA	46
I.10.1. Espectrometría de masas.....	49
I.10.2. Espectrometría de movilidad ionica	54
I.12. BIBLIOGRAFÍA.....	60
CAPÍTULO 1: APLICACIONES NO DIRIGIDAS DEL PERFIL DE VOLÁTILES DE MUESTRAS DE SUERO EN LA INVESTIGACIÓN DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	74
1.1. INTRODUCCIÓN.....	75
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	78
1.2.1. Instrumentación y software.....	78
1.2.2. Estándares y reactivos	79
1.2.3. Muestras	79
1.2.4. Método del HS-GC-MS.....	81
1.2.5. Procesamiento de datos.....	81
1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	82
1.3.1. Optimización del método HS-GC-MS	82
1.3.2. Características metabólicas derivadas del análisis metabolómico no dirigido e identificación de picos	85
1.3.3 Modelos quimiométricos para la identificación de pacientes con EII	87
1.4. CONCLUSIONES	92
1.5. BIBLIOGRAFÍA.....	93

CAPÍTULO 2: ESPECTOMETRÍA DE MOVILIDAD IÓNICA PARA EL ESTUDIO METABOLÓMICO DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL MEDIANTE EL PERFIL DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES EN SUERO Y ORINA EN HUMANOS	97
2.1. INTRODUCCIÓN	98
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	100
2.2.1. Estándares y reactivos	100
2.2.2. Muestras	100
2.2.3. Instrumentación y software	103
2.2.4. Método HS-GC-IMS	104
2.2.5. Procesamiento de datos	104
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	105
2.3.1. Optimización del método HS-GC-IMS	105
2.3.2. Identificación de compuestos	109
2.3.3. Caracterización del método y cuantificación de los compuestos volátiles identificados	114
2.3.4. Modelos quimiométricos para clasificar las muestras según el diagnóstico de EII	118
2.4. CONCLUSIONES	124
2.5. BIBLIOGRAFÍA	125
CAPÍTULO 3: EVALUACIÓN DEL METABOLISMO DEL HIERRO, EL PERFIL DE LÍPIDOS Y LA DIGESTIÓN Y ESTADO NUTRICIONAL EN LA EII	128
3.1. INTRODUCCIÓN	129
3.2. MATERIAL Y METODOS	132
3.2.1. Población de estudio	132
3.2.2. Recopilación de datos y variables en estudio	134
3.2.3. Recogida y conservación de muestras	136
3.2.4. Procesamiento analítico de las muestras sanguíneas	137
3.2.5. Procesamiento analítico de las muestras de heces	137
3.2.6. Tratamiento de datos y software	139

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	139
3.3.1. Estudio del metabolismo del hierro en la EII.....	139
3.3.1.1. Estudio del hierro sérico.....	141
3.3.1.2. Estudio de la ferritina	143
3.3.1.3. Estudio del índice de saturación de la transferrina	144
3.3.1.4. Estudio de la hemoglobina	145
3.3.1.5. Estudio del volumen corpuscular medio	146
3.3.1.6. Estudio de la proteína C reactiva	147
3.3.1.7. Estudio del déficit de hierro, ferropenia y anemia.....	148
3.3.2. Estudio del perfil lipídico.....	151
3.3.2.1. Cálculo de índices de aterogenia	157
3.3.4. Estudio de la absorción y digestión a través de las heces	160
3.3.4.1. Digestión de los hidratos de carbono	160
3.3.4.2. Digestión de las proteínas.....	162
3.3.4.3. Digestión de las grasas.....	163
3.3.5. Aplicación del cribado CONUT como método rápido de detección de la desnutrición.....	164
3.3.5.1. Estudio de la CF y su correlación con el cribado CONUT.	167
3.4. CONCLUSIONES	168
3.5. BIBLIOGRAFÍA.....	170
CONCLUSIONES	175
ANEXOS	177
ABREVIATURAS	179
ÍNDICE DE TABLAS	183
ÍNDICE DE FIGURAS	185

RESUMEN



RESUMEN

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un trastorno inmunitario crónico y multifactorial caracterizado principalmente por la inflamación del intestino, que cursa con periodos de actividad y remisión disminuyendo la calidad de vida de los pacientes. En general, la EII engloba dos patologías diferentes: la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). Clínicamente, ambas enfermedades comparten síntomas similares, como diarrea sanguinolenta, dolor abdominal, debilidad y pérdida de peso; mientras que suelen diferir en las complicaciones y la prevalencia, así como en la localización y profundidad de la inflamación.

Actualmente el diagnóstico de la EII y sus diferentes entidades no es tarea sencilla, y este pasa por la observación de diferentes factores clínicos, histológicos, endoscópicos y analíticos siendo un proceso costoso, invasivo y lento.

En este aspecto, los recientes avances en la instrumentación analítica y las estrategias metabolómicas han jugado un importante papel en el estudio de la EII. En esta Tesis Doctoral se ha estudiado el perfil de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de pacientes con EII mediante aproximaciones metabolómicas no dirigidas con el objetivo de desarrollar modelos quimiométricos para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad. Los métodos serán aplicados en el análisis de orina y suero sanguíneo. La orina presenta ventajas como su fácil recogida, siendo una de las principales vías de excreción de metabolitos hidrosolubles y xenobióticos, mientras que el suero sanguíneo proporciona una visión general del metabolismo, aunque con un nivel de especificidad inferior en comparación con la orina.

En el Capítulo 1, se desarrollada una metodología basada en cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) para la monitorización del perfil de VOCs en suero. Además, se propone un análisis de espacio de cabeza (HS) como tratamiento de la muestra y sistema de introducción, evitando los procedimientos más complejos descritos hasta la fecha. El tratamiento quimiométrico consiste en un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA) que permite generar modelos de predicción útiles para la diferenciación entre pacientes con EII e individuos sanos sin EII.

En el Capítulo 2, se optimiza y valida un método basado en GC acoplada a la espectrometría de movilidad iónica (IMS) usando también inyección por espacio de cabeza para la determinación de los VOCs tanto en muestras de suero como orina. La IMS es una técnica analítica emergente cuyas aplicaciones en el campo clínico son cada

vez más frecuentes debido a sus múltiples ventajas frente a otras técnicas analíticas. La IMS realiza una separación bidimensional ya que los analitos se separan en función de su interacción con la columna GC y de su comportamiento de deriva bajo la influencia de un campo eléctrico, aumentando el poder de resolución y posibilitando la motorización de un mayor número de VOCs. Los VOCs determinados mediante GC-IMS se utilizan para la diferenciación entre pacientes con EII e individuos sanos, así como los diferentes estadios de la enfermedad (enfermedad activa o en remisión) mediante la creación de modelos basados en OPLS-DA. Además, se desarrolla de manera simultánea una estrategia dirigida que permite la cuantificación e identificación de volátiles en muestras biológicas de interés para determinar qué compuestos contribuyen en mayor medida a cada una de las clases de EII.

Los métodos desarrollados en ambos Capítulos podrían ser utilizados como una herramienta complementaria en el diagnóstico de la EII, evitando métodos invasivos de alto coste como la endoscopia.

Por otro lado, en esta Tesis Doctoral también se estudia y compara la malnutrición y la malabsorción de pacientes con EC o CU con la enfermedad activa o en remisión. Ambos síndromes afectan directamente a los pacientes EII provocando alteraciones en el metabolismo del hierro, en el perfil lipídico y en su estado nutricional.

Concretamente en el Capítulo 3 se evalúa el metabolismo del hierro, a través de los valores de hierro sérico, ferritina, índice de saturación de la ferritina, hemoglobina y volumen corpuscular medio. Los niveles de ferritina pueden aumentar en caso de inflamación causando un factor de confusión en los resultados obtenidos, por lo que en este estudio también se han evaluado de manera conjunta los niveles de proteína C reactiva (PCR). Para evaluar el perfil lipídico se investigan los parámetros de colesterol, triglicéridos, LDL y HDL, así como el riesgo aterogénico asociado a la enfermedad mediante el índice de Castelli. Finalmente, se realiza un estudio del estado nutricional a través de la observación microscópica de las heces y el cribado CONUT correlacionándolo con los niveles de calprotectina fecal (CF).

OBJETIVOS



OBJETIVOS

Los objetivos de esta Tesis Doctoral se enmarcan dentro de diversos Proyectos de Investigación desarrollados a lo largo del transcurso de este trabajo y que forman parte de las líneas de investigación que el grupo “Métodos Instrumentales Aplicados” ha ido desarrollando en los últimos años en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Murcia. Esta Tesis Doctoral ha sido desarrollada en colaboración con el Hospital Rafael Méndez de Lorca (Murcia).

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido proponer métodos de diagnóstico complementarios para la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y la detección temprana de las diferentes comorbilidades silenciosas de la enfermedad como son la ferropenia o la desnutrición.

Para ello se ha empleado la cromatografía de gases con inyección por espacio de cabeza acoplada (HS-GC) a la espectrometría de masas (MS) y la espectrometría de movilidad iónica (IMS) con el objetivo de monitorizar los compuestos volátiles orgánicos (VOCs) de suero y orina y usarlos para la clasificación de pacientes con EII con la enfermedad activa o en remisión y su diferenciación de los individuos sanos sin EII. Con el objetivo de detectar de manera temprana la ferropenia o la desnutrición se han analizado muestras de sangre y heces llevando a cabo un estudio del perfil metabólico del hierro y lípidos de los pacientes enfermos y se ha realizado un análisis de la digestión a través de la observación microscópica de las heces. Además, se ha usado la escala CONUT como método rápido y fiable de detección de la desnutrición.

Los objetivos específicos establecidos para la realización de esta Tesis Doctoral se estructuraron como se describe a continuación:

1. Selección de las muestras biológicas más apropiadas para llevar a cabo los análisis, ya que su naturaleza influirá directamente en los resultados obtenidos.
2. Búsqueda de voluntarios tanto individuos sanos como pacientes con EII para que participen en la investigación y en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.
3. Toma de muestras, recopilación de los historiales y datos clínicos de los voluntarios y creación de una base de datos con toda la información.
4. Optimización y validación de los métodos analíticos basados en HS-GC-MS y HS-GC-IMS para la monitorización de VOCs en las muestras biológicas seleccionadas.
5. Desarrollo de estrategias metabólicas no dirigidas para el análisis de los datos. Selección de los marcadores o las características más importantes para

- la creación de modelos quimiométricos que permitan la clasificación de las muestras.
6. Desarrollo de una estrategia metabolómica dirigida que de manera simultánea a la no dirigida permita la cuantificación e identificación de VOCs en las muestras biológicas de interés para determinar qué compuestos contribuyen en mayor medida a cada una de las clases de EII (pacientes con EII activa, EII en remisión o voluntarios sanos).
 7. Detección a través de muestras de sangre de posibles alteraciones en el metabolismo del hierro o el perfil lipídico en los pacientes con EII.
 8. Estudio de la absorción digestiva en pacientes con EII a través de la visualización microscópica de las heces.
 9. Aplicación de la escala CONUT de detección de la desnutrición en pacientes no hospitalizados y estudio de su relación con parámetros de inflamación intestinal como la calprotectina fecal (CF).

INTRODUCCIÓN



I.1. ASPECTOS GENERALES DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

El concepto de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) comenzó a emplearse en la primera mitad del siglo XX, por lo que es considerada una enfermedad de reciente diagnóstico. La EII es un trastorno inflamatorio autoinmune que afecta al tracto digestivo y cuya etiología es desconocida, si bien se sabe que hay un factor de predisposición genética para desarrollar la enfermedad y que ciertos factores ambientales intervienen en el desarrollo de esta patología.

Esta enfermedad es inmunomediada y cursa por brotes, es decir, el paciente tendrá periodos de inactividad o remisión de la enfermedad y otros periodos con la enfermedad activa en la que los pacientes muestran los síntomas típicos asociados a la EII, como son el dolor abdominal, hemorragia, diarrea o anemia. Este curso discontinuo de la enfermedad afecta a la calidad de vida de los pacientes tanto física como psicológicamente y por ello el diagnóstico temprano de la enfermedad y su seguimiento es esencial para hallar una estrategia terapéutica adecuada.

Dentro de la EII se diferencian dos entidades, la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). Además, existe otra entidad de la EII que afecta a menos del 5% de los pacientes, y cuyos criterios diagnósticos tanto radiológicos, como clínicos o endoscópicos no coinciden ni con la EC ni con la CU, por lo que recibe el nombre de colitis no clasificada [1].

- **Enfermedad de Crohn.** Es una patología que puede afectar a cualquier tramo gastrointestinal, desde la boca hasta el ano, afectando principalmente al íleon (30% de los pacientes), o al intestino grueso o colón (20 - 25% de los pacientes). La EC se describe como una enfermedad discontinua ya que afecta de manera alterna o parcheada a diferentes zonas, encontrando áreas inflamadas y áreas sanas (Figura I.1). Las capas de la mucosa intestinal podrán afectarse de diferentes maneras dependiendo de la gravedad de la inflamación y de la profundidad. La EC puede afectar a cualquiera de las tres capas (de dentro a fuera mucosa, submucosa y serosa) en su profundidad y por esta razón se le denomina afectación transmural [2].
- **Colitis Ulcerosa.** Afecta solamente al colon, desde tramos distales hasta los más proximales, provocando una inflamación difusa en su mucosa. La aparición de la CU está altamente relacionada con el desarrollo del cáncer de colon y las principales manifestaciones clínicas son la diarrea sanguinolenta y/o con moco,

dolor abdominal y pérdida de peso. Las complicaciones potencialmente mortales en la CU son la colitis fulminante y el megacolon tóxico (Figura I.2) [1].

ENFERMEDAD DE CROHN

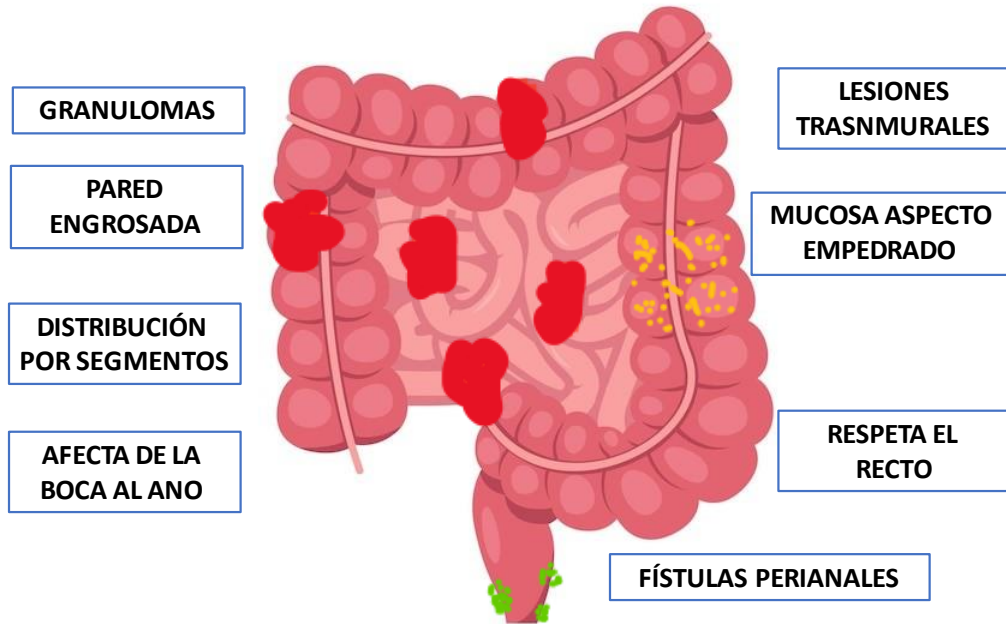


Figura I.1. Esquema de afectación de la EC.

COLITIS ULCEROSA

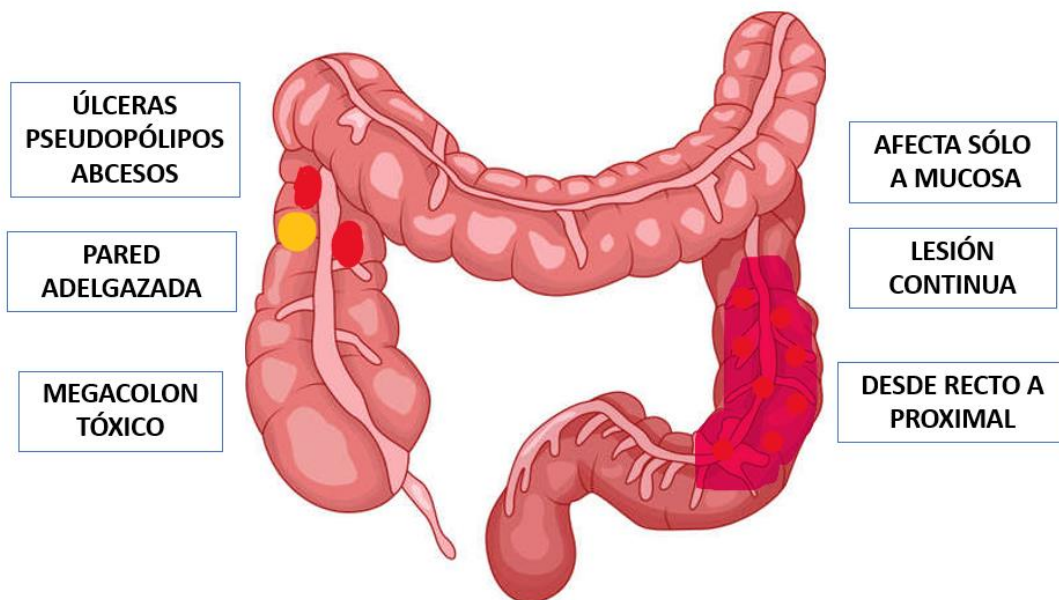


Figura I.2. Esquema de afectación de la CU.

Tanto la EC como la CU pueden presentarse a cualquier edad, aunque hay dos rangos de edad donde la aparición de la enfermedad es más frecuente, entre los 20-40 años y entre los 50-70 años [1,3,4]. Cabe destacar, que actualmente se encuentra una prevalencia más elevada de la EII en los países industrializados, que coincide con el progreso en la medicina y las nuevas técnicas diagnósticas. El aumento del número de pacientes diagnosticados con EII supone además un gran impacto socioeconómico en los sistemas de salud, por el aumento de las listas de espera para la realización de pruebas diagnósticas, y por el tratamiento y seguimiento de la enfermedad, lo que supone un gasto sanitario incrementado [4].

El método de diagnóstico **Gold estándar** para la EII es la endoscopia junto con biopsia, que determinan el estado de la mucosa intestinal y permite diagnosticar diferencialmente entre EC y CU. Existen otros marcadores analíticos, como la calprotectina fecal (CF), la proteína C reactiva (PCR) o la velocidad de sedimentación glomerular (VSG), que junto con las pruebas de imagen permiten guiar hacia un diagnóstico y seguimiento de la enfermedad. La endoscopia es un método invasivo que conlleva muchos riesgos, no solo los intrínsecos de la propia técnica como podría ser una perforación o sangrado sino los propios de la sedación o anestesia que en muchas ocasiones precisan los pacientes para someterse a esta técnica. Por esta razón no se pueden realizar con regularidad.

El tratamiento de la enfermedad se basa en el control de los síntomas y de la actividad inflamatoria mediante fármacos antiinflamatorios, además de corticoesteroides, inmunomoduladores o fármacos biológicos, en el caso de EII moderada o severa. La dieta también juega un papel muy importante en estos pacientes por los déficits de absorción que provoca la enfermedad debido a la inflamación del intestino, principalmente en la población pediátrica, pero no es atípico encontrar adultos que padecen la enfermedad con déficits vitamínicos y/o pérdida de peso o anemia que precisan de suplementos vitamínicos y nutricionales.

Con el fin de entender y comprender mejor la EII, es conveniente aclarar los siguientes términos:

- **Severidad.** Hace referencia a la gravedad de la enfermedad, se escala de acuerdo con diferentes índices clínicos y refleja el estado sintomático del paciente.
- **Actividad.** Viene determinada por la extensión y grado de la afectación morfológica, clínica, estado nutricional y/o serológico.

- **Recurrencia.** Se refiere a aparición de la enfermedad de nuevo. Este término se emplea más habitualmente tras resecciones quirúrgicas.
- **Recidiva o activa.** Se refiere a la aparición de síntomas de la enfermedad después de un periodo de remisión o inactividad.
- **Remisión.** Hace referencia a la desaparición clínica, histológica o endoscópica de la enfermedad.
- **Refractariedad.** Se refiere a la poca o nula respuesta de la enfermedad al tratamiento médico.

I.2. CONTEXTO HISTORICO DE LA EII

Las primeras descripciones de la EC datan de 1769, cuando el médico italiano Dr. Morgagni relató modificaciones intestinales en la autopsia de un joven que sufría diarrea y debilidad. En los siglos posteriores, diversos médicos y cirujanos fueron describiendo pacientes con los mismos signos y síntomas, pero no fue hasta 1931 cuando el gastroenterólogo Dr. Burril Bernard Crohn, identificó la enfermedad que ahora lleva su nombre. El Dr. Crohn trabajaba en el hospital neoyorquino Mount Sinaí, un centro médico que en aquella época atendía a gran parte de la población judía de la ciudad, una población que presenta una mayor incidencia de la enfermedad, según se ha demostrado actualmente. Sin embargo, no fue hasta la década de los sesenta cuando se empleó de manera oficial el término de "Enfermedad de Crohn", donde el Dr. Lockhart-Mummery y el Dr. Morson la describieron como una enfermedad que podía afectar a cualquier tramo del aparato digestivo [5,6].

Por su parte la CU fue por primera vez descrita como una diarrea no contagiosa en el siglo XVIII afectando al príncipe Carlos III de Inglaterra y Escocia. Un siglo después, en 1859, el Dr. Samuel Wilks describió por primera vez la enfermedad al realizarle la autopsia a una mujer. Tras años de estudio de la enfermedad y de aportaciones muy detalladas sobre su clínica y patología, otros investigadores como Allchin o Hale-White establecieron como diferenciarla de otras entidades. En 1909, en la Real Sociedad de Medicina Británica se presentaron 300 casos de CU y en los 30 años posteriores se terminó de describir y delinear la enfermedad. Las causas de la CU a lo largo de la historia han ido cambiando desde una etiología infecciosa o alérgica hasta psiquiátrica en la primera mitad del siglo XX [5].

I.3. EPIDEMIOLOGÍA

La EII afecta de manera indistinta a hombres y mujeres. La edad de padecer la enfermedad tiene una distribución bimodal de manera que hay un pico de diagnóstico en pacientes entre los 20 y los 40 años y otro segundo pico de aparición de la enfermedad entre los 50 y los 70. Tanto la incidencia como la prevalencia de la enfermedad se ha visto aumentada mundialmente en las últimas dos décadas, afectando principalmente a los países industrializados [2]. Si bien es cierto que en otros continentes y países en los que los recursos sanitarios y económicos son menores puede que la enfermedad este infradiagnosticada, debido al elevado coste de los instrumentos diagnósticos o quizás esta diferencia en la prevalencia se deba a factores ambientales [1].

La prevalencia más alta, por tanto, se encuentra en los países y continentes más desarrollados, como son Europa (322/100.000), Canadá (319/100.000) y EE. UU. (214/100.000) [4]. Un estudio realizado en 2017 por la Dra. Chaparro et al. reveló que en España se diagnostican 10.000 nuevos casos al año de EII (Figura I.3) [4,5]. Además, dicho estudio reveló que el 10% de los pacientes con EII había necesitado ser intervenido quirúrgicamente y un 23% precisó ingreso hospitalario en su primer año de diagnóstico. El 70% de estos ingresos fueron con el brote de debut de la enfermedad [6].



Figura I.3. Incidencia de EII España en 2017 [6].

I.4. ETIOLOGÍA Y PATOGENIA

Actualmente la etiopatogenia de la EII sigue sin estar del todo clara, los últimos estudios y la evidencia actual sostienen que se trata de una enfermedad multifactorial en la que no solo intervienen factores inmunológicos, sino también genéticos, ambientales y cada vez más dietéticos. Todos estos factores producen un desequilibrio en la homeostasis a nivel gastrointestinal produciendo la enfermedad [1-5].

I.4.1. Inmunidad alterada

La EII es una enfermedad que se desarrolla por una disfunción del sistema inmunitario. En condiciones normales, la acción de la propia flora intestinal y de la nutrición hace que el intestino posea una gran carga antigénica. La gran mayoría de las bacterias son comensales, es decir, inocuas y además producen grandes beneficios ya que facilitan la digestión impidiendo que otras bacterias patógenas invadan el organismo [7].

La respuesta inmunológica del intestino esta mediada tanto por el sistema inmune innato y el adaptativo. El innato es considerado la primera barrera intestinal, su principal función es la detección tanto de patógenos como de toxinas, el sistema inmune innato por tanto son células presentadoras de antígenos. Los tipos celulares por los que está compuesta son:

- **Células epiteliales o de Paneth.** Detectan patógenos y secretan lisozimas y defensinas que actúan frente a agentes patógenos y regulan las bacterias comensales.
- **Células epiteliales diferenciadas tipo M.** Se encargan de reconocer a los patógenos.
- **Neutrófilos fagocíticos y macrófagos.**

Por otro lado, el sistema inmune adaptativo da respuesta específica inmunitaria a consecuencia de la información recibidas por las células presentadoras de antígenos. Está conformado por **linfocitos T, linfocitos B y células dendríticas** que activan los linfocitos T permitiendo conectar la inmunidad innata con la adaptativa, dando así una respuesta inmune celular (Th1) o humoral (Th2) y bacteriana (Th17), tal y como se puede apreciar en la Figura I.4 [8].

Todas estas células son las que deben dar una respuesta protectora e inmunomediada frente a los antígenos y ser capaces de distinguir entre comensales y patógenos [9]. Los últimos estudios indican que la EII se produce cuando el sistema

inmunitario produce una respuesta inadecuada de estas células frente a bacterias que son beneficiosas para el organismo [7].

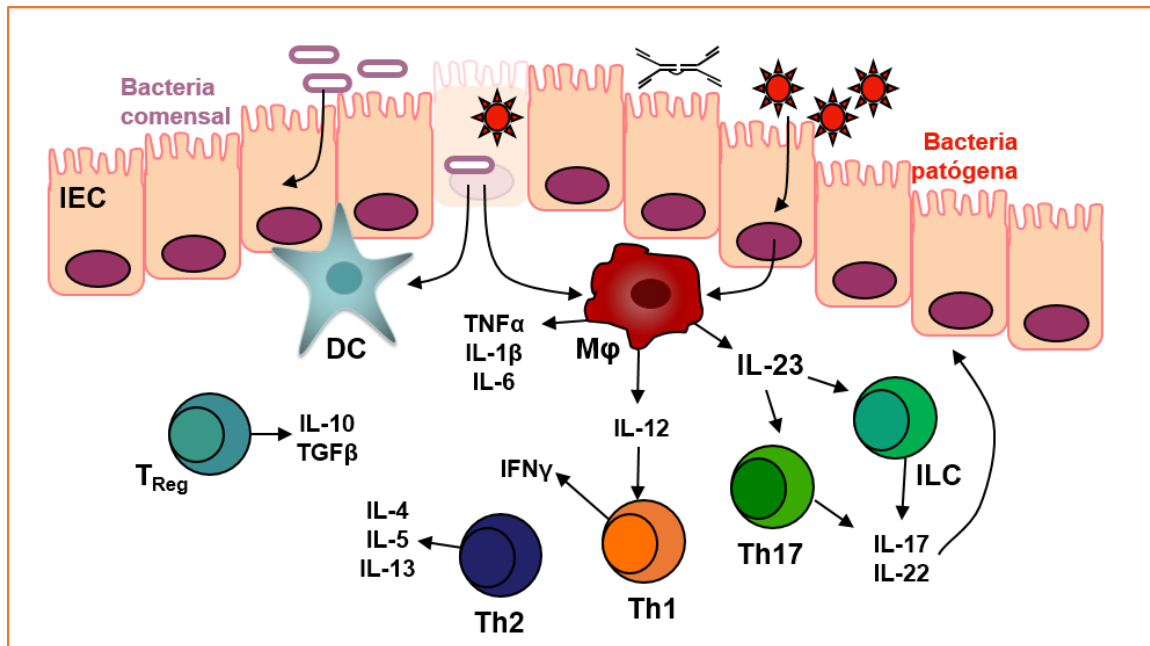


Figura I.4. Poblaciones celulares clave y mediadores de la homeostasis del intestino y patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal [7]. DC: células dendríticas, IEC: células del epitelio intestinal, ILC: células linfoides innatas, Mφ: macrófagos, sIgA: Inmunoglobulina A secretada, Th: células T helper, Treg: célula T reguladora.

El desencadenante para desarrollar EC o CU puede ocurrir por una disfunción en cualquier punto de la cadena inmunitaria. Algunos estudios han demostrado una disminución de la actividad de las células de Paneth que podría producir un desequilibrio de las citoquinas, y una colonización de bacterias patógenas que mantendrían una activación inmunológica constante e inadecuada contribuyendo así a la aparición de la EC [10]. Otros estudios también han mostrado que podría ocurrir una respuesta atípica de los linfocitos Th1 que podría favorecer la aparición de la CU [11].

Actualmente, existe la evidencia científica del papel fundamental de las citoquinas en esta cascada inmunológica. La citoquina TNF-α (Factor de Necrosis Tumoral) es directamente segregada por linfocitos T, macrófagos y monocitos como respuesta a la inflamación de la mucosa, siendo su concentración elevada en pacientes con EII [6,7, 10-12]. Este hecho ha fundamentado el uso de terapias biológicas anti-TNF para los pacientes con EII, ya que protege la barrera intestinal y disminuye la apoptosis del epitelio.

I.4.2. Factor genético

En las últimas dos décadas se han producido grandes avances en la detección de polimorfismos en diferentes genes que actúan en la respuesta inmunológica de la EII, demostrando la susceptibilidad genética de los individuos para desarrollar EII. Una de estas alteraciones ha sido encontrada en el gen NOD2/CARD15 en el cromosoma 16 y que ha sido ligado a la aparición de EC [13]. Este descubrimiento supuso un gran avance en la patogenia de la EII poniendo en relieve la importancia de la inmunidad innata en los pacientes que padecen EC [14]. Otros estudios que han aportado valiosa información sobre el factor genético de la EII son los GWAS (*Genome-wide association studies*, estudios de asociación del genoma), cuyos descubrimientos han permitido ver que células y recorridos biológicos participan en la evolución de la EII y su fenotipo [15]. Además, estos estudios han permitido relacionar la EII con otras enfermedades inmunomediadas como la diabetes mellitus tipo 1, la artritis reumatoide, psoriasis, espondilitis anquilosante o celiaquía con las que comparten locus [8,16].

El estudio de Subra Kugathasan publicado en 2006 sobre la heredabilidad de la enfermedad concluye que la probabilidad de transmisión de progenitores a hijos es de un 9,2% para al EC y un 6,2% para la CU. Si los dos progenitores tienen EII la probabilidad ascendería hasta un 30%. Para gemelos monocigóticos la concordancia de EC es del 37,3% y del 10% para CU [17].

I.4.3. Infecciones

La presencia de diferentes bacterias y su relación con la aparición de la EII también ha sido investigada. Algunos estudios relacionan la infección por *Mycobacterium paratuberculosis*, *Pseudomonas* o algunas especies de *Listeria*, con la aparición de la enfermedad [18,19]. La presencia de *Echerichia coli* también se ha investigado en los enfermos de EII, demostrando que los pacientes con EC, principalmente con afectación en íleon, presentan una gran cantidad de cepas de esta bacteria en comparación con otros pacientes sanos. Dichos patógenos son altamente resistentes y replican en los macrófagos provocando altos niveles de TNF- α como respuesta a la propia infección [20,21].

También se ha relacionado la gastroenteritis aguda con la EII, y es que, según los estudios de García Rodríguez et al., durante el primer año tras la infección hay mayor riesgo de desarrollar la EII [22,23].

I.4.4. Microbiota intestinal

El microbiota intestinal es el conjunto de microorganismos que se alojan en el intestino. Existen alrededor de 3.500 especies de estas bacterias, siendo mayor la proporción de bacterias que de células eucariotas del propio individuo. Este microbiota resulta imprescindible para el sistema inmunitario del intestino, la absorción de nutrientes y el metabolismo energético [24-26].

Aunque aún queda mucho por investigar sobre la influencia del microbiota intestinal en la patogenia de la EII y poder confirmar la relación de causa-efecto, la vinculación de la EII con una alteración de la flora intestinal está sustentada por varios argumentos fisiológicos, como la propia estructura de la mucosa, el desarrollo inmunitario, la motilidad intestinal, o el recambio celular [27-29].

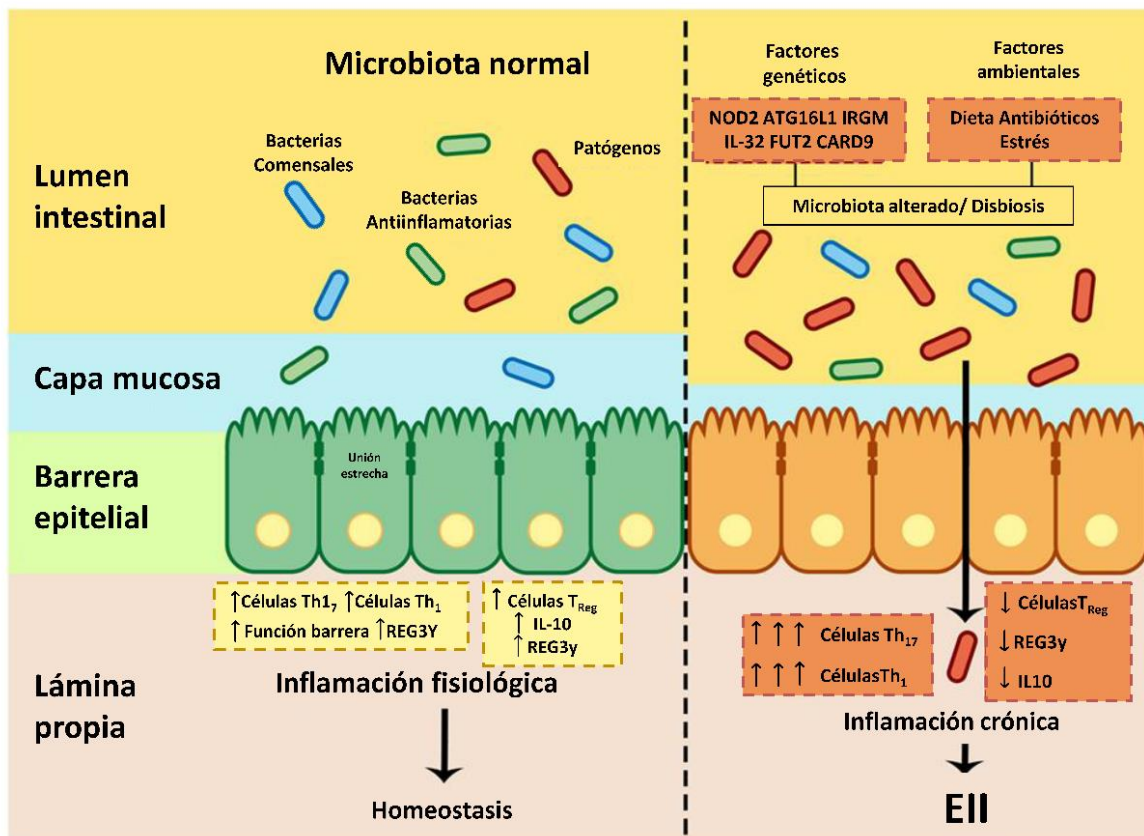


Figura I.5. Microbiota intestinal y disbiosis en EII [30].

Además, la EII afecta predominantemente a colon e íleon que son los lugares de mayor exposición bacteriana (Figura I.5) [31,32]. En condiciones normales, en el microbiota intestinal hay presentes más especies comensales que patógenos. Cuando se produce un desequilibrio de esta composición se produce una disbiosis. La disbiosis puede alterar la barrera intestinal incluso con inflamación, en algunos pacientes con EC [33].

I.4.5. Nutrición

La nutrición y los hábitos dietéticos han supuesto en los últimos años una fuente de investigación para determinar las causas y evolución de diferentes enfermedades, ya que la presencia o exceso de ciertos alimentos pueden ser la causa o consecuencia del desarrollo de diferentes patologías.

El estudio de la nutrición en la EII no ha dejado de ser una excepción en la incesante búsqueda de la etiología de la enfermedad, aunque hasta la fecha aún no se han encontrado evidencias sobre si ciertas dietas o alimentos conducen a la aparición de la enfermedad. En 2020, la Sociedad Europea para nutrición clínica y metabolismo (ESPEN) recomendó que una dieta rica en frutas y verduras, o la leche materna en recién nacidos disminuyen el riesgo de desarrollar EII [34]. Por otro lado, diferentes estudios han descrito que los pacientes con EII tienen un patrón de consumo de energía parecido al del ayuno prolongado, provocando una disminución en la oxidación de carbohidratos, un aumento de la lipólisis y un consumo de la grasa de reserva, tanto en pacientes con la enfermedad activa como en remisión [35]. En los últimos años, también se ha evaluado la relación de la enfermedad con una deficiencia de vitamina D aunque hasta el momento no se ha podido demostrar su relación [36].

I.4.5. Factores ambientales

Otra de las teorías que más fuerza han cobrado en los últimos años es la influencia de los factores ambientales en el desarrollo de la EII, el consumo de tabaco, medicación, alimentos, la calidad del aire, el sedentarismo y el estrés.

El consumo de tabaco ha sido el factor más estudiado el desarrollo de la EII hasta la fecha, aunque los resultados han sido muy discordantes, ya que se ha demostrado que el consumo de tabaco es un factor de riesgo para sufrir EC, además de aumentar las complicaciones postoperatorias de los pacientes, pero se considera un factor protector para el desarrollo de la CU [37-39]. Otros estudios han descrito una disminución de los brotes en pacientes que habían dejado el tabaco, alcanzando niveles muy parecidos a los de los no fumadores [40]. Es por ello, por lo que cada vez más en las consultas de EII se está introduciendo a los pacientes en programas de deshabituación del tabaco.

Otro factor que presenta una alta fuerza de asociación es la apendicetomía, ya que ha demostrado aumentar el riesgo de CU [41-42].

Hasta la fecha, hay pocas evidencias de la influencia de los fármacos en el desarrollo de la EII, aunque se ha evaluado el efecto del uso de los antibióticos como factor de riesgo, ya que su uso altera el microbiota intestinal produciendo un desequilibrio de la homeostasis. Concretamente, el uso de antibióticos durante el primer año de vida se ha relacionado con la aparición de EC [43]. El uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) como factor de riesgo de la EII también es controvertido, aunque se ha observado que estos medicamentos pueden agravar la CU, no existe suficiente evidencia científica como para afirmar que su uso puede contribuir al desarrollo de la EII [44]. Por otro lado, el uso de anticonceptivos orales también se ha asociado con un mayor riesgo de padecer EII [45].

El aumento de la incidencia de la EII en los países industrializados ha guiado a los científicos a estudiar la calidad del aire y ver su correlación con el desarrollo de la enfermedad. Kaplan et al. describieron que niveles altos de NO₂ (dióxido de nitrógeno) y SO₂ (dióxido de azufre) en el aire se relacionan directamente con el riesgo de padecer tanto CU como EC [46].

El sedentarismo es otros de los factores que podría estar relacionado con el desarrollo de EII, principalmente en mujeres. Un estudio prospectivo evaluó el riesgo de desarrollar EC y CU en mujeres y resultó ser el doble para las mujeres sedentarias [47].

Aunque se ha informado de acontecimientos vitales estresantes relacionados con la aparición de la EC, la gran mayoría de los estudios sugieren que el estrés afecta principalmente a la evolución de la enfermedad al exacerbar los síntomas primarios y sugieren una asociación estrés-síntoma con este trastorno [41,48]. La enfermedad en sí misma puede empobrecer directamente la calidad de vida (cansancio, tratamiento médico, esfuerzo físico, etc.) o puede favorecer la aparición de situaciones estresantes, como el malestar prolongado, las estancias repetidas en el hospital, los procedimientos diagnósticos intrusivos, la pérdida de tiempo, los problemas laborales o problemas psicoafectivos entre otros.

I.5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La sintomatología clínica en la EC juega un papel fundamental para facilitar el diagnóstico de la propia enfermedad, aunque al afectar a cualquier tramo del aparato digestivo su clínica puede ser muy variada. En pacientes con afectación a nivel de intestino delgado o colon la clínica fundamental será diarrea, dolor abdominal o pérdida de peso, sin embargo, si la afectación es proximal, se encontrarán aftas o dolor bucal, y

epigastralgia. El cuadro de aparición típico es el dolor abdominal, la pérdida de peso y la diarrea de semanas de evolución en personas jóvenes. Estos cuadros pueden ir acompañados de otros síntomas típicos pero inespecíficos de la enfermedad como la fiebre, el dolor articular o la fatiga.

La causa de la diarrea es multifactorial, desde el sobrecrecimiento de bacterias, el déficit de absorción o malabsorción de sales minerales o incluso provocada por la propia inflamación intestinal. Sin embargo, cabe destacar que la diarrea y la rectorragia, es más común a la CU ya que afecta directamente a este último tramo del intestino [21,23], mientras que el dolor abdominal y la pérdida de peso son más propias de la EC. El dolor abdominal tiene una casuística similar a la diarrea, siendo más característico el dolor epigástrico cuando la EC afecta al tracto digestivo superior [24]. La pérdida de peso viene dada por el aumento del catabolismo por la actividad inflamatoria, la malabsorción intestinal y la disminución de la ingesta típica de los pacientes con EII, para evitar vómitos y diarreas tras la ingesta. Los pacientes con EC también pueden presentar ferropenia, anemia, astenia, distensión abdominal, estreñimiento o malnutrición [48].

Otra de las formas más comunes de manifestación de la EC es la enfermedad perianal, que cursa con la aparición de fistulas y abscesos a este nivel. Dicha afección aparece de forma recurrente aumentando el número de intervenciones quirúrgicas y disminuyendo la calidad de vida del paciente. En ocasiones también se pueden producir cuadros de obstrucción intestinal en pacientes con afectación ileal estenosante [49].

Por su parte la CU tiene manifestaciones clínicas muy parecidas a la EC, pero al afectar tan solo al intestino grueso, presenta una sintomatología más específica de esta parte del intestino. Los síntomas típicos incluyen el sangrado rectal y el tenesmo defecatorio alterando incluso el descanso nocturno. Cuanta más extensión de colon se halle afectada más se agravan estos síntomas.

Los pacientes con CU refieren dolor abdominal tipo cólico, que cesa tras la evacuación intestinal, habitualmente acompañada de sangre y mucosidad. Debido a esta pérdida de sangre, sobre todo en brotes activos de la enfermedad, se suele detectar también ferropenia, anemia, y fatiga. Además, son típicos otros síntomas como la taquicardia, la pérdida de peso, la falta de apetito, la disminución de la ingesta y la malnutrición, algunos de ellos comunes en la EC [50].

La Figura 1.6 resume las características y síntomas más comunes de la EC y la CU. Cabe destacar, que una de las complicaciones y manifestaciones de debut típica en los pacientes con CU, que afecta casi al 15% de los pacientes, es el megacolon tóxico,

especialmente en los pacientes más jóvenes [49], mientras que en el caso de la EC también aparece la hemorragia digestiva baja o la perforación colónica.

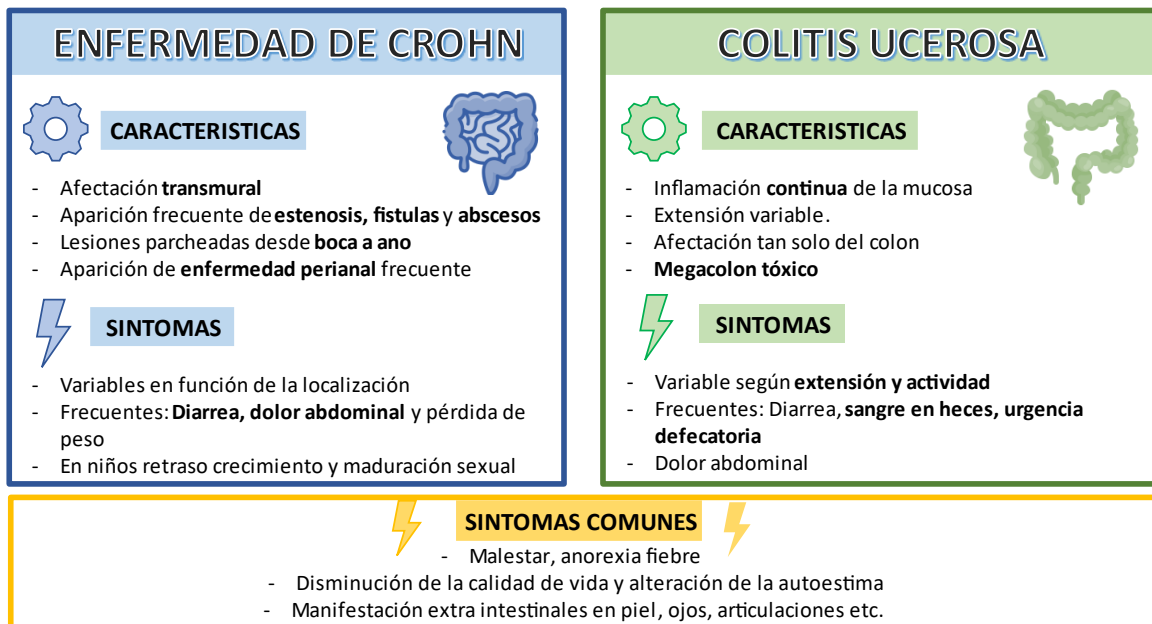


Figura I.6. Características y síntomas de la EII.

I.5.1. Manifestaciones extraintestinales

Las manifestaciones extraintestinales adquieren un gran impacto en los pacientes con EII, ya que se estima que hasta el 30% de los pacientes con EII padecerá alguna de ellas [50], y estas deben ser tratadas de manera conjunta a esta enfermedad. En ocasiones, estas manifestaciones extraintestinales son las manifestaciones de debut de una EII, y a veces, ante la ausencia de clínica digestiva, pueden abrir la ventana hacia un diagnóstico certero de EII.

Las principales manifestaciones extraintestinales son articulares, dermatológicas, oftálmicas, orales y osteopáticas entre otras:

- **Manifestaciones articulares.** Los problemas articulares asociados a la EII se dividen en artropatía axial y periférica. La periférica tipo I, afecta a articulaciones de mayor importancia como son las rodillas, hombros o los codos. Mientras que la artropatía periférica tipo II afecta principalmente a articulaciones más pequeñas como puede ser la mano [51]. La artropatía axial como la sacroileitis y la espondilitis afecta principalmente a pacientes con EC (entorno a un 4-50% de los pacientes), especialmente la espondilitis anquilosante [49]. Este tipo de manifestaciones extraintestinales es de complicado diagnóstico en muchas ocasiones para los facultativos, ya que muchas de ellas son propiamente

provocadas por el uso de fármacos. Actualmente las enfermedades articulares y reumatoideas asociadas a la EII son una de las investigaciones diana de la enfermedad, destacando el reciente estudio de Ferreira et al. en el que relaciona una elevación de los anticuerpos anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) con la espondiloartritis derivada de la EII [52].

- **Manifestaciones óseas.** Los pacientes con EII tienen mayores probabilidades de padecer tanto osteopenia como osteoporosis, con una incidencia del 2-30% y del 40-50%, respectivamente. Además, estas enfermedades pueden agravarse debido al uso de corticoides, nutrición artificial u otros fármacos. Esta afectación es especialmente sensible en poblaciones de EII más jóvenes, pudiendo afectar directamente al crecimiento, y siendo a veces la única manifestación de la EII en a estas tempranas edades [53].
- **Manifestaciones cutáneas.** Las manifestaciones cutáneas más frecuentes son el eritema nodoso o pioderma gangrenoso que afecta aproximadamente entre 5 y el 10% de los pacientes con EC. Son fáciles de diagnosticar y frecuentemente aparecen en fases activas de la enfermedad. Otros trastornos cutáneos como el síndrome de Sweet también son característicos de la EC. La Figura I.7 muestra un ejemplo de las manifestaciones cutáneas derivadas de la EII.
- **Manifestaciones oculares.** La uveítis y la escleritis son inflamaciones de las capas del ojo ocular, úvea y esclera, respectivamente. Ambas suelen presentar un déficit de la visión, dolor de ojo e intolerancia a la luz o fotofobia.
- **Manifestaciones trombóticas.** Aún se desconoce la causa, pero los pacientes con EII presentan un mayor riesgo de sufrir accidentes tromboembólicos [49,50]. Estos trombos, que se forman a nivel venoso y/o arterial, pueden suponer una urgencia médica cuando viajan hasta pulmones o arterias cerebrales, produciendo tromboembolismo pulmonar o ictus.



Figura I.7. Manifestaciones cutáneas: Síndrome de Sweet (a la izquierda) y pioderma gangrenoso (a la derecha).

- **Manifestaciones hepatobiliares.** La colangitis esclerosante o la hepatomegalia pueden aparecer como manifestaciones en la EII, afectando entorno al 2% de los pacientes. Además, también pueden agravarse por el uso de corticoides y la malnutrición [49-51].

I.6. DIAGNÓSTICO DE LA EII

A principios de la década de los 80, para el diagnóstico de la EII se usaban los criterios de Lennard-Jones, que incluían criterios clínicos, radiológicos y endoscópicos y que permitían valorar si un paciente padecía tanto EC como CU. Estos criterios se recogen en la Tabla I.1.

Actualmente el diagnóstico de las diferentes entidades de la EII no es tarea sencilla, ya que no existe un criterio que de manera aislada asegure su diagnóstico y este pasa por la observación de diferentes factores clínicos, histológicos, endoscópicos y analíticos [54].

Tabla I.1. Criterios de Lennard-Jones para el diagnóstico de la EII [56].

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS	COLITIS ULCEROSA	ENFERMEDAD DE CROHN
Clínicos	Rectorragia, diarrea crónica, dolor abdominal, manifestaciones extraintestinales.	Dolor abdominal recurrente, diarrea, pérdida de peso, masa abdominal, fiebre o febrícula, enfermedad perianal, fístulas, manifestaciones extraintestinales.
Diagnósticos	Mucosa granular, úlceras espiculares, pseudopólipos. Estrechamiento de la luz, acortamiento del colon, pérdida de haustración.	Úlceras aftoides, lineales o en espina de rosal, úlceras longitudinales, pólipos inflamatorios, edema de las válvulas conniventes. Estenosis, dilatación, fístulas, asimetría de las lesiones.
Endoscópicos	Mucosa eritematosa, granular, edematosa y/o friable, exudado o ulceraciones, hemorragia al roce o espontánea. Pólipos y pseudopólipos. Afectación mucosa continua. Lesión casi constante del recto.	Colon: aftas, ulceraciones lineales profundas o serpinginosas, aspecto en empedrado, estenosis, orificios fistulosos, pseudopólipos y pólipos; lesiones característicamente segmentarias, de extensión variable con recto mayoritariamente preservado. Íleon: aftas, úlceras, estenosis.
Anatomo-patológicos	Mayores: inflamación exclusiva de la mucosa, úlceras superficiales, distorsión de las criptas, microabscesos, depleción de las células caliciformes. Menores: infiltrado inflamatorio crónico, aumento de la vascularización mucosa, metaplasia de las células de Paneth, atrofia mucosa, hiperplasia linfoide.	Mayores: inflamación transmural, granulomas no caseificantes, agregados linfoides sin centro germinal. Menores: inflamación de carácter discontinuo, inflamación de la submucosa con arquitectura epitelial conservada, retención de moco con inflamación crónica, fisuras.
Enfermedad definida	Dos criterios	Granulomas y otro criterio o no granulomas y tres criterios.
Enfermedad probable		Dos criterios sin granulomas.

I.6.1. Criterios clínicos

Una correcta y profunda anamnesis del paciente y la recogida de las manifestaciones clínicas es esencial para guiar al facultativo en el diagnóstico de la EII y valorar la evolución de la enfermedad. Esta información detallada puede ser recogida por el médico o registrada por enfermería desde atención primaria, hospitalización y también desde consultas de EII. Las manifestaciones clínicas a tener en cuenta a la hora de diagnosticar la EII son el sangrado rectal, dolor abdominal, diarrea, pérdida de peso, síntomas perianales, especialmente en la EC, y también manifestaciones extraintestinales.

La Tabla I.2 muestra las manifestaciones clínicas típicas de la EC y CU. Ante la presencia de alguna o varias de estas manifestaciones se inicia la sospecha de un posible diagnóstico de EII, aunque la presencia de ellas por si solas no son suficientes para el dictamen de la enfermedad, y habrá que apoyarse en otros datos y pruebas para una conclusión definitiva.

Tabla I.2. Manifestaciones clínicas de la EC y la CU.

CLÍNICA	COLITIS ULCEROSA	ENFERMEDAD DE CROHN
<i>Sangrado rectal</i>	Frecuente	Raro
<i>Diarrea</i>	Intensa	Moderada
<i>Moco o pus en heces</i>	Frecuente	Raro
<i>Dolor abdominal</i>	Infrecuente	Frecuente
<i>Pérdida de peso</i>	Leve	moderada
<i>Masa abdominal</i>	Rara	Frecuente
<i>Lesiones anales</i>	Infrecuente	Frecuente

I.6.2. Pruebas de laboratorio, datos analíticos

De las muestras de sangre, orina y heces de un paciente sospechoso de EII se puede obtener valiosa información que guiará hacia el diagnóstico definitivo. Por ello, se debe solicitar una analítica completa que incluya valores bioquímicos y que permita observar los iones del paciente y valorar la función renal, el estado nutricional, la inflamación o en metabolismo férrico. Si bien es cierto, que como se ha mencionado anteriormente, la normalidad de valores en estas determinaciones no excluye del diagnóstico al paciente.

I.6.2.1. Hemograma

El análisis de un hemograma completo (siendo posible encontrar alteraciones en las tres series, con leucocitosis, anemia y trombocitosis reactiva), así como determinación de la VSG son factores importantes a tener en cuenta en el diagnóstico de la EII.

La VSG mide la velocidad a la que sedimentan los glóbulos rojos en el tubo capilar. En presencia de reactantes de fase aguda e inflamación, la VSG aumenta, y aunque este comportamiento no es específico de una inflamación a nivel de aparato digestivo, puede ser útil en el diagnóstico de la EII y también durante la monitorización de la enfermedad para distinguir entre periodos de actividad y remisión. Por tanto, a pesar de su baja especificidad, al ser una técnica de muy bajo coste, sigue usándose en la práctica clínica como un marcador de amplio espectro.

La Tabla I.3 muestra los valores normales de un hemograma. Niveles bajos de hemoglobina (HGB), volumen corpuscular medio (VCM) y glóbulos rojos pueden ser indicio de una pérdida de sangre, malnutrición o rectorragia que se traducen en valores de anemia y/o ferropenia, y por tanto pueden orientar al facultativo a la presencia de una EII [55,56].

Tabla I.3. Valores normales de un hemograma.

VALORES NORMALES HEMOGRAMA	
<i>Serie roja o Eritrocitaria</i>	
Glóbulos rojos	4,5-5millones/mm ³
Hematocrito hombre y mujer	42-52% y 37-48%
Volumen corpuscular medio	86-98 micromm ³
Hemoglobina hombre y mujer	13-18g/dl y 12-16g/dl
<i>Serie Blanca</i>	
Glóbulos blancos o leucocitos	5000-10000/mm ³
Neutrófilos	1500-8000/ml
<i>Serie Plaquetaria</i>	
Plaquetas	150000-400000/mm ³
Volumen plaquetario medio	7-13 fl

El recuento de leucocitos en el hemograma de un paciente con sospecha de EII también puede resultar de utilidad en su diagnóstico, ya que niveles aumentados de neutrófilos (neutrofilia) es un indicador de cuadro inflamatorio no infeccioso. Sin embargo, los neutrófilos son inespecíficos y también pueden verse alterados por ciertos

medicamentos como corticoides o el estrés. Por el contrario, una neutropenia o valores bajos de leucocitos ayudarán a descartar otras patologías de etiología infecciosa. El recuento de plaquetas tiene un papel ampliamente reconocido en procesos inflamatorios, cuando la inflamación aparece, el recuento de plaquetas aparece elevado mientras que el volumen plaquetario medio permanece bajo, y esto puede ser un hallazgo útil para diferenciar la EII de una diarrea infecciosa o crónica [57].

I.6.2.2. Bioquímica

La bioquímica de la sangre tiene actualmente un alto valor predictivo en la valoración del estado nutricional del paciente. Los valores en suero de vitaminas, minerales, proteínas y lípidos son indicadores de alta calidad que permiten detectar posibles estados de desnutrición en pacientes con EII, y valorar el estado proteico del paciente a través de la albúmina, la prealbúmina, creatinina y la proteína ligada al retinol. Otras determinaciones como el nivel del colesterol total (CT), lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL) también aportan valiosa información principalmente a nivel nutricional. Además, el nivel de minerales, como calcio, fósforo, magnesio y hierro y oligoelementos como Zinc, yodo o el cobre entre otros aportan información sobre el posible déficit nutricional del paciente [56].

Finalmente, los niveles PCR también son considerados muy valiosos para el diagnóstico de la EII. La PCR es una proteína que se sintetiza de manera incrementada a nivel hepático como respuesta a un proceso inflamatorio o bien infeccioso, ante estos estímulos producidos por la inflamación sus niveles en sangre aumentan de manera rápida [58]. A pesar de su utilidad, hay que tener en cuenta que los valores de la PCR también pueden verse aumentados en otros procesos inflamatorios o infecciosos como una neumonía o una pancreatitis [59].

I.6.2.3. Serología

Las pruebas serológicas para la detección de virus también se realizan habitualmente durante la fase de diagnóstico de la EII con el fin de descartar infecciones víricas como el virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), citomegalovirus (CMV) o virus de Epstein-Barr (VEB). Estos virus también suelen aparecer habitualmente en pacientes ya diagnosticados con brotes moderados y con tratamientos biológicos, debido a la inmunodepresión que provocan [60].

I.6.2.4. Muestra fecal

Las muestras fecales son útiles para descartar infecciones, se realizan coprocultivos además de analizar la toxina de *Clostridium difficile* y otros parásitos. El análisis de las muestras fecales también permite determinar los valores de lactoferrina (LF) y CF que se encuentran aumentadas ante una inflamación a nivel intestinal.

La CF es una proteína de la familia S100 [61] que está presente en todos los fluidos corporales, no sólo en heces. Sin embargo, su determinación en esta matriz es muy importante por su alta concentración (6 veces más que en otros fluidos corporales) y porque puede detectarse hasta 7 días después de su liberación [62]. La CF es uno de los principales biomarcadores intestinales, no solo por su gran valor clínico sino también por la facilidad de recogida y almacenamiento de la muestra. En los últimos años, esta proteína se ha convertido en un parámetro predictivo de enfermedades que afectan a intestino como el cáncer de colon, la colitis isquémicas o enteropatías. Y, por tanto, aunque valores elevados de CF no pueden considerarse específicos de la EII, puede ayudar a descartar otras enfermedades no intestinales. En la Figura I.8 se puede observar un esquema sobre la utilidad de la CF.

En la población general, un valor de CF por debajo de 50 µg/g ha sido considerado normal en adultos, siendo un valor incluso más alto para pacientes de edad más avanzada y jóvenes [61-64]. En niños menores de 4 años se consideran valores normales por debajo de 77 µg/g, y en mayores de 65 años se aceptan valores por debajo de 112 µg/g.

Rheenen et al. [65] realizaron un metaanálisis para el diagnóstico de la EII usando el valor de la CF. El estudio se realizó con 670 adultos y 371 niños con sospecha de EII, obteniendo una sensibilidad de 92% y una especificidad de 96% de los niños. Además, este mismo estudio demostró la efectividad de la CF para diferenciar entre pacientes con síndrome de intestino irritable de los que sufrían EII. Wright et al. [66] correlacionaron el valor de la CF con la actividad endoscópica, ya que evaluaron los niveles de CF y LF antes y después de la cirugía, obteniendo un descenso de estos valores tras la operación. También se observaron cifras más elevadas durante periodos activos de la enfermedad en comparación con los estados de remisión de la enfermedad.

Según los estudios de Von Roon et al. un valor de 100 µg/g serviría como discriminante en el estudio de la EII, descartando una enfermedad intestinal con valores por debajo de 50 µg/g [67]. Sin embargo, actualmente no se ha llegado a un consenso respecto a los valores de corte, ya que influye la edad, género, raza y clases de

localización anatómica. Además, otros factores como los fármacos (inhibidores de la bomba de protones o antiinflamatorios no esteroideos), el tumor gastrointestinal, la enfermedad celíaca, entre otros, pueden dar lugar a una menor especificidad de la CF.

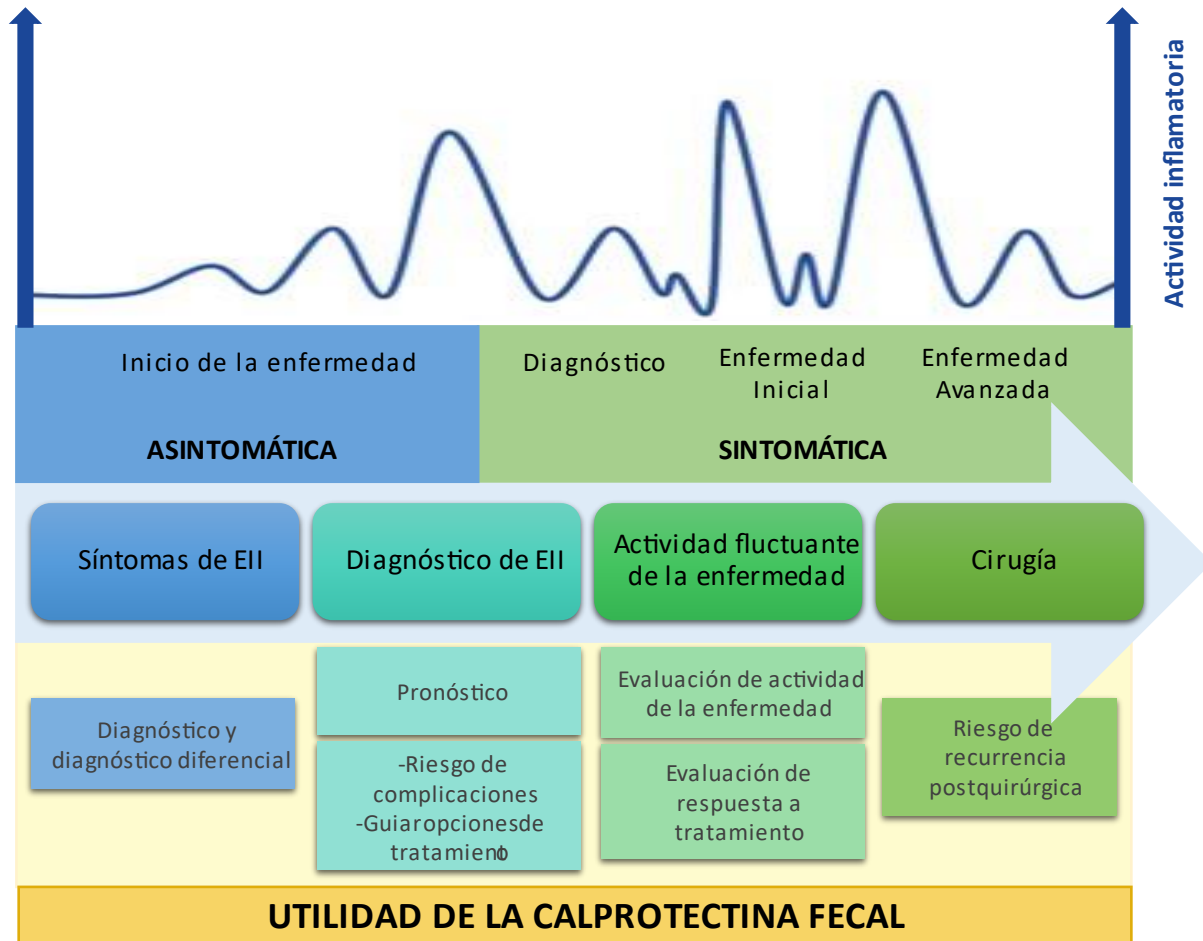


Figura I.8. Utilidad de la CF durante la evolución de la EII [68].

Como se ha comentado anteriormente, otro de los marcadores fecales de interés es la LF, una glicoproteína fijadora del hierro y específica de los neutrófilos que además tiene capacidad antimicrobiana. Al igual que la CF su liberación es proporcional al grado de inflamación de la mucosa convirtiéndolo en un marcador sensible y específico de la patología intestinal. Su duración en heces está en torno a los 2- 5 días [69].

Tanto la LF como la CF se determinan mediante un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) en laboratorios hospitalarios, un método sencillo y barato que convierte a estos dos marcadores en una útil opción para la detección y monitorización de la EII. Actualmente también están disponibles kits en las farmacias para detectar CF y LF en heces por los propios pacientes, basados en la inmunocromatografía, como se puede ver en la figura I.9.



Figura I.9. Kit de detección de CF basado en la inmunocromatografía.

I.6.2.5. Otros biomarcadores de interés

En la actualidad se continúa estudiando nuevos biomarcadores que detecten o certifiquen la presencia de la EII, los avances en la susceptibilidad genética de la EII y el desarrollo en materia de metabolómica y proteómica ha abierto una nueva ventana en materia de biomarcadores.

Respecto a los biomarcadores inmunológicos para predecir el diagnóstico de la EII se están estudiando ampliamente anticuerpos que actúan como autoantígenos o que ante hongos o bacterias reaccionan de manera cruzada. Se detectan a través del suero mediante una muestra sanguínea del paciente. El anticuerpo antineutrófilos perinucleares p-ANCA se descubrió en 1990 como un valor que ayudaba a distinguir a los pacientes de CU activa de los que tenían EC, sin embargo, se ha visto a lo largo de los años que ambas entidades (EC y CU) pueden presentar estos anticuerpos, y ha sido descartado como un marcador único de la enfermedad [70], aunque siempre son mucho más frecuentes en CU (41-73% de los pacientes) que en EC (6-38% de los pacientes). El anticuerpo ASCA también se ha evaluado como biomarcador. Un estudio de 157 pacientes con EII y 150 controles sanos ha demostrado que la sensibilidad y la especificidad del ASCA para diagnosticar la EC era del 60% y el 91%, respectivamente [71]. Sin embargo, este anticuerpo está presente entre el 39 y el 70% de los pacientes

con EC, aunque también lo está en sus familiares sanos (20-25%) y en pacientes con CU (10-15%).

Actualmente las recomendaciones de la Organización Europea del Crohn y la colitis (ECCO) desestiman la utilidad en la práctica clínica de estos marcadores como posibles sustitutos de una endoscopia y/o muestras histológicas principalmente en pacientes con síntomas digestivos inespecíficos, pero podrían ayudar a la diferenciación entre EC y CU tal como se muestra en la Tabla I.4 [72].

Tabla I.4. Papel de la combinación de autoanticuerpos en la EII [72].

	Anticuerpo	Sensibilidad %	Especificidad %
<i>Enfermedad de Crohn</i>	ASCA + pANCA -	55	93
<i>Colitis Ulcerosa</i>	ASCA - pANCA +	55	89
<i>CU en niños</i>	ASCA - pANCA +	70	93

La relación de la EII con ciertos factores genéticos está también siendo ampliamente investigada. El estudio de la influencia genética en la EII comenzó a principio de los años 90, pero no fue hasta una década después cuando se describió el primer locus de susceptibilidad genética, asociado al cromosoma 16, que genera diferentes mutaciones en el gen NOD2/CARD (Figura I.10) asociadas al desarrollo de la EC [73-75].

Todos los avances en el estudio de la genómica vienen desarrollándose potencialmente desde hace dos décadas gracias al avance tecnológico y científico del último siglo. Estos avances en materia de microarrays han permitido fenotipar cientos de miles polimorfismo de nucleótido único (*single nucleotide polymorphism*, SNP) [73], dando paso a los estudios de asociación del genoma, (*genome-wide association studies*, GWAS) que permiten identificar loci asociados con la aparición de ciertas enfermedades, como es el caso de la EII. Los estudios de GWAS no solo han permitido demostrar la importancia de la función de la barrera intestinal o la autofagia en la EII, sino que además han relacionado la EII con otras enfermedades autoinmunes como la diabetes mellitus tipo 1 o la artritis reumatoide [76].

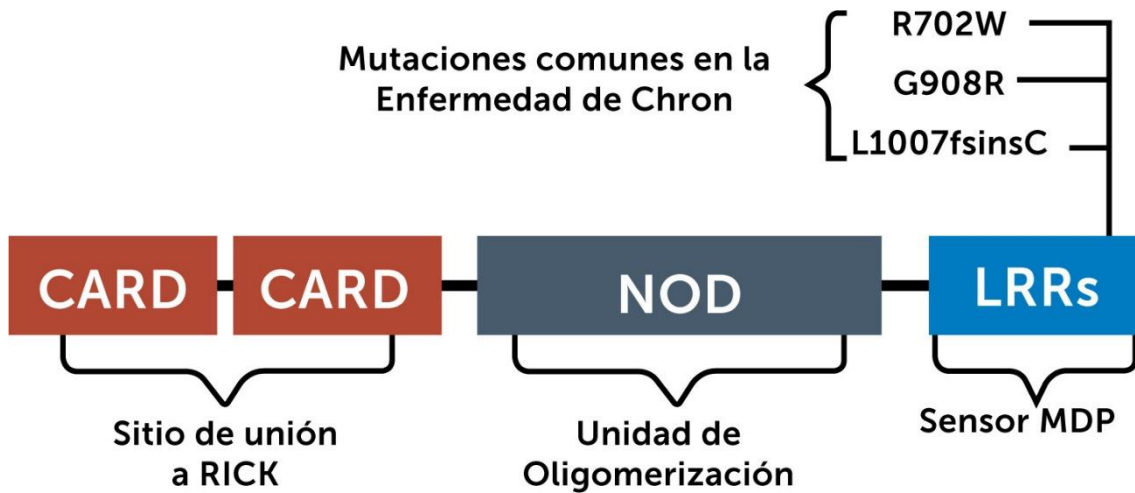


Figura I.10. Mutación del gen NOD2/CARD en la EC [73].

I.6.3. Pruebas diagnósticas

Las pruebas de imagen y la endoscopia siguen siendo el método de elección para el diagnóstico definitivo de la EII. A través de endoscopia se pueden tomar muestras, biopsias, para poder analizar la mucosa y el daño alcanzado, que será clave en el diagnóstico definitivo y diferencial de la CU o la EC. Entre las diferentes técnicas de imagen que se emplean para detectar la EII destacan:

- **Ecografía abdominal.** Suele emplearse con contraste para ver la extensión de la enfermedad y la actividad inflamatoria.
- **Enterorresonancia magnética.** Permite ver la profundidad de las lesiones y la afectación de la mucosa intestinal, lo que permite ver si el paciente tiene fístulas o abscesos. Es bastante bien tolerada por los pacientes y suele tener muy buen valor pronostico junto con la endoscopia [77].
- **Capsula endoscópica.** Es el estudio diagnóstico de primera elección para ver el intestino delgado ante una sospecha de EC. El paciente la ingiere y esta capsula (Figura I.11) va haciendo el recorrido digestivo a la vez que va tomando imágenes que se transmiten a un dispositivo que el paciente debe portar durante 10h, no precisa hospitalización y es muy segura y fiable. Actualmente tiene una alta sensibilidad y precisión para el hallazgo y diagnóstico de la EC [78].



Figura I.11. Cápsula endoscópica.

I.6.4. Endoscopia

La principal herramienta diagnóstica frente a la sospecha de la EII es la íleo-colonoscopia con toma de biopsias para poder evaluar que extensión tiene la enfermedad. Lo ideal es realizar esta prueba previamente al inicio de cualquier tratamiento. Para poder establecer un diagnóstico correcto la ECCO recomienda obtener al menos dos muestras de seis segmentos del intestino entre los que se incluyen íleon terminal, y las diferentes partes del colon, ascendente, transverso, descendente, sigmoides y recto [52]. Las imágenes endoscópicas (Figura I.12) orientarán hacia la EC si se encuentran lesiones parcheadas junto con úlceras más profundas y estrelladas, en cambio guiarán hacia la CU si se encuentra una lesión continua a lo largo del del colon [79].

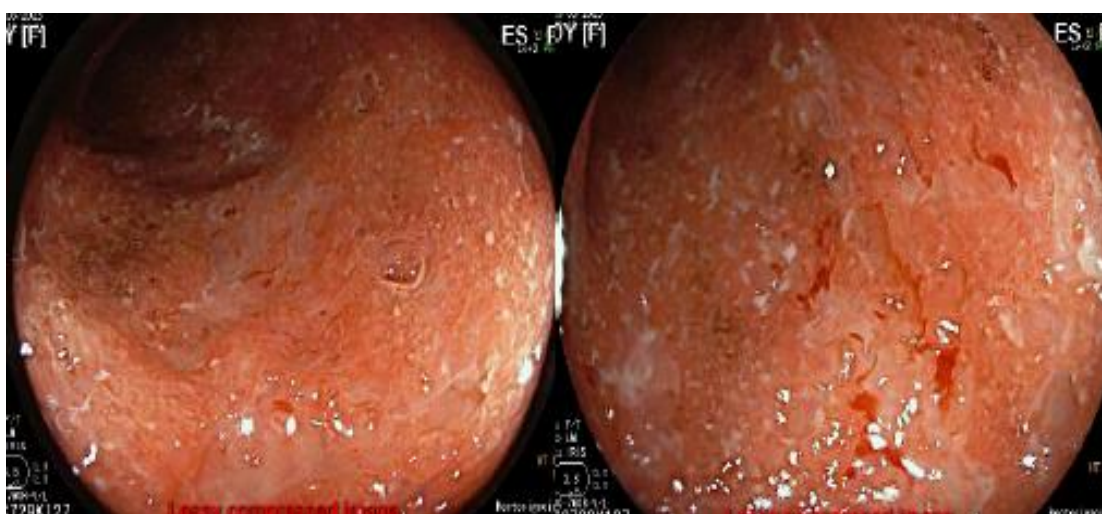


Figura I.12. Imagen colonoscopia CU severa con pérdida de patrón vascular.

Actualmente se trabaja con diferentes escalas que clasifican la severidad de la CU y la EC teniendo en cuenta las lesiones que se encuentran a través de las imágenes endoscópicas. Para la CU se utiliza habitualmente el Índice de Severidad Endoscópico de Colitis Ulcerativa (UCEIS), que desde 2012 tiene en cuenta el patrón vascular, la presencia de úlceras y el sangrado (Tabla I.5), y ha sido validado por numerosos estudios [80-83].

Tabla I.5. Índice endoscópico de severidad en colitis ulcerosa [82].

ÍNDICE ENDOSCÓPICO DE SEVERIDAD EN COLITIS ULCEROSA (UCEIS)		
	Puntuaje	Definición
Patrón Vascular	Normal (0)	Patrón normal
	Perdida focal (1)	Patrón vascular parcheado
	Ausencia de patrón vascular (2)	Ausencia de patrón vascular
Sangrado	No (0)	Sin sangre visible
	Mucoso (1)	Puntos con sangre superficial de fácil lavado
	Luminal mínimo (2)	Presencia de sangre en la luz
	Luminal moderado a severo (3)	Sangrado franco o que permanece a pesar del lavado
Erosiones y úlceras	No (0)	Sin erosiones o úlceras
	Erosiones (1)	Defectos en la mucosa \leq 5 mm
	Úlceras superficiales (2)	Úlceras >5 mm superficiales
	Úlceras profundas (3)	Úlceras profundas con bordes solevantados

Respecto a la EC se han desarrollado diversos índices tanto clínicos como endoscópicos para evaluar la actividad de la enfermedad. Concretamente, el Índice endoscópico de severidad para enfermedad de Crohn (CDEIS) ha resultado ser muy efectivo y además de reproducible (Tabla I.6). Este índice analiza cinco segmentos diferentes entre colon e íleon, tomando imágenes cada 10 centímetros de segmento y describiendo la presencia o no de lesiones, úlceras o estenosis. Se considera severo una resolución endoscópica un puntaje menor o igual que 7. En el seguimiento una disminución en al menos 4 o 5 puntos indica respuesta endoscópica [83-85].

Tabla I.6. Índice endoscópico de severidad en enfermedad de Crohn [85].

ÍNDICE ENDOSCÓPICO DE SEVERIDAD EN ENFERMEDAD DE CROHN (CDEIS)	
Úlceras profundas (en todos los segmentos explorados)	Ausentes (0 puntos) Presentes (12 puntos)
Úlceras superficiales (en todos los segmentos explorados)	Ausentes (0 puntos) Presentes (6 puntos)
Superficie comprometida (en todos los segmentos explorados)	0-10
Superficie comprometida por úlceras (Todos los segmentos)	0-10
Estenosis ulcerada	Ausente (0 puntos) Presente (3 puntos)
Estenosis no ulcerada	Ausente (0 puntos) Presente (3 puntos)

I.7. TRATAMIENTO DE LA EII

Actualmente el tratamiento de la EII va dirigido a conseguir una remisión clínica e histológica de la enfermedad durante el mayor tiempo o periodo posible. La manera de enfocar el tratamiento por parte de los facultativos puede ser de dos maneras, una de ellas, la más tradicional, consiste en el inicio del tratamiento escalonado comenzando por los fármacos menos tóxicos y lesivos para el paciente e ir evaluando la respuesta (Figura I.13). La otra estrategia depende de las circunstancias, la evolución de la enfermedad y el paciente, y consiste en atacar directamente la EII con un fármaco potente. Ambas estrategias dependerán del paciente, la evolución de la enfermedad, enfermedades, complicaciones concomitantes y respuesta a los fármacos, pero siempre teniendo el mismo objetivo que es mantener la enfermedad en fase de remisión clínica y endoscópica limitando el uso de corticoides [53].

Hoy en día para conseguir la remisión de la enfermedad se emplean aminosalicilatos, corticoides, inmunomoduladores y fármacos biológicos, suministrados por vía oral, intravenosa, supositorios o subcutánea dependiendo de las circunstancias del paciente y/o la evolución de la enfermedad.

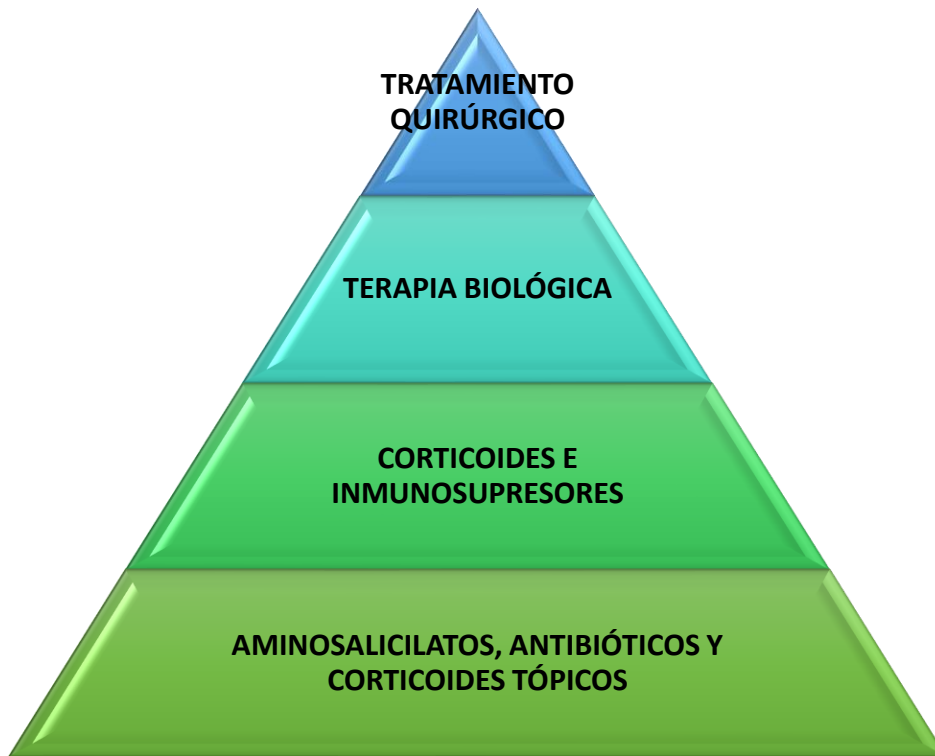


Figura I.13. Línea actual de tratamiento de la EI [86].

I.7.1. Aminosalicilatos

La forma de administración de los aminosalicilatos es vía oral y/o tópica a través del recto en forma de supositorios, enemas o espumas, lo cual facilita la elección de la administración del paciente siempre y cuando se posible. La forma de actuación de los aminosalicilatos se basa en su acción sobre las células epiteliales del intestino produciendo la liberación de citoquinas y otros mediadores de tipo lipídico que mantienen la integridad normal de la mucosa intestinal, regulando así la inflamación [87].

Los principales aminosalicilatos empleados son la sulfasazina o la mesalazina, que están compuestos de 5-ASA, que produce un efecto defensivo en la mucosa gastrointestinal, y que llega de forma intacta al colon para actuar de manera local en la luz mucosa colónica, combatiendo los epitelios dañados por la inflamación [88].

Es importante que el componente 5-ASA vaya acompañado de un sistema de liberación efectivo para que llegue al lugar donde se encuentra la lesión. La Tabla I.7. muestra las principales fórmulas de 5-ASA junto con el sistema de liberación y el lugar de actuación.

Diferentes estudios y ensayos clínicos han confirmado la efectividad de los aminosalicilatos para la inducción de la remisión en la CU, confirmando que dosis diarias

de más de 2 g de mesalazina al día son altamente eficaces para conseguir la remisión de la CU recurrente, y, además, tiene efecto protector contra el cáncer de colon en la CU [89-91]. Respecto a la EC se han reportado estudios donde el uso de la mesalazina resulta ser útil para la EC leve, sin embargo, no se han obtenido resultados concluyentes del beneficio de la mesalazina en EC moderadas o graves, debido a la variabilidad de localización y estadificación de la EC, por lo que actualmente solo es recomendado su uso cuando la afectación de la EC está limitada a intestino delgado [92,93].

Tabla I.7. Principales fórmulas orales de 5-ASA [1].

Droga	Cubierta	Marca	Sistema de liberación	Lugar de liberación
Mesalazina	5-ASA	Pentasa®	Micogranulos de etilcelulosa	Duodeno, yeyuno, íleon y colon
Mesalazina	5-ASA	Salofalk® y claversal®	Eudragit – L	Yeyuno medio. Íleon y colon
Mesalazina	5-ASA	Asacol®	Eudragit – S	Colon
Mesalazina MMX	5-ASA	Mezavant®	Gastrorresistencia MultriMatrix	Colon

I.7.2. Corticoides

El uso de los corticosteroides está limitado a brotes graves/moderados de CU y EC, y aquellos brotes refractarios y/o leves que no responden a otro tipo de fármacos. Estos medicamentos no tienen utilidad terapéutica para el mantenimiento de los periodos de remisión de la enfermedad. Su modo de acción es diverso, desde la inhibición de las vías proinflamatorias que suprime las interleucinas hasta la estimulación de los linfocitos para favorecer la apoptosis intestinal [94].

El repertorio de corticosteroides empleados en la EII va desde la vía oral con fármacos como la prednisona, prednisolona o la budesonida hasta los intravenosos, como la metilprednisolona y la hidrocortisona, y también rectales como espumas y enemas. Para la CU y la EC de actividad moderada se ha estudiado ampliamente el beneficio del uso de corticoides orales. La dosis recomendada por la ECCO es de 1 mg/kg/día de prednisona, no demostrando beneficios las dosis superiores a 60 mg/día. [35]. El uso de corticoides intravenosos está limitado al uso hospitalario en caso de brotes graves de la EII. Se ha de recordar que el uso de corticoesteroides es el

tratamiento de última elección por los facultativos en el tratamiento de la EII por las numerosas complicaciones que producen su uso prolongado.

I.7.3. Inmunomoduladores

Los inmunomoduladores que más ampliamente se usan para el tratamiento de la EII son azatropina (tiopurinas), metotrexato, ciclosporina y tacrolimus (inhibidores de la calcineurina).

En relación con el uso de tiopurinas, no existe actualmente consenso sobre cuál es la duración adecuada para el mantenimiento de la remisión de la enfermedad, teniendo en cuenta que los primeros efectos de las tiopurinas no aparecen hasta los 3 meses y que no tienen efecto en brotes severos de la EC [94,95]. El uso de la azatropina va dirigido principalmente para el mantenimiento de los periodos de remisión en la EC [96].

El metotrexato es menos usado que la azatropina y se emplea principalmente por vía intravenosa y subcutánea en pacientes con formas graves y/o corticorefractarias [97,98].

I.7.4. Agentes biológicos

La citoquina proinflamatoria TNF- α se encuentra en niveles altos tanto a nivel intestinal, como en heces y suero de pacientes con EC y CU [99,100]. En las últimas décadas se ha investigado el papel de esta citoquina en el desarrollo de la EII y se han propuesto tratamientos biológicos que permitan bloquear su acción.

Entre los más ampliamente usados para el tratamiento de la EII se encuentran el infliximab y el adalimumab, ambos empleados tanto para la EC como para la CU. También se han propuesto otros agentes biológicos específicos como el certolizumab para la EC o el golimumab para la CU. Todos ellos tienen el mismo mecanismo de acción, tienen un gran efecto antiinflamatorio actuando como anticuerpos monoclonales contra el TNF- α [53]. En su mayoría la forma de administración es intravenosa a nivel hospitalario, requiere la estancia hospitalaria de unas 4-5 horas para la administración de los tratamientos biológicos, tan solo el adalimumab y el golimumab se administran también de forma subcutánea. La Tabla I.8 resume las características de los principales agentes biológicos.

Tabla I.8. Principales agentes biológicos [53].

Agente biológico	Administración	Inducción	Mantenimiento	Optimización
Infliximab	Intravenosa	5 mg/kg/peso, semanas 0, 2 y	Cada 8 semanas	Cada 4-6 semanas, 10 mg/kg/peso
Adalimumab	Subcutánea	160 mg, 80 mg o 40 mg a 0, 2 y 4 semanas (cada 2 semanas)	40 mg cada 2 semanas.	Una dosis a la semana

La evidencia en la práctica clínica ha demostrado la gran efectividad de los tratamientos biológicos para alcanzar la remisión de la EII, especialmente ante brotes moderados y severos y refractarios al tratamiento con corticoides [101]. A pesar de su alta efectividad contra los brotes severos de EII, es conveniente mencionar que los pacientes en tratamiento con agentes biológicos son más susceptibles a infecciones oportunistas y tumores o síndromes linfoproliferativos.

Actualmente el uso de tratamientos biológicos se sitúa normalmente en el tercer escalón de tratamiento previo a la cirugía cuando el resto de las opciones de tratamiento (aminosalicilatos, corticosteroides e inmunomoduladores) han fracasado. Aunque ante una EII de mal pronóstico y/o de debut severo pueden también emplearse como tratamiento de primera línea [86].

En los últimos años han aparecido otros tratamientos biológicos para aquellos pacientes en los que los anti- TNF- α no son efectivos. Estos tratamientos se basan en inhibidores de moléculas pequeñas de adhesión como el vedolizumab o el ustekinumab.

I.7.5. Tratamiento quirúrgico

El tratamiento quirúrgico en los pacientes con EII requiere de gran experiencia y formación por parte del equipo multidisciplinar tanto cirujanos como gastroenterólogos y personal de enfermería, ya que es de vital importancia no atrasar la necesidad de cirugía innecesariamente cuando el paciente lo requiere, evitando llevar a complicaciones y un mayor tiempo de estancia hospitalaria y recuperación. Cuando los pacientes tienen una EII refractaria que no responde a ningún tratamiento, son candidatos a la cirugía laparoscópica. Esta cirugía conlleva una recuperación más rápida y supone menos complicaciones postoperatorias. Sin embargo, cuando esto no es posible, se opta por la colectomía total o subtotal en los enfermos de CU y por la

resección del tramo afecto en los pacientes con EC. Cabe destacar, que estas cirugías son de última elección ya que afectará de por vida a la calidad de vida de la paciente.

I.8. CLASIFICACIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD

En el seguimiento de la enfermedad a lo largo de la vida del paciente, durante los periodos de actividad y de remisión, es preciso evaluar la respuesta a los diferentes tipos de tratamientos y por ello que se requieren de escalas objetivas que permitan identificar la situación de paciente en cada momento, evaluando tanto su gravedad como su estado clínico. Actualmente se dispone de diferentes tablas de clasificación que se aplican para evaluar la evolución de la enfermedad y que se basan en la observación de tres aspectos: los síntomas, el comportamiento de la enfermedad y el curso que actualmente sigue, es decir, si ha habido resecciones previas, complicaciones o recaídas.

Una de las escalas más aplicadas tanto para la EC como la CU es la clasificación de Montreal, que fue creada por un grupo de gastroenterólogos reunidos en la ciudad que da nombre a la escala en el año 2005. Las Tablas I.9 y I.10 muestran la escala para la EC o UC, respectivamente.

Esta escala valora la edad del diagnóstico, la localización de la enfermedad y también que patrón de comportamiento tiene ya sea ulceroso, estenosante o incluso ambos. Esto permite a los gastroenterólogos y los equipos de seguimiento de la EII hacer un mejor pronóstico de la enfermedad y realizar un buen manejo terapéutico [102]. Esta escala está reconocida por la ECCO, siendo una escala de clasificación fenotípicas [48].

Para la clasificación de la EC, se añadió en la última versión la nomenclatura de la letra P haciendo referencia a las afecciones perianales, ya que son una de las complicaciones más frecuentes de la EC. Actualmente no existe evidencia de que la edad de inicio de la CU sea un factor determinante en el transcurso y evolución en la enfermedad como para ser un criterio que diferencia entre subgrupos, por lo que este criterio fue eliminado de la escala de Montreal para la CU [104].

Tabla I.9. Clasificación de Montreal para la EC [103].

CLASIFICACIÓN DE MONTREAL PARA LA ENFERMEDAD DE CROHN	
Edad al Diagnóstico (A)	
➤ A1 - 16 años o menos	
➤ A2 - Entre 17 y 40 años	
➤ A3 – Mayores de 40 años	
Localización (L)	
➤ L1 Íleon terminal	L1+L4 (íleon terminal+tracto digestivo alto)
➤ L2 Colon	L2+L4 (colon+tracto digestivo alto)
➤ L3 Ileocólica	L3+L4 (ileocólica+tracto digestivo alto)
➤ L4 Tracto digestivo alto	
Patrón clínico (B)	
➤ B1) Inflamatorio	B1p) Inflamatorio con afección perianal asociada
➤ B2) Estenosante	B2p) Estenosante con afección perianal asociada
➤ B3) Fistulizante	B3p) Fistulizante con afección perianal asociada

Tabla I.10. Clasificación de Montreal para la CU [103].

CLASIFICACIÓN DE MONTREAL DE LA COLITIS ULCEROSA	
Extensión (E)	
➤ E1) Proctitis ulcerosa: afección limitada al recto (el límite superior de la inflamación no supera la unión rectosigmoidea)	
➤ E2) Colitis izquierda (o colitis distal): afección limitada al colon izquierdo (el límite superior de la inflamación no supera el ángulo esplénico)	
➤ E3) Colitis extensa (pancolitis): afección que se extiende más allá del ángulo esplénico	
Gravedad (S)	
➤ S0) Colitis en remisión (Colitis silente): no hay síntomas de la enfermedad	
➤ S1) Colitis leve: cuatro o menos deposiciones al día con sangre, sin fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia ni aumento de la VSG	
➤ S2) Colitis moderada: criterios intermedios entre leve y grave, siempre con signos de afección sistémica leves	
➤ S3) Colitis grave: seis o más deposiciones diarias con sangre, fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia y aumento de la VSG, a menudo con signos de afección (“toxicidad”) sistémica grave	

Para la valoración de la actividad inflamatoria en la EC la escala más ampliamente usada es el Índice de la actividad de la enfermedad de Crohn (*Crohn's Disease Activity Index*, CDAI), que incluye 8 variables, siete de ellas clínicas y sólo un parámetro analítico. También es una de las escalas recomendadas por la ECCO y está considerado como un *gold estándar*, pero su uso es complicado ya que requiere registro de la última semana. En su lugar se aplica otra escala derivada, mucho más sencilla como es el Harvey-Bradshaw [103-105]. Esta escala como puede apreciarse en la Tabla I.11 puntúa variables de 0 a 4 puntos y además suma 1 punto por cada complicación asociada a la EC y por cada una de las deposiciones líquidas diarias, definiendo la enfermedad en remisión cuando se obtienen una puntuación inferior a 5, actividad media entre 5 y 7 puntos, moderada entre 8 y 16 y severa con puntuación mayor de 16 puntos. Esta escala no tiene límite superior porque depende del número de deposiciones diarias de los pacientes que en brotes severos pueden alcanzar hasta las 10-15 deposiciones.

Tabla I.11. Índice de Harvey Bradshaw para la EC. [103].

ÍNDICE DE HARVEY BRADSHAW PARA LA ENFERMEDAD DE CROHN					
	0 puntos	1 punto	2 puntos	3 puntos	4 puntos
Bienestar General	Muy bien	Regular	Malo	Muy mal	Terrible
Dolor abdominal	No	Leve	Moderado	Grave	
Masa abdominal	No	Dudosa	Definitiva	Dolorosa	
Deposiciones líquidas diarias	Contar las del día previo, un punto por cada deposición.				
Complicaciones	Artralgia - Uveítis -Eritema nodoso - Ulceras aftosas- Fisura anal - Nueva fístula - Absceso - Pioderma gangrenoso. Suma 1 punto cada complicación				

En cambio, para predecir la gravedad de la CU se emplea el índice de Truelove-Witts o el índice de actividad de la Clínica Mayo (UCDAI). Ambos presentan ciertas limitaciones ya que el tienden a subestimar la gravedad de los brotes y tener demasiado en cuenta las deposiciones diarreicas con sangre muy habituales en los pacientes con CU, como se puede apreciar en las Tablas I.12 y I.13. Ambos índices son bastantes sencillos de aplicar y solo precisan de una exploración tanto física y clínica del paciente para clasificar el brote como leve, moderado o severo.

Tabla I.12. Índice de Truelove-Witts para la CU. Inactivo: < 11. Brote leve: 11-15. Brote moderado: 16-21. Brote grave: 22-27.[103].

ÍNDICE DE TRUELOVE-WITTS MODIFICADO PARA LA GRAVEDAD DE LA CU			
Puntuación	3 puntos	2 puntos	1 punto
Nº Deposiciones	6	4-6	<4
Sangre en heces	++ o más	+	-
Hemoglobina g/l			
Hombres	< 10	10-14	>14
Mujeres	< 10	10-12	>12
Albumina g/l	<30	30-32	>32
Fiebre °C	>38	37-38	<37
VSG	>30	15-30	<15
Leucocitos x1000	>13	10-13	<10
Potasio	>3	3,3 – 3,8	>3,8
Taquicardia	>100	80-100	<80

Para el seguimiento y evolución de la EII se han comenzado a implantar las unidades de atención a pacientes con EC y CU, son consultas de asistencia específica para pacientes con EII y compuestas por equipos multidisciplinares que atienden al paciente de una forma integral y facilitan información acerca de la enfermedad no solo al paciente sino también a otros profesionales, familiares o amigos, son de reciente implantación en España y está causando un impacto muy positivo en la calidad de vida de paciente ya que actúan de soporte en la enfermedad no solo de manera presencial sino telemática también. Son consultas principalmente gestionadas por el personal de enfermería que atiende las complicaciones más frecuentes asociadas a la enfermedad como curas, apoyo emocional, soporte y educación sanitaria para los pacientes ostomizados a causa de la enfermedad, administración de tratamientos o sesiones grupales para pacientes y también puede derivar si es necesario a una consulta con el médico. Son paralelas al seguimiento de la enfermedad por parte del gastroenterólogo, las cuales tendrán una frecuencia u otra dependiendo de la evolución de la enfermedad o de las pruebas que se precisen en cada momento.

Tabla I.13. Índice de actividad de la Clínica Mayo para la gravedad de la colitis ulcerosa. Remisión: UCDAI < 2 Enfermedad grave: UCDAI > 9 [103].

ÍNDICE DE ACTIVIDAD DE LA CLÍNICA MAYO PARA LA GRAVEDAD DE LA CU	
Variable	Puntuación
Frecuencia defecatoria	
➤ Normal	0
➤ 1-2 dep/día más de lo habitual	1
➤ 3-4 dep/día más de lo habitual	2
➤ > 4 dep/día más de lo habitual	3
Sangrado rectal	
➤ Ninguno	0
➤ Hilos hemáticos en menos de la mitad de las deposiciones	1
➤ Sangrado visible en la mayoría de las deposiciones	2
➤ Rectorragia sin heces	3
Apariencia endoscópica de la mucosa	
➤ Normal	0
➤ Enfermedad leve	1
➤ Enfermedad moderada	2
➤ Enfermedad grave	3
Valoración médica	
➤ Normal	0
➤ Leve	1
➤ Moderado	2
➤ Grave	3

I.9. NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL DIAGNÓSTICO Y EL SEGUIMIENTO DE LA EII

En los últimos años, el desarrollo de las disciplinas ómicas y los avances tecnológicos en los métodos de análisis, han permitido investigar y proponer nuevas herramientas y estrategias para el estudio y diagnóstico de distintas enfermedades.

Procedente del sufijo latino “-ome”, el término “ómica” significa masa o muchos y se utiliza para diferenciar los estudios que implican un gran número de parámetros medidos, normalmente genes (genómica), ARN (transcriptómica), proteínas (proteómica) o metabolitos (metabolómica). La metabolómica ofrece una importante ventaja frente las demás disciplinas ómicas, debido a que es la más cercana al fenotipo, y por tanto la más representativa del estado del organismo en un momento puntual. Sin embargo, el elevado número de metabolitos en comparación con los genes o las proteínas, la convierte en una de las técnicas más complejas. Actualmente, la definición más común de metabolómica es la identificación y cuantificación sistemáticas de los productos metabólicos de moléculas pequeñas (de bajo peso molecular, <1 kDa) (el metaboloma) de un sistema biológico (célula, tejido, órgano, fluido biológico u organismo) en un momento específico, permitiendo así obtener una información cuantitativa y amplia del metaboloma de un sistema biológico. Metaboloma se utilizó, por tanto, para referirse a todo el conjunto de metabolitos que expresa un organismo [104] y siendo este el que mejor refleja el estado fisiológico de un organismo, ya que no sólo es el más sensible a cualquier cambio, ya sea interno o externo, sino que los metabolitos son los verdaderos agentes activos reguladores de la homeostasis [106,107].

La metabolómica ha jugado un papel muy importante en los últimos 15 años en el estudio de la EII. Se han realizado estudios metabolómicos en diferentes matrices biológicas humanas incluyendo orina, plasma, heces, suero y tejido biopsiado de pacientes [107]. La selección de la muestra de estudio es una de las etapas críticas en metabolómica debido a su gran influencia en los resultados generados. Además, los diferentes tipos de muestras proporcionan información complementaria sobre el estado de un organismo: el plasma/suero ofrece información del metabolismo sistémico, es una lectura “instantánea” del estado metabólico de un individuo en el momento de la toma de la muestra mientras la orina proporciona un registro promedio de los metabolitos polares descartados por un organismo dando información del metabolismo exógeno y endógeno. Las muestras fecales aportan información del estado del sistema digestivo [107].

Las técnicas más empleadas para los estudios metabolómicos (Figura I.14) son la resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN) y la espectrometría de masas (MS), esta última acoplada tanto a cromatografía de gases (GC) como de líquidos (LC) [108].

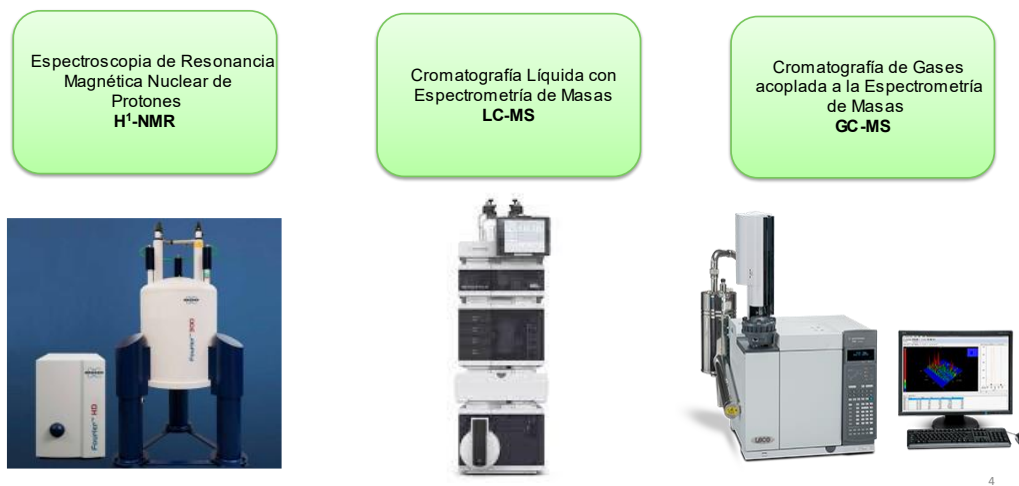


Figura I.14. Métodos analíticos previamente descritos para la detección de la EII.

Hoy en día la ^1H -RMN es la técnica más estudiada y desarrollada para el diagnóstico de la EII, que, mediante el análisis de muestras fecales, orina o plasma permite evaluar el contenido en aminoácidos y otros metabolitos relacionados con el fin de observar diferencias entre las poblaciones de enfermos y sanos metabolitos, las diferentes entidades de la enfermedad (EC o CU) o los diferentes estados (brote activo o en remisión) [109-111]. Concretamente, Schicho et al. [109] mostraron que el perfil metabólico cuantitativo de suero y plasma obtenido mediante espectroscopia de ^1H -RMN y un posterior análisis multivariante permitía discriminar entre pacientes con CU y EC. Williams et al. analizaron plasma de pacientes con EII demostrando que los perfiles de aminoácidos evaluados mediante un novedoso modelo estadístico de datos (aminograma) discriminaban entre EII y sanos y entre CU y EC [110]. Finalmente, William et al. analizaron muestras de orina de 206 sujetos y consiguieron diferenciar entre individuos sanos, y enfermos con EC y CU a través espectros de RMN [111].

Aunque en menor medida, la LC y GC acopladas a MS también han jugado un importante papel en los estudios metabolómicos relacionas con la IBD [107]. Específicamente, la GC-MS ofrece la capacidad de analizar metabolitos volátiles de baja polaridad como algunas grasas y ésteres, así como metabolitos de alta polaridad como los aminoácidos y ácidos orgánicos convertidos en derivados volátiles, mientras que los metabolitos de alto peso molecular apolares y semipolares (por ejemplo, esfingolípidos o glicerofosfolípidos) se suelen estudiar aplicando la LC-MS. Sin embargo, el metaboloma se compone de compuestos químicos de muy diferente naturaleza y por

tanto es imposible monitorizarlos de manera simultánea con una sola plataforma analítica.

I.9.1. Metabolómica dirigida y no dirigida

A través de la metabolómica se obtiene de manera global y simultánea perfiles metabolómicos de diferentes muestras biológicas en consecuencia a los cambios sistémicos y celulares del organismo. La intención de la metabolómica es identificar, cuantificar y/o caracterizar los metabolitos de una determinada muestra biológica. Sin embargo, dependiendo de los objetivos del estudio metabolómico, se pueden aplicar dos estrategias analíticas: el enfoque dirigido y el enfoque no dirigido.

En la estrategia **dirigida** se detecta y caracterizan moléculas específicas conocidas (normalmente en número <20), centrándose en una o más rutas metabólicas relacionadas que hayan sido definidas en estudios previos como biológicamente relevantes. Al conocerse la naturaleza de los analitos pueden aplicarse métodos con altos niveles de selectividad y exactitud que permitan determinar la concentración absoluta de cada metabolito. Este tipo de análisis también es muy útil en la detección de rutas metabólicas o biomarcadores concretos determinados previamente en un enfoque no dirigido. Para llevar a cabo el enfoque dirigido, se emplean más habitualmente instrumentos de GC o LC acoplados a espectrómetros de masa con analizadores triple cuadrupolo que trabajan en modo de monitorización de reacción múltiple (MRM) y que proporcionan buena selectividad y especificidad.

En la estrategia **no dirigida** se estudian las huellas metabolómicas, monitorizando de manera simultánea el mayor número posible de metabolitos. Al contrario que en la estrategia dirigida, en este caso los metabolitos que van a ser identificados no se conocen antes del estudio, por ello se suelen aplicar diferentes técnicas analíticas que sean complementarias entre sí ya que. A través de un análisis completo del metaboloma de la muestra se intenta asociar a una condición el mayor número de patrones específicos de metabolitos [113]. La metabolómica no dirigida se aplica a estudios libres de hipótesis, que constituye la fase de descubrimiento, con el objetivo de definir nuevos cambios en el metaboloma no observados con anterioridad. Esto puede relacionarse con el funcionamiento biológico de un organismo y con los mecanismos que están detrás de los cambios metabólicos alterados relacionados con el desarrollo de un estado de enfermedad. Este enfoque conduce a la generación de una nueva hipótesis que deberá ser validada en el estudio posterior, incluyendo un enfoque dirigido. En la Figura I.15 se observa un resumen del flujo de trabajo en ambos casos.

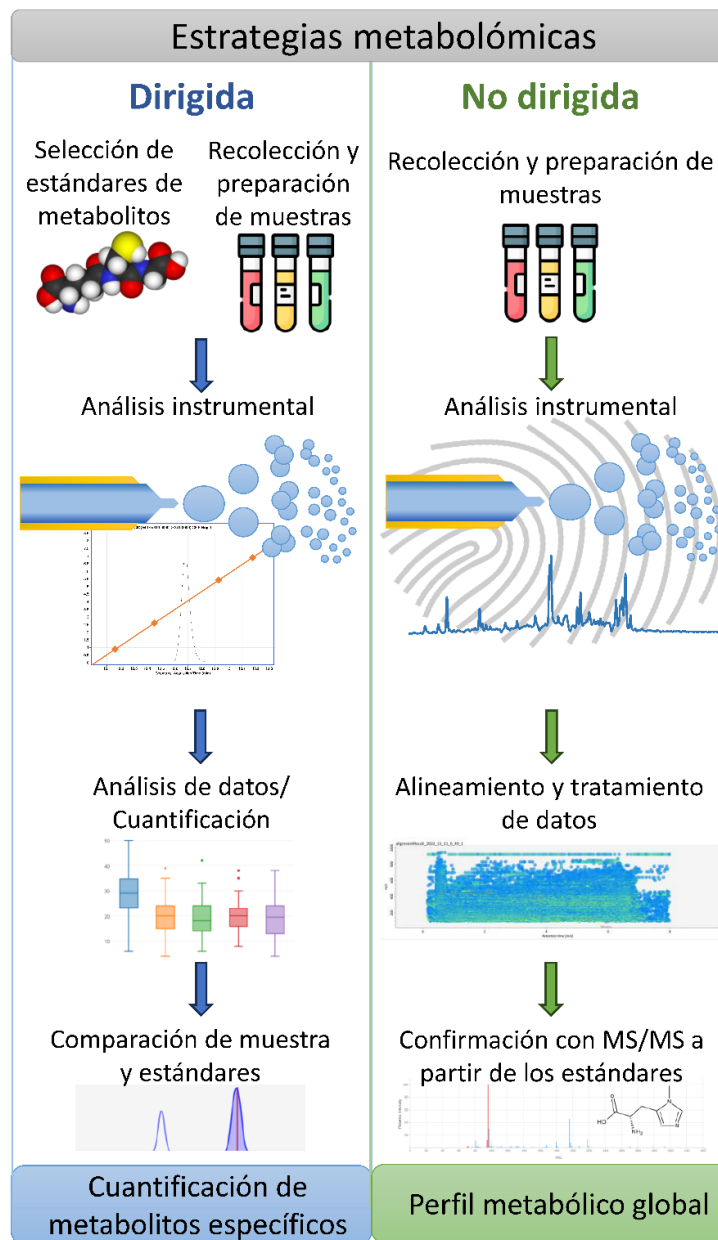


Figura I.15. Flujo de trabajo en metabolómica dirigida y no dirigida.

En el enfoque dirigido, el proceso se inicia seleccionando los metabolitos de interés. Seguidamente se recogen las muestras y se realiza el tratamiento de muestra previo al análisis instrumental. Para cuantificar los metabolitos objetivo, se construyen curvas de calibración y se incorporan estándares internos apropiados en los análisis. Todo ello lleva finalmente a la interpretación biológica de los resultados y a la obtención de manera específica, precisa y exacta de la cantidad absoluta de cada metabolito en las muestras seleccionadas. Sin embargo, en la estrategia no dirigida la selección de metabolitos se lleva a cabo tras el análisis estadístico, de manera que se trata de identificar los más significativos tras el resultado del estudio realizado. Finalmente se realiza de igual

manera la interpretación biológica para tratar de esclarecer rutas metabólicas y biomarcadores de interés.

Como se observa en la Figura I.16, una vez obtenido el conjunto de datos metabolómicos se aplican métodos de análisis ya sean univariantes o multivariantes para estudiar su estructura general y su relación con los datos fenotípicos de las muestras. A través del estudio de estos datos metabolómicos se crean modelos que describen las diferencias observadas, detectando de esta manera nuevos biomarcadores y contribuyendo a la construcción de nuevos modelos biológicos y/o genómicos.

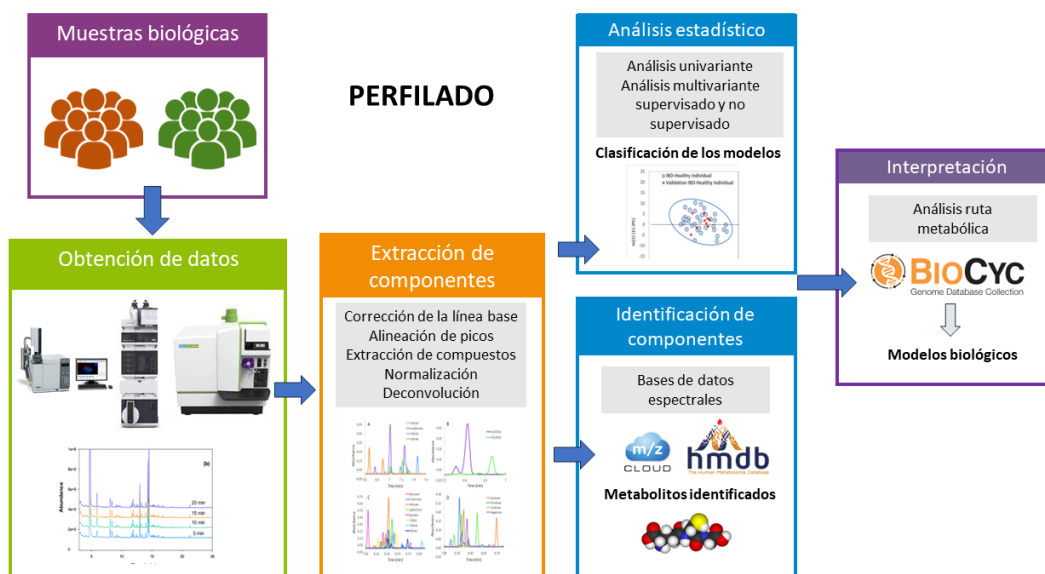


Figura I.16. Esquema detallado sobre el flujo de trabajo del análisis metabolómico no dirigido.

En la presente Tesis Doctoral se aborda una estrategia metabolómica no dirigida para el estudio del metaboloma de pacientes con EII (incluyendo pacientes con la enfermedad activa y en remisión) concretamente se ha monitorizado el perfil de compuestos volátiles orgánicos (VOCs) usando las técnicas GC-MS y GC acopladas a espectrometría de movilidad iónica (IMS).

I.10. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTOMETRÍA DE MASAS O ESPECTROMETRÍA DE MOVILIDAD IÓNICA

La cromatografía se define como “método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen en dos fases, una de las cuales constituye un lecho estacionario de gran superficie y la otra una fase móvil que pasa a través o a lo largo del lecho estacionario”. La GC se caracteriza por tener una fase móvil gaseosa inerte, en las que las separaciones se realizan por las interacciones inespecíficas de los componentes de la muestra con la fase estacionaria. En metabolómica, esta técnica se aplica para separar, identificar y cuantificación metabolitos poco polares volátiles o térmicamente estables.

El equipo común de GC consta de un sistema de gas portador, un inyector, una columna de cromatografía de gases y un detector.

La naturaleza del gas portador puede influir en las características de separación del sistema GC y puede modificar la sensibilidad de la detección, normalmente se utilizan hidrógeno, helio o nitrógeno como gases portadores. La estabilidad y reproducibilidad del caudal del gas portador es un requisito que condiciona el éxito de un análisis en GC, ya que influyen considerablemente tanto en la eficacia de la separación como en la cuantificación de los analitos.

Los dispositivos de inyección de muestras tienen la misión de vaporizar la muestra a analizar e incorporarla a la corriente de gas portador que se dirige hacia la columna. El inyector más antiguo y más comúnmente utilizado para columnas capilares es el inyector *split/splitless*. Este inyector puede funcionar en dos modos, en el modo *split*, la muestra inyectada se vaporiza en la corriente de gas portador y una pequeña porción de la muestra se dirige a la cabeza de columna de GC, (los ratios varían entre 10:1 y 400:1) mientras que en el modo *splitless*, toda la muestra es inyectada en la columna. Por otro lado, se encuentran otros sistemas de inyección acoplados a los equipos de GC como la desorción térmica, los inyectores de vaporización de temperatura programable o los inyectores de espacio de cabeza. En el marco de esta Tesis Doctoral se ha empleado un muestreador automático con inyección en espacio de cabeza [114].

El muestreo de espacio de cabeza (HS) es un tipo de técnica de introducción de muestras para GC en la que, se analiza la capa de gas o el espacio de cabeza por encima de la muestra en un vial, en lugar de extraer un volumen del interior de la capa de muestra (Figura I.17). El HS requiere que los compuestos de interés tengan una alta volatilidad, mientras que el resto de la muestra es mucho menos volátil o no volátil. La técnica se presta muy bien como sustituto de las laboriosas extracciones cuando los

tipos de muestra son sólidos o líquidos viscosos, como la sangre, ampliamente estudiada en los estudios metabolómicos. La muestra se transfiere a un vial adecuado para el HS y se tapa inmediatamente para minimizar la pérdida de componentes volátiles. Una vez tapado el vial, estos compuestos de bajo punto de ebullición comienzan a migrar entre la muestra y la capa de espacio de cabeza, alcanzando finalmente el equilibrio (Figura I.17). El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio depende de la muestra y se determina experimentalmente. Este tiempo se optimiza incubando el vial en un horno o en otro entorno de temperatura controlada.

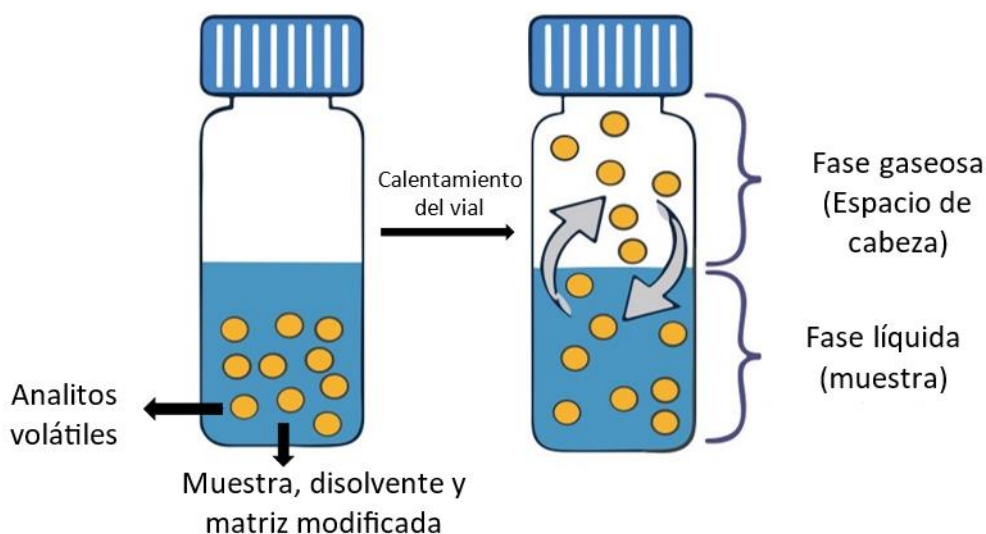


Figura I.17. Representación muestreo en espacio de cabeza.

Las columnas para GC pueden dividirse en dos grupos distintos: columnas empacadas y columnas capilares de varias dimensiones [115]. Una columna empacada es una columna rígida de metal o vidrio rellena de pequeñas partículas que suelen estar recubiertas de una fina capa de un polímero de alto peso molecular. Los soportes sólidos más comunes son las tierras de diatomeas, los fluorocarbonos, el negro de humo grafitizado y las perlas de vidrio, aunque aproximadamente el 90% de los soportes son de tierras de diatomeas. La fase estacionaria de las columnas de GC tiene que cumplir los siguientes requisitos: baja presión de vapor, alta estabilidad química y viscosidad relativamente baja a la temperatura de análisis; selectividad para los componentes de la muestra investigada; buena capacidad de humectación tanto de la superficie del soporte inerte como de la pared, posiblemente inerte, de la columna. La longitud de una columna empacada está limitada a unos 3 m debido a las altas presiones que se requieren para mantener los caudales de gas portador a las velocidades necesarias para un rendimiento óptimo. Las columnas empacadas tienen varias ventajas sobre las columnas capilares. Las columnas de relleno tienen una

capacidad de muestra entre 10 y 1.000 veces mayor que las columnas capilares. Esto hace que las columnas empaquetadas sean superiores cuando es necesario analizar grandes cantidades de muestra. Sin embargo, las columnas empaquetadas tienen entre un 2 y un 10% menos de platos teóricos por metro que las columnas capilares. Junto con las longitudes más cortas de las columnas empaquetadas (1-3 m frente a los 10-60 m de las columnas capilares), el número total de platos teóricos es sustancialmente inferior al de las columnas capilares.

Una columna capilar (también llamada tubular abierta) es un tubo de vidrio o sílice fundida de diámetro interno muy pequeño (generalmente entre 0,20-0,53 mm). La superficie interna de una columna capilar está recubierta con una fina capa de fase estacionaria, de modo que las moléculas de soluto pueden entrar en contacto con las paredes internas del tubo. La mayoría de las fases estacionarias de las columnas capilares están reticuladas y unidas covalentemente a la superficie de sílice fundida. La cantidad de fase estacionaria en una columna capilar se denota por el grosor de su película, que suele ser de 0,1-5 μm . En las columnas capilares, la retención de los compuestos es proporcional al grosor de la película; la retención aumenta a medida que aumenta el grosor de la película y disminuye a medida que baja. La ventaja de las columnas capilares es su gran capacidad de separación por lo que han sido utilizadas con más frecuencia que las columnas empaquetadas [116-118].

Para conseguir una separación eficaz y fiable, la columna cromatográfica de gases debe someterse a una temperatura constante (modo de separación isotérmica) o puede modificarse según un programa de temperatura predeterminado (gradiente de temperatura). La aplicación de un gradiente de temperatura aumenta considerablemente la eficacia de la separación [119]. Dado que la temperatura de la columna es uno de los parámetros más decisivos en el análisis por CG, su regulación exacta reviste una importancia capital.

Finalmente, los detectores interactúan con las moléculas de soluto cuando salen de la columna. Esta interacción se convierte en una señal eléctrica que se envía a un dispositivo de grabación o almacenamiento de datos. A continuación, se crea un cromatograma, que es un gráfico de la intensidad de la señal en función del tiempo transcurrido. Las principales características de los detectores son la cantidad mínima de un compuesto que es detectable y qué compuesto, en la misma cantidad, produce la señal respuesta más intensa del detector.

Diversos detectores diferentes se han acoplado a la GC para el desarrollo de métodos que permitan la detección y cuantificación de los componentes de una mezcla. Entre ellos la MS y la IMS son los detectores que se han utilizado en esta Tesis Doctoral.

I.10.1. Espectrometría de masas

La MS es un detector que permite la determinación cualitativa y cuantitativa de diversas estructuras orgánicas. Esta técnica se fundamenta en la generación de iones a partir de moléculas orgánicas en estado gaseoso. Las moléculas de la muestra ingresan al MS y se dirigen a la fuente de ionización, donde se generan los iones. La fuente de ionización posee una energía suficientemente alta para provocar la fragmentación de los enlaces químicos presentes en las moléculas de la muestra, aunque no se produce la descomposición en átomos individuales. A continuación, los iones se introducen en el analizador, que los separa en base a su masa y carga, para finalmente ser detectados. Al mismo tiempo, las moléculas no cargadas se eliminan mediante el empleo de una bomba de vacío. Por consiguiente, un espectro de masas proporciona información bidimensional al relacionar la abundancia de los distintos iones en función de la relación entre la masa y la carga (m/z) de cada uno de ellos [120].

Un MS cuenta de los siguientes elementos (Figura I.18):

1. Sistema de introducción de la muestra: dependerá de la naturaleza de la misma, tanto de su estado (sólido, líquido o gas) como de su complejidad. La muestra se puede introducir directamente en la fuente de ionización o también puede realizarse usando un sistema cromatográfico (GC o LC), lo cual ofrece la ventaja de permitir que las moléculas previamente separadas en la columna ingresen de manera secuencial al espectrómetro de masas.

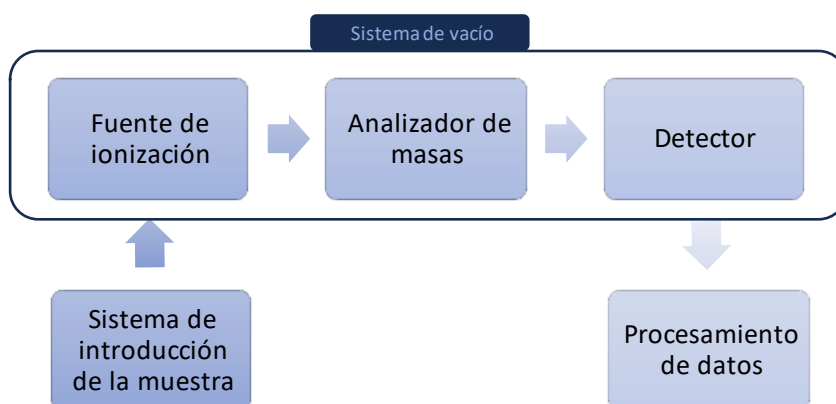


Figura I.18. Diagrama de flujo de los elementos constituyentes de un MS convencional.

1. Fuente de ionización: sistema encargado de generar los iones a partir de las moléculas neutras en fase gaseosa. En el caso de un acoplamiento GC-MS, existen dos tipos de sistemas de ionización:

- Impacto electrónico (EI): en este método, las moléculas de la muestra son ionizadas mediante la incidencia de un haz de electrones de alta energía. También se conoce como bombardeo electrónico y es el método más comúnmente utilizado.
- Ionización química (CI): se trata de una ionización más débil en comparación con el método anterior. Su principio se basa en la transferencia de carga desde un gas reactivo a las moléculas de la muestra.

2. Analizador de masas: el analizador es el sistema responsable de la separación de los iones en función de su relación m/z . Las características fundamentales de un analizador de masas incluyen la precisión, resolución, rango de masas y velocidad de adquisición.

La precisión se refiere al potencial para determinar la masa de un ion en relación con la masa teórica calculada a partir de su composición elemental. Esta característica está estrechamente vinculada a la capacidad de resolución del analizador. La resolución, por su parte, se define como una medida de la capacidad de separación de iones adyacentes por parte del analizador. El rango de masas es el intervalo m/z que el analizador es capaz de transmitir al detector, y viene determinado por su configuración. Por último, la velocidad de adquisición o barrido es el número de veces que puede adquirir el espectro por unidad de tiempo y, por tanto, afecta a la calidad en la definición del pico. De esta forma, la selección de un tipo de analizador u otro dependerá de los requerimientos en cuanto a estos parámetros se refiere y a la aplicación en concreto.

Los analizadores más comúnmente empleados son el cuadrupolo simple (Q), el triple cuádruplo (QqQ), la trampa de iones (IT) y el tiempo de vuelo (TOF). En esta Tesis Doctoral, se ha empleado el analizador Q, que consiste en un conjunto de cuatro barras metálicas cilíndricas paralelas colocadas equidistantes del eje central (Figura I.19). Esto permite que el haz de iones proveniente de la fuente impacte sobre el centro del dispositivo.

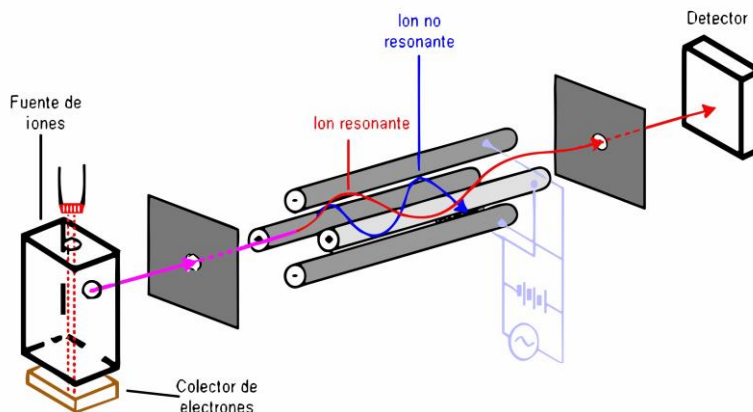


Figura I.19. Esquema de un analizador de masas cuadrupolo simple convencional [121].

Al cuadrupolo se le aplica tanto corriente continua (CC) como corriente alterna de alta frecuencia o radiofrecuencia (RF), de modo que sólo los iones con el m/z objetivo atraviesan con éxito el cuadrupolo y llegan al detector.

3. Detector: dispositivo encargado de recolectar y analizar los fragmentos iónicos generados al salir del analizador y chocar con él. A partir de la información recopilada, se genera el espectro de masas, el cual muestra las masas de los diversos iones presentes en la muestra. En este espectro, los valores de m/z se representan en el eje de las abscisas, mientras que en el eje de las ordenadas se indica la intensidad, es decir, la cantidad de iones con una determinada relación m/z que impactaron en el detector.

4. Sistema de vacío: Para que los procesos que tienen lugar en el MS puedan llevarse a cabo debe aplicarse un ambiente de alto vacío (del orden de 10^{-5} torr), por ello esta es una parte fundamental del instrumento. Gracias a este sistema, el recorrido libre medio de los iones formados, sin colisiones en su camino, es acorde con la longitud que deben recorrer hasta el detector.

5. Procesamiento de datos: Los espectros de masas son guardados y sometidos a análisis computacional. Posteriormente, se comparan con bancos de datos de espectros de masas previamente construidos, lo que posibilita la identificación de compuestos químicos.

La adquisición de datos varía dependiendo del equipo de MS, en los sistemas GC-MS con analizador tipo Q, como el usado en esta Tesis Doctoral, existen dos modos principales de adquisición de datos: monitorización de iones seleccionados (SIM) y

barrido completo o *full scan* (SCAN). Estos modos difieren en sus enfoques de adquisición de datos y en el tipo de información que proporcionan [122].

- **SIM**: es un modo de adquisición de datos en el que iones diana específicos son monitorizados selectivamente durante todo el análisis. En el modo SIM, el espectrómetro de masas está programado para aislar y monitorizar sólo los iones de interés predefinidos, normalmente denominados "iones diana" o "iones cuantificadores". El espectrómetro de masas cambia rápidamente entre estos iones objetivo, lo que permite una alta sensibilidad y una mayor relación señal-ruido para los iones seleccionados. El modo SIM suele emplearse para análisis cuantitativos dirigidos, en los que se controlan analitos específicos o metabolitos conocidos. Ofrece una mayor sensibilidad y una menor interferencia de otros compuestos presentes en la muestra. Sin embargo, el modo SIM no proporciona información completa sobre todo el rango de masas y puede no detectar compuestos inesperados o desconocidos que no estén incluidos en la lista de iones objetivo.
- **SCAN**: A diferencia de SIM, el modo SCAN implica la adquisición de un espectro de masas completo a través de un amplio rango de masas durante el análisis [123]. En este modo, el espectrómetro de masas explora todo el rango de masas y registra la intensidad de todos los iones detectados. Proporciona un perfil completo del espectro de masas de la muestra, permitiendo la identificación y cuantificación de una amplia gama de compuestos simultáneamente. El modo *full scan* es especialmente útil en metabolómica no dirigida o en estudios basados en el descubrimiento, en los que el objetivo es explorar todo el metaboloma e identificar compuestos o biomarcadores desconocidos. Proporciona una amplia gama de información sobre la distribución de masas de los iones en la muestra, lo que permite un análisis exhaustivo de los datos y la posterior identificación de metabolitos.

Los recientes avances en materia de MS han colocado a esta técnica como una herramienta ideal para la detección en las separaciones cromatográficas. La GC-MS permite identificar y además cuantificar analitos dentro de mezclas de gran complejidad, gracias a que se combina el sistema de alta selectividad de la separación cromatográfica junto con la elevada sensibilidad que ofrece el MS [116]. Esta técnica requiere de sistemas de conexión avanzados, ambos sistemas trabajan en fase gaseosa en cantidades mínimas.

El funcionamiento de ambas técnicas acopladas se resume de la siguiente manera (Figura I.20), cuando la muestra a analizar es inyectada en el cromatógrafo pasa

a estado gas, es arrastrada por el gas inerte hacia la columna capilar cromatográfica. De manera que los distintos constituyentes de la muestra se separan según su afinidad por la fase estacionaria y, por lo tanto, eluirán con tiempos de retención diferentes. A medida que las sustancias separadas salen por la abertura de la columna, fluyen hacia el MS empujadas por una alta corriente de vacío. La MS da lugar a los espectros de masas que caracterizan los analitos en función de su m/z . El acoplamiento de estos dos instrumentos permite una identificación más precisa que la de cualquiera de ellos por separado.

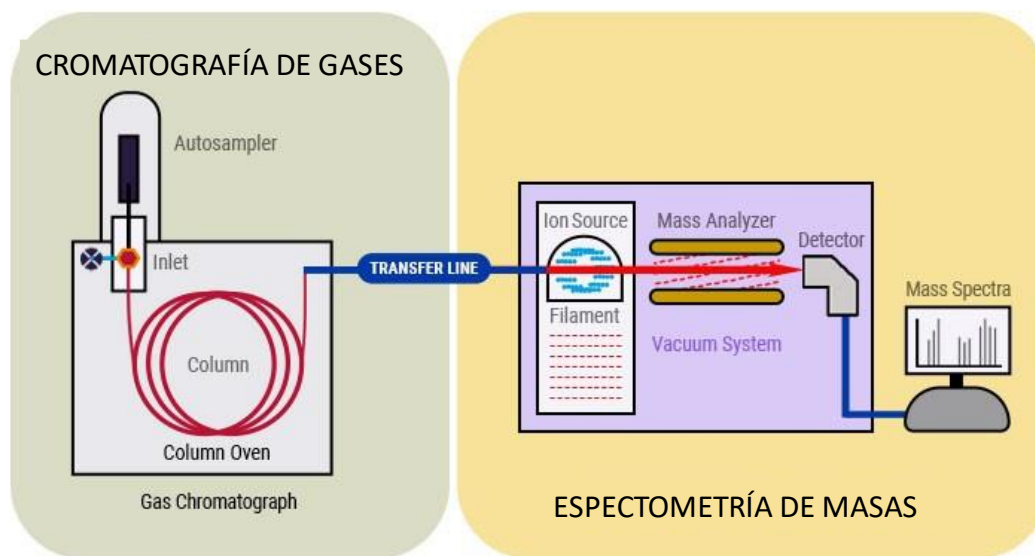


Figura I.20. Esquema completo de un instrumento GC-MS [124].

Por tanto, la GC-MS es un sistema de análisis que asegura una gran capacidad de separación de los diferentes analitos, su selectividad y sensibilidad y además es de sencilla reproducibilidad debido al bajo coste y a los reducidos tiempos de análisis. Recientemente, la GC-MS ha sido empleada para el estudio de la EII y su diagnóstico. En concreto, Kohashi et al. [125] se centraron en determinar mediante GC-MS los metabolitos hidrosolubles para el diagnóstico de la CU, e informaron de que los componentes del ciclo de la urea y del ácido tricarbóxico mostraron las alteraciones más significativas, y todos ellos, excepto la urea, exhibieron una disminución significativa de los niveles séricos en los pacientes con CU. Además, Ahmed et al. [126] monitorizaron entre 234 y 290 metabolitos para discriminar entre EC o CU inactiva y activa.

La GC-MS se emplea también en los laboratorios para encontrar sustancias dopantes en deportistas a través de la orina o en toxicología forense. A nivel industrial

se emplea para la detección de contaminantes alimentarios y medioambientales [127-131].

I.10.2. Espectrometría de movilidad iónica

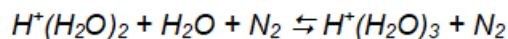
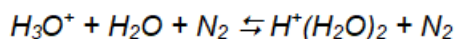
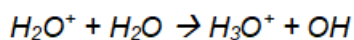
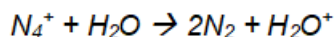
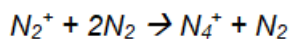
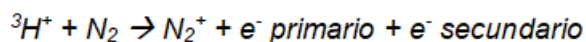
La IMS es una técnica de determinación de compuestos tanto volátiles como semivolátiles que se aplica a muestras en estado físico, tanto líquido, gaseoso y sólido. La IMS fue empleada por primera vez como herramienta de análisis por Karasek y Cohen en los años setenta. El funcionamiento del IMS está sustentado por la variabilidad de la movilidad de los diferentes iones bajo la influencia de un gas en un campo eléctrico a presión atmosférica [132].

Un espectrómetro de movilidad iónica se compone principalmente de cuatro partes: sistema de introducción de muestra, fuente de ionización, tubo de deriva y detector.

En el IMS las moléculas entran en estado gaseoso al interior del equipo arrastradas por un gas inerte, donde se ionizan gracias a una fuente de ionización. Las fuentes de ionización comúnmente utilizadas son radioactivas, fuentes de fotoionización (lámparas de fotodescarga y láseres), fuentes de descarga corona (CD) y fuentes con ionización por electrospray (ESI).

Las fuentes de ionización radiactivas son las más utilizadas debido a su estabilidad y fiabilidad de funcionamiento. No necesitan una fuente de energía adicional, aunque en ocasiones se necesitan permisos especiales que cumplan con la legislación. Las fuentes radiactivas más utilizadas se basan en el níquel (^{63}Ni), aunque también se utilizan comúnmente el tritio, emisor de partículas beta (^3H) y el americio, emisor de partículas alfa (^{241}Am). En esta Tesis Doctoral se ha utilizado como fuente radiactiva ^3H que obedece a la normativa recogida en el Real Decreto 783/2001 sobre protección sanitaria contra radiaciones ionizantes [133].

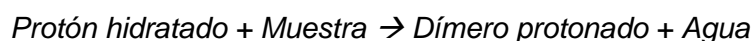
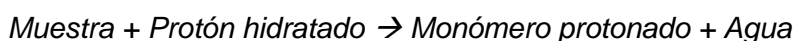
La ionización por medio de una fuente radiactiva de tritio se basa en la emisión de electrones primarios, que colisionan con los iones primarios positivos de nitrógeno (N_2^+), utilizado como gas inerte y, tras una serie de combinaciones de reacciones, que se muestran a continuación, da lugar a los iones denominados reactantes o hidratados [$\text{H}^+(\text{H}_2\text{O})_n$] generando el pico de iones reactantes (RIP). El RIP representa el total de iones disponibles generados en la fuente de tritio para ionizar a los compuestos neutros que entran en la cámara de ionización del IMS.



Estos iones se emplean para ionizar sustancias antes de introducir las en el tubo de deriva, es decir, la ionización química del analito se produce por reacción con los iones reactantes, generando iones específicos del producto, siempre que la afinidad protónica del analito sea superior a la del agua. Estas reacciones de formación de iones de producto, monómeros, dímeros o trímeros iónicos de los volátiles protonados son las siguientes:

Como se observa en las reacciones anteriores, las moléculas de la muestra colisionan con los iones reactantes y, por transferencia de protones, se forman intermediarios de reacción inestables que se estabilizan por pérdida de agua dando lugar a productos iónicos.

Una vez ionizadas las muestras, la separación de los iones se lleva a cabo a presión atmosférica bajo un campo eléctrico en el tubo de deriva. Normalmente, previo a la región de deriva, se incluye una puerta de iones o un obturador de iones. Están hechas de rejillas de alambre o análogos metálicos grabados y median la entrada de iones a la región de deriva. Los iones pasan cuando se aplica un pulso breve (entre 10 y 1000 μs) que se denomina anchura de pulso de rejilla (*grid pulse width*) e influye en la forma y anchura de los picos en los espectros de movilidad. Un valor alto de anchura de pulso de rejilla produce un aumento de la sensibilidad de las medidas a expensas de la resolución [134].



Los tubos de deriva consisten en anillos de deriva apilados o dispuestos alternativamente con anillos aislantes en una geometría tubular conectados por una cadena de resistencias. La construcción de tubos de deriva es cara y laboriosa ya que el ensamblaje de las piezas debe ser preciso. Se establece un campo eléctrico utilizando

un divisor de tensión para separar los iones entre el obturador de iones y el detector. La separación de los iones se basa en su tamaño y forma mientras colisionan con las partículas del flujo de gas de deriva, que fluye en contracorriente con el flujo de la muestra. Los iones más pequeños se mueven más rápidamente que los más grandes a través del tubo de deriva hacia el detector.

Los parámetros críticos que afectan a las separaciones IMS en el tubo de deriva son temperatura, pureza y composición de la atmósfera de gas de inerte, campo eléctrico y la longitud del tubo de deriva. En primer lugar, la temperatura de deriva influye en la movilidad de los iones y en su grado de agrupación. A baja temperatura las moléculas de agua neutra de la muestra y del gas de deriva pueden unirse a los iones en fase gaseosa en la región de deriva, lo que influye en la sensibilidad, el poder de resolución y la movilidad de los iones. En este caso, la movilidad de los iones es menor. Por el contrario, el aumento de la temperatura del tubo de deriva provoca una desagregación de iones de agua lo que se traduce en pequeñas variaciones en la humedad y entonces, los cambios en la movilidad de los iones se minimizan y además, la movilidad de los iones de muestra es mayor al aumentar la temperatura del tubo de deriva. Sin embargo, trabajar a alta temperatura es costoso en relación con la potencia y podría producir reactividad o fragmentación de iones [135]. Otro parámetro importante es la pureza y composición de los gases portador y de deriva. El gas portador en el tubo de deriva se utiliza para transportar las moléculas de la muestra desde la entrada hasta la región de reacción y proporcionar la atmósfera de apoyo para que se produzca la ionización. El gas de deriva está destinado a mantener un entorno de gas limpio en la región de deriva, libre de impurezas no deseadas. En relación con la pureza, si se utiliza aire ambiente como gas portador o de deriva, debe pasarse por un filtro de tamiz molecular para eliminar la humedad o reducir su contenido, así como el de otras impurezas de vapor impurezas que puedan estar presentes para evitar reacciones indeseables en los dispositivos IMS.

De hecho, el aire puro es el gas más utilizado, pero deben tomarse las mismas precauciones con otros gases, como el nitrógeno o el helio, etc. Con respecto a la composición de los gases portadores y de deriva, la precisión de las mediciones de movilidad iónica no debería verse afectada cuando se utilizan nitrógeno o aire puro sintético como gases de deriva según lo descrito en los trabajos de Gunzer [136] y Kirk [137]. En estos trabajos se llegó a la conclusión de que no es probable que haya diferencias significativas para la mayoría de los compuestos entre los valores de movilidad en nitrógeno y en aire puro sintético teniendo en cuenta las constantes de

polarizabilidad y masas de N_2 y O_2 junto con sus correspondientes abundancias en el aire.

Además, la intensidad de campo aplicada en la región de deriva influye en la separación de iones en el tubo de deriva ya que el aumento de este parámetro mejora el poder de resolución [138-141]. Por último, la longitud del tubo de deriva comúnmente es entre 5 y 10 cm, mejorando la resolución a mayor longitud de este ya que se ha confirmado que hay menos formación de clusters y reacciones de fragmentación cuando se utiliza un tubo de deriva más largo.

Finalmente, los iones colisionan con el detector, normalmente una placa de Faraday, provocando de esta manera una corriente que, mediante el empleo de un amplificador, la convierte en voltaje. La corriente de iones amplificada frente al tiempo da lugar al espectro de movilidad iónica de una medida [142-144]. La Figura I.21 muestra un esquema del instrumento IMS.

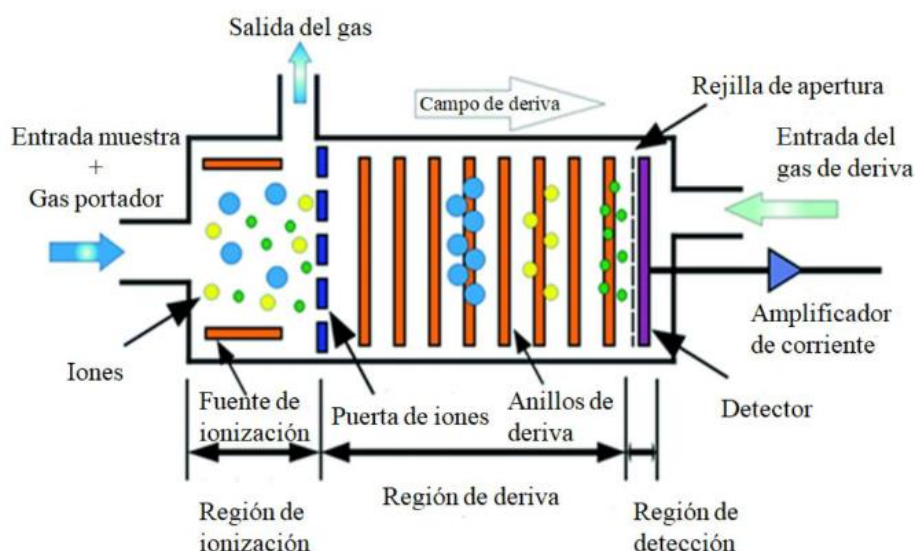


Figura I.21. Esquema general de un espectrómetro de movilidad iónica [144].

La velocidad de los iones es directamente proporcional al campo eléctrico aplicado, E (V/cm), en el que cada ion en el tubo de deriva colisiona con las moléculas de gas de deriva. La velocidad viene determinada por el número de colisiones de los iones con las moléculas de gas deriva, en el tubo de deriva.

$$V = K \cdot E$$

Siendo K la constante de movilidad iónica ($cm^2/V \cdot cm$), la cual es característica de cada ion y se define como:

$$K = \frac{l^2}{V \cdot t}$$

Donde, l es la longitud del tubo de deriva en cm, V es la velocidad de desplazamiento en cm/s y t es el tiempo de deriva en segundos.

Con el fin de normalizar los valores de K , éstos son corregidos con la presión y la temperatura, definiendo para ello la constante de movilidad reducida K_0 ($\text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{cm}$) mediante la siguiente expresión:

$$K_0 = K \frac{273}{T} \frac{P}{101}$$

El cálculo de la K_0 solo es posible realizarlo para valores bajos de campo eléctrico, ya que para valores mayores de campo la movilidad iónica deja de ser constante y pasa a depender del campo aplicado [142-144].

Aunque la IMS es ampliamente utilizada debido a sus características, en los últimos años se ha acoplado a técnicas cromatográficas como la GC, con el objeto de conseguir una separación previa de los constituyentes de la muestra empleando una columna capilar para facilitar la cuantificación de los compuestos volátiles y semivolátiles y aumentar así la selectividad del método.

El funcionamiento es el mismo, pero al realizar el acoplamiento se obtiene como resultado un espectro en tres dimensiones, siendo el eje X, el tiempo de deriva (ms), el eje Y, el tiempo de retención (s) y el eje Z, la intensidad (Figura 1.22). Estos espectros proporcionan tanto información cuantitativa (el área del pico está relacionada con la concentración), como cualitativa (la posición de la señal está relacionada con la forma y tamaño) de los compuestos analizados. Además, el RIP se va consumiendo con la presencia de analito, es decir, su señal disminuye cuando aumenta la señal de éste. El acoplamiento GC-IMS reúne las características de separación de la cromatografía de gases con la respuesta de alta sensibilidad y rapidez de la espectrometría de la movilidad iónica. Este instrumento de análisis permite detectar gran cantidad de compuestos a partir de cualquier muestra de tipo biológica, ambiental o alimentaria [145-147].

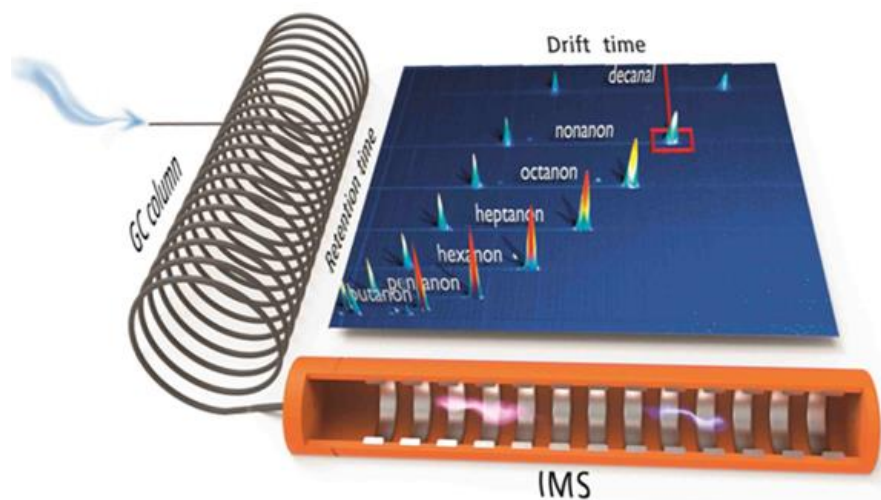


Figura I.22. Ejemplo de espectro de separación de VOCs por GC-IMS [143]

Debido a las tres dimensiones de las medidas GC-IMS, es necesario la utilización y manejo de herramientas que ayuden a ordenar y simplificar dichos datos para poder tratarlos. En química, uno de los métodos más utilizados para ello es la quimiometría, una disciplina que se basa en el empleo de métodos matemáticos, estadísticos y de lógica formal para obtener una información óptima de los datos químicos empleados.

La combinación GC-IMS se ha utilizado previamente para la evaluación simultánea de VOCs urinarios y fecales en pacientes pediátricos con EII junto con un enfoque de validación como tratamiento estadístico para la clasificación de los datos [147]. En muestras de aliento, esta técnica ha permitido distinguir entre pacientes con EII y controles sanos y, entre EC y CU [148]. Además, Bosch et al. llevaron a cabo un estudio para explorar el potencial de los patrones de VOCs fecales para predecir el curso de la EII en adultos utilizando GC-IMS en el que se utilizó un enfoque de validación cruzada como tratamiento de datos [149].

I.12. BIBLIOGRAFÍA

1. Sambuelli, A. M., Negreira, S., Gil, A., Goncalves, S., Chavero, P., Tirado, P., Bellicoso, M. & Huernos, S. (2019). Manejo de la enfermedad inflamatoria intestinal: Revisión y Algoritmos de tratamiento. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*, 49, 10- 48.
2. Ballester, M. P., Boscá-Watts, M. M. & Mínguez M. (2018). Enfermedad de Crohn. *Medicina Clínica*, 15, 26-33.
3. Ocaña S. & Casa M. (2016). Biomarcadores de interés en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Educ Contin en el Lab clínico*, 22, 72–84.
4. Rodríguez-Moranta F., Lobatón T., Rodríguez-Alonso L. & Guardiola J. (2013). Calprotectina fecal en el diagnóstico de enfermedades inflamatorias. *Gastroenterol Hepatol*, 6, 400–6.
5. Oliveros-Wilches R., Prieto-Ortiz, R., Reyes-Meneses, J. C., Parrano, D., Rengifo-Pardo, A., Cepeda-Vásquez, R. & Cañada, R. (2022). Historia y gastroenterología. Enfermedad de Crohn. *Asociación Colombiana de Gastroenterología*, 37, 114-116.
6. Chaparro, M., Garre, A., Núñez Ortiz, A., Diz-Lois Palomares, M. T., Rodríguez, C., Riestra, S., Vela, M., Benítez, J. M., Fernández Salgado, E., Sánchez Rodríguez, E. & Hernández, V., (2021) On Behalf Of The EpidemIBD Study Group Of Geteccu. Incidence, clinical characteristics and management of inflammatory bowel disease in Spain: large-scale epidemiological study. *J. Clin. Med*, 10, 2885.
7. Maloy, K. J. & Powrie, F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, 474, 298-306.
8. Silva, F., Gatica, T., & Pavez, C. (2019). Etiología y fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 30, 262-272.
9. Sepúlveda, S. E., Beltrán, C. J., Peralta, A., Rivas, P., Rojas, N., Figueroa, C., Quera, R. & Hermoso, M. A. (2008). Enfermedad inflamatoria intestinal: Una mirada inmunológica. *Revista médica de Chile*, 136, 367-375.
10. Wehkamp, J., Salzman, N. H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R. E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R. & Feathers, R. W. (2005). Reduced Paneth cell α -defensins in ileal Crohn's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 18129-18134.

11. Di Sabatino, A., Biancheri, P., Rovedatti, L., MacDonald, T. T. & Corazza, G. R. (2012). New pathogenic paradigms in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Disease*, 8, 368-371.
12. Bamias, G., Mishina, M., Nyce, M., Ross, W. G., Kollias, G., Rivera-Nieves, J., Pizarro, T. T. & Cominelli, F. (2006). Role of TL1A and its receptor DR3 in two models of chronic murine ileitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 8441-8446.
13. Grimm, M. C., & Pavli, P. (2004). NOD2 mutations and Crohn's disease: are Paneth cells and their antimicrobial peptides the link?. *Gut*, 53, 1558-1560.
14. Abdo, Y. Z. (2017). Evolución del conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal al Día*, 16, 30-36.
15. Yamazaki, K., McGovern, D., Ragoussis, J., Paolucci, M., Butler, H., Jewell, D., Cardon, L., Takazoe, M., Tanaka, T., Ichimori, T. & Saito, S. (2005). Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease. *Human molecular genetics*, 14, 3499-3506.
16. Zhernakova, A., van Diemen, C. & Wijmenga, C. (2009). Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases. *Nature Review Genetics*, 10, 43-55.
17. Kugathasan, S. & Amre, D. (2006). Inflammatory bowel disease – Environmental modification and genetic determinants. *Pediatric Clinic North America*, 56, 727-749.
18. Díaz, M., Lana, R., & Mendoza, J. L. (2007). Definiciones y manifestaciones clínicas generales. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*, 3, 21-8.
19. Ekblom, A., Helmick, C., Zack, M. & Adami, H. O. (1991). The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology*, 100, 350-358.
20. Barnich, N., Carvalho, F. A., Glasser, A. L., Darcha, C., Jantscheff, P., Allez, M., Peeters, H., Bommelaer, G., Desreumaux, P., Colombel, J. F. & Darfeuille-Michaud, A. (2007). CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *The Journal of clinical investigation*, 117, 1566-1574.
21. Martín-de-Carpi, J., Rodríguez, A., Ramos, E., Jiménez, S., Martínez-Gómez, M. J. & Medina, E. (2013). Increasing incidence of pediatric inflammatory bowel disease in Spain (1996-2009): the SPIRIT Registry. *Inflammatory Bowel Disease*, 19, 73-80.

22. Jess, T., Simonsen, J., Nielsen, N. M., Jorgensen, K. T., Bager, P., Ethelberg, S. & Frisch, M. (2011). Enteric Salmonella or Campylobacter infections and the risk of inflammatory bowel disease. *Gut*, 60,318-324.
23. Rodríguez, L. A. G., Ruigómez, A., & Panés, J. (2006). Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 130, 1588-1594.
24. Gomollón, F., Dignass, A., Annese, V., Tilg, H., Van Assche, G., Lindsay, J. O., Peyrin-Biroulet, L., Cullen, G. J., Daperno, M., Kucharzik, T., & Rieder, F. (2017). 3rd European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016: part 1: diagnosis and medical management. *Journal of Crohn's and Colitis*, 11, 3-25.
25. Guarner, F. (2011). Microbiota intestinal y enfermedades inflamatorias del intestino. *Gastroenterología y hepatología*, 3, 147-154.
26. Frank, D. N., St. Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., & Pace, N. R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the national academy of sciences*, 104, 13780-13785.
27. Hooper, L. V., & Gordon, J. I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292, 1115-1118.
28. Clavel, T., & Haller, D. (2007). Bacteria-and host-derived mechanisms to control intestinal epithelial cell homeostasis: implications for chronic inflammation. *Inflammatory bowel diseases*, 13, 1153-1164.
29. Spor, A., Koren, O., & Ley, R. (2011). Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 279-290.
30. Colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn - Clínica Rusca Sagués. Disponible en: <https://www.ruscasagues.es/colitis-ulcerosa-y-enfermedad-de-crohn/>. (Acceso 08/09/23).
31. Eckburg, P. B., & Relman, D. A. (2007). The role of microbes in Crohn's disease. *Clinical Infectious Diseases*, 44, 256-262.
32. Gionchetti, P., Amadini, C., Rizzello, F., Venturi, A., Poggioli, G., & Campieri, M. (2003). Probiotics for the treatment of postoperative complications following intestinal surgery. *Best Practice & Research*, 17, 821-31.
33. Joossens, M., Huys, G., Cnockaert, M., De Preter, V., Verbeke, K., Rutgeerts, P., Vandamme, P. & Vermeire, S. (2011). Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*, 60, 631-637.

34. Bischoff, S. C., Escher, J., Hébuterne, X., Kłęk, S., Krznaric, Z., Schneider, S., Shamir, R., Stadelova, K., Wierdsma, N., Wiskin, A. E. & Forbes, A. (2020). ESPEN practical guideline: Clinical Nutrition in inflammatory bowel disease. *Clinical Nutrition*, 39, 632-653.
35. Schneeweiss, B., Lochs, H., Zauner, C., Fischer, M., Wyatt, J., Maier-Dobersberger, T., & Schneider, B. (1999). Energy and substrate metabolism in patients with active Crohn's disease. *The Journal of nutrition*, 129, 844-848.
36. Merayo-Mancebo, D. *Relación entre niveles de Vitamina D y clínica visual en pacientes con Esclerosis Múltiple*. Disponible en: <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/54286/TFM-H586.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Acceso 08/09/23).
37. Mahid, S. S., Minor, K. S., Soto, R. E., Homung, C., A., & Galandiuk S. (2006). Smoking and inflammatory bowel disease: a metaanalysis. *Mayo Clinic Proceedings*, 81, 1462-71.
38. Zhang Y. Z., & Li, Y. Y. (2014). Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World Journal Gastroenterology*, 20, 91-9
39. Lindberg, E., Tysk, C., Andersson, K., & Jarnerot, G. (1988). Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut*, 29, 352-357.
40. Cosnes, J., Beaugerie, L., Carbonnel, F., & Gendre, J., P. (2001). Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology*, 120, 1093-1099.
41. García-Vega E. & Fernandez-Rodriguez, C. (2004). A stress management programme for Crohn's disease. *Behaviour Research and Therapy*, 42, 367-383
42. Loftus, E. V. (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 126, 1504-1517.
43. Kronman, M. P., Zaoutis, T. E., Haynes, K., Feng, R., & Coffin, S. E. (2012). Antibiotic exposure and IBD development among children: a population-based cohort study. *Pediatrics*, 130, 794-803.
44. Reinisch, W., Miehsler, W., Dejaco, C., Harrer, M., Waldhoer, T., Lichtenberger, C., & Vogelsang, H. (2003). An open-label trial of the selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, rofecoxib, in inflammatory bowel disease-associated peripheral arthritis and arthralgia. *Alimentary Pharmacology Therapeutics*, 17, 1371-1380.
45. Ortizo, R., Lee, S. Y., Nguyen, E. T., Jamal, M. M., Bechtold, M. M., & Nguyen, D. L. (2017). Exposure to oral contraceptives increases the risk for development of inflammatory bowel disease: a meta-analysis of case-controlled and cohort studies. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 29, 1064-1070.

46. Kaplan, G. G., Hubbard, J., Korzenik, J., Sands, B. E., Panaccione, R., Ghosh, S., Wheeler, A. J. & Villeneuve, P. J. (2010). The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution: a novel association. *The American journal of gastroenterology*, 105, 2412.
47. Jones, P. D., Kappelman, M. D., Martin, C. F., Chen, W., Sandler, R. S. & Long, M. D. (2015). Exercise decreases risk of future active disease in patients with inflammatory bowel disease in remission. *Inflammatory bowel diseases*, 21, 1063-1071.
48. Sicilia, B., Gasull, M. A., & Gomollón F. (2007). Epidemiología de las enfermedades inflamatorias intestinales. Factores ambientales internos y externos en su patogenia. *Enfermedad inflamatoria intestinal*, 3, 29-50.
49. López-Sanromán, A., Carpio, D., Calvet, X., Romero, C., Cea-Calvo, L., Juliá, B., & Argüelles-Arias, F. (2017). Perceived emotional and psychological impact of ulcerative colitis on outpatients in Spain: UC-LIFE survey. *Digestive diseases and sciences*, 62, 207-216.
50. Leone, S., Samhan-Arias, A., Ben-Shachar, I., Derieppe, M., Dinc, F., Grosu, I., Guinea, C., Lignell, J., Smailys, G., Sturludóttir, S., & Squires, S. (2016). ECCO-EFCCA Patient Guidelines on Ulcerative Colitis (UC). *Brussels: EFCCA*, 21, 1-29.
51. Paredes, J. M., Barrachina, M. M., Román, J., & Moreno-Osset, E. (2005). Patología articular en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterología y hepatología*, 28, 240-249.
52. Ferreira, R. M., Pimenta, S., Bernardes, M., & Costa, L. (2021). Asociación de anticuerpos anti-Saccharomyces cerevisiae con fenotipo clínico en pacientes con espondiloartritis. *Reumatología Clínica*, 17, 376-379.
53. Expósito, A. C. (2019). Enfermedad de Crohn en Atención Primaria. Crohn disease in Primary Health Care. *Revista de la Fundación de La Enfermería de Cantabria*, 3, 18-26.
54. Van Assche, G., Dignass, A., Panes, J., Beaugerie, L., Karagiannis, J., Allez, M., Ochsenkühn, T., Orchard, T., Rogler, G., Louis, E. & Kupcinskas, L. (2010). The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's and Colitis*, 4, 7-27.
55. De la Morena, F., & Gisbert, J. P. (2008). Anemia and inflammatory bowel disease. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 100, 285.

56. Detsky, A. S., Baker, J. P., Johnston, N., Whittaker, S., Mendelson, R. A., & Jeejeebhoy, K. N. (1987). What is subjective global assessment of nutritional status? *Journal of parenteral and enteral nutrition*, 11, 8-13.
57. Panizo, C., & Ortuño, F. (2009). Capítulo 2, Introducción a la evaluación del Hemograma, Panizo C. Lecumberri R., Rodríguez P., Interpretación básica de las pruebas de laboratorio de Hematología. Asociación Española de Hematología y Hemostasia, 19-21.
58. Karoui, S., Ouerdiane, S., Serghini, M., Jomni, T., Kallel, L., Fekih, M., Boubaker, J. & Filali, A. (2007). Correlation between levels of C-reactive protein and clinical activity in Crohn's disease. *Digestive and Liver Disease*, 39, 1006-1010.
59. Vermeire, S., Van Assche, G., & Rutgeerts, P. (2004). C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 10, 661-665.
60. González, V., Reyes Urueña, J., Alcina, M., Arando Lasagabaster, M., & Barberà, M. J. Clínica, tratamiento y diagnóstico de laboratorio de las ITS y el VIH. Disponible en: <https://openaccess.uoc.edu/handle/10609/144047>. . (Acceso 07/09/23).
61. Ayling, R. M., & Kok, K. (2018). Fecal calprotectin. *Advances in clinical chemistry*, 87, 161-190.
62. Sutherland, A. D., Geary, R. B., & Frizelle, F. A. (2008). Review of fecal biomarkers in inflammatory bowel disease. *Diseases of the colon & rectum*, 51, 1283-1291.
63. Benítez, J. M., & García-Sánchez, V. (2015). Faecal calprotectin: management in inflammatory bowel disease. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 6, 203.
64. Sherwood, R. A. (2012). Faecal markers of gastrointestinal inflammation. *Journal of clinical pathology*, 65, 981-985.
65. Van Rheenen, P. F., Van de Vijver, E., & Fidler, V. (2010). Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *Bmj*, 341.
66. Wright, E. K., Kamm, M. A., De Cruz, P., Hamilton, A. L., Ritchie, K. J., Keenan, J. I., Leach, S., Burgess, L., Aitchison, A., Gorelik, A. & Liew, D. (2016). Comparison of fecal inflammatory markers in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 22, 1086-1094.
67. Von Roon, A. C., Karamountzos, L., Purkayastha, S., Reese, G. E., Darzi, A. W., Teare, J. P., Paraskeva, P. & Tekkis, P. P. (2007). Diagnostic precision of fecal

- calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy. *Official journal of the American College of Gastroenterology ACG*, 102, 803-813.
68. Rogler, G., & Biedermann, L. (2015). Clinical utility of biomarkers in IBD. *Current gastroenterology reports*, 17, 1-9.
69. Silberer, H., Küppers, B., Mickisch, O., Baniewicz, W., Drescher, M., Traber, M. L., Kempf, A. & Schmidt-Gayk, H. (2005). Fecal leukocyte proteins in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Clinical Laboratory*, 51, 117-26.
70. Prideaux, L., De Cruz, P., Ng, S. C., & Kamm, M. A. (2012). Serological antibodies in inflammatory bowel disease: a systematic review. *Inflammatory bowel diseases*, 18, 1340-1355.
71. Lawrance, I. C., Murray, K., Hall, A., Sung, J. J., & Leong, R. (2004). A prospective comparative study of ASCA and pANCA in Chinese and Caucasian IBD patients. *Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG*, 99, 2186-2194.
72. Dubinsky, M. (2009). What is the role of serological markers in IBD? Pediatric and adult data. *Digestive diseases*, 27, 259-268.
73. Abdo, Y. Z. (2017). Evolución del conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal al Día*, 16, 30-36.
74. Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M. & Binder, V. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411,599-603.
75. Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R., H. & Achkar, J. P. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411,603-606.
76. Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R. K., Duerr, R. H., McGovern, D. P. & Hui, K. Y. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, 491,119-24.
77. Gee, M. S. & Harisinhani, M. G. (2011). MRI in patients with IBD. *Reson. Imaging.*, 33, 527-34.
78. Girelli, C. M. (2011) Capsule endoscopy in Cronh's disease. *Recenti progressi in medicina*, 102, 238-45.

79. Gompertz, M. & Sedano, R. (2019). Manifestaciones clínicas y endoscópicas en enfermedad inflamatoria intestinal. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 30, 273–282.
80. Stidham, R. W., Liu, W., Bishu, S., Rice, M. D., Higgins, P. D., Zhu, J., & Waljee, A. K. (2019). Performance of a deep learning model vs human reviewers in grading endoscopic disease severity of patients with ulcerative colitis. *JAMA network open*, 2, 193963-193963.
81. Travis, S. P., Schnell, D., Krzeski, P., Abreu, M. T., Altman, D. G., Colombel, J. F., Feagan, B. G., Hanauer, S. B., Lémann, M., Lichtenstein, G. R. & Marteau, P. R. (2012) Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). *Gut*. 61, 535-42.
82. Ikeya, K., Hanai, H., Sugimoto, K., Osawa, S., Kawasaki, S., Iida, T., Maruyama, Y. & Watanabe, F. (2016). The ulcerative colitis endoscopic index of severity more accurately reflects clinical outcomes and long-term prognosis than the Mayo endoscopic score. *Journal of Crohn's and Colitis*, 10, 286-295.
83. Khanna, R., Nelson, S. A. & Feagan, B. G. (2016). Endoscopic scoring indices for evaluation of disease activity in Crohn's disease. *Cochrane Database Systematic Review*, 8, 010642.
84. Khanna, R., Zou, G., Stitt, L., Feagan, B. G., Sandborn, W. J., Rutgeerts, P., McDonald, J. W., Dubcenco, E., Fogel, R., Panaccione, R. & Jairath, V. (2017). Responsiveness of Endoscopic Indices of Disease Activity for Crohn's Disease. *American Journal Gastroenterology*, 112, 1584-1592.
85. Mary, J. Y & Modigliani, R. (1989). Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: GETAID. *Gut*, 30, 983-989.
86. Abadia, C. D. (2008). Terapéutica biológica en la enfermedad de Crohn y en la colitis ulcerosa. *Medicina balear*, 23, 19-23.
87. Rousseaux, C., Lefebvre, B. & Dubuquoy, L. (2005). Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Journal of Experimental Medicine*, 201, 1205-1215.
88. Caprilli R. J., Cesarini M. & Angelucci, E. (2009). The long journey of salicylates in ulcerative colitis: the past and the future. *Journal of Crohn's and Colitis*, 3, 149-156.
89. Williams, C., Panaccione, R., Ghosh, S. & Rioux, K. (2011) Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 4, 237-248.

90. Ford, A. C., Achkar, J. P., Khan, K. J., Kane, S. V., Talley, N. J., Marshall, J. K., & Moayyedi, P. (2011). Efficacy of 5-aminosalicylates in ulcerative colitis: systematic review and meta-analysis. Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *American Journal Gastroenterology*, 106, 590-599.
91. Hanauer, S., Schwartz, J., Robinson, M., Roufail, W., Arora, S., Cello, J. & Safdi M. (1993). Mesalamine capsules for treatment of active ulcerative colitis: results of a controlled trial. Pentasa Study Group. *American Journal Gastroenterology*, 88, 1188-1197.
92. Malchow, H., Ewe, K., Brandes, J. W., Goebell, H., Ehms, H., Sommer, H., & Jesdinsky H. (1984). European Cooperative Crohn's Disease Study (ECCDS): results of drug treatment. *Gastroenterology*, 86, 249-266.
93. Summers, R. W., Switz, D. M., Sessions, J. T., Jr, Bechtel, J. M., Best, W. R., Kern, F., Jr, & Singleton, J. W. (1979). National cooperative Crohn's disease study: results of drug treatment. *Gastroenterology*, 77, 847-869.
94. Cuffari, C., Hunt, S., & Bayless, T. (2001). Utilisation of erythrocyte 6-thioguanine metabolite levels to optimize azathioprine therapy inpatients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 48, 642-646.
95. Konidari, A., & Matary, W. E. (2014). Use of thiopurines in inflammatory bowel disease: safety issues. *World Journal Gastrointestinal Pharmacology Therapeutics*, 5, 63-76.
96. Pearson, D. C., May, G. R., Fick, G. H., & Sutherland, L. R. (1995). Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn's disease. A meta-analysis. *Annals of Internal Medicine*, 123, 132-142.
97. Wang, Y., MacDonald, J. K., Vandermeer, B., Griffiths, A. M. & El-Matary, W. (2015). Methotrexate for maintenance of remission in ulcerative colitis. *The Cochrane database of systematic reviews*, 11, 1-66.
98. Fraser, A. G. (2003). Methotrexate: first-line or second-line immunomodulator? *European journal of gastroenterology & hepatology*, 15, 225-231.
99. Murch, S. H., Braegger, C. P., Walker-Smith, J. A. & MacDonald, T. T. (1993). Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease, *Gut*, 34, 1705.
100. Braegger, C. P., Nicholls, S., Murch, S. H., Stephens, S., & MacDonald. P. (1992). Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet*, 339-389.

101. Järnerot, G., Hertervig, E., Friis-Liby, I., Blomquist, L., Karlén, P., Grännö, C., Vilien, M., Ström, M., Danielsson, A., Verbaan, H., Hellström, P. M., Magnuson, A., & Curman, B. (2005). Infliximab as rescue therapy in severe to moderately severe ulcerative colitis: a randomized, placebo-controlled study. *Gastroenterology*, 128, 1805-1811.
102. Satsangi, J., Silverberg, M. S., Vermeire, S., & Colombel, J. (2006). The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*, 55, 749-753.
103. Monrroy, H., & Ibáñez, P. (2013). Clasificación de la gravedad de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterología Latinoamericana: Clasificaciones en gastroenterología*, 24, 85-90.
104. Solberg, I. C., Lygren, I., Jahnsen, J., Aadland, E., Høie, O., Cvancarova, M., Bernklev, T., Henriksen, M., Sauar, J., Vatn, M. H., & Moum, B. (2009). Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study). *Scandinavian Journal Gastroenterology*, 44, 431-440.
105. Carr, S., Aebersold, R., Baldwin, M., Burlingame, A. L., Clauser, K., & Nesvizhskii, A. (2004). The need for guidelines in publication of peptide and protein identification data: Working Group on Publication Guidelines for Peptide and Protein Identification Data. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3, 531-533.
106. Rocke, D. M. (2004). Design and analysis of experiments with high throughput biological assay data. *In Seminars in cell & developmental biology*, 15, 703-713.
107. Storr, M., Vogel, H., J. & Schicho, R. (2013). Metabolomics: is it useful for IBD? *Current Opinion og Gastroenterology*, 29, 378-383.
108. Gallagher, K., Catesson, A., Griffin, J., Holmes, E., & Williams, H. (2021). Metabolomic analysis in inflammatory bowel disease: A systematic review. *Journal of Crohn´s and Colitis*, 15, 813-826.
109. Schicho, R., Shaykhtudinov, R., Ngo, J., Nazyrova, A., Schneider, C., Panaccione, R., Kaplan, G. G., Vogel, H. J. & Storr, M. (2012). Quantitative metabolomic profiling of serum, plasma, and urine by 1H NMR spectroscopy discriminates between patients with inflammatory bowel disease and healthy individuals. *Journal of proteome research*, 11, 3344-3357.
110. Williams, H. R., Willsmore, J. D., Cox, I. J., Walker, D. G., Cobbold, J. F., Taylor-Robinson, S. D., & Orchard, T. R. (2012). Serum metabolic profiling in inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences*, 57, 2157-2165.
111. Williams, H., R., Cox, J. I., Walker, D. G., North, B. V., Patel, V. M., Marshall, S., E., Jewell, D. P., Ghosh, S., Thomas, H. J., Teare, J. P., & Jakobovits, S. (2009).

- Characterization of inflammatory bowel disease with urinary metabolic profiling. *Official journal of the American College of Gastroenterology ACG*, 104, 1435-1444.
112. Hisamatsu, T., Okamoto, S., Hashimoto, M., Muramatsu, T., Andou, A., Uo, M., Kitazume, M.T., Matsuoka, K., Yajima, T., Inoue, N., Kanai, T., Ogata, H., Iwao, Y., & Hibi, T. (2012). Novel, objective, multivariate biomarkers composed of plasma amino acid profiles for the diagnosis and assessment of inflammatory bowel disease. *PloS one*, 7, e31131.
113. Leon, Z., Garcia-Canaveras, J. C., Donato, M. T. & Lahoz, A. (2013). Mammalian cell metabolomics: experimental design and sample preparation. *Electrophoresis* 34, 2762-2775.
114. Kitson, F. G., Larsen, B. S., & McEwen, C. N. (1996). Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide. *Academic Press*.
115. Barry, E., F. (2004). Columns: Packed and capillary; column selection in gas chromatography. *Modern practice of gas chromatography*, 65-191.
116. Gutiérrez Bouzán, M., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. Gutiérrez, MC; Droguet, M." La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor". *Boletín Intexter*, julio, 122, 35-41.
117. Keulemans, A. I. M. 'Gas chromatography'. (1959). *Reinhold Publisher Corporation*, 43.
118. Bartle, K., D. & Myers, P. (2002). History of gas chromatography. *TrAC - Trends Anal. Chem*, 21, 547-557.
119. Davis, J. M., Pompe, M., & Samuel, C. (2000). Justification of statistical overlap theory in programmed temperature gas chromatography: Thermodynamic origin of random distribution of retention times. *Analytical chemistry*, 72, 5700-5713.
120. Koppelaar, D W., Barinaga, C., J., Denton, M. B., Sperline, R. P., Hieftje, G. M., Schilling, G. D., & Iv, I. V. (2005). *MS detectors*, 418.
121. Espectrometría de masas. Disponible en: https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf. (Acceso 08/09/23)
122. Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C. F., & Miró, M. (2019). Encyclopedia of analytical science. Elsevier.
123. Gowda, G. N., & Djukovic, D. (2014). Overview of mass spectrometry-based metabolomics: opportunities and challenges. *Mass Spectrometry in Metabolomics: Methods and Protocols*, 1, 3-12.

124. Chromatography Explained: How Mass Spectrometry Adds Information to Your Analysis .Disponible en: <https://blog.perkinelmer.com/posts/chromatography-explained-how-mass-spectrometry-adds-information-to-your-analysis/>. (Acceso 08/09/23)
125. Kohashi, M., Nishiumi, S., Ooi, M., Yoshie, T., Matsubara, A., & Suzuki M. (2014). A novel gas chromatography mass spectrometry-based serum diagnostic and assessment approach to ulcerative colitis. *Journal of Crohn's Colitis*, 8, 1010-1021.
126. Ahmed, I., Greenwood, R., Costello, B., Ratcliffe, N., & Probert, C. S. (2016) Investigation of faecal volatile organic metabolites as novel diagnostic biomarkers in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology Therapeutics*, 43, 596-611.
127. De Preter, V., & Verbeke, K. (2013). Metabolomics as a diagnostic tool in gastroenterology. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*, 4, 97.
128. Chen, J. J., Liu, Z., Fan, S. H., Yang, D., Y., Zheng, P., Shao, W. H., Qi, Z. G., Xu, X. J., Li, Q., Mu, J. & Yang, Y. T. (2014). Combined application of NMR-and GC-MS-based metabonomics yields a superior urinary biomarker panel for bipolar disorder. *Scientific reports*, 4, 5855.
129. Bovee, T. F., Hoogenboom, L. A., Hamers, A. R., Traag, W. A., Zuidema, T., Aarts, J. M., Brouwer, A., & Kuiper, H. A. (1998). Validation and use of the CALUX-bioassay for the determination of dioxins and PCBs in bovine milk. *Food Additives & Contaminants*, 15, 863-875.
130. Rodrigues, M. V. N., Reyes, F. G. R., Magalhães, P. M. & Rath, S. (2007). GC-MS determination of organochlorine pesticides in medicinal plants harvested in Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 18, 135-142.
131. Mazzarino, M., Orengia, M. & Botrè, F. (2007). Application of fast gas chromatography/mass spectrometry for the rapid screening of synthetic anabolic steroids and other drugs in anti-doping analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 4117-4124.
132. Eiceman, G. A., & Karpas, Z. (2013). Ion mobility spectrometry. *CRC press*.
133. Decree, R. (2001). Real Decreto 783/2001, de 6 de julio por el que se aprueba el Reglamento sobre Protección Sanitaria contra Radiaciones Ionizantes.
134. P. V., Johnson, L., W. Beegle, H. I. Eiceman, I. Kanik & Kim, G., A. (2007)., Ion Mobility Spectrometry in Espace Exploration, *Int. J. Mass Spectrom*, 262, 1-15.
135. Kanu, A. B., & Hill Jr, H. H. (2008). Ion mobility spectrometry detection for gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1177, 12-27.

136. Gunzer, F. (2016). Comparison of experimental and calculated ion mobilities of small molecules in air. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 20-16.
137. Kirk, A. T., Raddatz, C. R., & Zimmermann, S. (2017). Separation of isotopologues in ultra-high-resolution ion mobility spectrometry. *Analytical chemistry*, 89, 1509-1515.
138. Davidson, K. L. & Bush, M. F. (2017). Effects of drift gas selection on the ambient-temperature, ion mobility mass spectrometry analysis of amino acids. *Analytical chemistry*, 89, 2017-2023.
139. Wu, C., Siems, W. F., Asbury, G. R., & Hill, H. H. (1998). Electrospray ionization high-resolution ion mobility spectrometry mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 70, 4929-4938.
140. Borsdorf, H., Nazarov, E. G., & Eiceman, G. A., (2002). Atmospheric pressure chemical ionization studies of non-polar isomeric hydrocarbons using ion mobility spectrometry and mass spectrometry with different ionization techniques. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 13, 1078-1087.
141. Cumeras, R., Figueras, E., Davis, C. E., Baumbach, J. I., & Gracia, I. (2015). Review on ion mobility spectrometry. Part 1: current instrumentation. *Analyst*, 140, 1376-1390.
142. Creaser, C. S., Griffiths, J. R., Bramwell, C. J., Noreen, S., Hill, C. A., & Thomas, C. P. (2004). Ion mobility spectrometry: a review. Part 1. Structural analysis by mobility measurement. *Analyst*, 129, 984-994.
143. Gesellschaft für Analytische Sensortechnik mbH (G.A.S., Dortmund). Disponible en: <https://www.gas-dortmund.de/index.php?spath=389>. (Acceso 08/09/23)
144. Arroyo-Manzanares, N., García-Nicolás, M., Castell, A., Campillo, N., Viñas, P., López-García, I., & Hernández-Córdoba, M. (2019). Untargeted headspace gas chromatography –ion mobility spectrometry analysis for detection of adulterated honey. *Talanta*, 205, 120123.
145. UNE, ISO 22718. Cosméticos. Microbiología. Detección de *Staphylococcus aureus*. Disponible en: <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma/?c=N0071255>. (Acceso 08/09/23)
146. ISO 12647-2. Tecnología gráfica. Control del proceso para la elaboración de separaciones de color, pruebas e impresos tramados.). Disponible en: <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma?c=N0056069>. (Acceso 08/09/23)
147. el Manouni el Hassani, S., Bosch, S., Lemmen, J. P., Brizzio Brentar, M., Ayada, I., Wicaksono, A. N., & de Meij, T. G. (2019). Simultaneous assessment of urinary

- and fecal volatile organic compound analysis in de novo pediatric IBD. *Sensors*, 19, 4496-4507.
148. Tiele, A., Wicaksono, A., Kansara, J., Arasaradnam, R. P., & Covington, J. A. (2019). Breath analysis using enose and ion mobility technology to diagnose inflammatory bowel disease-A pilot study. *Biosensors*, 9, 55-63.
149. Bosch, S., Wintjens, D. S., Wicaksono, A., Pierik, M., Covington, J. A., de Meij, T. G., & de Boer, N. K. (2022). Prediction of Inflammatory Bowel Disease Course Based on Fecal Scent. *Sensors*, 22, 2316-2323.

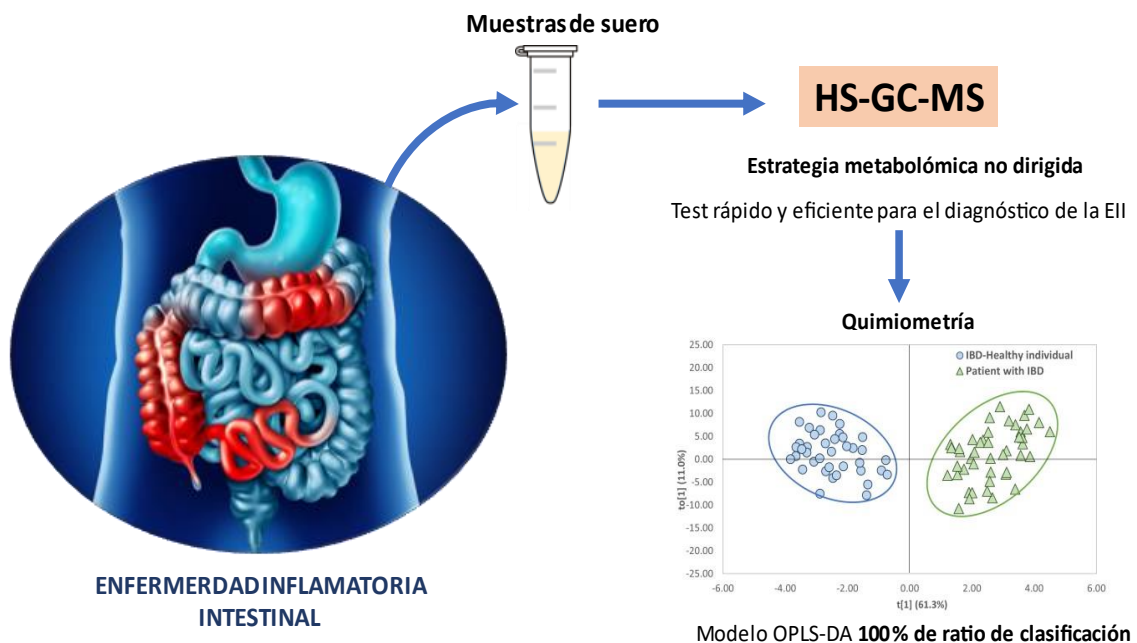
CAPÍTULO 1

APLICACIONES NO DIRIGIDAS DEL PERFIL DE VOLÁTILES DE MUESTRAS DE SUERO EN LA INVESTIGACIÓN DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL



RESUMEN

El diagnóstico de la EII depende de criterios basados en resultados histológicos, endoscópicos, radiológicos y clínicos. Estos estudios presentan inconvenientes como su elevado coste, y que son métodos invasivos y lentos. En este Capítulo, se propone una estrategia metabolómica no dirigida basada en la monitorización de compuestos volátiles en suero, mediante GC-MS y sistema de introducción de muestra de espacio de cabeza, como prueba complementaria, rápida y eficiente para el diagnóstico de pacientes con EII. Para desarrollar el método y construir un modelo quimiométrico que permita el diagnóstico de la EII, se recogieron muestras de suero de pacientes con EII y de voluntarios sanos sin EII. Los análisis se realizaron incubando 400 μ L de suero durante 10 minutos a 90 °C. Para el procesamiento de los datos se utilizó una estrategia metabolómica no dirigida. Se detectaron un total de 96 características, de las cuales un total de 10 compuestos volátiles pudieron ser identificados y confirmados mediante el análisis de estándares reales. El tratamiento quimiométrico consistió en un análisis OPLS-DA obteniendo un 100% de tasa de clasificación, ya que todas las muestras analizadas se clasificaron correctamente.



1.1. INTRODUCCIÓN

La EII es un trastorno inmunitario crónico y multifactorial caracterizado principalmente, aunque no de forma exclusiva, por la inflamación del intestino. En general, la EII engloba dos patologías diferentes: la CU y la EC. Clínicamente, ambas enfermedades comparten síntomas similares, como diarrea sanguinolenta, dolor abdominal, debilidad y pérdida de peso; mientras que suelen diferir en las complicaciones y la prevalencia, así como en la localización y profundidad de la inflamación [1,2]. Existen casos en los que es imposible diferenciar entre CU y EC, ya que los pacientes muestran características patológicas superpuestas de CU y EC, a menudo se llega a un diagnóstico provisional de EII no clasificada.

Actualmente, no existe ninguna prueba específica y única para el diagnóstico de la EII. Además, la enfermedad se presenta de forma fluctuante, con periodos de brotes inflamatorios que alternan con otros de remisión de la enfermedad. En primer lugar, se examinan los síntomas clínicos, que incluyen anemia, dolor abdominal, debilidad, pérdida de peso y diarrea con sangre y/o mucosidad. En general, la sospecha clínica de EII motiva la práctica de análisis de sangre y heces, colonoscopia y algunos estudios de imagen que confirman el diagnóstico excluyendo otras causas.

El análisis de sangre puede mostrar un recuento elevado de glóbulos blancos y niveles elevados de PCR. La PCR es una proteína plasmática sintetizada en el hígado que puede utilizarse como marcador para la determinación indirecta del grado de inflamación. En circunstancias normales, la PCR se sintetiza en pequeñas cantidades (<1 mg/L); sin embargo, debido a algunos estímulos, generalmente la inflamación, los hepatocitos aumentan rápidamente su síntesis [2,3].

En cuanto al análisis de heces, la CF es una proteína abundante y ampliamente distribuida, que se encuentra principalmente en monocitos, macrófagos reactivos y leucocitos polimorfonucleares. Su función biológica no se conoce con exactitud, pero destaca su actividad protectora en procesos inflamatorios, proliferativos e infecciosos, en los que sus niveles plasmáticos aumentan de 8 a 40 veces. Por ello, recientemente se ha propuesto la determinación de CF en heces como nuevo marcador para el diagnóstico de la EII [4,5], que puede utilizarse para predecir el riesgo de recaída o monitorizar la respuesta al tratamiento. Los marcadores fecales tienen la ventaja teórica de poseer una mayor especificidad para el diagnóstico de enfermedades gastrointestinales como la EII, ya que no se elevan en otros procesos de localización extradiigestiva como es el caso de la PCR [6-10].

Un nivel elevado de CF ($>50 \mu\text{g/g}$) identifica a los pacientes que tienen más probabilidades de padecer EII y que deben someterse a una colonoscopia. Por el contrario, un nivel de CF $<50 \mu\text{g/g}$ hace que el diagnóstico de EII sea altamente improbable. Sin embargo, el gran inconveniente de este biomarcador es que, en la actualidad, sus puntos de corte óptimos no están claramente definidos [11]. Así pues, la monitorización de los niveles de CF de manera individual no es actualmente una estrategia fiable para el diagnóstico y seguimiento de la EII sin el análisis de otros aspectos de la enfermedad.

La colonoscopia permite la visualización directa de la mucosa intestinal y la obtención de biopsias, por lo que es la prueba de referencia para el diagnóstico de la EII. Sin embargo, tiene algunos riesgos y limitaciones, ya que es un procedimiento invasivo con un coste relativamente elevado y requiere preparación intestinal y sedación del paciente. Además, se estima que más del 60% de las colonoscopias realizadas en pacientes jóvenes son potencialmente evitables, ya que sus resultados son normales [9].

A menudo es necesario reevaluar el estado de la enfermedad con exploraciones complementarias que permitan detectar la presencia de inflamación de forma segura, rápida y fiable. En el caso de las pruebas radiológicas, en los pacientes con EC, la resonancia magnética con contraste intestinal es preferible a la tomografía computarizada, ya que su precisión diagnóstica es mayor y evita la exposición frecuente a la radiación.

Así pues, el diagnóstico de la EII depende de criterios basados en los resultados de exámenes clínicos, endoscópicos, histológicos y radiológicos, que suelen ser costosos, invasivos y lentos. Por lo tanto, se necesitan herramientas de diagnóstico de bajo coste, rápidas y no invasivas. En los últimos años, los enfoques metabólicos han mostrado resultados prometedores en el diagnóstico de la EII. El análisis metabólico consiste en el estudio exhaustivo y cuantitativo del metaboloma, entendiendo éste como el conjunto completo de pequeñas moléculas llamadas metabolitos que son sintetizadas por un sistema biológico [12]. La selección de muestras en los estudios metabólicos es clave, ya que cada tipo de muestra proporciona información bioquímica diferente: la sangre puede proporcionar información útil sobre el metabolismo sistémico, mientras que los perfiles fecales son indicativos del metabolismo digestivo, y la orina proporciona un perfil del metabolismo endógeno. Debido a la diversidad química de los metabolitos, la elección de la técnica analítica también será decisiva en el estudio metabólico.

Actualmente, la $^1\text{H-NMR}$ y la LC con espectrometría de masas en tándem (MS/MS) son las técnicas más usadas en los estudios metabolómicos de pacientes con EII. La $^1\text{H-NMR}$ se ha utilizado en el análisis de biofluidos como plasma, suero, heces y orina de pacientes con esta enfermedad y se han comparado con individuos sanos sin EII. Estos estudios se han centrado principalmente en moléculas no complejas y pequeñas, como aminoácidos o metabolitos derivados, encontrando diferencias en los perfiles metabólicos entre los pacientes con EII y los controles sanos sin EII así como entre los subtipos de EII [13-18].

La LC-MS/MS también se ha aplicado para el seguimiento del mediador lipídico de la inflamación leucotrieno E4 en plasma [19], y el perfil lipídico en orina [20] como biomarcadores de la actividad de la EII. Recientemente, también se ha investigado el potencial de la LC acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), demostrando que existe una pérdida de "diversidad metabólica" entre los pacientes sanos sin EII y con EII, ya que los metabolitos intestinales se reducían con frecuencia, lo que provocaba alteraciones en la respuesta inmunitaria y la proliferación celular, entre otros procesos biológicos [21].

Otras técnicas, como la espectrometría de masas por resonancia de ciclotrón iónico con transformación de Fourier (FT-ICR-MS) [22] y la electroforesis capilar de inyección multisegmento (MSI-CE) acoplado al MS [23] también se han aplicado para el análisis de muestras fecales y orina, respectivamente, en diversos enfoques metabolómicos en el estudio de la EII.

La GC-MS ha permitido el análisis de metabolitos volátiles en suero [24] o heces [25] como enfoque de evaluación y detección de la EII o sus subtipos. En concreto, Kohashi et al. [24] se centraron en los metabolitos hidrosolubles para el diagnóstico de la CU, e informaron de que los componentes del ciclo de la urea (citrulina, ornitina y urea) y del ciclo del ácido tricarboxílico (ácido fumárico, ácido succínico y ácido málico) mostraron las alteraciones más significativas, y todos ellos, excepto la urea, exhibieron una disminución significativa de los niveles séricos en los pacientes con CU. Además, en los pacientes con CU se detectó una disminución significativa de los niveles séricos de varios aminoácidos, como isoleucina, lisina, histidina, leucina y metionina. Otras técnicas analíticas como la GC acoplada a la espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF) [26-28], o la GC bidimensional acoplada a la TOF-MS de alta resolución (GCxGC-HRTOF-MS) [29] también se han utilizado para diversos enfoques metabolómicos en el estudio de la EII en muestras de aliento, heces, biopsias de mucosa, suero y orina.

Ahmed et al. [25] monitorizaron entre 234 y 290 metabolitos para discriminar entre EC o CU inactiva y activa. Los metabolitos estadísticamente significativos para separar los grupos se clasificaron para grandes rasgos en aldehídos, cetonas, alcoholes secundarios, ésteres y ácidos grasos de cadena corta y ramificada. Estudios más recientes se centran en el análisis de VOCs fecales [30] y exhalados [31] utilizando GC-IMS.

El objetivo de este trabajo es investigar una aproximación metabolómica totalmente no dirigida basada en el perfil de VOCs totales obtenido por GC-MS para el diagnóstico de la EII. La novedad incluye que se propone un análisis de HS como tratamiento de la muestra de suero y sistema de introducción, evitando procedimientos más complejos propuestos hasta la fecha, que se basan en la microextracción en fase sólida (SPME) [24] o la combinación de extracción líquido-líquido y pasos de liofilización y derivatización [25]. Por otro lado, este es el primer estudio realizado de forma totalmente no dirigida.

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1. Instrumentación y software

Los análisis HS-GC-MS se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases 8890 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) equipado con sistema HS (Gerstel, Mülheim, Alemania) y acoplado a un espectrómetro de masas (5977B) detector cuadrupolar selectivo de masas, Agilent Technologies) con fuente de iones inertes basada en EI. La separación cromatográfica se realizó en una columna capilar HP-5MS (30 m × 0,25 mm de diámetro interior × 0,25 μm de espesor de película), también de Agilent Technologies.

El análisis y la adquisición de datos se realizaron con la aplicación MSD Chemstation Data Analysis (versión G1701EA), y los datos se procesaron con MS-DIAL (versión 4.80, RIKEN) y SIMCA-P (Umetrics, Malmö, Suecia).

1.2.2. Estándares y reactivos

Se utilizó un total de 10 patrones analíticos para la identificación de compuestos volátiles en muestras de suero: butanal, pentanal, tolueno, hexanal, etilbenceno, p-xileno, heptanal, 1-etil-3-metilbenceno, 1,3,5-trimetilbenceno y 2-etil-1-hexanol. Todos ellos fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.) y se prepararon

soluciones madre individuales a 1000 µg/mL en metanol MeOH. Todas las soluciones patrón se almacenaron a -20 °C.

El metanol (MeOH) de alta calidad fue suministrado por ChemLab (Zedelgem, Bélgica). El gas portador utilizado fue helio con una pureza del 99,99% y fue proporcionado por Air Liquide (Madrid, España).

Sigma-Aldrich también suministró una mezcla de alcanos (de C8 a C40) a 500 µg/mL en diclorometano. La mezcla de alcanos se preparó a 1 µg/mL en hexano y se utilizó como control de calidad durante todos los análisis.

1.2.3. Muestras

Los comités éticos de la Universidad de Murcia (Informe Favorable ID: 2908/2020) y del Hospital Universitario Rafael Méndez (Lorca, España) aprobaron este estudio. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes y voluntarios, y las muestras se utilizaron de acuerdo con las directrices del hospital.

Se reclutó a un total de 56 pacientes con EII y 48 voluntarios sin sospecha de enfermedad EII del Hospital Universitario Rafael Méndez. El diagnóstico de EII se estableció mediante criterios endoscópicos, histológicos y radiológicos. Dado que la EII es una enfermedad muy amplia, los pacientes que participaron en este estudio fueron seleccionados con diferentes cuadros clínicos para cubrir un amplio espectro de la enfermedad.

La Tabla 1.1. muestra las características clínicas y demográficas de la población del estudio. La cohorte del estudio comprendía un 55% de mujeres en el grupo de voluntarios sanos sin EII y un 64% de mujeres en el grupo de pacientes con EII. La edad media de los pacientes de la cohorte con EII y de los voluntarios sanos sin EII fue de 48,9 y 43,0 años, respectivamente. En la Tabla 1.1. también se muestran los valores de PCR, CF y otros parámetros como el colesterol, el hierro, leucocitos y la HGB, ya que se han observado valores anómalos de estos parámetros en pacientes con EII [32,33], aunque no se encontraron diferencias significativas en ninguno de estos parámetros entre los dos grupos. Cabe señalar que algunos voluntarios sanos sin EII mostraron una PCR elevada, lo que sugiere la existencia de otro proceso inflamatorio, no relacionado con la EII.

Los pacientes con EII que participaron en el estudio recibieron una amplia variedad de tratamientos, entre ellos los específicos de la enfermedad inflamatoria, como aminosalicilatos (mesalazina), tiopurinas (azatioprina), corticosteroides (budesonida,

dipropionato de beclometasona, prednisona y metilprednisolona) y biológicos (anti-TNF, anti-interleucinas IL12/23, anti-integrinas, inhibidores de JAK); así como suplementos minerales (hierro o calcio) y vitamínicos (ácido fólico, cianocobalamina, calciferol). En el caso de los voluntarios sin EII, algunos de ellos también tomaban algún tipo de medicación, como antihipertensivos, antibióticos, analgésicos, antipsicóticos o antidepresivos.

Tabla 1.1. Características clínicas y demográficas de los pacientes a estudio.

	Voluntarios sanos sin EII	Voluntarios con EII	P-valor ^a
Número de participantes	45	56	
Genero			
Hombre n (%)	20 (45)	20 (36)	
Mujer n (%)	25 (55)	36 (64)	
Edad (años)			
Mediana (IQR)	43,0 (23,0-63,4)	48,9 (38,2-57,1)	0,250
Colesterol (mg/dL)			
Mediana (IQR)	186,0 (161,5-208,0)	192,5 (170,5-215,0)	0,810
Desconocidos (%)	11	5	
Fe (µg/dL)			
Mediana (IQR)	86,3 (83,0-100,5)	84,8 (56,0-100,0)	0,740
Desconocidos (%)	51	64	
HGB (g/dL)			
Mediana (IQR)	13,6 (13,0-14,5)	14,1 (13,3-15,1)	0,584
Desconocidos (%)	7	14	
LEU (mg/dL)			
Mediana (IQR)	6,2 (6,1-7,6)	7,5 (5,7-8,6)	0,571
Desconocidos (%)	9	18	
PCR (mg/dL)			
Mediana (IQR)	0,5 (0,1-0,8)	0,7 (0,1-0,6)	0,280
Desconocidos (%)	16	2	
CF (µg/g)			
Mediana (IQR)	88,6 (68,0-127,0)	297,4 (29,5-287,4)	0,350
Desconocidos (%)	10	3	

HGB: Hemoglobina. LEU: leucocitos. PCR: proteína C reactiva. CF: Calprotectina fecal. IQR: Rango intercuartílico.

^aAmbos grupos fueron comparados estadísticamente usando al T-test.

Cada muestra de sangre se recogió en un tubo especial para la extracción de sangre. Este tubo contiene un gel separador que permite separar las células de la sangre, obteniéndose suero como resultado final tras ser centrifugado a 3000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, el suero se transfirió a un tubo limpio y se almacenó a -20 °C hasta su utilización

Para su análisis, las muestras de suero se atemperaron a temperatura ambiente durante aproximadamente media hora y se agitaron vigorosamente en vórtex durante 2 min para su total homogeneización. A continuación, se colocaron 400 µL de suero en un vial de vidrio de 20 mL y se cerraron herméticamente con tapones de rosca de aluminio de 18 mm provistos de septo de silicona y se inyectaron en el sistema HS-GC-MS.

1.2.4. Método del HS-GC-MS

Un volumen de 400 µL de muestra se incubó a 90 °C durante 10 min, mientras se agitaba a 750 rpm. A continuación, se inyectaron 1,5 mL del espacio de cabeza en el sistema GC utilizando una jeringa de 2,5 mL (90 °C) en modo *splitless*. El gas portador fue helio con un flujo de 1 mL/min. El programa del horno fue el siguiente: se empezaba con una temperatura inicial de 40 °C que se mantenía durante 5 min, a continuación, se incrementaba a 130 °C a 5 °C/min y posteriormente a 200 °C a 35 °C/min (tiempo total 25 min). La MS operó en modo impacto electrónico (EI) a 70 eV. Las temperaturas de la fuente de iones, la línea de transferencia y el cuadrupolo se fijaron en 230, 280 y 150 °C, respectivamente. La adquisición de datos se llevó a cabo en el intervalo de 20-400 *m/z*.

1.2.5. Procesamiento de datos

Los datos de HS-GC-MS se convirtieron a formatos ABF (Analysis Base Framework) y se procesaron con MS-DIAL, que incluye la selección de picos, la deconvolución, la identificación de compuestos y la alineación de picos. La identificación de compuestos se llevó a cabo utilizando el índice de retención basado en la mezcla de alcanos por el método de Kovats y la biblioteca espectral MSP de metabolómica GC-MS (RIKEN).

Las características (incluyendo tanto los compuestos identificados como los no identificados) se utilizaron para llevar a cabo el estudio multivariante. El análisis quimiométrico consistió en un análisis OPLS-DA utilizando la escala de varianza unitaria (UV) y se llevó a cabo utilizando el software SIMCA-P. El modelo OPLS-DA se construyó

utilizando el 80% de las muestras y se validó externamente con el 20% restante. Las elipses para cada categoría utilizando un nivel de probabilidad de confianza del 95% se obtuvieron con el software Excel utilizando los algoritmos disponibles libres en internet. Se evaluaron $R^2X(\text{cum})$, $R^2Y(\text{cum})$, $Q^2(\text{cum})$ y la tasa de clasificación (CR) para estudiar el éxito del modelo. El procedimiento de validación cruzada consistió en 7 interacciones sin cambiar los datos de manera aleatoria. $R^2X(\text{cum})$ y $R^2Y(\text{cum})$ representan la fracción acumulada de la varianza explicada por un componente específico. $Q^2(\text{cum})$ indica la capacidad predictiva del modelo quimiométrico, que debería tener un valor superior a 0,4 [34]. Además, la validación del modelo se llevó a cabo mediante una prueba de permutación utilizando 50 permutaciones aleatorias.

Se incluyeron muestras de control de calidad (QC) al principio y al final de una serie de ensayos, y a intervalos regulares a lo largo del ensayo (un QC cada 5 muestras analizadas). Los QC eran una mezcla de muestras de suero con el objetivo de obtener una muestra representativa de la composición cualitativa y cuantitativa de las muestras. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para comprobar posibles desviaciones de la señal o pérdidas de sensibilidad.

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1. Optimización del método HS-GC-MS

La optimización del método HS-GC-MS se llevó a cabo con el objetivo de conseguir los mejores resultados en términos de intensidad y separación entre picos. En concreto, se investigaron el programa del horno, el volumen de la muestra de suero y la temperatura y el tiempo de incubación.

Teniendo en cuenta que el objetivo de un método metabolómico no dirigido es obtener la mayor cantidad de información posible, es fundamental conseguir una buena separación entre picos en el menor tiempo posible, por lo que el primer parámetro optimizado fue el programa del horno. Entre los diferentes programas de temperatura ensayados, los mejores resultados se obtuvieron con las siguientes condiciones: se empezaba con una temperatura inicial de 40 °C que se mantenía durante 5 min, a continuación, se incrementaba a 130 °C a 5 °C/min y posteriormente a 200 °C a 35 °C/min, el tiempo total del programa era 25 min.

La cantidad de muestra disponible limitó el rango de volúmenes de muestra investigados. Se realizaron experimentos utilizando 100, 250 y 400 µl de suero. Como era de esperar, al utilizar una mayor cantidad de muestra, el número de señales y su

intensidad aumentaron (Figura 1.1A). Por lo tanto, se seleccionaron 400 μL para los experimentos posteriores.

A continuación, se investigó el efecto de la temperatura de incubación. Se realizaron experimentos a temperaturas entre 80 y 100°C. Al aumentar la temperatura de 80 a 90 °C también aumentó la intensidad de las señales. Esto se debe a que las altas temperaturas facilitan la liberación de VOCs con altos puntos de ebullición. Sin embargo, al aumentar la temperatura de 90 a 100 °C, prácticamente no se observaron diferencias significativas, por lo que finalmente se seleccionó 90 °C como valor óptimo.

Por último, el tiempo de incubación se estudió entre 5 y 20 min. Como puede observarse en la Figura 1.1B, el intervalo de tiempo estudiado no tuvo un efecto muy significativo en la intensidad de las señales obtenidas. Se observó un pequeño incremento en las señales que aparecen al principio del cromatograma al aumentar el tiempo de 5 a 10 min. Sin embargo, después de 10 min no se observaron diferencias. Por lo tanto, se seleccionó como óptimo un tiempo de incubación de 10 min.

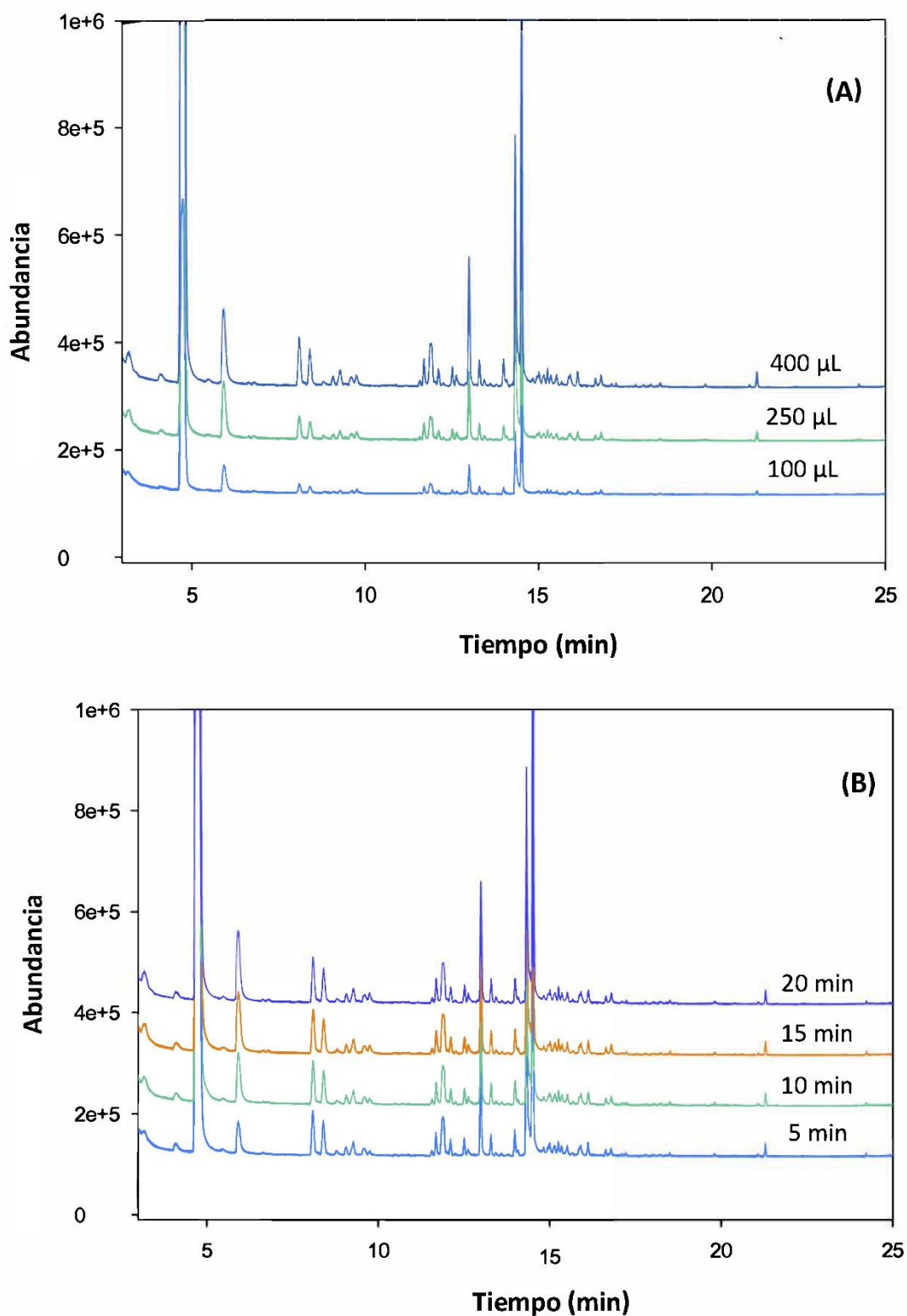


Figura 1.1. Optimización del volumen de muestra (A) y tiempo de incubación (B).

1.3.2. Características metabólicas derivadas del análisis metabolómico no dirigido e identificación de picos

Para el análisis de datos, se propuso una estrategia metabolómica no dirigida utilizando MS-DIAL. De acuerdo con el método de adquisición, el rango de masas se estableció entre 20-400 m/z . Para la detección de picos, los datos se suavizaron con un promedio de suavizado ponderado linealmente utilizando un nivel de 3 barridos y una anchura media de pico de 20 barridos. El ruido se definió con una amplitud de iones inferior a 1000. La deconvolución se llevó a cabo para detectar las características de m/z -tiempo de retención, de manera que las características con igual anchura de pico y tiempo de retención se combinaron en matrices únicas. En este caso, se fijó una resolución de 0,5, ya que valores más altos podrían disminuir el número de picos cromatográficos detectados y valores más bajos podrían reconocer el ruido como picos cromatográficos.

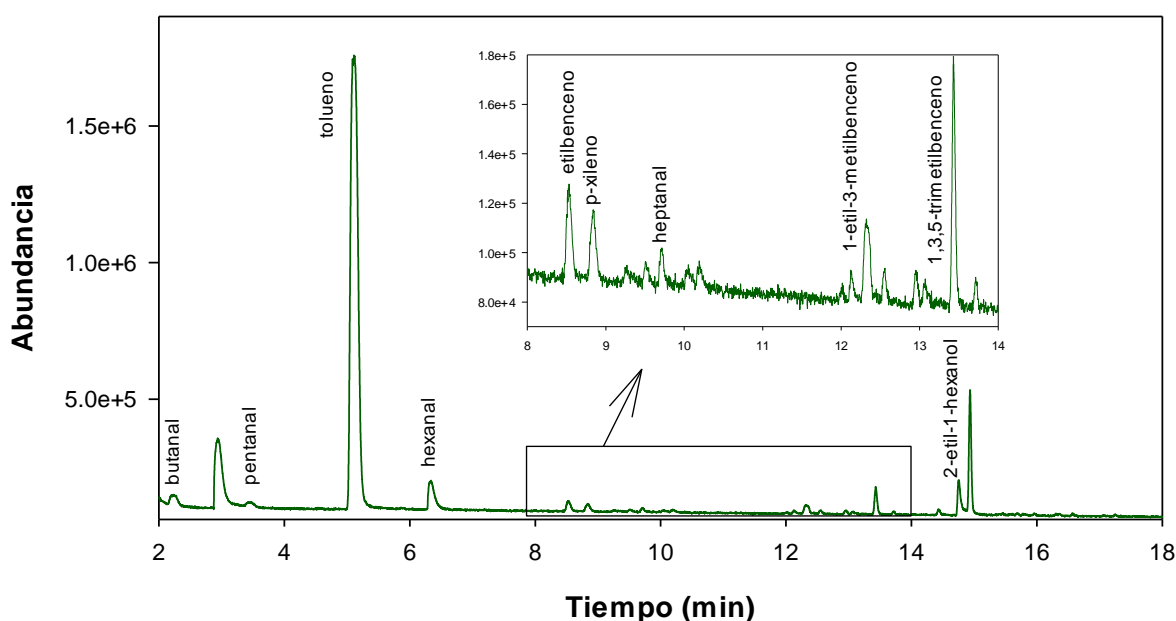
Para la identificación de los compuestos se utilizó el índice de retención basado en la mezcla de alcanos por el método de Kovats. La mezcla de alcanos (C8 a C40) se analizó utilizando la metodología propuesta y se creó un diccionario con el tiempo de retención que se utilizó para la identificación. Los espectros de masas deconvolutados se cotejaron con una biblioteca espectral metabolómica MSP de GC-MS de RIKEN. El índice de retención, el tiempo de retención y las tolerancias m/z se fijaron en 20, 0,5 min y 0,5 Da, respectivamente. Se consideró un criterio de coincidencia superior al 85%. Por último, la alineación se llevó a cabo utilizando una tolerancia de tiempo de retención de 0,075 min y una tolerancia de similitud espectral del 70%.

Con estos parámetros, se detectaron un total de 96 características, de las cuales un total de 10 compuestos pudieron ser identificados y confirmados mediante el análisis de estándares reales (Figura 1.2). En la Tabla 1.2 se resumen los compuestos identificados.

La presencia de butanal, pentanal, tolueno, hexanal, etilbenceno, p-xileno y heptanal se ha descrito previamente en muestras de suero humano [35,36]. El 1-etil-3-metilbenceno se ha asociado a fumadores y se ha detectado en el aliento exhalado [37], mientras que el 1,3,5-trimetilbenceno y el 2-etil-1-hexanol se han detectado en muestras biológicas humanas y de ratas tras la exposición a estos compuestos [38,39].

Tabla 1.2. Compuestos detectados e identificados en las muestras de suero

RT (min)	Compuesto	Iones (m/z)
2,3	<i>butanal</i>	44, 43, 72, 41
3,5	<i>pentanal</i>	44, 58, 29, 41
5,1	<i>tolueno</i>	91, 92, 77, 65
6,3	<i>hexanal</i>	56, 44, 41, 43
8,5	<i>etilbenzeno</i>	106, 91, 65, 77
8,8	<i>p-Xileno</i>	91, 106, 105, 77
9,8	<i>heptanal</i>	70, 41, 44, 43
12,3	<i>1-etil-3-metilbenzeno</i>	120, 105, 91, 77
13,4	<i>1,3,5-trimetilbenzeno</i>	105, 120, 91, 77
14,8	<i>2-etil-1-hexanol</i>	57, 41, 43, 70, 83

**Figura 1.2.** Cromatograma HS-GC-MS de un suero humano donde se muestran los compuestos identificados.

Posteriormente, se llevó a cabo un estudio estadístico de los compuestos identificados en las muestras, con el objetivo de encontrar diferencias entre las muestras de suero de los voluntarios sanos sin EII y las muestras de pacientes con EII. Para ello, se realizó una t-test utilizando los valores del área de los picos de las muestras de cada categoría, ya que los datos se ajustaban a una distribución normal. Sólo el pentanal (valor $p=0,01$) y el hexanal (valor $p=0,01$) presentaron diferencias estadísticamente

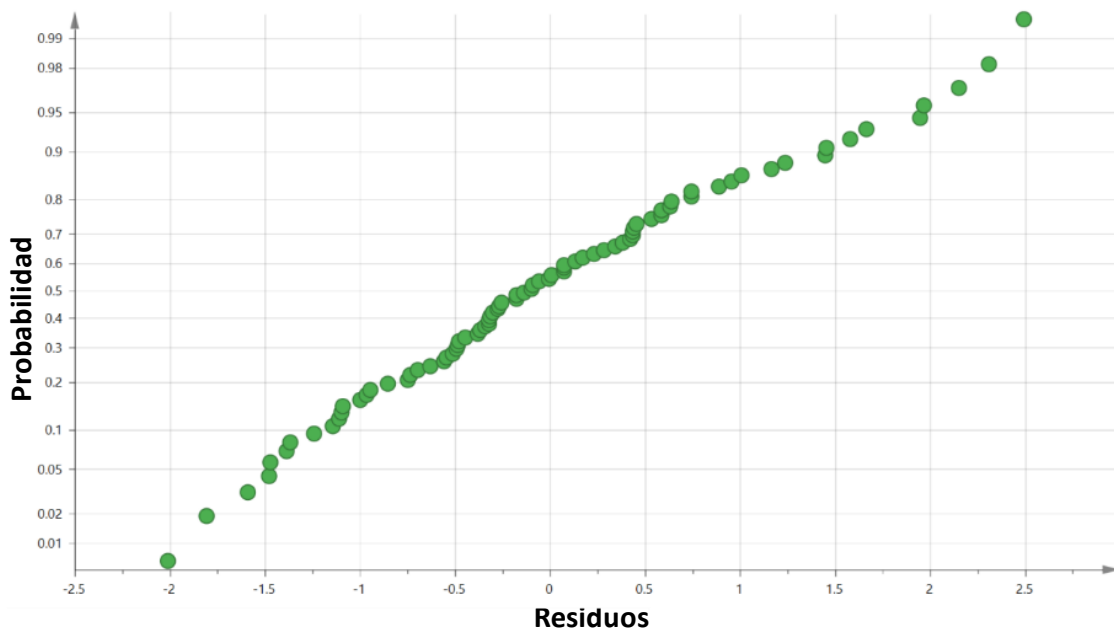
significativas entre las dos categorías con un nivel de confianza del 95,0%. Encontrando mayores concentraciones de estos dos compuestos en el grupo de pacientes con EII. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas para butanal, tolueno, p-xileno, heptanal, 1-etil-3-metilbenceno, 1,3,5-trimetilbenceno y 2-etil-1-hexanol (p -valor $> 0,05$).

1.3.3 Modelos quimiométricos para la identificación de pacientes con EII

Las 96 características (incluidos los compuestos conocidos y desconocidos) se utilizaron para crear el conjunto de datos para el análisis multivariante, por lo tanto, la matriz de datos tenía una dimensión de 101 (muestras) x 96 (características). Las 101 muestras incluían tanto muestras de suero de voluntarios sanos sin EII (45 muestras) como muestras de suero de pacientes con EII (56 muestras).

Inicialmente, se obtuvo el gráfico de probabilidad normal de residuos. Como puede observarse en la Figura 1.3., los residuos eran aleatorios y estaban distribuidos normalmente, ya que el diagrama de probabilidad normal tiene todos los puntos situados en una línea recta. La distribución normal de los datos permite crear los modelos utilizando los datos brutos sin necesidad de aplicar transformaciones. Además, todos los datos experimentales oscilaron entre -2,5 y +2,5, por lo que no se detectaron valores anómalos.

Figura 1.3. Diagrama de probabilidad normal de residuos.



Tras comprobar que los datos se distribuían normalmente, se llevó a cabo un PCA sobre el conjunto de entrenamiento para visualizar cualquier posible agrupación de muestras, pero no fue suficiente para discriminar entre las dos categorías (Figura 1.4). Por lo tanto, se propuso un OPLS-DA utilizando escala UV o autoescalado, el más aplicado en metabolómica y que utiliza la desviación estándar como factor de escalado [40].

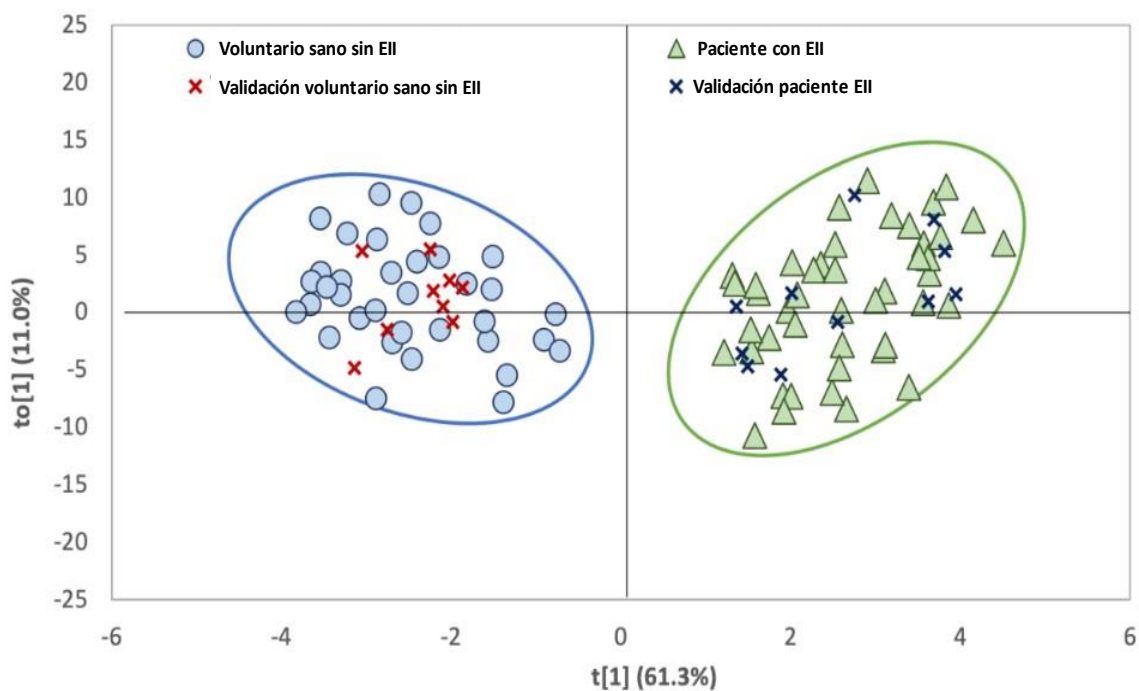


Figura 1.4. Gráfico de puntuación del modelo PCA para diferenciar entre individuos sanos sin EII y pacientes con EII.

Para la construcción y validación de los modelos, el conjunto de datos se dividió aleatoriamente en dos subconjuntos. El 80% de las muestras se utilizó para la optimización del modelo (45 muestras de suero de pacientes con EII y 36 de voluntarios sanos sin EII) y el 20% restante para su validación (11 muestras de suero de pacientes con EII y 9 de voluntarios sanos sin EII). El modelo quimiométrico obtenido (1 + 1 componente, $R^2X = 0,828$, $R^2Y = 0,723$ y $Q^2 = 0,543$) separó perfectamente las muestras procedentes de pacientes con EII y de voluntarios sanos sin EII, como puede verse en la Figura 1.5.

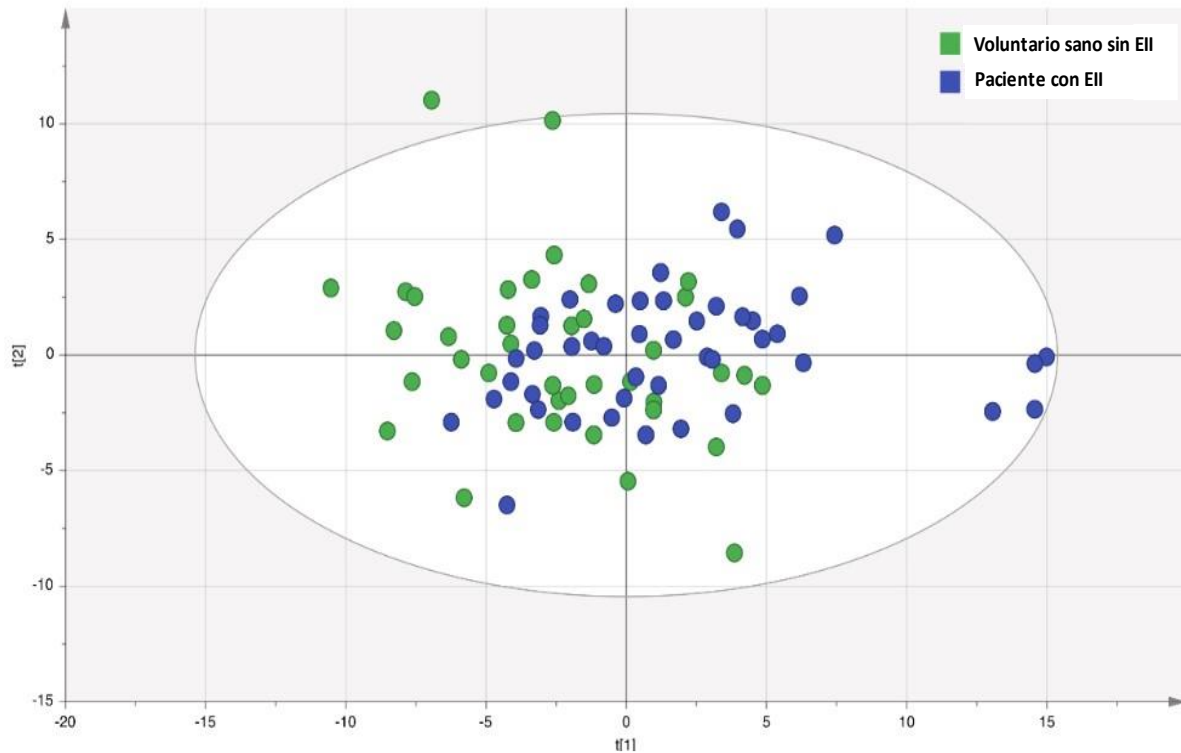


Figura 1.5. Separación de muestras de EII y voluntarios sanos sin EII.

En los estudios metabolómicos, normalmente se admite $Q^2 > 0,5$ para determinar una buena predictibilidad, aunque es difícil dar un límite general ya que ésta depende en gran medida de las propiedades del conjunto de datos. Por este motivo, para demostrar la predictibilidad del modelo, éste también se ha validado mediante una prueba de permutación que consiste en comparar el Q^2 obtenido para el conjunto de datos original con la distribución de valores Q^2 calculada cuando los valores Y originales se asignan aleatoriamente a los individuos [41]. La Figura 1.6 muestra el gráfico de permutaciones para el modelo OPLS-DA utilizando 50 permutaciones aleatorias. Este gráfico confirma la validez del modelo, ya que todos los valores Q^2 y R^2 a la izquierda son inferiores a los puntos originales a la derecha y la línea de regresión de los puntos Q^2 intercepta el eje vertical por debajo de cero. Además, tras aplicar el modelo al conjunto de validación, se obtuvo un CR del 100%, ya que todas las muestras se clasificaron correctamente.

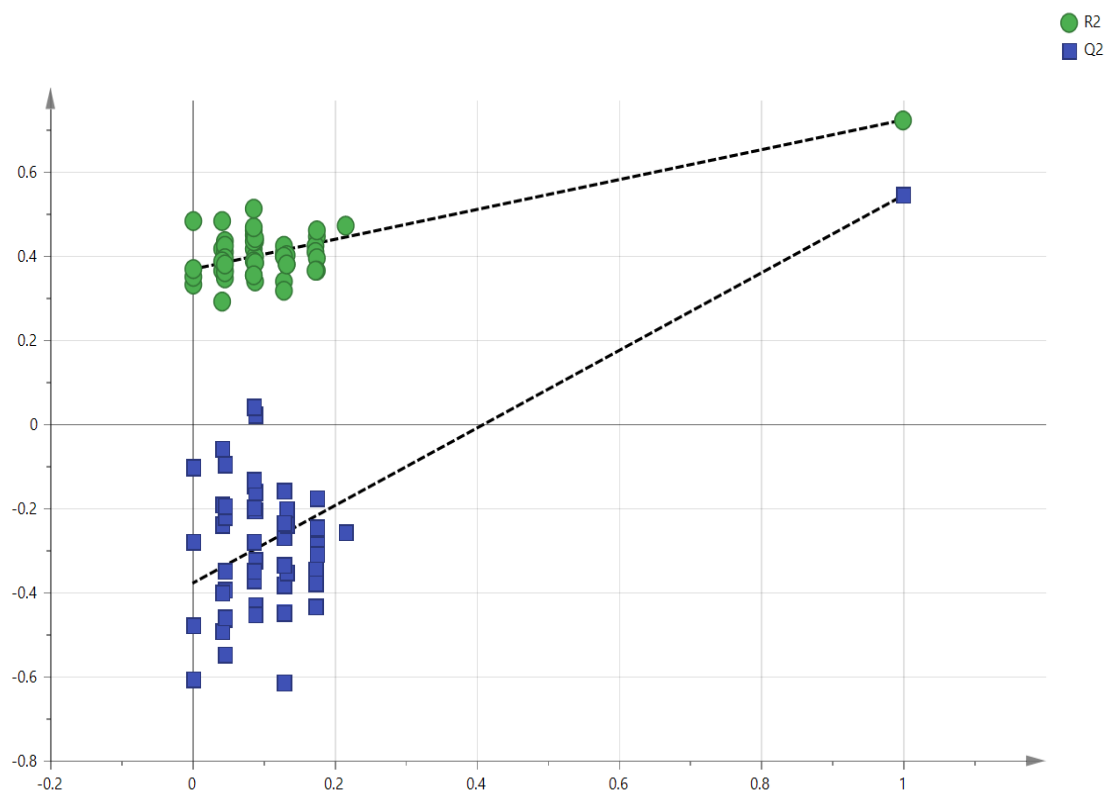


Figura 1.6. Gráfico de permutaciones para el modelo OPLS-DA utilizando 50 permutaciones aleatorias

El gráfico de influencia de las variables en la proyección (VIP) (Figura 1.7) reveló que el hexanal y el pentanal fueron dos de los compuestos que más influyeron en la clasificación de las muestras, de acuerdo con los datos obtenidos del análisis ANOVA. La modelización posterior de hombres y mujeres por separado permitió evaluar la influencia de los factores de confusión mediante el gráfico de estructuras compartidas y únicas (SUS). El gráfico SUS comparó la contribución de los VOCs para diferenciar a las mujeres con EII de las mujeres sanas sin EII con su contribución para diferenciar a los hombres con EII de los hombres sanos sin EII (Figura 1.8). Los rasgos mayoritarios se agrupan estrechamente en torno a la diagonal del gráfico SUS, por lo que los compuestos volátiles responsables de la diferenciación de pacientes con EII son los mismos en mujeres y hombres, lo que supone un valor añadido a la metodología propuesta.

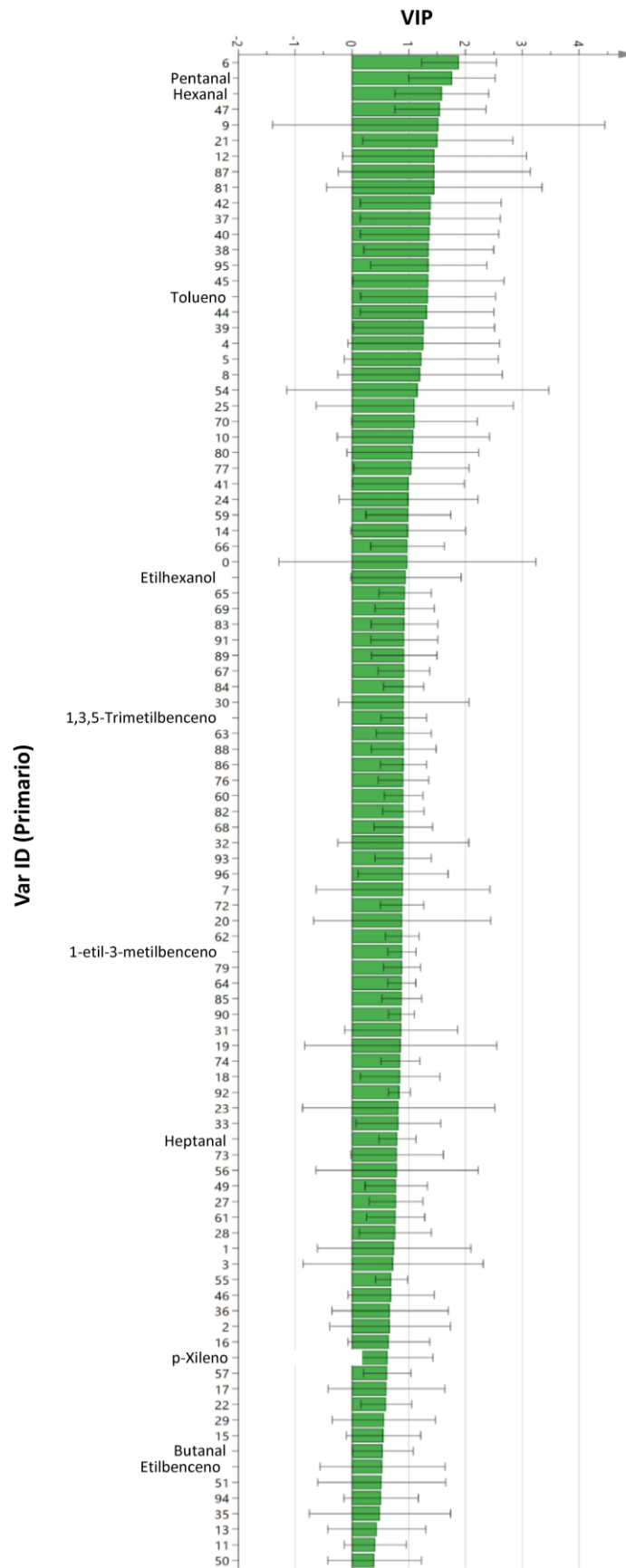


Figura 1.7. Gráfico de influencia variable en las proyecciones (VIP) para la clasificación de pacientes con EII

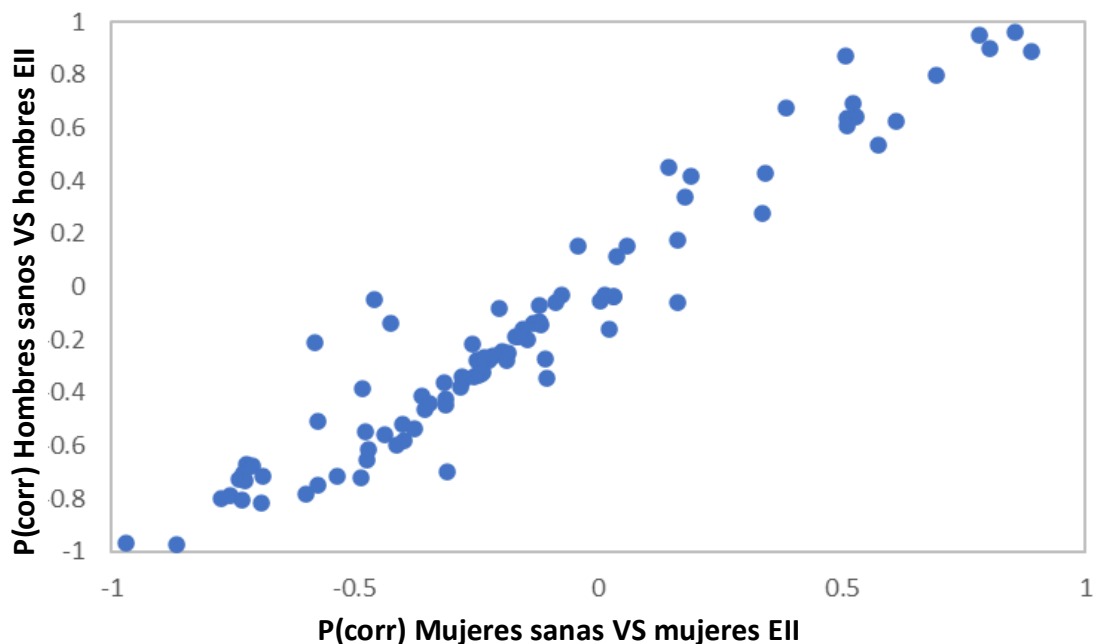


Figura 1.8. Análisis gráfico de estructuras compartidas y únicas (SUS) comparando modelos OPLS-DA específicos de género (femenino (eje x) y masculino (eje y)) para diferenciar entre voluntarios sanos sin EII y pacientes con EII.

1.4. CONCLUSIONES

Este capítulo se propone una estrategia analítica basada en el uso de HS-GC-MS y su combinación con modelos quimiométricos como posible herramienta complementaria para el diagnóstico de pacientes con EII.

La estrategia metabolómica no dirigida permitió obtener 96 características que se utilizaron para construir un modelo OPLS-DA para separar a los pacientes con EII de los individuos sanos sin EII. La validación externa no dio lugar a falsos positivos ni falsos negativos (obteniendo un 100% de CR). Los resultados mostraron una mayor concentración de hexanal y pentanal en los pacientes con EII. Además, se observó un perfil de volátiles similar en los pacientes con EII de ambos sexos.

Las principales ventajas del método propuesto son su rapidez en la obtención de resultados fiables, ya que se tarda menos de una hora en aplicar el método HS-GC-MS y el modelo quimiométrico, y la no necesidad de tratamiento de la muestra, ya que se monitorizan los volátiles generados en el espacio de cabeza al calentar la muestra. Aunque, los resultados obtenidos demuestran el potencial de esta metodología, se debe seguir investigando esta metodología, aumentando el número de muestras, y evaluar la influencia en la clasificación de las otras enfermedades inflamatorias.

1.5. BIBLIOGRAFÍA

1. Kim, D. H., & Cheon, J. H. (2017). Pathogenesis of inflammatory bowel disease and recent advances in biologic therapies. *Immune network*, 17, 25-40.
2. Wright, E. K., Ding, N. S., & Niewiadomski, O. (2018). Management of inflammatory bowel disease. *The Medical journal of Australia*, 7, 318-322.
3. Gisbert, J. P., González-Lama, Y., & Maté, J. (2007). Role of biological markers in inflammatory bowel disease. *Gastroenterología y hepatología*, 30, 117-129.
4. Sipponen, T., & Kolho, K. L. (2015). Fecal calprotectin in diagnosis and clinical assessment of inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 50, 74-80.
5. Khaki-Khatibi, F., Qujeq, D., Kashifard, M., Moein, S., Maniati, M., & Vaghari-Tabari, M. (2020). Calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clinica chimica acta*, 510, 556-565.
6. Vermeire, S., Van Assche, G., & Rutgeerts, P. (2004). C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 10, 661-665.
7. Vermeire, S., Van Assche, G., & Rutgeerts, P. (2005). The role of C-reactive protein as an inflammatory marker in gastrointestinal diseases. *Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology*, 2, 580-586.
8. Vermeire, S., Van Assche, G., & Rutgeerts, P. (2006). Oratory markers in IBD: Magic, or unnecessary toys?. *Gut*, 55, 426-431.
9. Van der Sluys Veer, I. Biemond, H. W., Verspaget, C. B. H. W., Lamers, A. (1999). Faecal parameters in the assessment of activity in inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 34, 106-110.
10. Tibble, J. A., & Bjarnason, I. (2001). Fecal calprotectin as an index of intestinal inflammation. *Drugs of Today*, 37, 85-96.
11. Ander, G., Wålinder, R., & Johanson, G. (2010). Acute effects of exposure to 1 mg/m³ of vaporized 2-ethyl-1-hexanol in humans. *Indoor Air*, 20, 168-175.
12. Castillo-Peinado, L. S, Luque de Castro, M.D. (2016). Present and foreseeable future of metabolomics in forensic analysis. *Anal Chim Acta*. 925:1-15.
13. Keshteli, A. H., Tso, R., Dieleman, L. A., Park, H., Kroeker, K. I., Jovel, J., Gillevet, P.M., Sikaroodi, M., Mandal, R., Fedorak, R.N. & Madsen, K.L (2018). A distinctive urinary metabolomic fingerprint is linked with endoscopic postoperative disease recurrence in Crohn's disease patients. *Inflammatory Bowel Diseases*, 24, 861-870.

14. Williams, H. R., Willsmore, J. D., Cox, I. J., Walker, D. G., Cobbold, J. F., Taylor-Robinson, S. D., & Orchard, T. R. (2012). Serum metabolic profiling in inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences*, 57, 2157-2165.
15. Stephens, N. S., Siffledeen, J., Su, X., Murdoch, T. B., Fedorak, R. N., & Slupsky, C. M. (2013). Urinary NMR metabolomic profiles discriminate inflammatory bowel disease from healthy. *Journal of Crohn's and Colitis*, 7, 42-48.
16. Le Gall, G., Noor, S. O., Ridgway, K., Scovell, L., Jamieson, C., Johnson, I. T., & Narbad, A. (2011). Metabolomics of fecal extracts detects altered metabolic activity of gut microbiota in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Journal of proteome research*, 10, 4208-4218.
17. Bjerrum, J. T., Nielsen, O. H., Hao, F., Tang, H., Nicholson, J. K., Wang, Y., & Olsen, J. (2010). Metabonomics in ulcerative colitis: diagnostics, biomarker identification, and insight into the pathophysiology. *Journal of proteome research*, 9, 954-962.
18. Williams H. R. T. Cox, I. J, Walker, D. G., North, B. V., Patel, V. M., & Marshall, S., E. (2009). Characterization of inflammatory bowel disease with urinary metabolic profiling. *American Journal Gastroenterology*, 104, 1435–44.
19. Stanke-Labesque, F., Pofelski, J., Moreau-Gaudry, A., Bessard, G., & Bonaz, B. (2008). Urinary leukotriene E4 excretion: a biomarker of inflammatory bowel disease activity. *Inflammatory bowel diseases*, 14, 769-774.
20. Williams, H., R., Cox, J., I., Walker, D., G., North, B., V., Patel, V., M., Marshall, S., E., Jewell, D., P., Ghosh, S., Thomas, H., J., Teare, J., P & Jakobovits, S. (2009). Characterization of inflammatory bowel disease with urinary metabolic profiling. *Official journal of the American College of Gastroenterology*, 104, 1435-1444.
21. Fan, F., Mundra, P. A., Fang, L., Galvin, A., Moore, X. L., Weir, J. M., & Dart, A. M. (2015). Lipidomic profiling in inflammatory bowel disease: comparison between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*, 21, 1511-1518.
22. Jansson, J., Willing, B., Lucio, M., Fekete, A., Dicksved, J., & Halfvarson, J. (2009). Metabolomics reveals metabolic biomarkers of Crohn's disease. *PLoS One*, 4, e6386.
23. Yamamoto, M., Shanmuganathan, M., Hart, L., Pai, N., & Britz-McKibbin, P. (2021). Urinary metabolites enable differential diagnosis and therapeutic monitoring of pediatric inflammatory bowel disease. *Metabolites*, 11, 245.
24. Kohashi, M., Nishiumi, S., Ooi, M., Yoshie, T., Matsubara, A., & Suzuki, M. (2014). A novel gas chromatography mass spectrometry-based serum diagnostic

- and assessment approach to ulcerative colitis. *Journal Crohn's Colitis*, 8, 1010-21.
25. Ahmed, I., Greenwood, R., Costello, B., Ratcliffe, N., & Probert, C. S. (2016). Investigation of faecal volatile organic metabolites as novel diagnostic biomarkers in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology Therapeutics* 43, 596-611.
 26. Bodelier, A. G., Smolinska, A., Baranska, A., Dallinga, J. W., Mujagic, Z., Vanhees, K., & van Schooten, F. J. (2015). Volatile organic compounds in exhaled air as novel marker for disease activity in Crohn's disease: a metabolomic approach. *Inflammatory bowel diseases*, 21, 1776-1785.
 27. Diab, J., Hansen, T., Goll, R., Stenlund, H., Jensen, E., Moritz, T., & Forsdahl, G. (2019). Mucosal metabolomic profiling and pathway analysis reveal the metabolic signature of ulcerative colitis. *Metabolites*, 9, 291.
 28. Nusbaum, D. J., Sun, F., Ren, J., Zhu, Z., Ramsy, N., Pervolarakis, N., & Whiteson, K. (2018). Gut microbial and metabolomic profiles after fecal microbiota transplantation in pediatric ulcerative colitis patients. *FEMS microbiology ecology*, 94, 133.
 29. Di Giovanni, N., Meuwis, M. A., Louis, E., & Focant, J. F. (2019). Untargeted serum metabolic profiling by comprehensive two-dimensional gas chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Journal of proteome research*, 19, 1013-1028.
 30. Bosch, S., Wintjens, D., S., J, Wicaksono, A., Kuijvenhoven, J., der Hulst, R. & Stokkers P. (2020) The faecal scent of inflammatory bowel disease: Detection and monitoring based on volatile organic compound analysis. *Digestive Liver Disease*, 52, 745-52.
 31. Tiele, A., Wicaksono, A., Kansara, J., Arasaradnam, R., P. & Covington, J., A. (2019). Breath analysis using nose and ion mobility technology to diagnose inflammatory bowel disease - A pilot study. *Biosensors*, 9, 55.
 32. Agouridis, A. P., Elisaf, M., & Millionis, H. J. (2011). An overview of lipid abnormalities in patients with inflammatory bowel disease. *Annals of gastroenterology: quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology*, 24, 181-187.
 33. Kaitha, S., Bashir, M., & Ali, T. (2015). Iron deficiency anemia in inflammatory bowel disease. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 6, 62-72.
 34. Godzien, J., Ciborowski, M., Angulo, S., & Barbas, C. (2013). From numbers to a biological sense: How the strategy chosen for metabolomics data treatment

- may affect final results. A practical example based on urine fingerprints obtained by LC-MS. *Electrophoresis*, 34, 2812-2826.
35. Silva, L. K., Hile, G. A., Capella, K. M., Espenship, M. F., Smith, M. M., De Jesús, V. R., & Blount, B. C. (2018). Quantification of 19 aldehydes in human serum by headspace SPME/GC/high-resolution mass spectrometry. *Environmental science & technology*, 52, 10571-10579.
 36. Mochalski, P., King, J., Klieber, M., Unterkofler, K., Hinterhuber, H., Baumann, M., & Amann, A. (2013). Blood and breath levels of selected volatile organic compounds in healthy volunteers. *Analyst*, 13, 2134-2145.
 37. Marco, E., & Grimalt, J. O. (2015). A rapid method for the chromatographic analysis of volatile organic compounds in exhaled breath of tobacco cigarette and electronic cigarette smokers. *Journal of chromatography A*, 1410, 51-59.
 38. Ernstgård, L., Norbäck, D., Nordquist, T., Wieslander, G., Wålinder, R., & Johanson, G. (2010). Acute effects of exposure to 1 mg/m³ of vaporized 2-ethyl-1-hexanol in humans. *Indoor Air*, 20, 168-175.
 39. Świercz, R., Wąsowicz, W., & Majcherek, W. (2006). Mesitylene (1, 3, 5-Trimethylbenzene) in the Liver, Lung, Kidney, and Blood and 3, 5-Dimethylbenzoic Acid in the Liver, Lung, Kidney and Urine of Rats after Single and Repeated Inhalation Exposure to Mesitylene. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15, 485-492.
 40. Van den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K., & Van der Werf, M. J. (2006). Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC genomics*, 7, 1-15.
 41. Triba, M. N., Le Moyec, L., Amathieu, R., Goossens, C., Bouchemal, N., Nahon, P., & Savarin, P. (2015). PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. *Molecular BioSystems*, 11, 13-19.

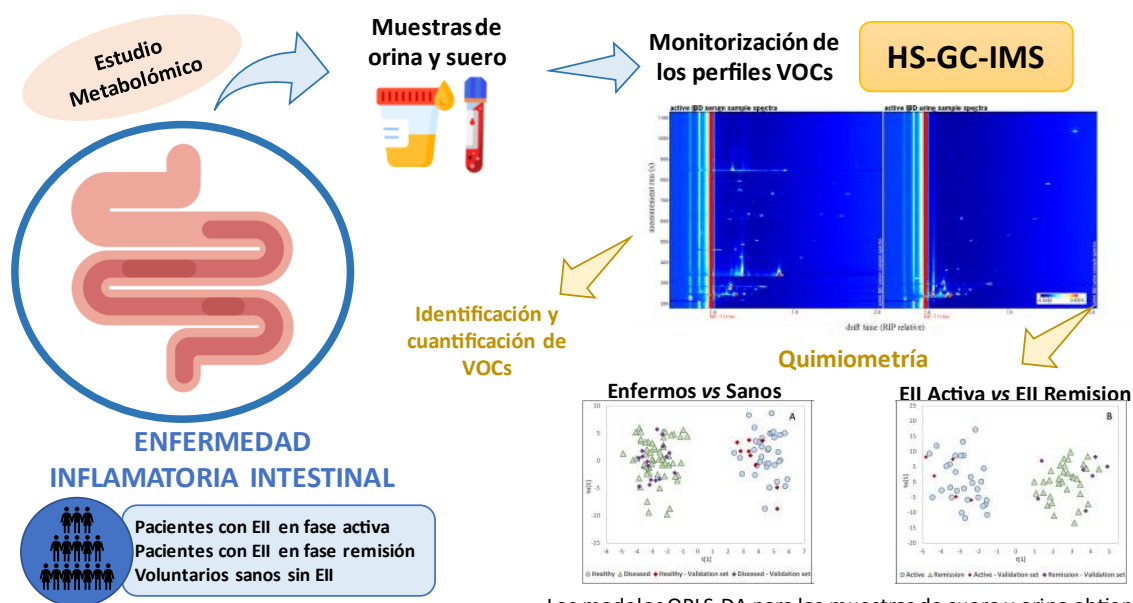
CAPÍTULO 2

ESPECTROMETRÍA DE MOVILIDAD IÓNICA PARA EL ESTUDIO METABOLÓMICO DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL MEDIANTE EL PERFIL DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES EN SUERO Y ORINA HUMANOS



RESUMEN

En este Capítulo, se investiga el potencial de la HS-GC-IMS para monitorizar los compuestos volátiles del suero y la orina y su relación con la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), con el objetivo de proponer una metodología analítica rápida y fiable que sea complementaria en el diagnóstico de pacientes con esta enfermedad. El método fue optimizado con objeto de monitorizar el mayor número de compuestos volátiles, y se aplicó en el análisis de 118 muestras de suero y 123 muestras de orina de pacientes diagnosticados con EII (en remisión y en fase activa de la enfermedad) y de voluntarios sanos sin EII. El estudio individual de los marcadores permitió identificar y cuantificar doce compuestos en muestras de orina y seis en muestras de suero. Además, esta información se utilizó para realizar un análisis de varianza unidireccional con el fin de comparar las distintas categorías. Los datos también fueron procesados por medio de un análisis OPLS-DA utilizando todos los marcadores integrados en los mapas topográficos de cada tipo de muestra. Los modelos quimiométricos permitieron diferenciar las muestras de pacientes con EII y de los voluntarios sanos, así como determinar el estado de la EII (en remisión o activo).



Los modelos OPLS-DA para las muestras de suero y orina obtienen un 100% de clasificación.

2.1. INTRODUCCIÓN

La EII es muy compleja, aun no tiene cura y está caracterizada por periodos agudos de agravamiento de los síntomas clínicos como el dolor abdominal o la diarrea y un empeoramiento analítico y otros periodos de remisión de la enfermedad donde estos síntomas se reducen o desaparecen [1]. Por lo tanto, la aplicación de estrategias metabolómicas que permitan no sólo diagnosticar la enfermedad sino también establecer el transcurso de la enfermedad abren un nuevo campo de investigación y de gran aplicación en el sector sanitario.

Como se ha demostrado en el Capítulo anterior, la monitorización del perfil de volátiles en muestras biológicas humanas permite establecer estrategias que sirvan como herramientas complementarias en el diagnóstico de la EII. En este sentido, la IMS ha demostrado ser eficaz para la monitorización y caracterización de VOCs en análisis biológicos, ya que se reconoce por su alta sensibilidad y selectividad y sus cortos tiempos de respuesta [2]. El principio de funcionamiento del IMS consiste en la separación de los VOCs en función de su diferente movilidad dentro del tubo de deriva sometido a un campo eléctrico mantenido constantemente a presión atmosférica ambiente. Combinando la GC con la detección IMS, se puede lograr rápidamente una separación bidimensional de los VOCs (basada en el tiempo de retención de la GC y el tiempo de deriva del IMS) para muchas aplicaciones con alta sensibilidad y selectividad [3].

La combinación GC-IMS se ha utilizado previamente para la evaluación simultánea de VOCs urinarios y fecales en pacientes pediátricos con EII, incluyendo en el estudio 10 sujetos con EII (cinco con CU y cinco con EC) y 10 controles aplicando después un enfoque de validación cruzada de 10 repeticiones como tratamiento estadístico para la clasificación de los datos [4]. En muestras de aliento, esta técnica ha permitido distinguir entre pacientes con EII y controles sanos y, dentro de los pacientes con EII, entre EC y CU. El conjunto de datos constaba de 39 muestras (treinta de EII y nueve de controles), y el análisis de los datos se basó en una selección supervisada de características y una validación cruzada tipo k-fold. Además, se realizó una identificación provisional de los VOCs del aliento que contribuyen a la clasificación utilizando la base de datos NIST (*National Institute of standards and technology*) [5]. Además, Bosch et al. llevaron a cabo un estudio para explorar el potencial de los patrones de VOCs fecales para predecir el curso de la EII en adultos utilizando GC-IMS en el que se utilizó un enfoque de validación cruzada de 10 repeticiones también, como tratamiento de datos. No se observaron

alteraciones en los perfiles de VOC fecales que precedieran a un cambio en la enfermedad clínica [6].

En este contexto, en este Capítulo se propone el uso de la GC-IMS para el estudio metabolómico de la EII mediante inyección por HS para la monitorización de los VOCs presentes en muestras de suero y orina. La orina presenta ventajas como su fácil recogida, siendo una de las principales vías de excreción de metabolitos hidrosolubles y xenobióticos. Además, el suero sanguíneo es el segundo biofluido más utilizado en los estudios metabolómicos, después de la orina. La sangre puede proporcionar una instantánea metabólica que integra muchos tejidos del cuerpo humano por medio de sus interacciones con estos tejidos y, por lo tanto, proporciona una visión general del metabolismo, aunque con un nivel de especificidad inferior en comparación con la orina [7]. Por lo tanto, se desarrollará una herramienta metabolómica no dirigida con el objetivo no sólo de mejorar el diagnóstico de la EII, sino también de evaluar el curso de la enfermedad (activo o remisión) en caso de un diagnóstico positivo, algo que nunca se ha realizado hasta la fecha utilizando IMS. La GC-IMS es una técnica analítica emergente cuyas aplicaciones en el campo clínico son cada vez más frecuentes debido a sus múltiples ventajas frente a otras técnicas analíticas. El IMS opera a presión atmosférica con una preparación mínima o nula de la muestra, realizando una separación bidimensional ya que los analitos se separan en función de su interacción con la columna GC y de su comportamiento de deriva bajo la influencia de un campo eléctrico, resultando ventajoso frente al GC-MS. Por lo tanto, el acoplamiento GC-IMS incrementa la capacidad de separación de los picos y el poder de resolución, permitiendo la determinación de un mayor número de compuestos, lo cual es prácticamente obligatorio en los estudios metabolómicos. Este estudio es el primero en investigar conjuntamente muestras de orina y suero de pacientes con EII y de voluntarios sanos y en crear modelos quimiométricos robustos utilizando datos de los VOCs obtenidos por HS-GC-IMS, incluyendo un mayor número de muestras que en estudios anteriores. Además, se desarrolla de manera simultánea una estrategia dirigida que permite la cuantificación e identificación de volátiles en muestras biológicas de interés para determinar qué compuestos contribuyen en mayor medida a cada una de las clases de EII (pacientes con EII activa, EII en remisión o voluntarios sanos), una novedad que no se había conseguido hasta ahora.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Estándares y reactivos

Para la caracterización del perfil de volátiles de las muestras de suero y orina, se utilizaron un total de 19 patrones analíticos: dos alcoholes (1-propanol, 1-pentanol), cinco cetonas (2-heptanona, 2-hexanona, 2-pentanona, 2-butanona, acetona), cuatro aldehídos (heptanal, hexanal, pentanal, benzaldehído), un ácido (ácido acético), un éster (acetato de etilo), dos hidrocarburos aromáticos (o-xileno, tolueno) y cuatro terpenos (alfa-pineno, beta-pineno, linalol, limoneno). Todos ellos fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.).

Se prepararon disoluciones patrón individuales de cada compuesto a 1000 µg/mL en orina artificial y se almacenaron a 4 °C. Para la preparación de la orina artificial se siguió el procedimiento descrito por Farias *et al.* [8] con ligeras modificaciones. Concretamente, se preparó una disolución acuosa que contenía urea (0,411 M), cloruro de potasio (0,0268 M), cloruro de sodio (3 g/L), sulfato disódico (0,0513 M), fosfato de potasio (0,014 M) y cloruro de amonio (0,0186 M). Todos ellos fueron suministrados por Sigma-Aldrich. El agua ultrapura (18,2 MΩ/cm) fue suministrada por un sistema Milli-Q Plus (Millipore Bedford, MA, EE. UU.). También se empleó gas nitrógeno (99,99% de pureza, Air Liquide, Madrid) para el análisis HS-GC-IMS.

Además, se utilizó una disolución alcalina de suero, Isofundin de B. Braun Medical (Barcelona, España), para realizar calibraciones de los compuestos identificados en el suero.

Como QC se analizó una mezcla de cetonas (2-octanona, 2-heptanona, 2-hexanona, 2-pentanona y 2-butanona) a 500 µg/L en agua. El QC se inyectó al inicio de cada secuencia para comprobar que el equipo está en condiciones óptimas. El uso de una mezcla de cetonas como QC es habitual en GC-IMS. Las cetonas analizadas se distribuyen por todo el mapa topográfico (en tiempo de retención y deriva), lo que permite evaluar la calidad de los resultados en distintos momentos del análisis.

2.2.2. Muestras

Para llevar a cabo este trabajo se recogieron muestras de orina y suero de pacientes con enfermedad EII diagnosticada y en diferentes estados (remisión y activa) y de voluntarios sanos sin EII utilizados como grupo control. Las muestras se obtuvieron del Hospital Universitario Rafael Méndez (Lorca, Murcia, España), se obtuvo el consentimiento informado de todas las personas y las muestras se usaron de acuerdo

con las pautas del hospital. Además, los comités éticos de la Universidad de Murcia (Informe favorable ID:2908/2020) y del Hospital Universitario Rafael Méndez (Lorca, España) aprobaron este estudio.

La población utilizada para este estudio estaba formada por 166 individuos, de los cuales sólo 74 proporcionaron ambas muestras, suero y orina, el resto de los individuos proporcionaron solo la muestra de orina o la muestra de suero. En concreto, se analizaron 118 muestras de suero, 37 de pacientes diagnosticados de EII activa, 41 de pacientes con EII en remisión y 40 de pacientes sanos de EII. Además, se analizaron 123 muestras de orina de 34 pacientes con EII activa, 43 con EII en remisión y 46 pacientes sanos de EII.

La Tabla 2.1 muestra el resumen demográfico de los individuos que participaron en este estudio. Se han incluido los parámetros de CF, PCR, hierro, HGB y CT ya que valores anómalos de estos parámetros se han relacionado previamente con pacientes con EII [9-10]. Para el análisis de los datos se ha calculado la media de los parámetros disponibles, junto con la mediana y el rango intercuartílico (IQR), incluyendo el percentil 25 y 75.

Como se puede observar, en las muestras de suero, la edad media de los pacientes con EII es de 47,1 años, y había 26 hombres y 11 mujeres en la fase activa y 17 hombres y 24 mujeres en la fase de remisión. Además, mientras que los valores medios de hemoglobina (HGB), hierro y colesterol son similares en los pacientes con EII en fase activa y en fase de remisión, se encuentran grandes diferencias en los valores de CF (media de 1099,7 $\mu\text{g/g}$ en fase activa y 396,4 $\mu\text{g/g}$ en fase de remisión, con una p-valor 0,0129) y PCR (1,3 mg/L en fase activa y 0,4 mg/L en fase de remisión, con una p-valor de 0,0109). Por el contrario, los voluntarios sanos de EII tenían un valor medio de calprotectina de 17,6 $\mu\text{g/g}$, por debajo del límite establecido (50 $\mu\text{g/g}$) [11-13] como indicador de una posible EII. Se obtuvo una P-valor de 0,017 para los niveles de calprotectina entre sanos y enfermos. Un nivel elevado de CF (>50 $\mu\text{g/g}$) identifica a los pacientes que tienen más probabilidades de padecer EII.

Tabla 2.1. Datos demográficos de los pacientes control sanos y con EII.

Grupo de muestras de suero (n = 118)				
Parámetro	EII activa (n = 37)	EII remisión (n = 41)	Controles (n = 40)	P- valor
Edad media en años (Mediana; IQR)	47,1 (48,0; 33,3–59,0)	47,1 (47,0; 40,0–53,0)	47,9 (47,5; 37,0–53,3)	
Ratio de genero H:M	26:11	17:24	25:15	
Hábitos tabaco	2 fumadores 3 exfumadores	1 fumadores 8 exfumadores	N/A	
Media CF en µg/g (Mediana; IQR)	1099,7 (454,5; 166,3–1023,0) 1 desconocido	396,4 (94,0; 37,0–236,0) 1 desconocido	17,6 (14,5; 8,0–26,0) 6 desconocidos	0,017
Media PCR en mg/L (Mediana; IQR)	1,3 (0,6; 0,2–1,0)	0,4 (0,3; 0,1–0,5)	N/A	0,012
Media HGB en g/dL (Mediana; IQR)	13,9 (13,9; 13,3–15,1)	14,4 (14,3; 13,4–15,2)	N/A	0,078
Media hierro en µg/dL (Mediana; IQR)	83,3 (86,0; 53,0–100,0)	87,2 (80,0; 74,0–101,0)	N/A	0,211
Media colesterol en mg/dL (Mediana; IQR)	189,6 (195,0; 168,0–218,0)	190,5 (187,5; 172,3–208,3)	N/A	0,100
Grupo de muestras de orina (n= 123)				
Parámetro	EII activa (n= 34)	EII remisión (n= 43)	Controles (n= 46)	P- valor
Edad media en años (Mediana; IQR)	48,3 (51,0; 37,3–59,7)	48,9 (48,0; 39,5–58,0)	44,0 (45,0; 32,3–52,8)	
Ratio de genero H:M	20:14	15:28	19:27	
Hábitos tabaco	1 fumadores, 2 exfumadores	3 fumadores, 1 exfumador	N/A	
Media CF en µg/g (Mediana; IQR)	1130,1 (463,0; 172,0–848,0) 2 desconocidos	505,3 (96,5; 49,5–337,0) 1 desconocido	28,3 (19,0; 12,0–43,5) 3 desconocidos	0,014
Media PCR en mg/L (Mediana; IQR)	1,4 (0,6; 0,2–1,1) 1 desconocido	0,5 (0,3; 0,1–0,5)	N/A	0,015
Media HGB en g/dL (Mediana; IQR)	13,8 (13,8; 13,3–14,7) 1 desconocido	14,1 (14,0; 13,4–14,9)	N/A	0,105
Media hierro en µg/dL (Mediana; IQR)	87,8 (79,0; 53,0–99,0) 1 desconocido	82,7 (78,0; 66,5–98,0)	N/A	0,216
Media colesterol en mg/dL (Mediana; IQR)	188,9 (192,5; 168,8–218,3) 1 desconocido	199,1 (195,0; 178,3–213,8)	N/A	0,110

CF: Calprotectina fecal; PCR: proteína C reactiva; HGB: hemoglobina; IQR: rango intercuartílico (percentil 25-75); N/A: no disponible.

En cuanto a los individuos de las muestras de orina, la edad media de los pacientes con EII activa era de 48,3 años, con 20 hombres y 14 mujeres. Para los pacientes en remisión, 48,9 años (15 hombres y 28 mujeres), y en las muestras de control, 44 años

(19 hombres y 27 mujeres). En relación con los valores de CF, PCR, hierro, HGB y CT, se observó el mismo comportamiento entre los grupos que en el conjunto de sueros.

Por posible influencia en el perfil metabolómico, también se han registrado los hábitos tabáquicos de los participantes en este estudio. Como puede observarse, el número de fumadores y ex-fumadores en las muestras de pacientes con EII es muy reducido. Las muestras de suero incluían muestras de 3 fumadores (2 de pacientes con EII activa y 1 de un paciente en remisión), y de 11 exfumadores (3 de pacientes con EII activa y 8 de pacientes en remisión). En cuanto a las muestras de orina, el grupo de paciente con EII activa incluía 1 fumador y 2 exfumadores y el grupo de EII en remisión 3 fumadores y 1 exfumador. En este caso, no se disponía de la información de los hábitos tabáquicos del grupo control.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos especiales que contienen un gel que permite separar las células de la sangre. El suero se obtuvo tras centrifugar la sangre en estos tubos a 3000 rpm durante 10 minutos y a temperatura ambiente. Las muestras de orina se recogieron en frascos estériles de 50 mL. Ambas muestras, suero y orina, se alicuotaron en tubos limpios y se almacenaron inmediatamente a -20°C . Previo al análisis, las muestras se atemperaron a temperatura ambiente durante aproximadamente treinta minutos. A continuación, el suero (400 μL) o la orina (2 mL) se colocaron en viales de vidrio de 20 mL provistos de tapones de rosca de aluminio de 18 mm y septo de silicona y se analizaron mediante HS-GC-IMS.

2.2.3. Instrumentación y software

El equipo GC-IMS usado para llevar a cabo los análisis constaba de un GC de Agilent Technologies 6890N (Waldbronn, Alemania) y un módulo IMS de G.A.S (Dortmund, Alemania) equipado con fuente de tritio y un tubo de deriva de 98 mm de longitud. Para la inyección del espacio de cabeza se utilizó una jeringa de 2,5 ml (Gerstel GmbH, Mühlheim, Alemania). Para la separación de los compuestos se usó una columna GC no polar HP-5MS UI (30 m \times 0,25 mm, 0,25 μm) también de Agilent.

Para la adquisición de datos se utilizó el software LAV (G.A.S.). Los datos se procesaron con los programas VOCal (G.A.S.), SIMCA (Umetrics, Suecia, versión 14.1) y Statgraphics Centurion XV (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA, EE. UU.).

2.2.4. Método HS-GC-IMS

Las muestras de orina (2 mL) y suero (400 μ L) se incubaron a 70 °C durante 4 min (750 rpm). A continuación, se inyectaron 750 μ L del espacio de cabeza usando el modo *splitless*. La temperatura de la jeringa se ajustó a 80 °C, y la temperatura del inyector fue de 100 °C. Se utilizó nitrógeno como gas portador con un caudal de 1 mL/min. El programa de temperatura del horno consistió en mantener la temperatura a 50 °C durante 4 min, a continuación, se elevó la temperatura a 130 °C a una velocidad de 10 °C/min, y se mantuvo durante 8 min. El tiempo total del análisis GC fue de 20 min.

Para la separación en el IMS, se trabajó a presión atmosférica y en modo positivo. El gas de deriva también fue nitrógeno a un caudal de 150 mL/min. La temperatura del tubo de deriva se fijó en 90 °C, operando a un voltaje fijo de 500 V/cm. Los voltajes de bloqueo y deriva utilizados fueron 50 y 241 V, respectivamente. Los parámetros de adquisición fueron los siguientes: velocidad de repetición de 30 ms, ancho de pulso de rejilla de 150 μ s y un promedio de 32 barridos.

2.2.5. Procesamiento de datos

El procesamiento de datos consistió en el alineamiento de los datos, selección de los marcadores más importantes, normalización y construcción de los modelos quimiométricos para la discriminación de las muestras de pacientes con EII (activa o remisión) y de los voluntarios sanos de EII.

Inicialmente, los mapas topográficos de cada muestra (suero u orina) se alinearon utilizando el software LAV y usando una muestra como referencia. Tras analizar visualmente todos los espectros, se seleccionaron 209 marcadores para las muestras de suero y 193 marcadores para las de orina. Como variable respuesta se seleccionó los valores de intensidad por encima de la línea de base, y la normalización se realizó utilizando la señal del RIP antes del tiempo muerto.

Las dos matrices de datos, una para las muestras de suero y otra para las muestras de orina, se construyeron con todas las muestras analizadas (filas) y todos los marcadores seleccionados (columnas). Estas matrices se dividieron aleatoriamente en dos subgrupos: el conjunto de entrenamiento, formado por el 80% de las muestras, y el conjunto de validación, formado por el 20% restante de muestras.

Los modelos se construyeron usando el conjunto de entrenamiento y se basaron en el análisis OPLS-DA. Para su construcción se usó la escala de UV, ya que es la escala más usada en los estudios metabólicos. El éxito del modelo se evaluó mediante los

siguientes parámetros: Q2(cum) (capacidad predictiva acumulada), R2Y(cum) y R2X(cum) (variación explicada acumulada en X e Y, respectivamente), sensibilidad, CR y precisión [14].

R2X(cum) y R2Y(cum) indican la fracción acumulada de la variación explicada por un componente específico. Cuanto más cercanos sean estos parámetros a uno, mejor es el ajuste del modelo. La capacidad predictiva del modelo quimiométrico, para el que se recomienda un valor superior a 0,4 en metabolómica, viene indicada por Q2(cum) [15]. El CR (%) se evaluó para los conjuntos de validación y entrenamiento, mientras que la sensibilidad ($\frac{\sum \text{verdaderos positivos}}{\sum \text{verdaderos positivos} + \sum \text{falsos negativos}} \times 100\%$) y la precisión ($\frac{\sum \text{verdaderos positivos}}{\sum \text{verdaderos positivos} + \sum \text{falsos positivos}} \times 100\%$) se evaluaron para el conjunto de validación [16].

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Optimización del método HS-GC-IMS

La optimización del método analítico se basó en conseguir analizar el mayor número posible de compuestos volátiles lo más intensas posibles, seleccionando como variable respuesta la suma de todas las señales presentes en el mapa topográfico. Para el análisis de ambas matrices biológicas (suero y orina), se investigaron los parámetros de volumen de muestra, tiempo y temperatura de incubación de la muestra, adición de sal (cloruro de sodio) y la temperatura del tubo de deriva. La optimización se llevó a cabo utilizando muestras de suero y orina de un mismo voluntario durante todos los experimentos.

Inicialmente, se estudió la cantidad de muestra. En el caso de las muestras de suero, se disponía de un volumen de muestra muy limitado, con un máximo de 400 μL de cada muestra, por lo que el volumen de suero a utilizar se optimizó entre 100 y 400 μL (Figura 2.1A). El volumen de muestra de orina se optimizó entre 0,5 y 3 mL (Figura 2.1B). En el caso de las muestras de suero, la intensidad de las señales aumenta al aumentar el volumen de la muestra, por lo que se seleccionaron 400 μL como volumen óptimo de suero. El mismo patrón se observa al aumentar el volumen de la muestra de orina, aunque no se observaron diferencias significativas al utilizar 2 y 3 mL de muestra. Por lo tanto, se decidió trabajar con 2 mL, dadas las limitaciones en la cantidad de muestra disponible de algunos pacientes.

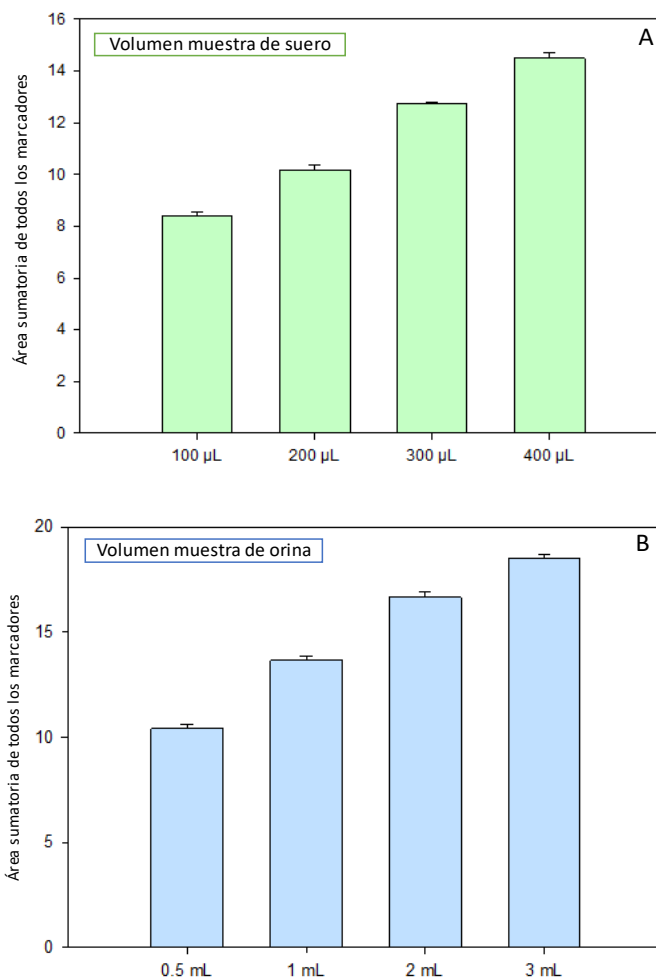


Figura 2.1. Área sumatoria de marcadores obtenidos para optimización de volumen con muestras de suero (A) y orina (B).

A continuación, se optimizó conjuntamente la temperatura de incubación, el tiempo de incubación y la adición de cloruro de sodio mediante un diseño de experimentos de superficie de respuesta. Se realizaron dos diseños de experimentos para cada una de las matrices estudiadas, que consistieron en un diseño compuesto central 2^3 + estrella, centrado en las caras y con tres puntos centrales espaciados, dando lugar a un total de 17 experimentos. La temperatura de incubación se estudió entre 60 y 80 °C, el tiempo de incubación entre 1 y 15 min y el porcentaje de cloruro de sodio entre 0 y 10% m/v.

La optimización multivariante se llevó a cabo usando como variable de respuesta la suma de todas las áreas de señales presentes en el mapa topográfico. Los gráficos de superficie de respuesta obtenidos se muestran en la Figura 2.2. Los coeficientes de determinación (R^2) para las muestras de suero y orina fueron del 84,92% y 90,34%, respectivamente, demostrando la idoneidad de los diseños. En ambos casos, las

condiciones óptimas fueron las siguientes: temperatura de incubación = 70 °C, tiempo de incubación = 4 min y porcentaje de cloruro de sodio = 0%.

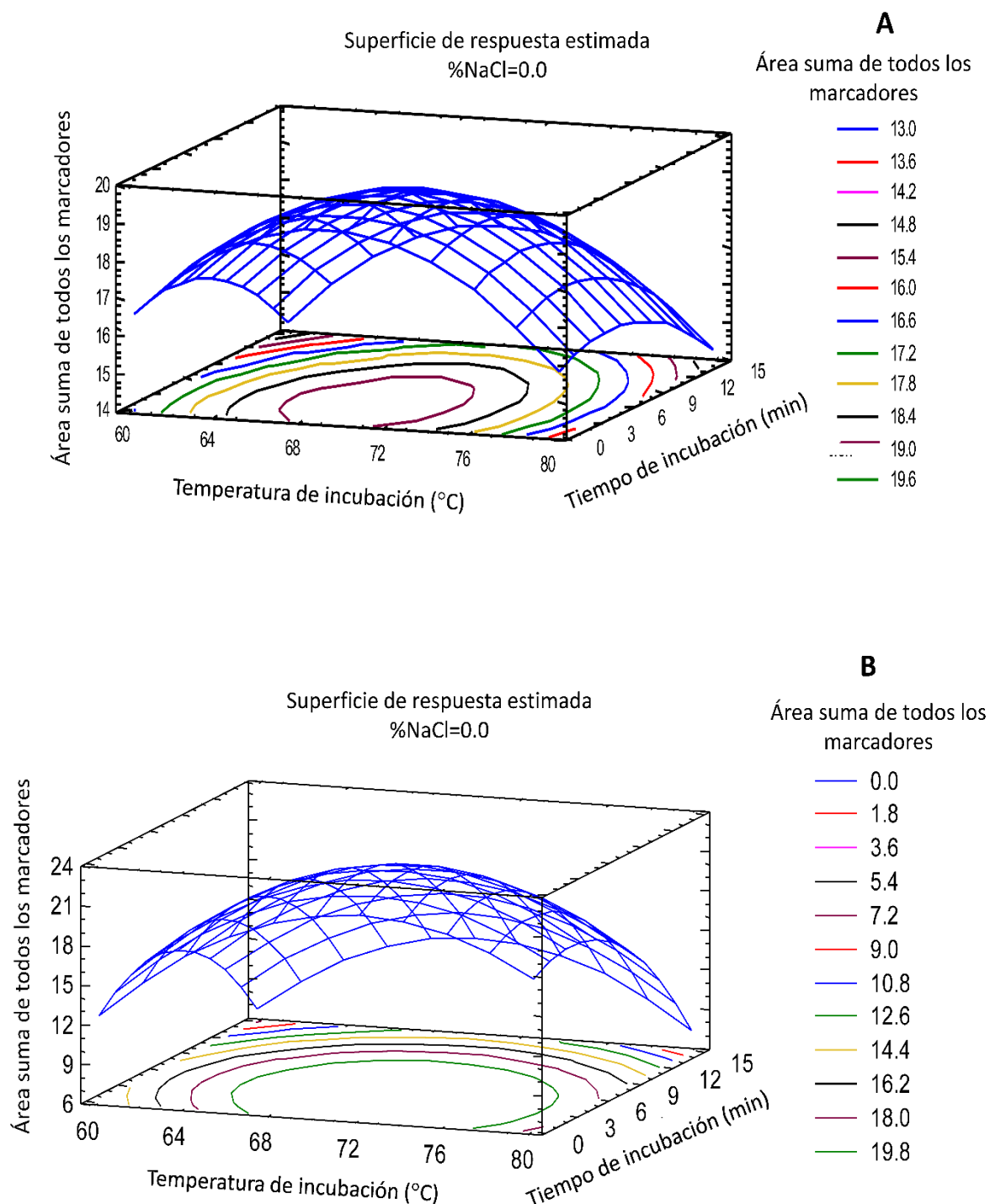


Figura 2.2. Superficie de respuesta estimada obtenida en la optimización del método HS-GC-IMS para las muestras de suero (A) y orina (B), utilizando un diseño compuesto central ($2^3 +$ estrella, centrado en las caras), con tres puntos centrales espaciados.

Finalmente, se optimizó la temperatura del tubo de deriva entre 60 y 90 °C utilizando un método univariante. Al comparar la suma de las áreas de todos los marcadores para cada una de las temperaturas del tubo de deriva probadas, tanto para el suero como para la orina, se observó que la suma de señales aumenta a medida que aumenta la temperatura. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando 90 °C como temperatura del tubo de deriva para ambas matrices. En la Figura 2.3 se puede observar el mapa topográfico del suero, donde se observa mayor número de señales a 90 °C. No se subió la temperatura del tubo de deriva por encima de 90 °C, para no trabajar a la temperatura máxima recomendada por el fabricante (100 °C), con el objetivo de poder limpiar posteriormente el equipo.

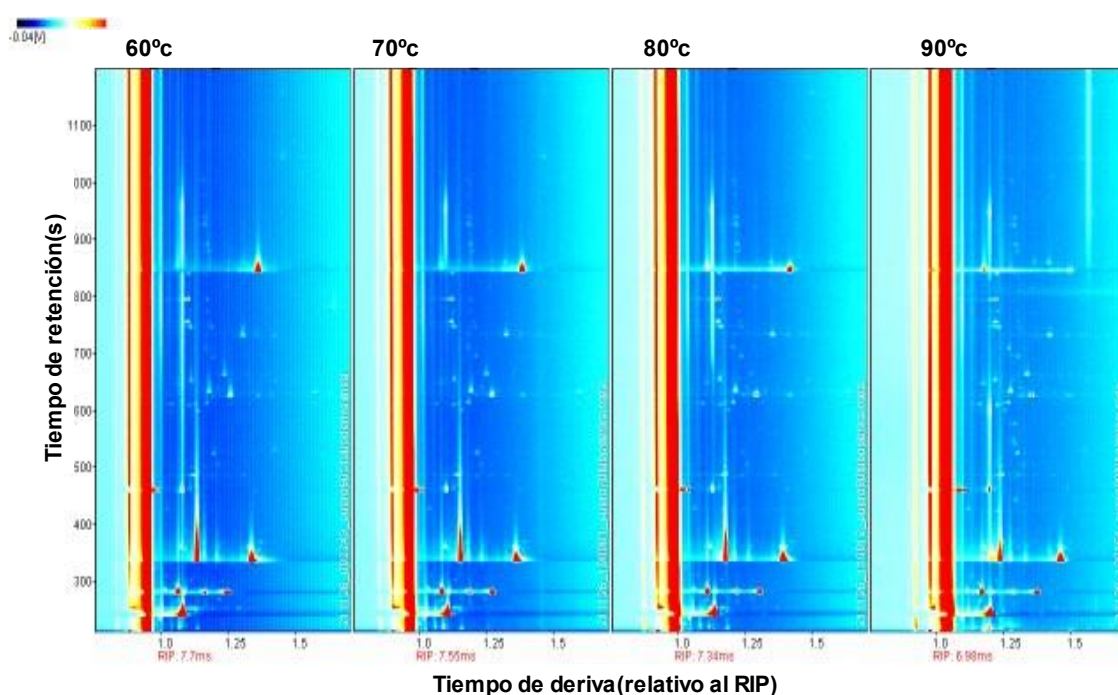


Figura 2.3. Mapas topográficos obtenidos temperatura del tubo de deriva entre 60 y 90 °C utilizando un método univariante para el suero.

Los perfiles volátiles obtenidos con el método HS-GC-IMS optimizado se muestran en la Figura 2.4 para una muestra de suero y una muestra de orina de un paciente con EII activa. Como puede observarse, el espectro obtenido para la muestra de suero es más rico en señales que el obtenido para la muestra de orina, aunque la cantidad de muestra analizada es mucho menor en el suero (400 μ L) que en la orina (2 mL).

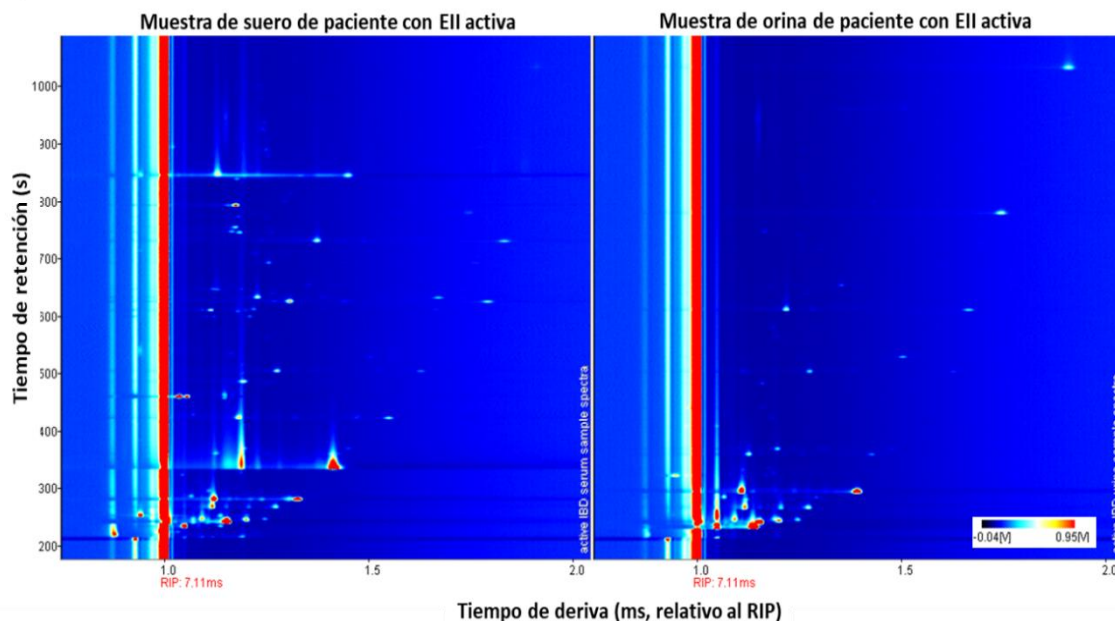


Figura 2.4. Mapas topográficos obtenidos con el método HS-GC-IMS optimizado para las muestras de suero y orina de un paciente con EII activa.

1.3.2. Identificación de compuestos

El método HS-GC-IMS se empleó para analizar muestras de orina o suero de pacientes diagnosticados de EII, con la enfermedad activa o en remisión, y de los voluntarios sanos, con el objetivo de encontrar diferencias en los diferentes mapas topográficos obtenidos que pudieran relacionarse con ciertos biomarcadores que ayudasen en el diagnóstico de la EII.

Concretamente, se analizaron muestras de orina de 123 voluntarios (34 pacientes con EII activa, 43 pacientes con EII en remisión y 46 individuos sanos sin EII). La Figura 2.5 muestra los espectros obtenidos para cada categoría de EII. Como puede observarse, la parte inicial del espectro (entre 230 y 400 s) contiene un mayor número de señales, recogiendo tanto los compuestos más volátiles como los polares. Las tres categorías mostraron espectros muy similares, y con una alta variabilidad de señales entre las distintas muestras, pero de manera general pueden apreciarse ligeras diferencias mediante exploración visual. Por ejemplo, las muestras de orina de pacientes con EII activa mostraron menos compuestos polares en la parte inicial del espectro, y también menos compuestos no polares que las muestras de pacientes sanos y en remisión. Por otra parte, la intensidad de los compuestos volátiles en la parte media del espectro es mayor en las muestras de pacientes en fase de remisión que en las demás categorías.

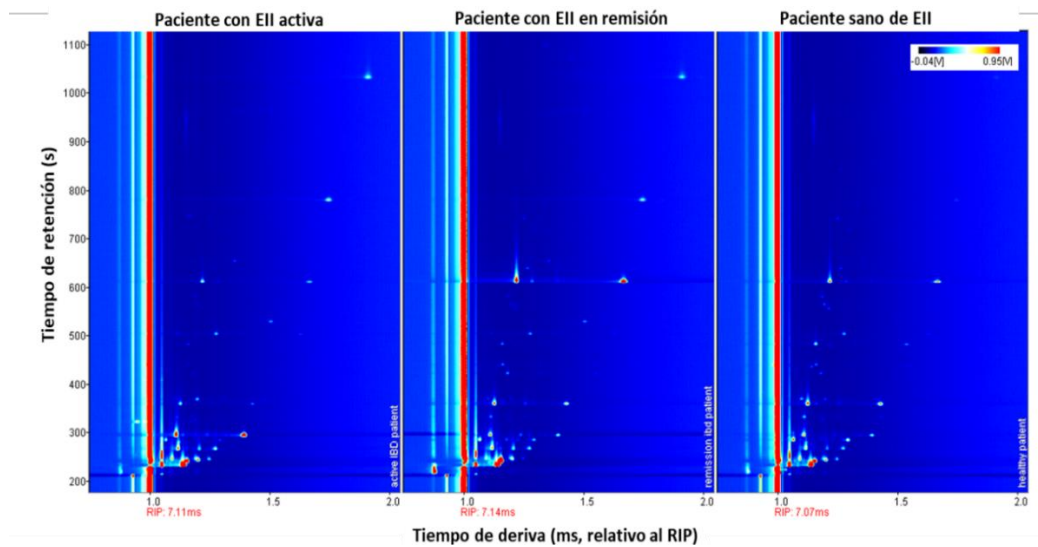


Figura 2.5. Espectros obtenidos tras el análisis de muestras de orina de pacientes con EII activa, en remisión y de los voluntarios sanos sin EII.

En cuanto a las muestras de suero, se analizaron un total de 118 muestras de suero (37 de pacientes con EII activa, 41 pacientes con EII en remisión y 40 voluntarios sanos sin EII). Las diferencias espectrales entre cada categoría pueden verse en la Figura 2.6. Nuevamente puede observarse, que el número de señales en las muestras de suero es mayor que en el caso de la orina. Al igual que la otra matriz, la parte del espectro con más señales también es la parte inicial que recoge los compuestos más polares y volátiles. Para estas muestras, la diferenciación por inspección visual es más complicada, los espectros de las tres categorías son muy similares, pero se observa una mayor intensidad de los marcadores entre 230 y 300 s de tiempo de medición en las muestras de suero de pacientes con EII en remisión.

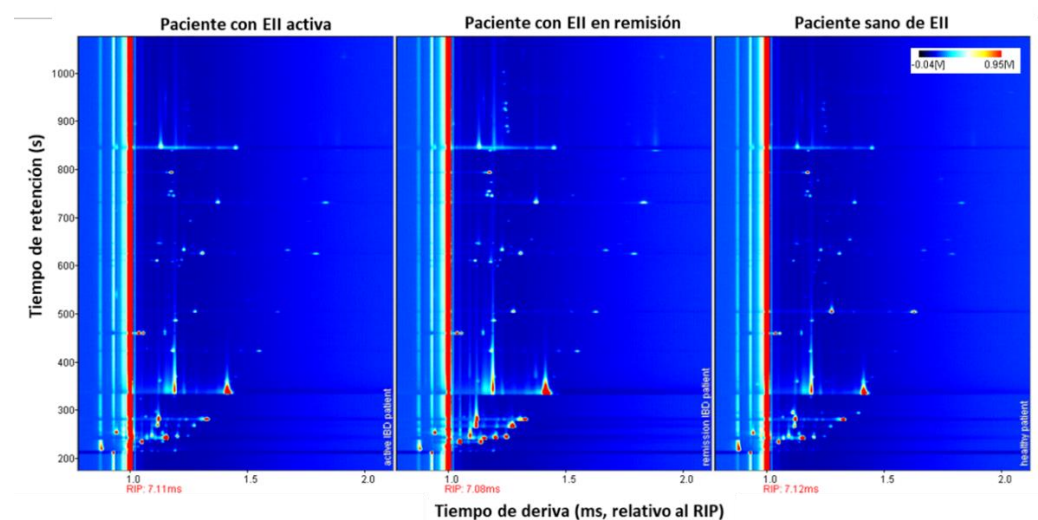


Figura 2.6. Espectros obtenidos tras el análisis de muestras de suero de pacientes con EII activa, en remisión y de los voluntarios sanos sin EII.

Con el objetivo de investigar los espectros más a fondo, e identificar algunos de los compuestos volátiles detectados por HS-GC-IMS en las muestras de orina y suero analizadas, se llevó a cabo una identificación prospectiva preliminar utilizando el software VOCal. Con este software, se identificaron tentativamente un total de 27 compuestos en las muestras de orina y 15 compuestos en las muestras de suero. Para confirmar esta identificación se inyectaron por separado los 19 estándares disponibles. En concreto, 1-propanol, o-xileno, 2-heptanona, heptanal, benzaldehído, alfa-pineno, beta-pineno, hexanal, 2-hexanona, 1-pentanol, pentanal, 2-pentanona, acetato de etilo, 2-butanona, ácido acético, acetona, linalol, limoneno y tolueno. De estos estándares, el 1-propanol, o-xileno, 2-heptanona, heptanal, benzaldehído, hexanal, 2-hexanona, 1-pentanol, pentanal, 2-pentanona, 2-butanona, acetona, y tolueno se habían descrito previamente en orina y suero [17-23], como se puede ver en la Tabla 2.2 todos ellos fueron identificados en nuestro análisis a excepción del tolueno. Se prepararon disoluciones estándares de cada compuesto de manera individual y conjuntamente a 10 µg/mL en orina artificial o en una solución alcalina comercial de suero para la identificación de los compuestos en orina o en suero, respectivamente.

Tras el análisis de los estándares se pudo confirmar la identificación de 12 compuestos en las muestras de orina (Figura 2.7A) y 6 en las muestras de suero (Figura 2.7). La Tabla 2.2 muestra los tiempos de retención y deriva y la constante de movilidad reducida (K_0) de cada compuesto identificado. Cabe señalar que se detectaron tanto monómero como dímero para todos los compuestos.

Tabla 2.2. VOCs identificados por HS-GC-IMS en muestras de orina y suero.

Compuesto	Tiempo retención (s)	Tiempo de deriva monómero (ms)	Tiempo de deriva del dímero (ms)	K_0	
				Monómero	Dímero
acetona	244,53	7,75	8,04	1,91	1,84
1-propanol	268,29	7,75	8,89	1,91	1,66
2-butanona	288,09	7,46	8,98	1,98	1,65
acetato de etilo	297,00	7,76	9,69	1,91	1,53
2-pentanona	360,36	7,89	9,92	1,88	1,49
pentanal	372,24	8,35	10,31	1,77	1,43
2-hexanona	493,02	8,34	10,97	1,77	1,35
hexanal	506,88	8,92	11,36	1,66	1,30
2-heptanona	641,52	8,87	11,94	1,67	1,24
o-xileno	648,45	7,66	7,80	1,93	1,90
heptanal	657,36	9,47	12,42	1,56	1,19
benzaldehído	749,43	8,15	10,68	1,81	1,39

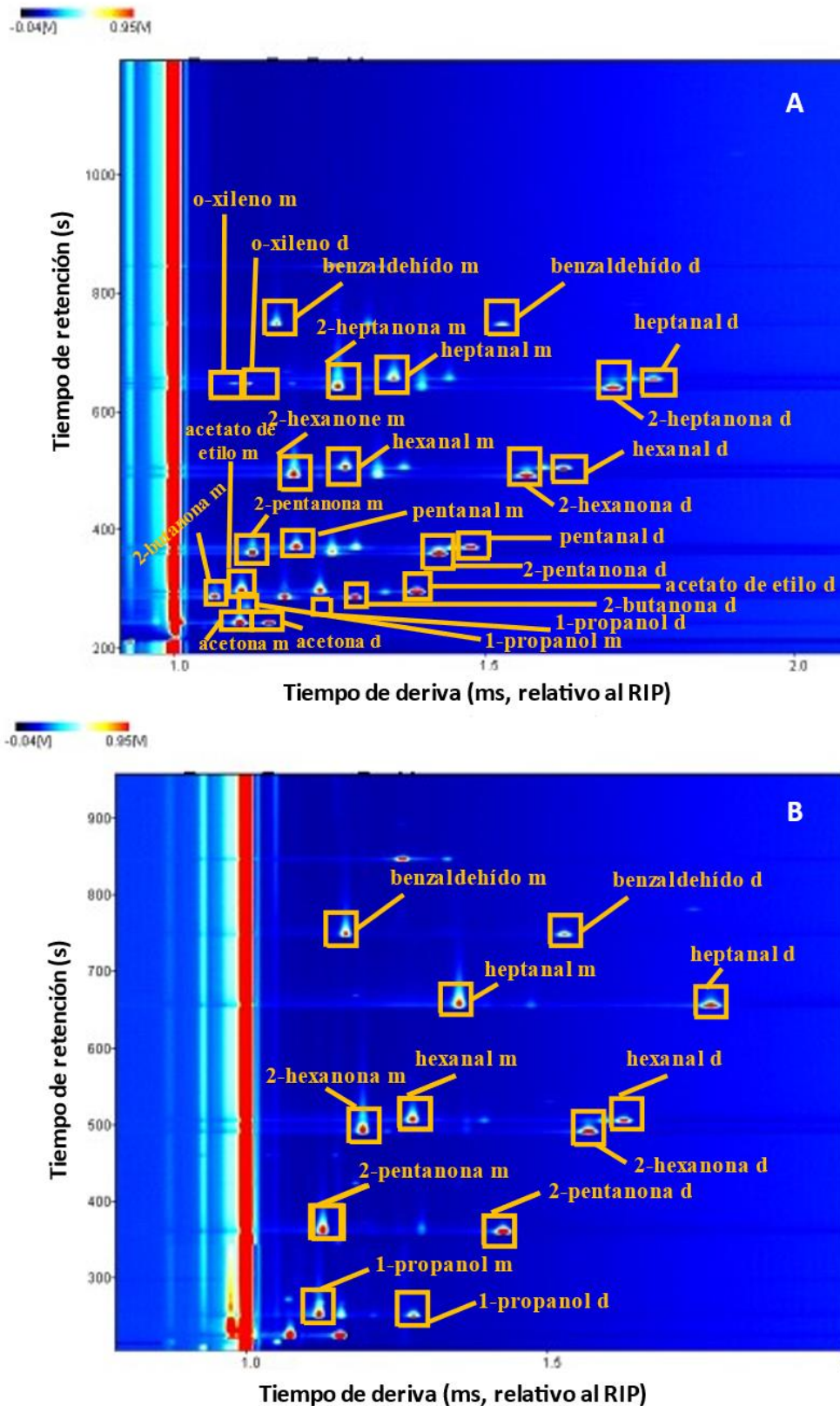


Figura 2.7. Mapas topográficos mostrando la identificación de los compuestos orgánicos volátiles en las muestras de orina (A) y suero (B).

Finalmente, la Figura 2.8 muestra la comparación de los compuestos identificados en las diferentes categorías (muestras de pacientes con EII activa, muestras de pacientes con EII en remisión y muestras de los voluntarios sanos sin EII). Una exploración visual de esta figura revela que los compuestos 1-propanol y acetato de etilo aparecen principalmente en la orina de EII activa. Por el contrario, las cetonas 2-butanona, 2-pentanona y 2-hexanona aparecen principalmente en las muestras de orina sana. En cuanto al contenido de 2-heptanona, era mayor en la orina de pacientes con EII en remisión. En cuanto a las muestras de suero, se puede observar que los compuestos 1-propanol y benzaldehído aparecen principalmente en individuos con EII en remisión, mientras que ocurre lo contrario con la 2-pentanona, su intensidad es más bajas en los pacientes con EII en remisión. Los voluntarios sanos sin EII mostraron la mayor concentración de heptanal, mientras que los pacientes con EII (activos o remisión) presentaron el contenido más bajo. Por otra parte, en el caso de la 2-hexanona se observa lo contrario, una mayor concentración en los enfermos de EII en comparación con los voluntarios sanos sin EII. Aunque esto es sólo una comparación visual de tres de las muestras analizadas, por lo que un exhaustivo análisis estadístico tiene que llevarse a cabo, con el fin de establecer claros biomarcadores, que permitan la diferenciación entre clases.

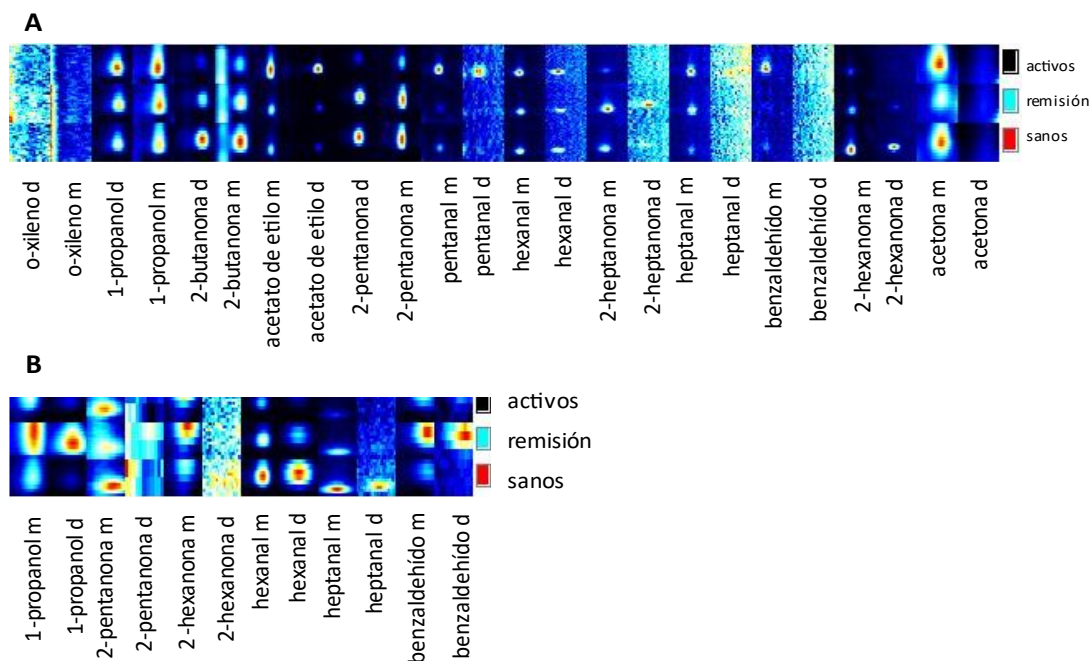


Figura 2.8. Comparación de la intensidad de los compuestos identificados en las muestras de orina (A) y suero (B) de cada categoría (pacientes con EII activa, pacientes con EII en remisión y voluntarios sanos sin EII).

2.3.3. Caracterización del método y cuantificación de los compuestos volátiles identificados

Para cuantificar el contenido de los compuestos volátiles identificados en las muestras de suero y orina, se establecieron curvas de calibración utilizando orina artificial o solución alcalina de suero dopada con ocho niveles de concentración entre 0,01 y 2 $\mu\text{g/mL}$. Cada nivel de concentración se inyectó por duplicado en ambos tipos de matrices. Para obtener la mejor curva de calibración, ya que en el análisis del IMS puede aparecer varias señales para un compuesto, se examinaron diferentes respuestas analíticas: área del monómero, área del dímero o la suma de las áreas del monómero y el dímero. Además, se estudiaron ajustes lineales o logarítmicos. En todos los casos, los datos se ajustaron mejor a una regresión logarítmica, esto estaba en concordancia con lo descrito previamente en la bibliografía [24]. Tras el ajuste de regresión logarítmica, la suma del monómero y el dímero ofrece los mejores coeficientes de regresión ($R^2 > 0,97$ o $R^2 > 0,98$ para las muestras de orina o suero, respectivamente), como puede verse en la Tabla 2.3. Las pendientes también fueron mayores para la suma del monómero y el dímero, lo que demuestra un aumento de la sensibilidad del método. El aumento de la sensibilidad se verificó estadísticamente para cada compuesto utilizando un t-test para determinar si la pendiente de la regresión utilizando la suma del monómero y el dímero era mayor que la pendiente de la regresión utilizando el monómero o el dímero individualmente, obteniéndose valores p-valores inferiores a 0,05 en todos los casos.

Los límites de cuantificación (LOQ) también se muestran en la Tabla 2.3, calculados como 10 veces la relación señal/ruido (S/N). Para los compuestos identificados en orina, los LOQ oscilaron entre 0,007 y 0,046 $\mu\text{g/mL}$, correspondiendo a acetona y o-xileno, respectivamente. Para los compuestos identificados en suero, los LOQ se situaron entre 0,009 y 0,014 $\mu\text{g/mL}$, correspondiendo a hexanal o heptanal y 1-propanol o 2-pentanona, respectivamente.

Tabla 2.3. Curvas de calibración, y parámetros de calidad de los compuestos identificados por HS-GC-IMS en las muestras de orina y suero, usando como respuesta analítica la suma de intensidad del monómero y dímero.

Analito	Ecuación	R ²	LOQ, µg/mL
Orina			
<i>acetona</i>	$y = 0,6702\ln(x) + 4,2112$	0,9869	0,007
<i>1-propanol</i>	$y = 0,3754\ln(x) + 0,4277$	0,9858	0,020
<i>2-butanona</i>	$y = 1,0539\ln(x) + 4,0504$	0,9809	0,029
<i>acetato de etilo</i>	$y = 1,0282\ln(x) + 4,0399$	0,9823	0,011
<i>2-pentanona</i>	$y = 1,0124\ln(x) + 4,1322$	0,9796	0,022
<i>Pentanal</i>	$y = 0,543\ln(x) + 2,9407$	0,9804	0,011
<i>2-hexanona</i>	$y = 0,8639\ln(x) + 3,8745$	0,9735	0,014
<i>Hexanal</i>	$y = 0,4022\ln(x) + 2,2671$	0,9746	0,011
<i>2-heptanona</i>	$y = 0,6184\ln(x) + 2,9437$	0,9740	0,013
<i>o-xileno</i>	$y = 0,3913\ln(x) + 1,7657$	0,9929	0,046
<i>heptanal</i>	$y = 0,3754\ln(x) + 1,955$	0,9712	0,011
<i>benzaldehído</i>	$y = 0,4875\ln(x) + 1,8455$	0,9833	0,029
Suero			
<i>1-propanol</i>	$y = 0,3418\ln(x) + 2,2068$	0,982	0,014
<i>2-pentanona</i>	$y = 0,9346\ln(x) + 3,5073$	0,9802	0,014
<i>2-hexanona</i>	$y = 0,7628\ln(x) + 3,2827$	0,9871	0,013
<i>hexanal</i>	$y = 0,4079\ln(x) + 2,1909$	0,9924	0,009
<i>heptanal</i>	$y = 0,4617\ln(x) + 2,4882$	0,9983	0,009
<i>benzaldehído</i>	$y = 0,5289\ln(x) + 2,063$	0,9822	0,013

Las curvas de calibrado se aplicaron para la cuantificación de los compuestos identificados en las muestras de orina y suero. La Tabla 2.4 y 2.5 muestran los contenidos medios, junto con sus valores de desviación estándar para cada categoría en ambos tipos de matrices. Esta información se utilizó posteriormente para realizar un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y una prueba de diferencia mínima significativa (LSD) para comparar las distintas categorías.

Tabla 2.4. Concentraciones medias ($\mu\text{g/mL}$) y desviación típica de los VOCs identificados en cada categoría, incluidos los resultados de la prueba LSD para las muestras de orina.

Los superíndices a,b,c representan los resultados del ANOVA y la prueba LSD, es decir, la

Componente	Orina		
	Activos	Remisión	Sanos
acetona	$1,1 \pm 0,7$ ^{a,b}	$1,5 \pm 0,9$ ^b	$1,0 \pm 0,6$ ^a
1-propanol	$0,5 \pm 0,8$ ^b	$0,2 \pm 0,6$ ^a	$0,04 \pm 0,27$ ^a
2-butanona	$0,06 \pm 0,04$ ^a	$0,05 \pm 0,04$ ^a	$0,06 \pm 0,06$ ^a
acetato de etilo	$1,1 \pm 1,2$ ^{a,b}	$1,3 \pm 1,8$ ^b	$0,6 \pm 1,1$ ^a
2-pentanona	$0,1 \pm 0,3$ ^a	$0,07 \pm 0,05$ ^a	$0,09 \pm 0,14$ ^a
pentanal	$0,001 \pm 0,004$ ^a	$0,0 \pm 0,0$ ^a	$0,0003 \pm 0,002$ ^a
2-hexanona	$0,004 \pm 0,006$ ^a	$0,006 \pm 0,008$ ^a	$0,003 \pm 0,006$ ^a
hexanal	$0,003 \pm 0,008$ ^a	$0,01 \pm 0,01$ ^a	$0,01 \pm 0,05$ ^a
2-heptanona	$0,0009 \pm 0,004$ ^a	$0,001 \pm 0,004$ ^a	$0,003 \pm 0,02$ ^a
o-xileno	<LOQ	<LOQ	<LOQ
heptanal	<LOQ	<LOQ	<LOQ
benzaldehído	$0,01 \pm 0,03$ ^a	$0,01 \pm 0,02$ ^a	$0,01 \pm 0,04$ ^a

clasificación en diferentes grupos para un compuesto específico.

Tabla 2.5. Concentraciones medias ($\mu\text{g/mL}$) y desviación típica de los VOCs identificados en cada categoría, incluidos los resultados de la prueba LSD para las muestras de suero.

Componente	Suero		
	Activos	Remisión	Sanos
acetona			
1-propanol	$0,6 \pm 1,6$ ^a	1 ± 5 ^a	$0,2 \pm 0,8$ ^a
2-butanona			
acetato de etilo			
2-pentanona	$0,035 \pm 0,005$ ^a	$0,033 \pm 0,004$ ^a	$0,034 \pm 0,006$ ^a
pentanal			
2-hexanona	$0,04 \pm 0,03$ ^b	$0,06 \pm 0,04$ ^c	$0,010 \pm 0,014$ ^a
hexanal	$0,06 \pm 0,07$ ^a	$0,04 \pm 0,09$ ^a	$1,7 \pm 1,6$ ^b
2-heptanona			
o-xileno			
heptanal	<LOQ	<LOQ	$0,004 \pm 0,005$ ^b
benzaldehído	$0,034 \pm 0,012$ ^b	$0,032 \pm 0,007$ ^b	$0,028 \pm 0,005$ ^a

Los superíndices a,b,c representan los resultados del ANOVA y la prueba LSD, es decir, la clasificación en diferentes grupos para un compuesto específico.

Los resultados mostraron que, en las muestras de orina, el 1-propanol permitió diferenciar a los pacientes con EII activa del resto de categorías, ya que su concentración era significativamente mayor ($0,5 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$) en la orina procedente de pacientes con EII activa que en la orina de pacientes en remisión y los voluntarios sanos sin EII. Por el contrario, los compuestos acetona y acetato de etilo mostraron la mayor abundancia en las muestras de pacientes en remisión, con contenidos medios de $1,5 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ y $1,3 \pm 1,8 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Cabe destacar, que las muestras de orina de los individuos sanos mostraron la menor abundancia de estos compuestos (acetona y acetato de etilo), mientras que se encontró una alta variabilidad en el grupo de pacientes con enfermedad activa. No se encontraron diferencias significativas entre las distintas categorías para el resto de los compuestos. Aunque fueron detectados, los contenidos de heptanal y o-xileno no pudieron cuantificarse en ninguna muestra, ya que estaban por debajo del LOQ.

En el suero, se observó que el hexanal y el benzaldehído permitían diferenciar a los individuos sanos de los pacientes enfermos de EII (en fase activa y de remisión), ya que hexanal mostraba una mayor concentración en los individuos sanos con concentraciones medias de $1,7 \pm 1,6 \mu\text{g/mL}$, y benzaldehído una menor concentración en esta categoría de muestras con concentraciones medias de $0,028 \pm 0,005 \mu\text{g/mL}$. El aldehído heptanal sólo pudo cuantificarse en los individuos sanos, ya que su concentración en los pacientes con EII estaba por debajo del LOQ. El único compuesto de los estudiados que permitió diferenciar entre las tres categorías fue la 2-hexanona, mostrando su mayor concentración en los individuos con la enfermedad en remisión ($0,06 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$) y la menor concentración en los individuos sanos ($0,010 \pm 0,014 \mu\text{g/mL}$). No se encontraron diferencias significativas para el 1-propanol y la 2-pentanona.

Como se ha demostrado, el análisis estadístico realizado permitió establecer ciertas relaciones entre los diferentes compuestos identificados y las tres categorías de muestras. Sin embargo, algunos de los resultados, como las conclusiones obtenidas para la concentración de hexanal son contradictorias con las descritas en el Capítulo 1, donde hexanal mostró una mayor concentración en los pacientes sanos. Este hecho, unido a la importante variabilidad dentro de cada grupo, justifica la necesidad de realizar modelos quimiométricos que permitan trabajar con toda la huella dactilar de las muestras, sin establecer marcadores específicos.

2.3.4. Modelos quimiométricos para clasificar las muestras según el diagnóstico de EII

Como se describe en la Sección 1.2.5., inicialmente se llevó a cabo el alineamiento de las muestras superponiéndolas a una muestra de orina o de suero de referencia. A continuación, se seleccionaron visualmente y de manera manual un total de 193 y 209 marcadores (identificados por los tiempos de retención y deriva) para las muestras de orina o suero, respectivamente.

Las matrices de datos obtenidas, incluyendo todas las muestras y marcadores, tenían las siguientes dimensiones: 123 (muestras) \times 193 (marcadores) para la orina y 118 (muestras) \times 209 (marcadores) para el suero. Aunque algunas de las variables o marcadores empleados podrían no aportar información útil, se optó por no eliminar datos con el objetivo de proporcionar un método de cribado rápido para encontrar diferencias entre las muestras de pacientes con EII (en remisión y activos) y los individuos sanos y ayudar así al diagnóstico de la EII.

Antes de construir los modelos, se obtuvieron los diagramas de probabilidad normal para los residuales para comprobar si los datos seguían una distribución normal (Figuras 2.9 y 2.10). Como puede observarse, todos los puntos estaban dispuestos en línea recta, lo que indica que los residuos eran aleatorios y estaban distribuidos normalmente. Dada esta distribución normal de los datos, el análisis quimiométrico se llevó a cabo utilizando los datos brutos sin transformar.

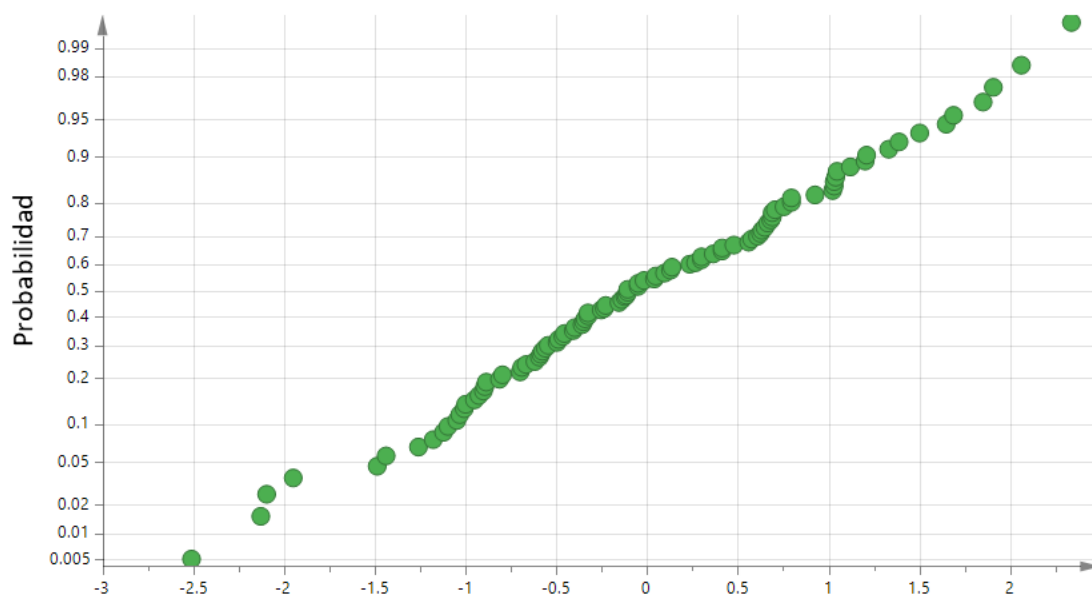


Figura 2.9. Diagrama de probabilidad normal residual obtenido a partir de muestras de orina.

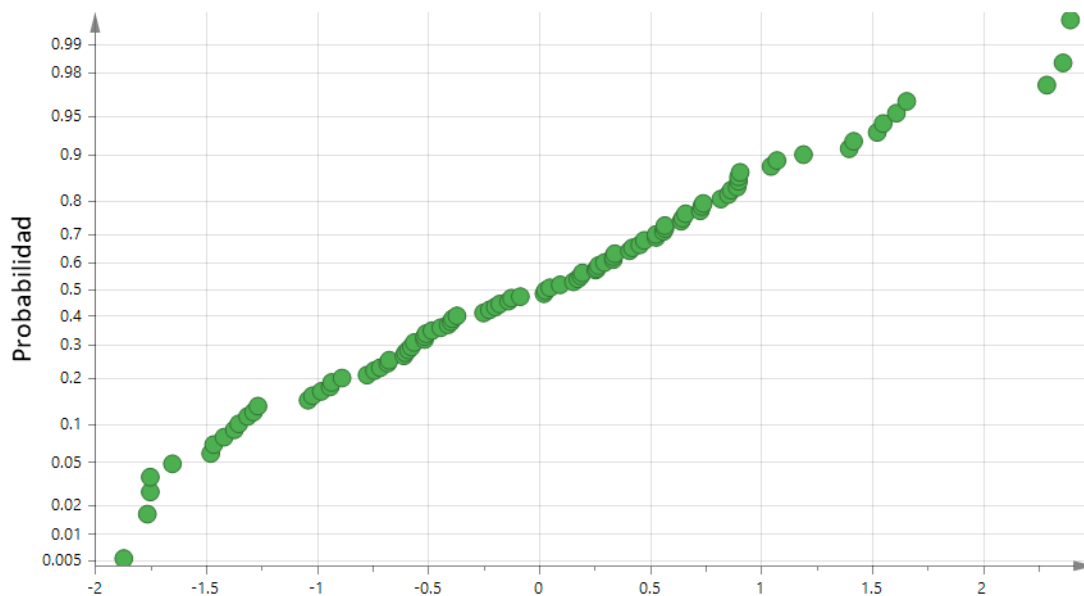


Figura 2.10. Diagrama de probabilidad normal residual obtenido a partir de muestras de suero.

El tratamiento quimiométrico se basó en la combinación de dos modelos OPLS-DA diferentes, un modelo inicial para la diferenciación de las muestras de pacientes con EII (incluyendo pacientes con la enfermedad activa o en remisión) y las muestras de los voluntarios sanos de EII, y un segundo modelo para la diferenciación entre los dos estadios de la enfermedad, activa o en remisión.

Los modelos OPLS-DA se construyeron usando el 80% de los datos y se validaron con el 20% restante. En todos los casos se usó escala UV o autoescalado, por ser la más usada en metabolómica, que se define como $(\text{valor obtenido} - \text{media}) / \text{desviación estándar}$. Además, se construyeron modelos normalizando los datos respecto a la intensidad del RIP y sin normalizar, con el fin de conseguir los mejores resultados para la clasificación de las muestras.

Los modelos OPLS-DA para diferenciar entre individuos sanos y enfermos con EII se construyeron usando una matriz de datos formada por 98 muestras para la orina (37 muestras de individuos sanos y 61 muestras de pacientes con EII, incluyendo 29 con la enfermedad activa y 32 en remisión) y otra matriz de 94 muestras para el suero, incluyendo 32 individuos sanos y 62 pacientes con enfermedad EII (30 con la enfermedad activa y 32 en remisión). El modelo de las muestras de orina validó externamente con 25 muestras (9 muestras de individuos sanos y 16 de pacientes enfermos), mientras que el modelo de las muestras de suero se validó con 24 muestras, incluyendo 8 individuos sanos y 16 pacientes con enfermedad EII (7 pacientes activos y 9 en remisión).

La Tabla 2.6 muestra los resultados obtenidos para ambos tipos de matrices. Como puede observarse, los mejores resultados en ambos casos se obtuvieron con los datos normalizados con la intensidad RIP, con Q2 de 0,692 y 0,901 para la orina y el suero, respectivamente. La Figura 2.11 muestra los gráficos *score* de los modelos OPLS-DA óptimos. Aunque ambos modelos clasifican correctamente el 100 % de las muestras, y obteniendo, por tanto, una sensibilidad y precisión del 100%, los parámetros de calidad del modelo obtenido para el suero son mejores que los obtenidos para la orina, ya que los valores de R2 y Q2 son mayores, mostrando también una menor diferencia entre ellos, lo que demuestra la capacidad predictiva del modelo y la no presencia de una sobre dimensionalidad de los modelos.

Tabla 2.6. Selección del pretratamiento de los datos HS-GC-IMS y modelo quimiométrico para la clasificación de muestras de orina y suero entre pacientes sanos y enfermos (incluyendo pacientes con enfermedad activa y en fase de remisión).

Muestras de orina								
Normalización	Modelo de información				CR (%)		Sens (%)	Prec (%)
	PCs	R2X (cum)	R2Y (cum)	Q2 (cum)	Cal	Val	Val	Val
<i>Sin normalizar</i>	1+4+0	0,375	0,902	0,683	100	100	S (100), E (100)	S (100), E (100)
<i>Usando el RIP</i>	1+6+0	0,447	0,941	0,692	100	100	S (100), E (100)	S (100), E (100)
Muestras de suero								
Normalización	Modelo de información				CR (%)		Sens (%)	Prec (%)
	PCs	R2X (cum)	R2Y (cum)	Q2 (cum)	Cal	Val	Val	Val
<i>Sin normalizar</i>	1+4+0	0,570	0,953	0,875	100	100	S (100), E (100)	S (100), E (100)
<i>Usando el RIP</i>	1+4+0	0,875	0,953	0,901	100	100	S (100), E (100)	S (100), E (100)

Clases: voluntarios sanos sin EII (S) y pacientes con EII (E). Sens: Sensibilidad; Prec: Precisión; Val: Validación; Cal: Calibración.

Los modelos OPLS-DA para diferenciar entre pacientes con EII activa y en remisión, se construyeron usando una matriz de datos de dimensiones 61 (27 muestras en fase activa y 34 muestras en fase de remisión) x 193 (marcadores) para las muestras de orina, y 63 (30 muestras en fase activa y 33 muestras en fase de remisión) x 209 (marcadores) para las muestras de suero

El conjunto de validación estaba formado por 7 pacientes en fase activa y 9 en fase de remisión para las muestras de orina, y por 7 pacientes en estadio de EII activa y 8 en remisión para las muestras de suero. La Tabla 7 muestra los resultados obtenidos, en ambos casos los mejores resultados se obtienen nuevamente normalizando los datos

respecto a la intensidad de RIP, y se clasifican de manera correcta el 100% de las muestras. Sin embargo, los valores de los parámetros de calidad de los modelos son algo menores que los obtenidos anteriormente, en el caso de la orina se obtiene un $Q^2 = 0,190$, por lo que no puede considerarse un modelo válido. El Q^2 mide la capacidad predictiva del modelo, y en este caso es inferior a 0,4, el valor mínimo recomendado para considerar el modelo válido en metabolómica. En el caso de las muestras de suero el Q^2 obtenido es 0,424, por lo que los VOCs detectados en las muestras de suero podrían ser también útiles para diferenciar entre pacientes con la EII activa o en remisión. La Figura 2.12 muestra los gráficos score de los modelos OPLS-DA óptimos para ambas matrices.

Tabla 2.7. Selección del pretratamiento de los datos HS-GC-IMS y modelo quimiométrico para la clasificación de muestras de suero y orina entre pacientes con EII con la enfermedad activa o en remisión.

Muestras de orina								
Normalización	Modelo de información				CR (%)		Sens (%)	Prec (%)
	PCs	R2X (cum)	R2Y (cum)	Q2 (cum)	Cal	Val	Val	Val
<i>Sin normalizar</i>	1+4+0	0,397	0,866	0,0538	100	100	A (100), R (100)	A (100), R (100)
<i>Usando el RIP</i>	1+6+0	0,667	0,902	0,424	100	100	A (100), R (100)	A (100), R (100)
Muestras de suero								
Normalización	Modelo de información				CR (%)		Sens (%)	Prec (%)
	PCs	R2X (cum)	R2Y (cum)	Q2 (cum)	Cal	Val	Val	Val
<i>Sin normalizar</i>	1+6+0	0,665	0,905	0,320	100	100	A (100), R (100)	A (100), R (100)
<i>Usando el RIP</i>	1+5+0	0,432	0,92	0,190	100	100	A (100), R (100)	A (100), R (100)

Clases: activo (A) y remisión (R) en pacientes con EII. Sens: Sensibilidad; Prec: Precisión; Val: Validación; Cal: Calibración.

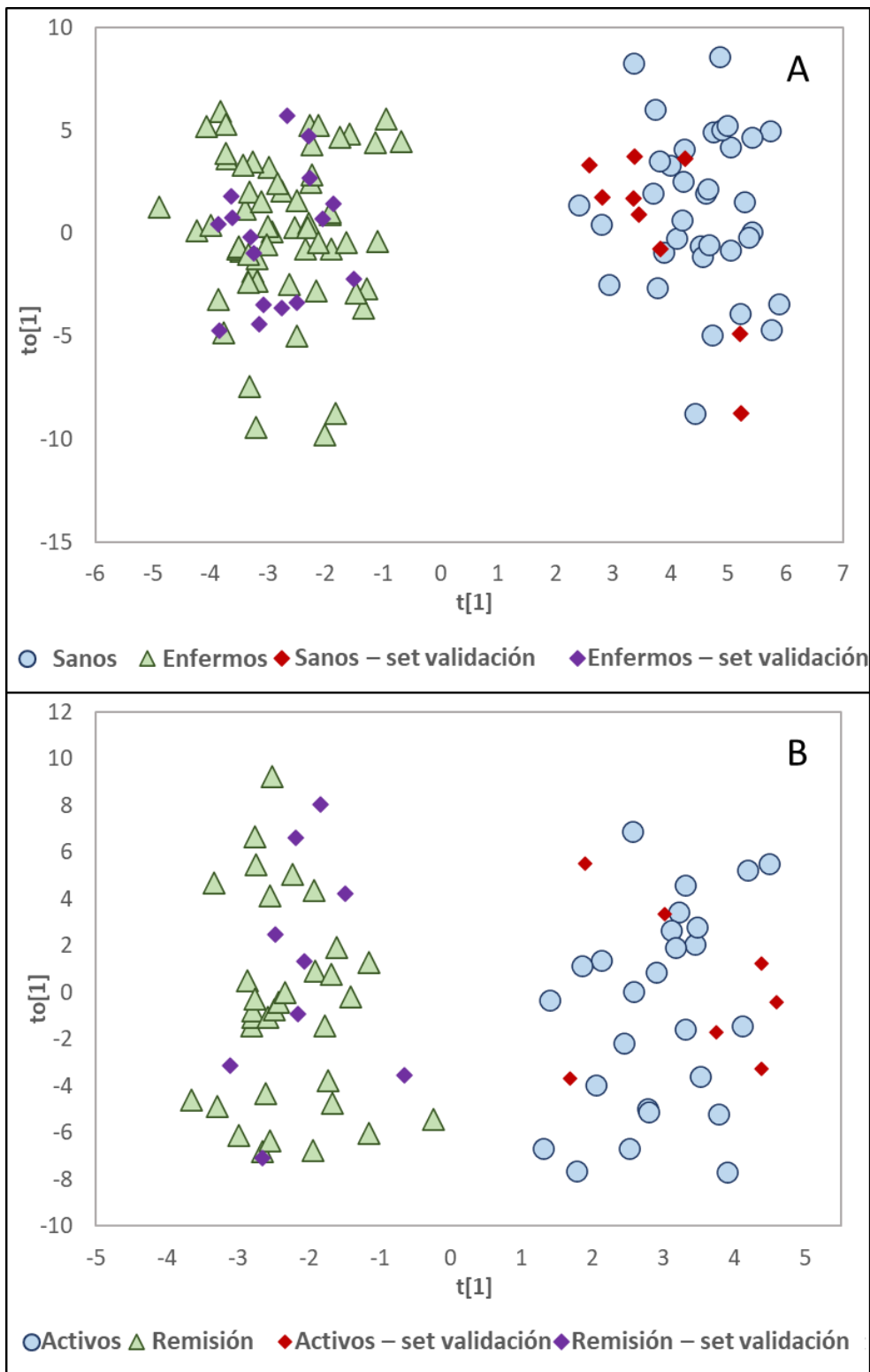


Figura 2.11. (A) Gráfico de *score* del modelo binario OPLS-DA utilizando datos normalizados con respecto a la intensidad RIP y el escalado UV para discriminar entre orina de enfermos y sanos. (B) Gráfico de *score* del modelo OPLS-DA binario utilizando datos normalizados con respecto a la intensidad RIP y el escalado UV para discriminar entre la orina de pacientes con EII en fase activa o en remisión.

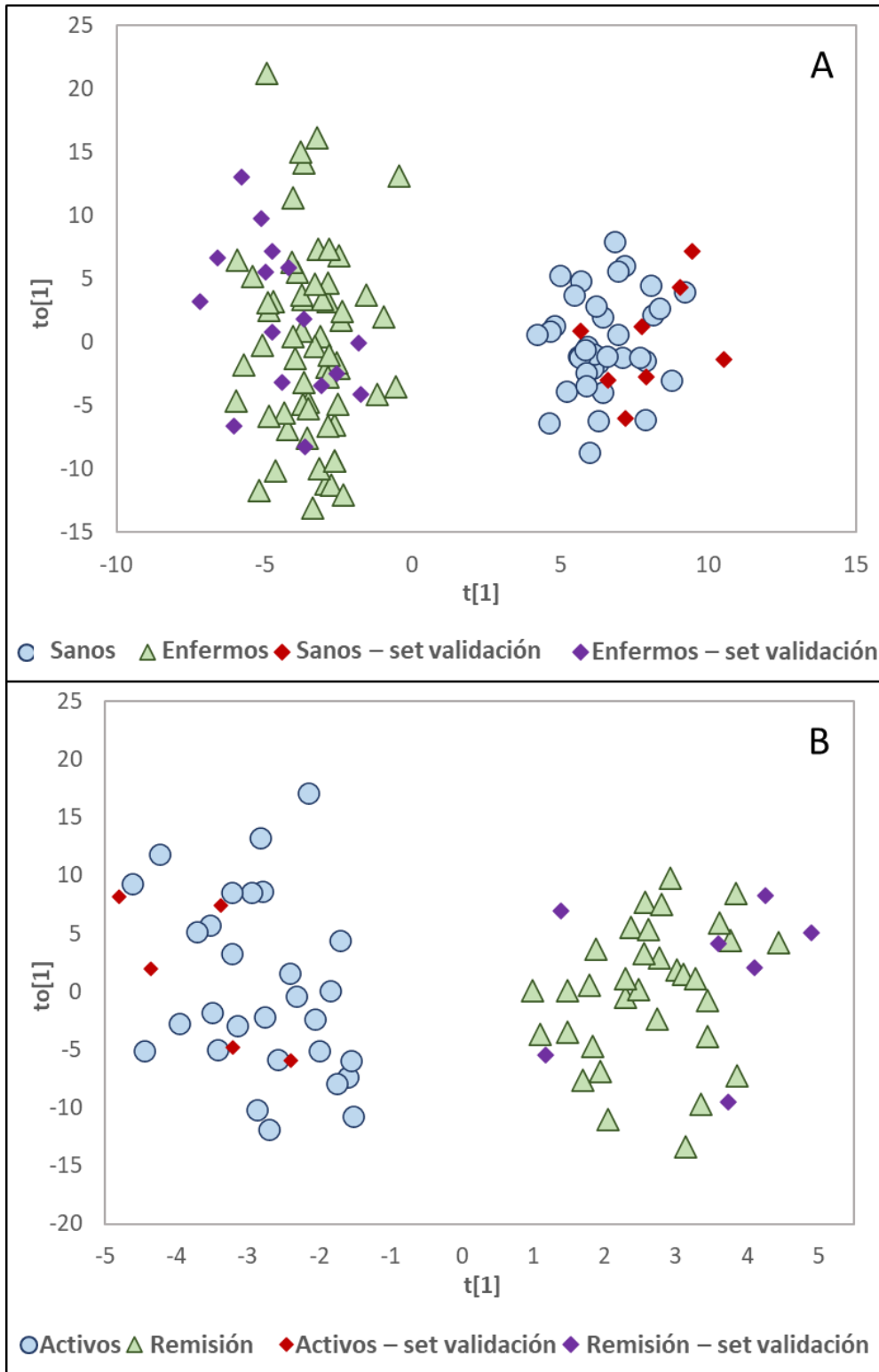


Figura 2.12. (A) Gráfico de *score* del modelo OPLS-DA binario utilizando escalado UV para discriminar entre el suero de voluntarios con EII enfermos y sanos. (B) Gráfico de *score* del modelo OPLS-DA binario utilizando datos normalizados con respecto a la intensidad RIP y el escalado UV para discriminar entre el suero de pacientes con EII en fase activa o en remisión.

2.4. CONCLUSIONES

En este Capítulo se ha evaluado el potencial del HS-GC-IMS para monitorizar los VOCs en muestras de orina y suero y diferenciar entre individuos sanos y pacientes con EII, así como en pacientes diagnosticados con EII y diferentes estados de la enfermedad (EII activa o en remisión). Se ha llevado a cabo la identificación y cuantificación de los VOCs característicos en ambas matrices (suero y orina). Los contenidos de los VOCs se utilizaron para comparar enfermos de EII e individuos sanos sin EII, así como las dos etapas de la enfermedad mediante pruebas ANOVA y LSD, concluyendo que, en las muestras de orina, el compuesto 1-propanol fue capaz de diferenciar a los pacientes activos del resto, y la acetona y el acetato de etilo distinguieron a los pacientes en remisión de las otras clases. En las muestras de suero, el hexanal y el benzaldehído diferenciaron a los individuos sanos de los enfermos. Además, la 2-hexanona identificada en el suero es el único marcador que permitió diferenciar entre los tres estadios de la enfermedad.

Los mejores modelos quimiométricos OPLS-DA se obtuvieron normalizando las señales respecto a la intensidad de RIP. Todos los modelos binarios alcanzaron una sensibilidad y precisión del 100%, lo que demuestra la solidez de los modelos OPLS-DA para el diagnóstico de la EII utilizando muestras de orina y suero. Sin embargo, sólo las muestras de suero son adecuadas para discriminar entre pacientes con EII en fase activa o en remisión.

2.5. BIBLIOGRAFÍA

1. Koliiani-Pace, J. L., & Siegel, C. A. (2019). Prognosticating the course of inflammatory bowel disease. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics*, 29, 395-404.
2. Rudnicka, J., Mochalski, P., Agapiou, A., Statheropoulos, M., Amann, A., & Buszewski, B. (2010). Application of ion mobility spectrometry for the detection of human urine. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398, 2031-2038.
3. Vautz, W., Franzke, J., Zampolli, S., Elmi, I., & Liedtke, S. (2018). On the potential of ion mobility spectrometry coupled to GC pre-separation—A tutorial. *Analytica chimica acta*, 1024, 52-64.
4. el Manouni el Hassani, S., Bosch, S., Lemmen, J. P., Brizzio Brentar, M., Ayada, I., Wicaksono, A. N., & de Meij, T. G. (2019). Simultaneous assessment of urinary and fecal volatile organic compound analysis in de novo pediatric IBD. *Sensors*, 19, 4496.
5. Tiele, A., Wicaksono, A., Kansara, J., Arasaradnam, R. P., & Covington, J. A. (2019). Breath analysis using enose and ion mobility technology to diagnose inflammatory bowel disease—A pilot study. *Biosensors*, 9, 55.
6. Bosch, S., Wintjens, D. S., Wicaksono, A., Pierik, M., Covington, J. A., de Meij, T. G., & de Boer, N. K. (2022). Prediction of Inflammatory Bowel Disease Course Based on Fecal Scent. *Sensors*, 22, 2316.
7. Chetwynd, A. J., Dunn, W. B., & Rodriguez-Blanco, G. (2017). Collection and preparation of clinical samples for metabolomics. *Metabolomics: from fundamentals to clinical applications*, 19-44.
8. Farias, J. S., Zanin, H., Caldas, A. S., Dos Santos, C. C., Damos, F. S., & de Cássia Silva Luz, R. (2017). Functionalized multiwalled carbon nanotube electrochemical sensor for determination of anticancer drug flutamide. *Journal of Electronic Materials*, 46, 5619-5628.
9. Agouridis, A. P., Elisaf, M., & Milionis, H. J. (2011) An overview of lipid abnormalities in patients with inflammatory bowel disease. *Annals of Gastroenterology*, 24, 181–187.
10. Ayling, R. M., & Kok, K. (2018). Fecal calprotectin. *Advances in clinical chemistry*, 87, 161-190.
11. Sutherland, A., D., Gearry, R., B., & Frizelle, F., A. (2008). Review of fecal biomarkers in inflammatory bowel disease. *Diseases of the colon & rectum*, 51, 1283-1291.
12. Benítez, J., M., & García-Sánchez, V. (2015). Faecal calprotectin: management in inflammatory bowel disease. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 6, 203-209.

13. Sherwood, R. A. (2012). Faecal markers of gastrointestinal inflammation. *Journal of clinical pathology*, 65, 981-985.
14. Bajoub, A., Pacchiarotta, T., Hurtado-Fernández, E., Olmo-García, L., García-Villalba, R., Fernández-Gutiérrez, A., & Carrasco-Pancorbo, A. (2016). Comparing two metabolic profiling approaches (liquid chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometry) for extra-virgin olive oil phenolic compounds analysis: A botanical classification perspective. *Journal of Chromatography A*, 1428, 267-279.
15. Godzien, J., Ciborowski, M., Angulo, S., & Barbas, C. (2013). From numbers to a biological sense: How the strategy chosen for metabolomics data treatment may affect final results. A practical example based on urine fingerprints obtained by LC-MS. *Electrophoresis*, 34, 2812-2826.
16. Shahfiza, N., Osman, H., Hock, T., & Abdel-Hamid, A. H. (2017). Metabolomics approach for multibiomarkers determination to investigate dengue virus infection in human patients. *Acta Biochimica Polonica*, 6, 215-219.
17. Salami, M., Talebpour, Z., & Alizadeh, R. (2022). Fabrication of a new SPME fiber based on Polyacrylic acid/MIL-88 (Fe)-NH₂ composite as a self-healing coating for the analysis of breast cancer biomarkers in the urine sample. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 219, 114902.
18. Kohn, E., Barchel, D., Golik, A., Lougassi, M., Wainstock, T., Berkovitch, M., & Schwartzburd, F. (2022). Analysis of 10 urinary BTEX metabolites using LC-MS/MS. *Biomedical Chromatography*, 36, e5302.
19. Bannaga, A. S., Tyagi, H., Daulton, E., Covington, J. A., & Arasaradnam, R. P. (2021). Exploratory study using urinary volatile organic compounds for the detection of hepatocellular carcinoma. *Molecules*, 26, 2447.
20. Ligor, T., Zawadzka, J., Strączyński, G., González Paredes, R. M., Wenda-Piesik, A., Ratiu, I. A., & Muszytowski, M. (2021). Searching for potential markers of glomerulopathy in urine by HS-SPME-GC× GC TOFMS. *Molecules*, 26, 1817
21. O'Lenick, C. R., Pleil, J. D., Stiegel, M. A., Sobus, J. R. & Wallace, M. A. G. (2019). Detection and analysis of endogenous polar volatile organic compounds (PVOCs) in urine for human exposome research. *Biomarkers*, 24, 240-248.
22. Silva, C. L., Perestrelo, R., Capelinha, F., Tomás, H., & Câmara, J. S. (2021). An integrative approach based on GC-qMS and NMR metabolomics data as a comprehensive strategy to search potential breast cancer biomarkers. *Metabolomics*, 17, 1-11.
23. Mousazadeh, M., Jahangiri-Manesh, A., Nikkhah, M., Abbasian, S., Moshaii, A., Masroor, M. J., & Norouzi, P. (2022). Detection of hexanal gas as a volatile organic

compound cancer biomarker using a nanocomposite of gold nanoparticles and selective polymers. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 905, 1159-1162.

24. Arroyo-Manzanares, N., García-Nicolás, M., Castell, A., Campillo, N., Viñas, P., López-García, I., & Hernández-Córdoba, M. (2019). Untargeted headspace gas chromatography–ion mobility spectrometry analysis for detection of adulterated honey. *Talanta*, 205, 120-123.

CAPÍTULO 3

EVALUACIÓN DEL METABOLISMO DEL HIERRO, EL PERFIL DE LÍPIDOS Y LA DIGESTIÓN Y ESTADO NUTRICIONAL EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL



RESUMEN

La malnutrición y la malabsorción son síndromes que afectan directamente a los pacientes con EII provocando alteraciones en el metabolismo del hierro, en el perfil lipídico y en su estado nutricional. La valoración de estos tres parámetros se lleva a cabo de manera rápida y sencilla a través de un análisis de sangre y de heces que permiten evaluar la digestión. En este estudio se han evaluado estos tres parámetros en una población de 173 pacientes con EII, con el objetivo de comparar su comportamiento en pacientes con EC o CU con la enfermedad activa o en remisión. El metabolismo del hierro se evaluó a partir de los valores de hierro sérico, ferritina, índice de saturación de la ferritina, hemoglobina y volumen corpuscular medio. Además, se estudió su relación con la PCR al ser un factor de confusión. En el estudio del perfil lipídico se evaluaron los parámetros de colesterol, triglicéridos, LDL y HDL, así como el riesgo aterogénico asociado a la enfermedad mediante el índice de Castelli. Finalmente, se hizo un estudio del estado nutricional a través de la observación microscópica de las heces y el cribado CONUT correlacionándolo con los niveles de CF. Tras evaluar los resultados, no se encontraron diferencias significativas en el metabolismo del hierro y lípidos entre los pacientes. Además, se detectó la presencia de proteínas y grasas en las heces de más del 40% de los pacientes y un 18% mostraron desnutrición moderada. Los pacientes con desnutrición también mostraron valores más elevados de CF. La monitorización y seguimiento de estos parámetros podrían ayudar a los facultativos a redirigir el curso de la enfermedad y prevenir complicaciones concomitantes como la anemia, y la prevención de desnutrición tanto a nivel hospitalario como ambulatorio.



3.1. INTRODUCCIÓN

La malnutrición es una característica común de la EII. Siguiendo la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS) “*la malnutrición abarca la desnutrición (emaciación, retraso del crecimiento e insuficiencia ponderal), los desequilibrios de vitaminas o minerales, el sobrepeso, la obesidad, y las enfermedades no transmisibles relacionadas con la alimentación*” [1]. Se estima que entre el 50 y 70% de los pacientes con EC presentan malnutrición, mientras que ésta se presenta en menor medida en pacientes que padecen CU, entre un 18 y 62% de los pacientes con EII presentan malnutrición [2]. Esto se debe a que la afectación más común en los pacientes con EC está presente en el íleon terminal donde hay una mayor absorción de nutrientes que en el colon. Además, en la EC la malnutrición aparece de una forma más insidiosa ya que los brotes son más duraderos y de menor intensidad, mientras que en la CU los brotes son más agudos, por lo que aparece una malnutrición característicamente proteica visceral [3].

La desnutrición y/o malnutrición es un agravante de la EII ya que reduce los periodos de remisión de la enfermedad, enlentece la cicatrización, disminuye la densidad ósea y favorece la aparición de eventos trombóticos entre otras complicaciones [4].

En los pacientes con EII tanto las deficiencias de macronutrientes (que conducen a una desnutrición proteico-energética global), que son menos pero clínicamente más relevantes, como los déficits de micronutrientes específicos, (nutrientes necesarios para la vida en pequeñas cantidades) son evidentes y ampliamente contrastadas por diferentes estudios [5].

Las deficiencias de minerales, oligoelementos o vitaminas se producen por varias razones, como la pérdida de sangre (deficiencia de hierro), diarrea crónica (hipomagnesemia) o la pérdida de lugares de absorción (vitamina B12) [6].

Son diversos los factores que contribuyen al desequilibrio nutricional de los pacientes con EII, como la propia actividad inflamatoria de la enfermedad, el gasto energético relacionado con la incapacidad de absorción de los nutrientes, el aumento del gasto energético no compensando en la dieta, la malabsorción, debido a la modificación de las vellosidades y criptas intestinales, que provocan un déficit en la absorción de nutrientes, y una alteración en la digestión de grasas, proteínas y almidón [3,7], la posibles resecciones intestinal, la diarrea, la medicación, la edad, y otros

factores como la disminución del apetito, el miedo a sufrir diarreas, dolor abdominal o náuseas, los cambios de ánimo o las restricciones dietéticas.

La determinación de ciertos parámetros bioquímicos tiene actualmente un alto valor predictivo en la valoración del estado nutricional del paciente con EII. Las concentraciones en suero de vitaminas, minerales, proteínas y lípidos son indicadores eficientes para detectar posibles estados de desnutrición en los pacientes. A través de los valores de la albúmina, la prealbúmina, creatinina y la proteína ligada al retinol, se puede valorar el estado proteico del paciente. También es importante evaluar el nivel del CT, HDL, LDL o la concentración de minerales, como calcio, fósforo, magnesio y hierro y oligoelementos como Zinc, yodo o el cobre entre otros, ya aportan información sobre el posible déficit nutricional [8,9]. Estas determinaciones ayudan a valorar la ingesta del paciente, la absorción, el balance nitrogenado o la pérdida de ciertos nutrientes. No se puede olvidar que estos parámetros deben analizarse de forma individualizada a las circunstancias de cada paciente, enfermedad, medicación, antecedentes.

Un estudio de cohorte español informó de la presencia de deficiencia de hierro en aproximadamente un tercio de los pacientes ambulatorios con EII [9]. El estudio del perfil férrico incluye diferentes marcadores que ayudan a identificar la cantidad de hierro del paciente y sobre todo su utilización en el organismo. El hierro es básico para la formación de la HGB y esta es la encargada de transportar el oxígeno hasta los eritrocitos. Cuando hay niveles insuficientes de hierro se produce menos HGB y eritrocitos, se traduce en una disminución del hematocrito y del tamaño de los eritrocitos.

El diagnóstico de deficiencia de hierro se basa en los niveles de ferritina sérica, aunque también se controlan el hierro sérico, el índice de saturación de la transferrina (IST), proteína encargada del transporte del hierro absorbido y la HGB [9]. Los niveles de ferritina pueden aumentar en caso de inflamación causando un factor de confusión en los resultados obtenidos si no se tiene en cuenta el grado de inflamación [3]. Por esta razón, se debe investigar también los niveles de PCR para reconocer a los pacientes con inflamación y distinguir la deficiencia de hierro absoluta o ferropenia de la deficiencia de hierro. La concentración sérica de hierro se reduce en pacientes con inflamación intestinal, por lo que su determinación de manera aislada no es útil para detectar su deficiencia en pacientes con EII [7-10].

La medición del CT también es otro factor importante para evaluar la malnutrición. Niveles de colesterol bajos se han relacionado con la malabsorción, desnutrición o problemas tanto renales como hepáticos [11, 12].

Por otro lado, el examen microscópico de las heces proporciona información más real acerca de los trastornos de la digestión en los pacientes, este examen se lleva a cabo con el objetivo es encontrar principios inmediatos no digeridos.

La presencia de fibras o proteínas en las heces se denomina creatorrea, es consecuencia de una mala función pancreática o gástrica. Cuando lo que se presenta en las heces es grasa, se denomina esteatorrea, es común en pacientes que sufren de malabsorción, es bastante frecuente en pacientes con EC o los que han sido sometidos a una resección intestinal. Por último, la presencia de hidratos de carbono, almidón, en las heces es denominada amilorrea, no tiene tanto interés como las anteriores, pero es útil para atestiguar un tránsito acelerado a través del colon [13,14].

En este Capítulo se ha estudiado el metabolismo del hierro, a través de los valores de hierro sérico, IST y HGB, así como de PCR y los valores de ferritina y transferrina; el perfil lipídico, a través de los niveles de CT, HDL, LDL y triglicéridos, con el objetivo de evaluar si existen diferencias significativas entre los pacientes con EC, CU en remisión o con la enfermedad activa. Así como estudiar la malabsorción entre los pacientes como posible factor de riesgo de la desnutrición en la EII, a través de la evaluación de la digestión de los hidratos de carbono, grasas y proteínas.

Para la evaluación de la desnutrición, los cribados o *screening* nutricionales son de crucial importancia. Estos cribados son procedimientos estandarizados que aplican herramientas sencillas, validadas, fiables y reproducibles, con una alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico [15]. El método de control Nutricional (CONUT) es un método de cribado que evalúa automáticamente la alerta nutricional mediante dos parámetros bioquímicos (albúmina sérica y colesterol) y un indicador inmunológico (recuento total de linfocitos). La albúmina sérica (g/dL) se utiliza como indicador de las reservas y/o la disponibilidad de proteínas. El CT (mg/dL) se utiliza como indicador de depleción calórica y, por último, el recuento total de linfocitos (células/mL) se utiliza como indicador de la pérdida de defensas inmunitarias, presumiblemente causada por la desnutrición [16,17]. Por ello, este Capítulo también se aplicará el método CONUT como cribado de detección rápida de desnutrición clínica en pacientes ambulatorios con EII y se comparará con los niveles de CF.

3.2. MATERIAL Y METODOS

3.2.1. Población de estudio

Para este estudio participaron de manera voluntaria 179 pacientes diagnosticados con EII de la consulta de digestivo del Hospital General Universitario Rafael Méndez, de Lorca, desde junio de 2021 hasta febrero de 2022. Se excluyeron del estudio menores de edad, pacientes cuyo diagnóstico de EII no era claro, y pacientes que fueron ingresados a la hora de la recogida de las muestras, resultando por tanto una población adulta ambulatoria de 173 pacientes con EII. La Figura 3.1. muestra el tipo de EII y el estado (activo y remisión) de la población en estudio. Como puede observarse, de los 173 pacientes, 96 padecían CU y 77 padecían EC. Entre los pacientes con EC, 39 de ellos estaban en un periodo activo de la enfermedad, mientras que 38 se encontraban con la enfermedad en remisión. En cuanto a los pacientes de CU, 64 pacientes estaban en remisión mientras que 32 se encontraban con la enfermedad en un estado activo.

La Tabla 3.1 muestra la información poblacional de los pacientes que participaron en este estudio. En concreto participaron 90 mujeres y 83 hombres con EII. La edad de los sujetos oscilaba entre los 18 y 85 años. El 32,4% de los pacientes eran menores de 40 años, un 48% pertenecían al rango de edad de entre 40-60 años y el resto adultos de entre 61-85 años. Se excluyeron de este trabajo los pacientes diagnosticados con EII no clasificada, debido al reducido número de muestras.

Para llevar a cabo este trabajo se recogieron muestras de heces y suero de pacientes con enfermedad EII diagnosticada y en diferentes estados (remisión y activa). Las muestras se obtuvieron del Hospital General Universitario Rafael Méndez de Lorca, se obtuvo el consentimiento informado de todas las personas y las muestras se usaron de acuerdo con las pautas del hospital. Además, los comités éticos de la Universidad de Murcia (Informe favorable ID:2908/2020) y del Hospital General Universitario Rafael Méndez (Lorca, España) aprobaron este estudio.

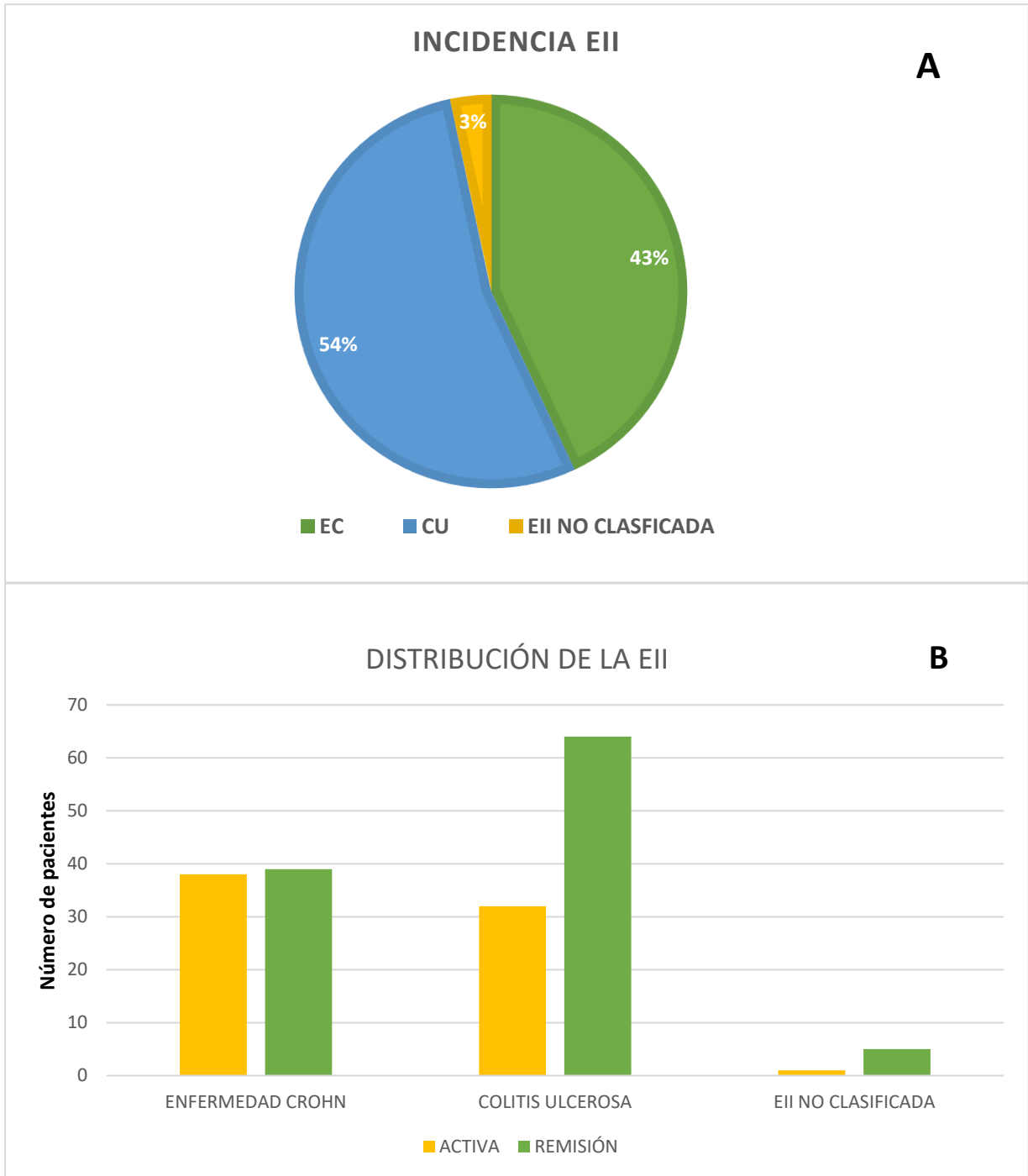


Figura 3.1. (A) Incidencia de la EC, CU y EII no clasificada y (B) distribución del estado de la enfermedad en la población de estudio.

Tabla 3.1. Datos demográficos de los pacientes con EC y CU activos y en remisión.

Parámetro	EC activa (n = 38)	EC remisión (n = 39)	CU activa (n = 32)	CU remisión (n = 64)
Edad media en años (Mediana; IQR)	45,2 (44,0; 34,0–56,0)	43,6 (45,0; 36,0–53,0)	51,8 (41,0; 37,0–65,0)	49,0 (51,0; 36,0–63,3)
Ratio de genero H:M	22:16	19:20	17:15	25:39
Dislipemia	2	6	6 1 desconocido	11
Diabetes	2	4	3 1 desconocido	6
Media CF en µg/g (Mediana; IQR)	962,0 (363,0; 142,0–843,5) 1 desconocido	100,7 (56,0; 12,0–115,0)	7483,3 (1482,0; 236,0–4015,0)	300,6 (79,0; 25,5–203,0) 1 desconocido
Media PCR en mg/L (Mediana; IQR)	1,1 (0,5; 0,1–0,8) 1 desconocido	0,3 (0,2; 0,1–0,5)	1,4 (0,6; 0,2–1,1)	1,2 (0,4; 0,2–1,0) 1 desconocido
Media HGB en g/dL (Mediana; IQR)	13,9 (13,8; 13,2–15,1) 1 desconocido	14,5 (14,5; 13,6–16,0)	13,8 (13,9; 13,2–14,6)	14,3 (14,3; 13,3–15,1) 1 desconocido
Media hierro en µg/dL (Mediana; IQR)	76,8 (70,0; 42,0–91,0) 1 desconocido	89,6 (86,0; 58,0–105,0)	74,1 (66,5; 43,0–108,5)	89,9 (83,0; 62,0–106,0) 1 desconocido
Media colesterol en mg/dL (Mediana; IQR)	181,0 (182,5,0; 150,0–203,0) 1 desconocido	200,5 (205,0; 177,0–200,0)	203,3 (20,0; 176,0–229,0)	193,7 (199,0; 173,0–212,0) 1 desconocido

3.2.2. Recopilación de datos y variables en estudio

La información de cada paciente requerida para este estudio se obtuvo en la consulta de digestivo tras firmar el consentimiento informado para la inclusión de sus datos en el estudio.

Los pacientes acudían a la consulta de digestivo cada 3-6 meses para la revisión de la enfermedad, se le extraía una analítica de sangre completa, un análisis de orina y una muestra de heces, además de realizar una anamnesis completa de los signos y síntomas clínicos de la enfermedad junto con sus antecedentes personales y el tratamiento. Estos datos eran incluidos en el informe clínico de la consulta del paciente.

El acceso a toda esta información de la historia clínica se realizó cumpliendo la normativa de confidencialidad y la ley protección de datos del paciente, acorde a la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales. El servicio murciano de salud cuenta con un sistema informático de volcado de datos clínicos llamado Selene. El uso de esta estación clínica se hacía desde el propio Hospital.

Las variables demográficas y clínico-patológicas utilizadas en este Capítulo se obtuvieron de la historia clínica informatizada de cada paciente. Todas las variables (demográficas, clínicas y de laboratorio) fueron recogidas de forma retrospectiva en una base de datos confeccionada al inicio del estudio.

Las variables de estudio en este Capítulo fueron las siguientes:

- Datos demográficos
 - Edad: expresada en años, al momento de la inclusión del paciente en el estudio.
 - Sexo: masculino o femenino

- Variables clínicas
 - Tipo de enfermedad: EC, CU o EII no clasificada.
 - Fase de la enfermedad: remisión o activa.
 - Antecedentes personales: hipertensión, diabetes, dislipemia, tabaquismo, consumo de alcohol, antecedentes quirúrgicos y familiares.
 - Signos y síntomas de la enfermedad: dolor abdominal, fiebre, diarrea, sangrado o mucosidad rectal, infecciones, presencia de patología reumatoide y pérdida de peso en los últimos 3 meses.
 - Tratamiento.

- Variables de laboratorio
 - Parámetros bioquímicos
 - Bilirrubina, expresada en mg/dL [Valores de referencia (V.R.) 0,05-1,20 mg/dL].
 - IST, expresada en % [V.R. >20%].
 - Albumina, expresada en g/dL [V.R. 3,5-5,2 g/dL].
 - CT, expresado en mg/dL [V.R. <200]
 - Ferritina, expresada en ng/mL [V.R. 30-300 ng/mL].
 - Hierro sérico, expresado en ng/mL [V.R. 50-300 ng/mL].
 - HDL [V.R. >45 mg/dL].
 - LDL [V.R. 0-130 mg/dL].
 - PCR, expresada en mg/dL [V.R. 0-0,60 mg/dL]
 - Triglicéridos, expresados en mg/dL [V.R. 0 <150 mg/dL]

 - Parámetros hematológicos
 - Leucocitos: recuento de leucocitos totales en sangre [V.R. 4,5-11 x10³ /μL].

- Plaquetas: recuento de plaquetas en sangre [V.R. $150-350 \times 10^3 /\mu\text{L}$].
 - Hemoglobina, expresada en g/L [V.R. $< 11\text{g/L}$ en mujeres y < 13 en hombres].
 - VCM, expresado en fL [V.R. $> 80 \text{fL}$].
- Marcadores fecales
- CF, expresada en ng/mL [V.R. $< 50 \text{ng/mL}$]
 - Presencia de grasa en heces.
 - Presencia de fibra en heces.
 - Presencia de hidratos de carbono en heces.

3.2.3. Recogida y conservación de muestras

La recogida de muestras se realizaba tras el consentimiento previo firmado en la consulta de digestivo. Los pacientes acudían a su centro de salud de referencia para la obtención de muestras y posteriormente se enviaban al Hospital General Universitario Rafael Méndez, donde se realizaba el análisis.

Todas las muestras fueron recogidas por personal de enfermería cualificado para la punción venosa. Tras dicha extracción la sangre se recolectaba en tubos de vacío BD Vacutainer con diferentes aditivos (Figura 3.2), dependiendo del parámetro a analizar, tal y como se reflejan en la Tabla 3.2.

Las muestras de heces eran recogidas por los propios pacientes en duquesitas y se entregaban al personal de enfermería.



Figura 3.2. Tubos de recolección de muestras de orina y sangre.

Tabla 3.2. Tipos de tubos utilizados y parámetros analizados en cada extracción.

Tipo de tubo/aditivo	Número de tubos extraídos	Parámetros analizados
Suero/tubo seco	1	Parámetros bioquímicos (albúmina, LDL, HDL, triglicéridos, CT, bilirrubina, PCR, hierro y ferritina)
Hemograma/EDTA 3K	1	Parámetros hematológicos: HGB, IST, VCM, linfocitos.
Duquesita (Heces)	1	CF, presencia de fibras musculares, grasa y almidón.

Las muestras de sangre una vez recogidas son enviadas al laboratorio para su análisis inmediato mientras que las muestras de heces una vez extraídas deben refrigerarse a -20°C en la misma duquesita donde fueron recogidas y pueden permanecer hasta 72 horas para su posterior análisis en el cual se determinaron los niveles de CF y la presencia de grasas, proteínas e hidratos de carbono al microscopio.

3.2.4. Procesamiento analítico de las muestras sanguíneas

El procesamiento analítico de las muestras se realizó en los laboratorios del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital General Universitario Rafael Méndez.

- **Hemograma:** el tubo de hemograma para la obtención de los parámetros hematológicos se analizó en el equipo Sysmex XE5000 (Roche Diagnostics®) mediante citometría de flujo fluorescente.
- **Bioquímica:** las determinaciones de los parámetros bioquímicos se analizaron por el equipo DxC700 Au y Dxl 800 Access ImmunoassaySystem(BeckmanCoulter®), mediante potenciometría, métodos colorimétricos, enzimáticos e inmunturbidimétricos.

3.2.5. Procesamiento analítico de las muestras de heces

Las muestras de heces se analizaron para determinar la CF, marcador que determina el estadio de activo o remisión de los pacientes junto con otros datos clínicos. La determinación se llevó a cabo por el método EliACalprotectin 2 en el instrumento ImmunoCAP250 (Thermo Fisher).

Para el estudio de la digestión y la malabsorción de los pacientes se analizó la cantidad de almidón, grasa y fibra presente en las heces de los pacientes por microscopía óptica.

- **Detección De Grasas:** Se transferían alrededor de 5 g aproximadamente de heces a un a un recipiente de 100 mL. La técnica para la detección y el diagnóstico final es según el descrito por Drummey [18,19]. La muestra se tiñe directamente con Sudan III y se examina al microscopio, dejando visible las gotas de grasa que aparecen coloreadas de color rojizo, como se puede apreciar en la Figura 3.3. La presencia de grasa en las heces se denomina esteatorrea. El resultado obtenido se clasifica según la información recogida en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Clasificación de la digestión según grasa fecal [19].

Presencia de gotas/micra	Valor cualitativo	Calidad de digestión
< 100 gotas de grasa entre 1-4 μm de diámetro a 4000 aumentos	Poca o ninguna presencia de gotas de grasa	Buena digestión
>100 gotas de grasa entre 1-8 μm de diámetro a 4000 aumentos	Moderada presencia de gotas de grasa	Digestión intermedia
> 100 gotas de grasa entre 6-75 μm de diámetro a 4000 aumentos	Abundante presencia de gotas de grasa	Digestión mala

- **Detección de fibra:** la presencia de fibras en las heces es un indicativo de mala digestión proteica, según su morfología y agrupación se determina de forma cualitativa la digestión del paciente. Al microscopio aparecen estructuras estriadas y con forma rectangular siendo signo de mala digestión, en cambio si aparecen ovaladas y sin estriación son signo de una correcta digestión.
- **Detección de Almidón:** la presencia de almidón en heces (Figura 3.3) se denomina amilorreia, es un buen indicador del tránsito acelerado a través del colon y se determina mediante la tinción de Lugol. El aspecto del almidón en heces determinará la mejor o peor digestión por parte del individuo, encontrando granos de diferente tamaño teñidos de color violeta y células amiláceas.

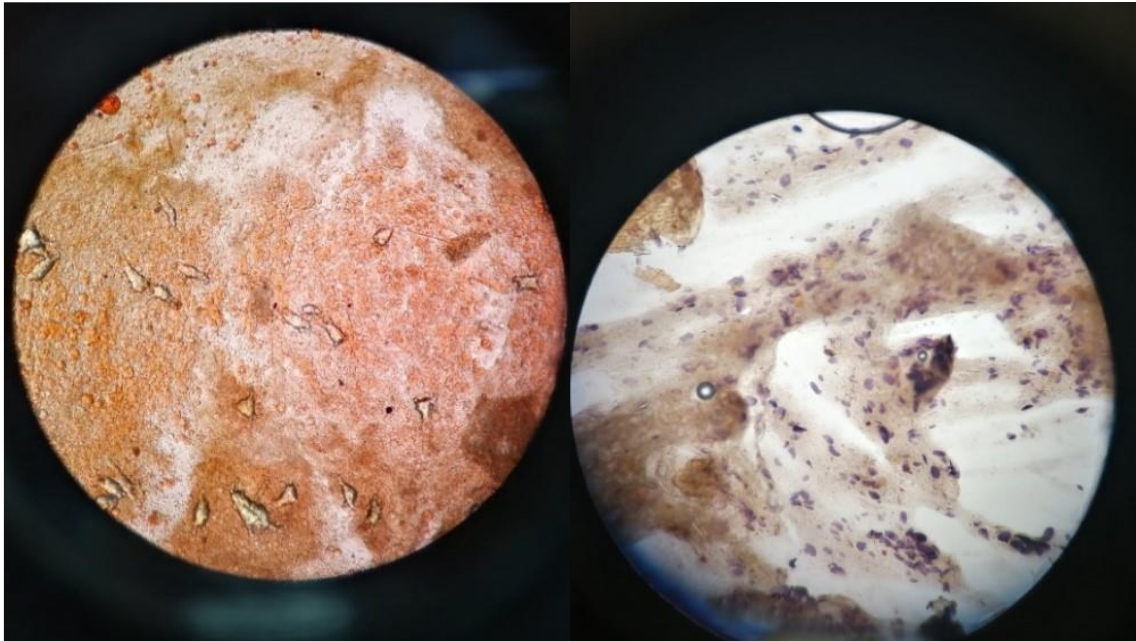


Figura 3.3. Muestra de heces al microscopio, a la derecha una mala digestión de la grasa con presencia de gotas y a la izquierda detección de almidón y fibra en heces.

3.2.6. Tratamiento de datos y software

Para el análisis estadístico de los datos, inicialmente se realizó un test de normalidad Kolmogorov-Smirnov para comprobar si los parámetros estudiados se distribuyen con normalidad. Como todos los parámetros se distribuyeron normalmente, para la comparación de cuatro grupos de muestras (CU Activos, CU Remisión, EC Activos y EC Remisión) se llevó a cabo una prueba paramétrica de análisis de varianza (ANOVA). Se consideraron diferencias significativas entre grupos cuando el P-valor fue menor de 0,05.

El análisis estadístico se realizó usando los softwares Origin 2022 y Microsoft Excell.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Estudio del metabolismo del hierro en la EII

El estudio del perfil férrico incluye diferentes marcadores que ayudan a identificar la cantidad de hierro del paciente y sobre todo su utilización en el organismo. Estos marcadores son hierro sérico, ferritina, IST, HGB, VCM, PCR y la presencia de sangrado. Los resultados obtenidos para la población en estudio se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Incidencia de pacientes con CU, EC, activos y remisión, según los parámetros del metabolismo del hierro.

	CU Activos n= 32	CU Remisión n= 63	EC Activos n= 37	EC Remisión n=39	Total
Hierro sérico < 50µg/dL en hombres < 60µg/dL en mujeres	11	13	14	3	41
Ferritina <30 ng/dL	12	29	14	17	72
Índice saturación ferritina <20%	18	22	18	12	70
Hemoglobina < 13g/dL en hombres < 11g/dL en mujeres	2	7	6	0	15
VCM < 80 fL	0	1	3	4	8
PCR > 0,6 mg/dL	17	13	12	8	40
Sangrando	13	12	10	2	37

Del total de 179, se descartaron los 6 pacientes con EII no clasificada y a 2 pacientes de los cuales no se disponía de datos analíticos, por lo que quedó una población de 171 pacientes, donde se detectaron 72 pacientes con niveles de ferritina por debajo de 30 ng/mL (rango de referencia 30-300 ng/mL).

Además, se puede apreciar que en los pacientes con CU y EC activa existe una mayor incidencia de niveles de hierro sérico bajos con respecto al resto de pacientes, alcanzado una ratio de 1 de cada de tres pacientes aproximadamente que tienen déficit de hierro. Con respecto a ferritina se observan datos de ratio muy parecidos, pero por el contrario se detecta que el 45% de los pacientes con CU en remisión presentan este déficit de ferritina superando al resto de grupos. Finalmente, con respecto al IST los grupos de EC y CU en remisión presentan una incidencia similar cerca al 30% de los pacientes mientras que los grupos activos esta incidencia aumenta al 56,2% y al 47,4% de CU y EC respectivamente. La hemoglobina baja se detectó tan solo en 15 pacientes del total del estudio, destacando que 7 de ellos pertenecen al grupo de CU en remisión, grupo que contaba con más tamaño muestral y 6 al grupo de EC que suponen el 15% de los pacientes de este grupo. Respecto a la incidencia de pacientes con niveles de

VCM por debajo del 80% tan solo se detectaron un total de 8 pacientes, que suponen el 4,6% de los pacientes del estudio.

Como se comentó anteriormente, los niveles de ferritina pueden aumentar en caso de inflamación y por tanto es necesario investigar también los niveles de PCR. Estimar un valor patológico para la PCR en pacientes con EII resulta complicado, pero diversos estudios hablan de indicios de actividad moderada a partir de 0,6 mg/dL [20] por lo que se estimó este valor como punto de corte. En este estudio un total de 52 pacientes con EII, mostraron un valor de PCR por encima de 0,6 mg/dL. En cuanto al sangrado, un total de 37 (21,63%) pacientes afirmaron tener episodios de sangrado a través de las heces en el momento de la toma de las muestras por lo que también debe considerarse como un factor de confusión.

Un estudio de cohorte español informó de deficiencia de hierro en aproximadamente un tercio de los pacientes ambulatorios con EII, con un mayor riesgo en las mujeres y en los pacientes con actividad grave de la enfermedad [21]. Estos datos pueden explicarse probablemente por las pérdidas menstruales en las mujeres premenopáusicas y por el mayor riesgo de diarrea sanguinolenta en pacientes con enfermedad activa, lo que sugiere una mayor atención en este entorno específico [22]. Debido a que no se registró que mujeres se encontraban con sangrados menstruales a la hora del análisis, se decidió no comparar los datos entre sexos para no obtener resultados sesgados.

Para comparar los resultados y observar diferencias significativas entre grupos para los parámetros de hierro sérico, ferritina, IST, PCR, HGB y VCM se llevó a cabo un test ANOVA, tras comprobar que todos los datos se distribuían normalmente. Los niveles de PCR se tuvieron en cuenta para el estudio por ser factores de confusión en el metabolismo del hierro como se mencionó anteriormente.

3.3.1.1. Estudio del hierro sérico

Los valores normales para el hierro sérico en sangre son por encima de 50 µg/dL en hombres y por encima de 60 µg/dL en mujeres. La Tabla 3.5 muestra la media del nivel de hierro sérico en los 4 grupos estudiados (CU y EC activos o en remisión) junto con su desviación estándar.

Tras realizar el test ANOVA no encontraron diferencias significativas entre los grupos con respecto a los niveles de hierro en sangre (P-valor = 0,21). Sin embargo, la media del hierro sérico fue inferior en la población activa que, en la población en

remisión, esto podría ser debido a que la inflamación en el intestino no permite absorber con normalidad el hierro nivel intestinal. Las pérdidas hemáticas y la malabsorción de hierro serían la causa más frecuente de unos niveles bajos de hierro en sangre con la EII activa.

Tabla 3.5. Análisis estadístico del hierro sérico ($\mu\text{g/dL}$) en la población de EII.

	Número sujetos	Media	Desviación estándar	F valor	P-valor
EC REMISIÓN	39	89,69	37,57	1,51	0,21
EC ACTIVA	37	76,86	55,93		
CU REMISIÓN	63	89,93	36,92		
CU ACTIVA	32	74,18	43,72		

La Figura 3.4. muestra el diagrama de cajas y bigotes que permite evaluar la dispersión y simetría de los niveles de hierro sérico entre los pacientes con EII. Tanto en esta figura como en la tabla anterior, se puede observar, que los pacientes con EII activa, tienen una desviación estándar mayor y por tanto mayor dispersión de los datos, mientras que los sujetos en remisión tienen unos valores más cercanos a la media. El nivel más alto de hierro fue detectado en un paciente con EC activa y superó los 300 $\mu\text{g/dL}$. Además, los pacientes con la EII en remisión también tienen una media hierro sérico superior que los activos en torno a un 89 $\mu\text{g/dL}$ frente a un 74-76 $\mu\text{g/dL}$, valores que se acercan más al punto de corte por el cual se establece el déficit del hierro.

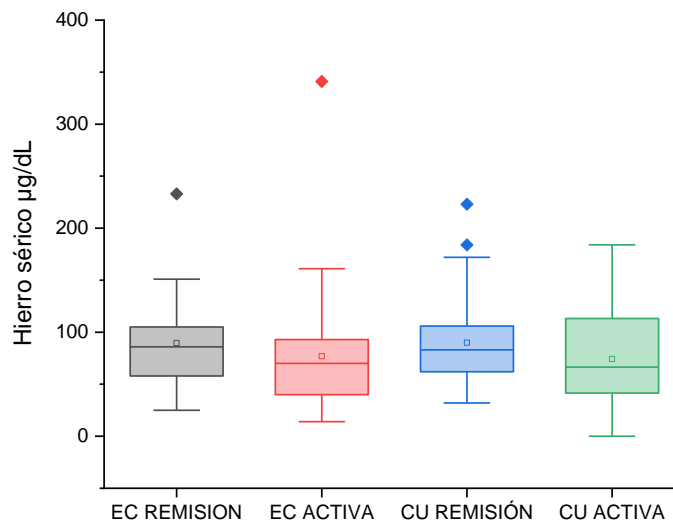


Figura 3.4. Dispersión y simetría del nivel de hierro sérico entre los pacientes con EII.

3.3.1.2. Estudio de la ferritina

Normalmente, en personas saludables la ferritina en sangre está por encima de 30 $\mu\text{g/dL}$. Este parámetro fue también evaluado en la población en estudio y los resultados se recogen en la Tabla 3.6. Como se puede observar tanto los pacientes con EC como los pacientes con CU con un brote activo tienen una desviación estándar mayor y por tanto una mayor dispersión de los datos como se refleja en la Figura 3.5. Cabe destacar que el nivel más alto de ferritina, al igual que el hierro sérico, se detectó en un paciente con EC activa y superó los 600 $\mu\text{g/dL}$. Tras aplicar el test ANOVA, no se encontraron diferencias significativas entre los cuatro grupos en los niveles de ferritina debido a las elevadas desviaciones estándar encontradas ($P\text{-valor} = 0,41$), sin embargo, de manera cualitativa se puede observar que la media de este parámetro casi se duplica en la población activa frente a los sujetos en remisión.

Resulta llamativo que la ferritina sea más alta en los pacientes con la enfermedad activa donde se observó anteriormente que los niveles de hierro eran más bajos. Esto se debe a que la ferritina es un reactante de fase aguda y en presencia de inflamación se eleva falsamente, pudiendo enmascarar una ferropenia. Por ello, este parámetro debe valorarse junto con la PCR, que es un reactante de la inflamación y en pacientes con EII activa, donde se detectan niveles de PCR altos, el punto de corte de la ferritina aumenta hasta 100 $\mu\text{g/dL}$ [9,10].

Tabla 3.6. Análisis estadístico de la ferritina ($\mu\text{g/dL}$) en la población de EII.

	Número sujetos	Media	Desviación estándar	F valor	P-valor
EC REMISIÓN	39	50,97	50,39	0,95	0,41
EC ACTIVA	37	92,16	146,57		
CU REMISIÓN	63	61,25	71,44		
CU ACTIVA	32	92,75	244,44		

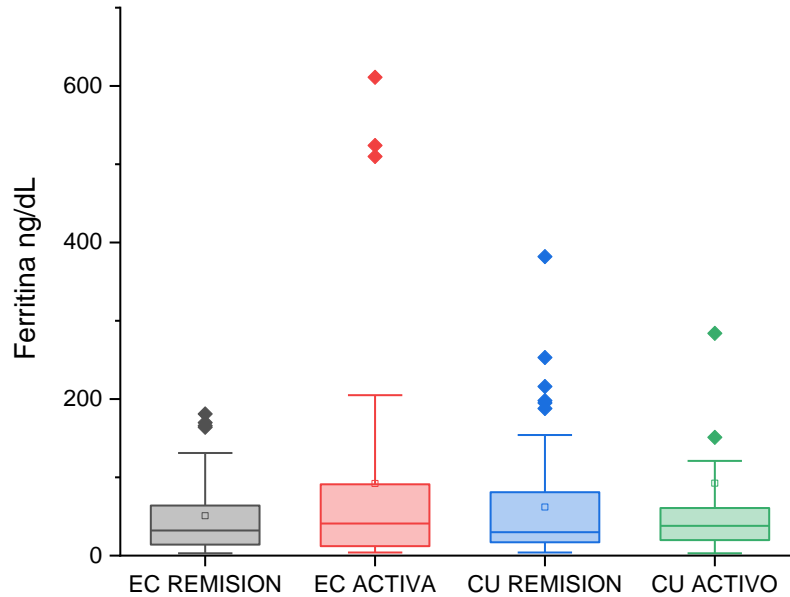


Figura 3.5. Dispersión y simetría del nivel de ferritina entre los pacientes con EII.

3.3.1.3. Estudio del índice de saturación de la transferrina

En los últimos años el IST está siendo considerado de gran valor para la evaluación del metabolismo del hierro en pacientes con EII y otros procesos inflamatorios ya que no se ve sesgado por la inflamación [20-24]. En una población sana debe estar por encima del 20%. En la Tabla 3.7 se muestran los resultados del IST para la población con EII estudiada en este Capítulo. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los cuatro grupos (P-valor = 0,53), pero los pacientes con EC activa muestran una mayor dispersión de los datos, volviendo a detectarse el valor más alto en un paciente de esta categoría (con un valor de IST por encima del 70%). (Figura 3.6.). Por otra parte, resulta llamativo que los pacientes con CU activa muestren valores menores de IST estando la media incluso por debajo del punto de corte, es decir por debajo del 20%.

Tabla 3.7. Análisis estadístico del IST (%) en la población de EII.

	Número sujetos	Media	Desviación estándar	F valor	P-valor
EC REMISION	39	24,06	11,82	0,72	0,53
EC ACTIVA	37	21,67	17,37		
CU REMISION	63	23,50	11,07		
CU ACTIVA	32	19,60	10,98		

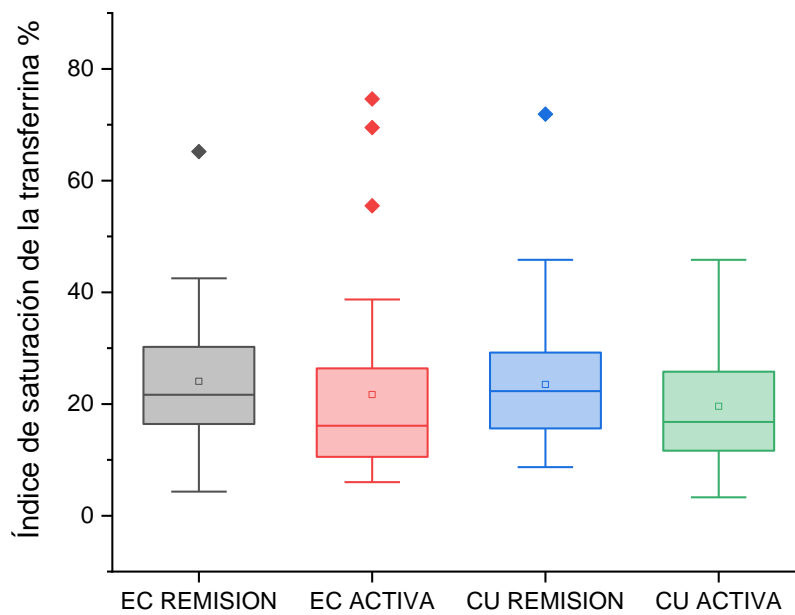


Figura 3.6. Dispersión y simetría del nivel de IST entre los pacientes con EII.

3.3.1.4. Estudio de la hemoglobina

La HGB en sangre debe estar por encima de 13 g/dL en hombres y por encima de 11 g/dL en mujeres, en una población sana. En la Tabla 3.8 se puede observar que no hay grandes diferencias entre los pacientes con EC y CU con la enfermedad activa o en remisión, de hecho, la hemoglobina en los pacientes con EII no se ve alterada hasta que no se alcanza la anemia o en algún otro proceso patológico. El test ANOVA, por lo tanto, tampoco encontró diferencias significativas entre los cuatros grupos (Figura 3.7). Aunque cabe destacar que el nivel más bajo de HGB se detectó en un paciente con EC activa, no superando los 10 g/dL de hemoglobina en sangre.

Tabla 3.8. Análisis estadístico de la HGB (g/dL) en la población de EII.

	Número sujetos	Media	Desviación estándar	F valor	P-valor
EC REMISIÓN	39	14,5	1,33	2,08	0,10
EC ACTIVA	37	13,9	1,64		
CU REMISIÓN	63	14,32	1,21		
CU ACTIVA	32	13,87	1,22		

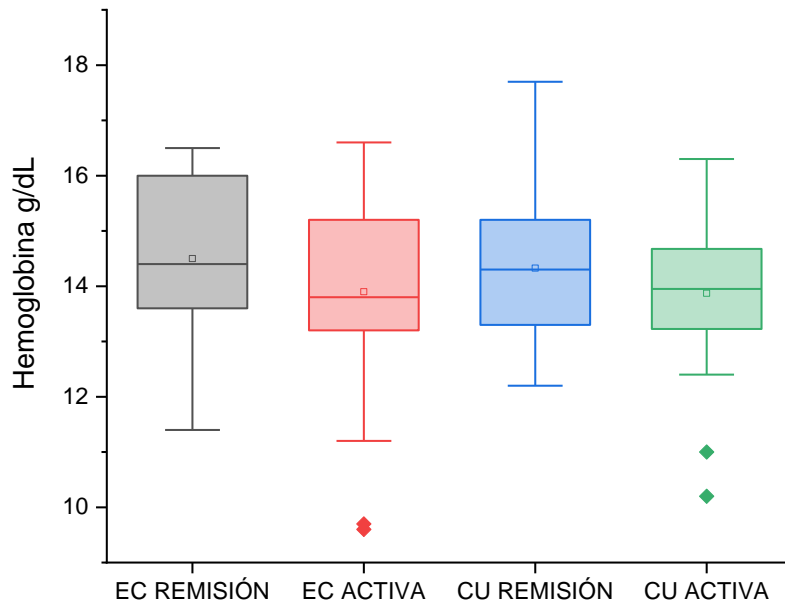


Figura 3.7. Dispersión y simetría del nivel de HGB entre los pacientes con EII.

3.3.1.5. Estudio del volumen corpuscular medio

Tras comparar los resultados de población con EII objeto de estudio en este Capítulo, se pudo observar los valores de VCM eran muy parecidos en las cuatro categorías, no encontrando diferencias significativas entre ellos (P -valor = 0,43). El valor medio del VCM más alto se observó en el grupo de CU en remisión (89,67 fL) mientras que el valor más bajo correspondía a los pacientes con CU activa (87,87 fL). No obstante, el valor medio del VCM estuvo por encima del valor normal (80 fL) en las cuatro categorías.

Tabla 3.9. Análisis estadístico del VCM (fL) en la población de EII.

	Número sujetos	Media	Desviación estándar	F valor	P-valor
EC REMISIÓN	39	88,53	6,48	0,91	0,43
EC ACTIVA	37	88,41	6,20		
CU REMISIÓN	63	89,67	5,09		
CU ACTIVA	32	87,87	3,98		

La Figura 3.8 se muestra el diagrama de cajas y bigotes donde se puede observar la dispersión y simetría del nivel de VCM entre los pacientes con EII. Cabe destacar que en este caso el nivel más bajo de VCM se encontró en un paciente con EC remisión no superando los 70 fL.

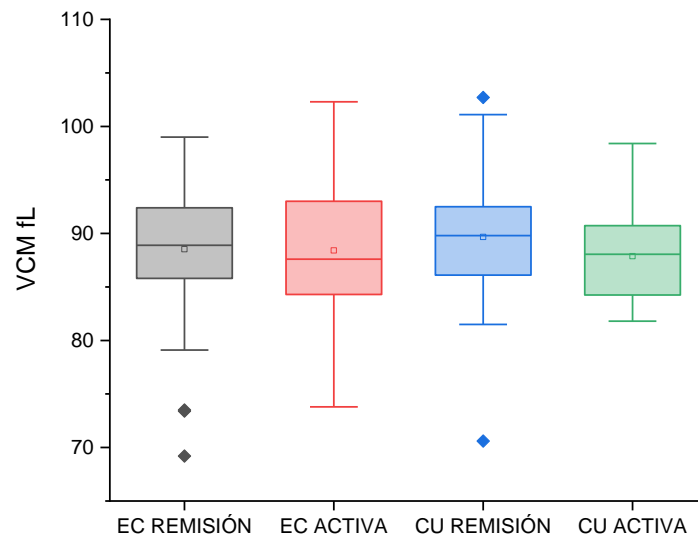


Figura 3.8. Dispersión y simetría del nivel de VCM entre los pacientes con EII.

3.3.1.6. Estudio de la proteína C reactiva

Como se comentó anteriormente, los niveles de PCR deben tenerse en cuenta para el estudio del metabolismo del hierro por ser un factor de confusión. Cuando se compararon los resultados de la PCR para las cuatro categorías, el test ANOVA encontró diferencias significativas (P-valor = 0,02), aunque no se habían encontrado diferencias significativas en la metabolización del hierro, por lo que en este caso la inflamación (y elevados valores de PCR), no tuvieron una gran influencia en la elevación de la ferritina. En este caso, los enfermos tanto con EC como con CU en brote activo mostraron valores más altos de PCR que los enfermos en remisión. Como puede observarse en la Tabla 3.10, en los pacientes con la enfermedad activa la media del PCR fue 1,18 y 1,40 mg/dL para los pacientes con EC o CU activa, respectivamente, y ambos casos estaba por encima de 0,6 mg/dL el punto de corte que han establecido diversos estudios para describir una actividad inflamatoria [19].

Tabla 3.10. Análisis estadístico de la PCR (mg/dL) en la población de EII.

	Número sujetos	Media	Desviación estándar	F valor	P-valor
EC REMISIÓN	39	0,38	0,56	3,21	0,02
EC ACTIVA	37	1,18	2,32		
CU REMISIÓN	63	0,43	0,68		
CU ACTIVA	32	1,40	3,32		

La Figura 3.9 muestra el diagrama de cajas y bigotes donde se puede observar la dispersión y simetría de los niveles de PCR.

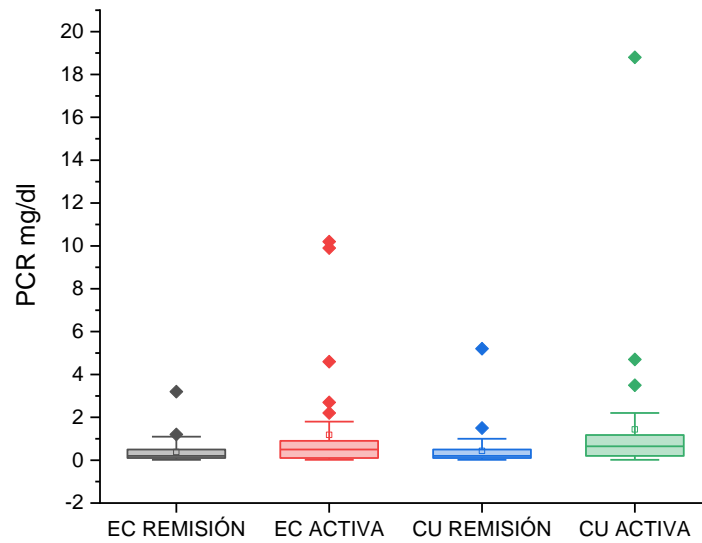


Figura 3.9. Dispersión y simetría de los niveles de PCR entre los pacientes con EII.

3.3.1.7. Estudio del déficit de hierro, ferropenia y anemia

A continuación, se estudió la incidencia de la deficiencia de hierro, la ferropenia y la presencia de anemia crónica entre los pacientes con CU y EC tanto en remisión como con la enfermedad activa, atendiendo al factor de confusión de la PCR y por tanto de la actividad inflamatoria. Para este estudio, se disponía de una población total de 171 individuos.

El diagnóstico de deficiencia de hierro se basa en los niveles de ferritina sérica, los cuales se encuentran en niveles bajos (<30 ng/dL), para el diagnóstico de la ferropenia o deficiencia absoluta de hierro se tienen en cuenta además no solo la ferritina, sino que el IST (<20%) también y la anemia se controla además la HGB cuyos valores normales son superiores a 13 g/dL en hombres y 11 g/dL en mujeres, [9]. Los niveles de ferritina pueden aumentar en caso de inflamación causando un factor de confusión en los resultados obtenidos si no se tiene en cuenta el grado de inflamación [3]. Por esta razón, se debe investigar también los niveles de PCR para reconocer a los pacientes con inflamación y distinguir la deficiencia de hierro absoluta o ferropenia de la deficiencia de hierro. En condiciones normales de no inflamación, la deficiencia de hierro se determinaría por niveles de ferritina por debajo de 30 ng/dL en cambio ante la presencia de inflamación (PCR > 0,6 mg/dL) estos valores aumentan hasta <100 ng/dL por lo que si no se tiene en cuenta este factor de confusión se podría estar infradiagnosticado esta patología. Como se puede observar en la Tabla 3.11, el 55% de la población estudiada

con EII presentan deficiencia de hierro ya sea en presencia de inflamación o no o con la PCR en niveles normales o alterada. Entre los pacientes con deficiencia de hierro, destaca los grupos de la EC y la CU activa donde el 54 y 65,6% de los pacientes de dichos grupos respectivamente presentan niveles de ferritina por debajo de los valores establecidos como normales, siendo estos 30 ng/dL con PCR normal y por debajo de 100 ng/dL en los casos donde la PCR se encuentra elevada.

En el caso de la deficiencia absoluta de hierro se tuvieron en cuenta los niveles de ferritina e IST atendiendo también al factor de confusión de la PCR o inflamación. La deficiencia de hierro absoluta afecta a un 31,5% de la población estudiada. En este caso también los grupos de pacientes con EII activa alcanzan cuotas de incidencia más altas para la deficiencia absoluta de hierro que los de remisión, mostrando un 40,1% frente a un 27% del grupo en remisión.

Chaubal et al., compararon población de activos con CU con un grupo control de sanos obteniendo diferencias significativas respecto a la anemia y a la ferropenia, un 53% frente a un 13% del grupo control [23]. Portela et al., en 2016, también estudiaron la presencia de anemia entre los grupos activos y remisión encontrando una mayor prevalencia entre los activos, 33,6% frente al 15,6 ($p < 0,001$) [24]. Sin embargo, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no se han llevado a cabo hasta la fecha la comparación de los niveles de hierro, ferropenia y anemia crónica entre las diferentes entidades de la EII y su estado (activo o remisión), por lo que esto una novedad del presente Capítulo y abre la puerta a continuar la investigación en este ámbito.

Tabla 3.11. Incidencia de pacientes con déficit de hierro, ferropenia y anemia.

		EC REMISIÓN N=39	EC ACTIVO N=37	CU REMISIÓN N=63	CU ACTIVO N=32	Total N=171
Deficiencia hierro	Ferritina <30 ng/dL PCR<0,6 mg/dL	15	10	25	4	95
	Ferritina <100 ng/dL y PCR>0,6 mg/dL	7	10	7	17	
Deficiencia absoluta de hierro o ferropenia	Ferritina <30 ng/dL y PCR<0,6 mg/dL + IST < 20%	5	8	9	1	54
	Ferritina <100 ng/dL PCR>0,6 mg/dL. + IST<20%	9	6	4	12	
Anemia crónica	Ferritina <30 ng/dL y PCR<0,6 mg/dL + IST < 20% + HGB baja	0	1	0	0	2
	Ferritina <100 ng/dL, PCR>0,6 mg/dL + IST<20% + HGB baja	0	0	0	1	

A pesar de los tratamientos y recomendaciones que se dieron a los pacientes a lo largo de las consultas de digestivo, tan solo 10 de estos pacientes tomaban suplementación oral de hierro y no se reflejó en ninguna consulta las recomendaciones de una dieta rica en hierro para alcanzar niveles de ferritina normales, a pesar de encontrarse muchos de ellos en niveles bajos de hierro sérico o con ferropenia, lo que hace pensar que el diagnóstico de ferropenia está infradiagnosticado. Si bien es cierto que la ECCO tan solo recomienda la suplementación de hierro cuando se alcanzan

niveles analíticos de anemia, no menciona ninguna pauta a seguir en estos pacientes con ferropenia, que de no cambiar sus hábitos nutricionales o no tomar suplementos de hierro, pueden llegar a alcanzar niveles de anemia. Tan solo recomienda monitorizar cada 3 meses los niveles de HGB, ferritina, saturación de transferrina y PCR y que la suplementación de hierro en estos pacientes dependerá del escenario clínico, el facultativo y las preferencias del paciente. Sin embargo, niveles de hierro séricos bajos y ferropenia pueden afectar a la calidad de vida de los pacientes provocando fatiga, alteración del sueño, cansancio, o caída de pelo entre otros. En el estudio de Ott et al., se estudió una población de 279 pacientes con EII de los cuales 26 de ellos presentaban ferropenia y tan solo 9 de ellos estaban bajo tratamiento, tras un año de tratamiento 4 de ellos resolvieron la ferropenia [25]. Además, varios estudios han demostrado que el hierro luminal puede aumentar la CF y alterar el microbioma intestinal, que se ha demostrado que desempeña un papel en la patogénesis de la EII [26, 27]. Otro inconveniente es que el tratamiento con hierro oral puede tardar hasta 6 meses en reponer por completo las reservas de hierro [28].

La ferropenia en ocasiones puede ser asintomática, pero en otros pacientes puede dar una sintomatología que afecta a la calidad de vida del paciente con debilidad, cefalea o cansancio entre otros síntomas. Lo mismo ocurre con la anemia, durante un tiempo se creyó que tan solo cuando los niveles de HGB eran bajos aparecían las consecuencias de la anemia. Actualmente se emplea el término de anemia asintomática [29]. Es por ello por lo que la monitorización regular de estos parámetros bioquímicos puede ayudar a mejorar la calidad de vida de los pacientes ambulatorios con EII. Puesto que la suplementación de hierro oral no se recomienda hasta alcanzar niveles de HGB bajos y que la suplementación oral podría sesgar los valores de la CF se debería instar a los pacientes con ferropenia a seguir una dieta equilibrada y rica en hierro para aumentar los depósitos y redirigir a los pacientes al servicio de nutrición para la planificación de la dieta o crear sesiones informativas sobre cómo combatir la ferropenia con o sin suplementación oral de hierro.

3.3.2. Estudio del perfil lipídico

Las dislipidemias son alteraciones metabólicas de los lípidos que provocan cambios en los niveles séricos de lipoproteínas: elevación de CT, LDL, triglicéridos y HDL. Existen pruebas sólidas de que los cambios en las concentraciones séricas de colesterol influyen en la aparición de la enfermedad coronaria [30], recordando que los pacientes con EII tienen mayor riesgo de presentar tromboembolismo, concretamente (3 o 4 veces

mayor en comparación con la población general) [31]. El perfil lipídico se evaluó por medio de los parámetros de CT, HDL, LDL y triglicéridos, en la Tabla 3.12 se puede observar los valores normales de los diferentes parámetros de los lípidos como los valores de riesgo medio y alto. Del total de los 171 individuos, de los que se disponía de información sobre el perfil lipídico, 81 padecían dislipemia, es decir tenían una alteración en los niveles de lípidos (grasas) en sangre, tal y como se puede ver en la Tabla 3.13.

Tabla 3.12. Valores normales de los parámetros lipídicos [32].

	Valores normales	Aceptable-alto	Alto
CT mg/dL	<200	200-239	>240
HDL mg/dL	<45	45-60	>60
LDL mg/dL	0 -130	130-159	>160
Triglicéridos mg/dL	0 -150	150-199	>200

El análisis de los principales componentes lipídicos del plasma como es el CT y los triglicéridos es habitual en los exámenes rutinarios, ya que su alteración es bastante frecuente en la población. La aparición de dislipemia está fuertemente asociada a la aparición de una enfermedad cardiovascular ateromatosa [32]. Sabiendo los valores del CT y el HDL se puede calcular el índice de Castelli, que es un valor mucho más potente para la predicción de riesgo aterogénico que los valores de colesterol, HDL y LDL independientes [33-35]. El Índice de Castelli o índice aterogénico, se define como la relación CT/HDL y permite evaluar el riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular.

Tabla 3.13. Monitorización del metabolismo lipídico en los pacientes con EII. Se muestra la incidencia de cada parámetro respecto al total de datos.

	EC REMISIÓN	EC ACTIVO	CU REMISION	CU ACTIVO	TOTAL
Colesterol >200 mg/dL	23/39	11/37	29 /63	18/32	81/ 171
HDL >45 mg/dL	10/12	5/ 6	12/ 12	11/14	19/ 44
LDL >130 mg/dL	10/ 12	5/ 6	11/ 12	9 /13	35/ 44
Triglicéridos >150 mg/dL	7/ 39	11/ 32	17/ 62	3/ 29	38/ 162

Nota: Se indica el número total de datos

Para la evaluación del CT sólo se disponía de la información para 171 pacientes, de los cuales el 50% mostraron hipercolesterolemia, es decir tenían niveles de colesterol altos (por encima de 200 mg/dL), y concretamente en 3 individuos se encontraron niveles superiores a 250 mg/dL. El análisis estadístico demostró que no había diferencias significativas entre las cuatro categorías (P-valor = 0,07). Aunque los niveles más altos de CT se detectaron en los pacientes con EC en remisión y CU activa (Tabla

3.14), detectando el nivel más alto de colesterol en este último grupo con un valor por encima de 300 g/dL (Figura 3.10).

Tabla 3.14. Análisis estadístico del CT (mg/dL) en la población de EII.

	Número sujetos	Media	Desviación estándar	F valor	P-valor
EC REMISIÓN	39	200,51	39,50	2,39	0,07
EC ACTIVA	37	181	35,27		
CU REMISIÓN	63	193,84	36,72		
CU ACTIVA	32	203,31	32,16		

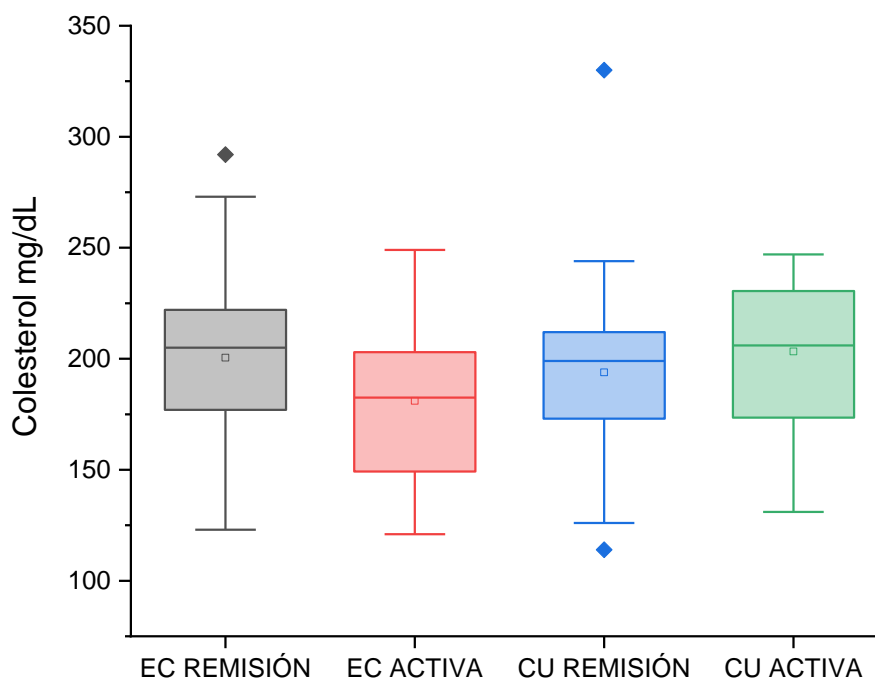
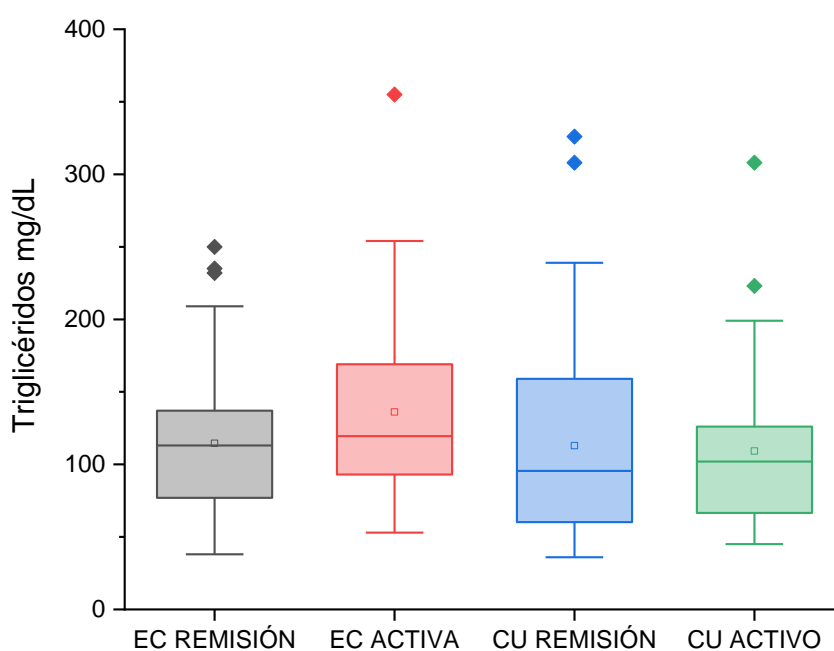


Figura 3.10. Dispersión y simetría del nivel de CT en los pacientes con EII.

La información de los triglicéridos sólo estaba disponible para 162 pacientes del estudio. Como puede observarse en la Tabla 3.15 y Figura 3.11 tampoco se encontraron diferencias significativas en entre los diferentes pacientes evaluados (P-valor = 0,27), destacando que ninguna de las medias de los cuatro grupos superaba el valor de referencia de 150 mg/dL.

Tabla 3.15. Análisis estadístico de los triglicéridos (mg/dL) en la población de EII.

	Número sujetos	Media	Desviación estándar	F valor	P-valor
EC REMISIÓN	39	114,51	54,26	1,3	0,27
EC ACTIVA	32	136,15	63,06		
CU REMISIÓN	62	112,93	66,78		
CU ACTIVA	29	109,13	57,13		

**Figura 3.11.** Dispersión y simetría del nivel de triglicéridos en los pacientes con EII.

En el caso de HDL, sólo se disponía de información para 44 pacientes y en este caso tampoco se encontraron diferencias significativas entre grupos (P-valor = 0,84). Los resultados se muestran en la Tabla 3.16 y Figura 3.12.

Tabla 3.16. Análisis estadístico del HDL (mg/dL) en la población de EII.

	Número sujetos	Media	Desviación estándar	F valor	P-valor
EC REMISIÓN	12	56,25	12,75	0,26	0,84
EC ACTIVA	6	55,66	13,54		
CU REMISIÓN	12	61,25	8,95		
CU ACTIVA	14	60,14	24,80		

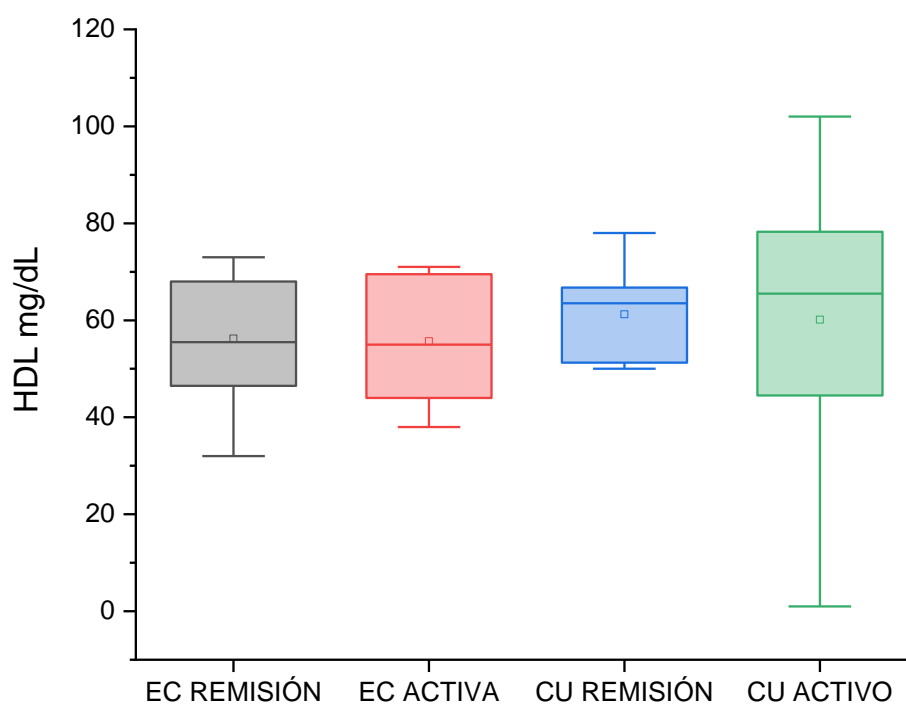


Figura 3.12. Dispersión y simetría del nivel de HDL en los pacientes con EII.

Como puede observarse, la media de todos los grupos se mantuvo por encima de 60 mg/dL. Valores menores a este valor de referencia se consideran perjudiciales para los pacientes aumentando el riesgo aterogénico.

En el caso de la LDL, los análisis estadísticos se realizaron sólo con 44 pacientes, ya que del resto no se disponía de la información de este parámetro. Como puede verse en la Tabla 3.17 el P-valor fue de 0,64, no encontrando diferencias entre grupos. En todos los casos el valor medio de las cuatro categorías se mantuvo por encima de los 130 mg/dL (Figura 3.13), niveles por encima a 160 mg/dL se consideran altamente perjudiciales para los pacientes aumentando también el riesgo aterogénico.

Tabla 3.17. Análisis estadístico del LDL en la población de EII.

	Número sujetos	Media	Desviación estándar	F valor	P-valor
EC REMISIÓN	12	149,41	33,19	0,56	0,64
EC ACTIVA	6	135,50	38,06		
CU REMISIÓN	12	150,91	24,32		
CU ACTIVA	14	140,92	23,36		

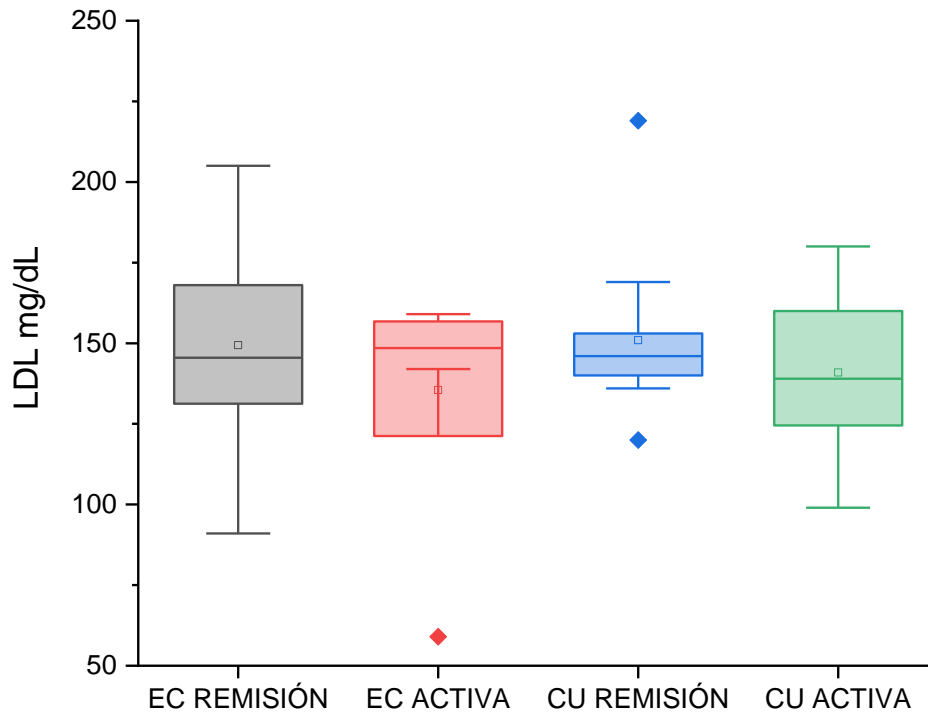


Figura 3.13. Dispersión y simetría del nivel de LDL en los pacientes con EII.

El estudio prospectivo de Soh et al. en Korea, durante 7 años, en el que participaron casi 10 millones de pacientes, relacionó cifras bajas de CT, LDL y/o HDL con el riesgo de padecer EC, mientras que cifras bajas de triglicéridos estarían relacionadas con el riesgo de desarrollar CU [36]. Biyyani et al., en un estudio que llevaron a cabo con 393 voluntarios, también describieron diferencias estadísticamente significativas en los valores de CT en los pacientes con EC en comparación con los pacientes con CU, donde se recogían las cifras más altas [37]. Por otro lado, Piquer et al. demostraron que en los sujetos con EII activa, la inflamación provoca alteraciones en los perfiles de lípidos, apolipoproteínas y lipoproteínas, así como una reducción del eflujo de colesterol. Estos cambios son similares a los propuestos para promover la aterogénesis y pueden contribuir al desarrollo de eventos cardiovasculares [338]. Finalmente, Fan et al. en 2015 también compararon el perfil lipídico de un grupo de pacientes con EC frente a otro de sano encontrando diferencias significativas y negativas para el grupo de enfermos, relacionándolo con la patogénesis de la enfermedad [39].

Sin embargo, en este estudio no se encuentran diferencias significativas en el perfil lipídico de los pacientes con EII, ni entre las diferentes entidades, ni entre los diferentes estados de la enfermedad. Esto estaría en concordancia con el estudio realizado por Ferreiro et al. en España, en el que participaron 97 pacientes, ya que no se encontraron diferencias significativas ni en el contenido de triglicéridos, ni en el CT entre los pacientes con EII activa y en remisión [40].

Aunque no se encontraron diferencias significativas, el nivel de lipoproteínas tanto de alta y baja densidad fue menor en los pacientes con EC (tanto en estado activo como en remisión), en comparación con los pacientes de CU, confirmando los resultados de Biyyani et al., ya que del mismo modo describieron que estas lipoproteínas mostraron valores más bajos en los pacientes con EC en comparación con los pacientes con CU, aunque tampoco se alcanzó significación estadística [37].

Los perfiles lipídicos de la EII son probablemente el resultado de una compleja interacción de citocinas inflamatorias, reactantes de fase aguda y alteración de la continuidad intestinal (ya sea una alteración quirúrgica o una alteración funcional debida a una inflamación grave). Dados los bajos niveles de HDL y el aumento de los niveles de LDL parece justificado un enfoque más agresivo en el perfil y el tratamiento de la dislipidemia en pacientes con EII.

3.3.2.1. Cálculo de índices de aterogenia

El origen del índice de Castelli está en los estudios del riesgo cardiovascular de Framingham, ya que se demostró que pacientes con nivel de colesterol bajo también podrían estar en riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular si su colesterol HDL, también era bajo [32-34].

El Índice de Castelli o índice aterogénico, se define como la relación CT/HDL y permite evaluar el riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular. Este se basa en el hecho de que individuos con un nivel total de CT bajo también pueden estar en riesgo de enfermedad cardiovascular si tienen un bajo nivel de HDL, o viceversa, individuos con niveles altos de CT, pero niveles también altos de HDL no desarrollan problemas cardiovasculares ya que el exceso de colesterol es eliminado por el cuerpo. Según este índice, un valor por encima de 4,5 en hombres y de 4 en mujeres puede relacionarse con un alto riesgo de sufrir accidentes cardiovasculares.

Los resultados del cálculo de Castelli para la población objeto de estudio en este Capítulo se muestra en la Tabla 3.18 Cabe destacar que este parámetro sólo pudo calcularse para 44 pacientes, para los que la información de HDL estaba disponible.

Tabla 3.18. Distribución de pacientes con riesgo aterogénico en la población con EII.

SEXO	Tipo de EII	TRIGLICÉRIDOS	LDL	CT	HDL	CASTELLI
Hombre	CU	141	180	245	37	6,6
Mujer	EC	67	144	228	71	3,2
Mujer	CU	102	123	222	79	2,8
Hombre	CU	117	162	225	40	5,6
Mujer	EC	142	159	249	62	4,0
Hombre	CU	116	107	232	102	2,3
Mujer	CU	80	101	173	56	3,1
Mujer	CU	52	136	224	78	2,9
Hombre	CU	147	147	224	48	4,7
Hombre	EC	169	156	238	48	5,0
Hombre	EC	121	59	121	38	3,2
Hombre	EC	188	142	226	46	4,9
Mujer	CU	60	162	247	73	3,4
Mujer	EC	136	153	249	69	3,6
Hombre	CU	73	139	233	79	2,9
Mujer	CU	59	99	157	46	3,4
Mujer	CU	199	126	229	63	3,6
Hombre	CU	125	158	238	55	4,3
Mujer	CU	135	135	235	73	3,2
Mujer	CU	87	158	243	68	3,6
Mujer	EC	137	201	292	64	4,6
Mujer	EC	44	154	257	94	2,7
Hombre	EC	130	91	149	32	4,7
Hombre	CU	70	120	205	71	2,9
Hombre	CU	47	140	227	78	2,9
Hombre	EC	250	169	273	54	5,1
Hombre	CU	227	147	244	52	4,7
Hombre	CU	213	140	234	51	4,6
Mujer	CU	55	154	231	66	3,5
Mujer	EC	90	156	246	72	3,4
Hombre	CU	239	219	330	63	5,2
Mujer	EC	209	110	221	69	3,2
Hombre	EC	232	144	242	52	4,7
Mujer	CU	162	150	240	58	4,1
Hombre	EC	235	132	222	43	5,2
Mujer	CU	67	148	228	67	3,4
Mujer	EC	95	131	223	73	3,1
Hombre	CU	101	136	220	64	3,4
Hombre	CU	98	145	229	64	3,6
Mujer	EC	113	142	230	65	3,5
Hombre	CU	221	143	238	51	4,7
Hombre	EC	81	205	269	48	5,6
Hombre	EC	116	165	234	46	5,1
Mujer	CU	82	169	235	50	4,7

Como se puede observar de entre los 44 pacientes seleccionados se detectaron 19 de ellos con nivel del índice de Castelli elevado. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos de pacientes de EII se puede observar en la Tabla 3.19.

Tabla 3.19. Análisis estadístico del índice de Castelli en la población con EII.

	Número sujetos	Media	Desviación estándar	F valor	P-valor
EC REMISIÓN	12	4,35	0,87	0,72	0,54
EC ACTIVA	6	3,98	0,80		
CU REMISIÓN	12	3,97	0,78		
CU ACTIVA	14	3,70	1,21		

El grupo que mayor índice de Castelli obtiene es el grupo de la EC en remisión que supera 4 independientemente del sexo de los pacientes, es también este grupo el que mayor incidencia de pacientes con índice de Castelli alto, con un total de 11 de los 19 que obtuvieron un valor patológico para el índice de Castelli.

La detección del índice aterogénico resulta muy interesante entre los pacientes con EII, a pesar de que la muestra no era muy amplia, tan solo 44 pacientes, por lo tanto, se debería incluir la detección del HDL en el análisis rutinario en las consultas de digestivo, ya que casi la mitad de los pacientes, 19 de 44, tenían un índice de Castelli que determinaba un riesgo moderado de accidente cardiovascular. Recientes estudios como los de Nuñez et al, han evidenciado el riesgo cardiovascular entre los pacientes con EII, con un aumento de la arterosclerosis, infarto de miocardio o aumento de eventos tromboembólicos como la trombosis venosa o pulmonar [41].

El cálculo y detección de forma rutinaria de este riesgo aterogénico resulta esencial desde atención primaria o desde las consultas externas de digestivo es de gran utilidad, para prevenir este riesgo e incluir a los pacientes en planes de prevención de accidentes cardiovasculares, basados en la actividad física, dietas saludables y otras recomendaciones para mantener un estilo de vida que pueda disminuir este riesgo subyacente a la EII.

3.3.4. Estudio de la absorción y digestión a través de las heces

El examen microscópico de las heces, cuyo objetivo es encontrar principios inmediatos no digeridos, proporciona información más real acerca de los trastornos de la digestión en los pacientes.

En este Capítulo se determinó la presencia de hidratos de carbono, en este caso almidón, proteínas en forma de fibras musculares y de grasa. La presencia de todos o alguno de estos componentes en las heces de los pacientes lleva a la conclusión de un problema en la absorción y digestión de nutrientes y sus consecuentes problemas nutricionales. La Figura 3.14. muestra los resultados obtenidos tras realizar el examen microscópico en las heces de la población en estudio. Como puede observarse, el 34% de ellos no presentaron ningún producto patológico en las heces, de tal manera que en el 66% de los pacientes se encontró presencia de grasas y/o proteínas y/o hidratos de carbono en las heces. Para este estudio se seleccionaron 173 pacientes todos ellos con EC o CU en estado activo o remisión, también se eliminaron los pacientes con EII no clasificada por no tener suficiente tamaño muestral.

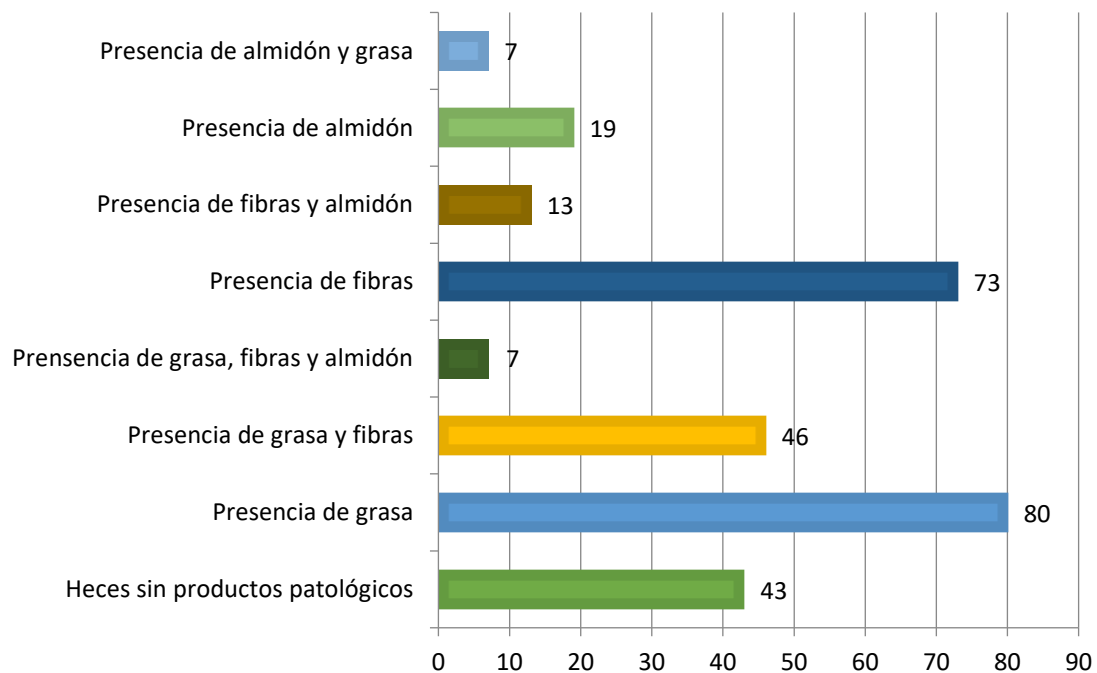


Figura 3.14. Pacientes con heces patológicas entre nuestra población de EII.

3.3.4.1. Digestión de los hidratos de carbono

Como se comentó anteriormente la presencia de amilorrrea, es decir la presencia de hidratos de carbono (almidón), en las heces es indicativo de un tránsito intestinal acelerado, y esto suele ocurrir en mayor proporción en pacientes que sufren de CU o de diarreas crónicas [4]. Sin embargo, hasta la fecha no se han encontrado estudios que

fundamenten la correlación de presencia de almidón de las heces de los pacientes con EII que no sea la malabsorción provocada por la propia inflamación del intestino que limita la absorción de los nutrientes. Ni tampoco que han encontrado estudios que encuentren diferencias en la absorción de los hidratos de carbono entre pacientes con EC y CU y/o en activo o remisión.

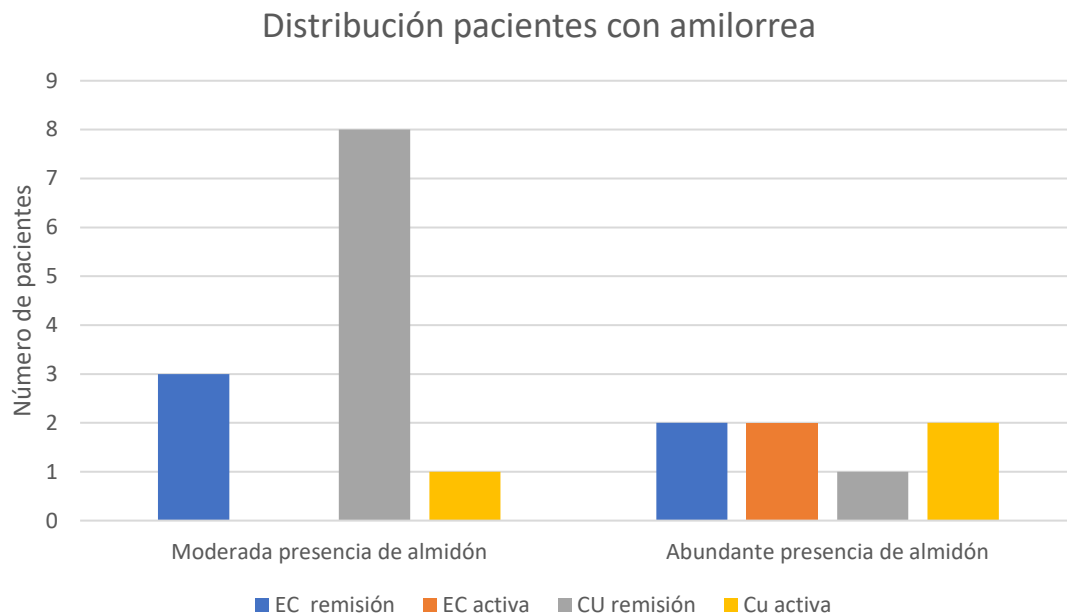


Figura 3.15. distribución de pacientes con amilorrea según EC, CU, activo y remisión.

En este estudio, la presencia de almidón en las heces fue clasificada en tres categorías:

- Ausencia de almidón. Digestión buena.
- Moderada presencia de almidón. Digestión intermedia.
- Abundante presencia de almidón. Digestión mala.

Entre los 173 pacientes tan solo se detectaron 19 pacientes con amilorrea, lo que supone un 10,9% de los pacientes incluidos en el estudio. La distribución entre pacientes con CU y EC, activos y remisión se muestra en la Figura 3.15. Como puede observarse, 15 de ellos (más de la mitad) eran enfermos con CU (tanto en remisión como activa), lo que estaría en concordancia con el tránsito intestinal acelerado traducido en diarreas o deposiciones muy frecuentes en esta entidad de la EII. Cabe destacar, que de los 19 pacientes que mostraron amilorrea, tan solo 4 de ellos refirieron haber tenido episodios de diarrea regularmente.

3.3.4.2. Digestión de las proteínas

La presencia de fibras en los pacientes es indicativa de una mala función pancreática o a nivel gástrico [37,40,42]. La presencia de fibra mal digerida en las heces fue clasificada en tres categorías:

- Fibra bien digerida. Digestión buena.
- Fibra medianamente digerida. Digestión intermedia.
- Fibra mal digerida. Digestión mala.

Entre los 173 pacientes se detectaron 73 pacientes con creatorrea, o aumento del contenido proteico de las heces, lo que supone un 42,2% de los pacientes incluidos en el estudio. Concretamente 42 de ellos tenían CU y 31 EC, como puede observarse en la Figura 3.16.

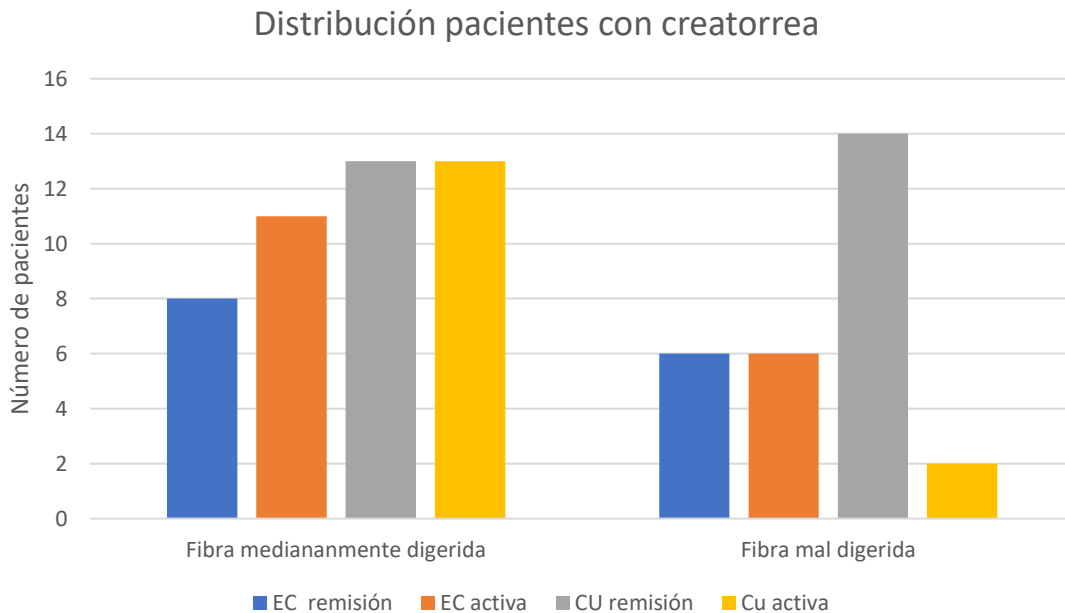


Figura 3.16. distribución de pacientes con creatorrea según EC, CU, activo y remisión.

Como puede observarse, 32 pacientes con la enfermedad activa (EC o CU) presentaban creatorrea, lo que supone el 45,7% de los pacientes con EII activa. Por el contrario, la incidencia de creatorrea en los enfermos en remisión, 41 es ligeramente menor (39%).

Si se comparan los resultados con otros estudios, estos dos porcentajes son muy altos para los pacientes con EII. Ramos et al. describió que el 18% de los pacientes con EII presentaba anomalías de los conductos pancreáticos y por tanto creatorrea en sus heces [42]; mientras que Garrido-Gomez et al, en la comunidad de Madrid, detectaron enfermedad pancreática en el 2,78% de los pacientes estudiados [43]. Por otro lado, el

trabajo de Rustomovic et al. determinó la presencia y cantidad de elastasa-1 en las heces de los pacientes con EII y controles, detectándola en hasta un 10% de los pacientes enfermos, correlacionando así la presencia de insuficiencia pancreática con la EII [44].

3.3.4.3. Digestión de las grasas

Finalmente, la presencia de gotas de grasa en heces o esteatorrea en los pacientes es un signo indicativo de malabsorción, mucho más frecuente en EC que afectan a íleon y pacientes con resecciones intestinales [5,45,46]. La presencia de gotas en heces fue clasificada en tres categorías:

- Ausencia de gotas de grasa. Digestión buena.
- Moderada presencia de gotas de grasa. Digestión intermedia.
- Abundante presencia de gotas de grasa. Digestión mala.

Entre los 173 pacientes se detectaron 80 pacientes con esteatorrea, lo que supone un 46,2% de los pacientes incluidos en el estudio. La distribución entre pacientes con CU y EC, activos y remisión según indica la figura 3.17.

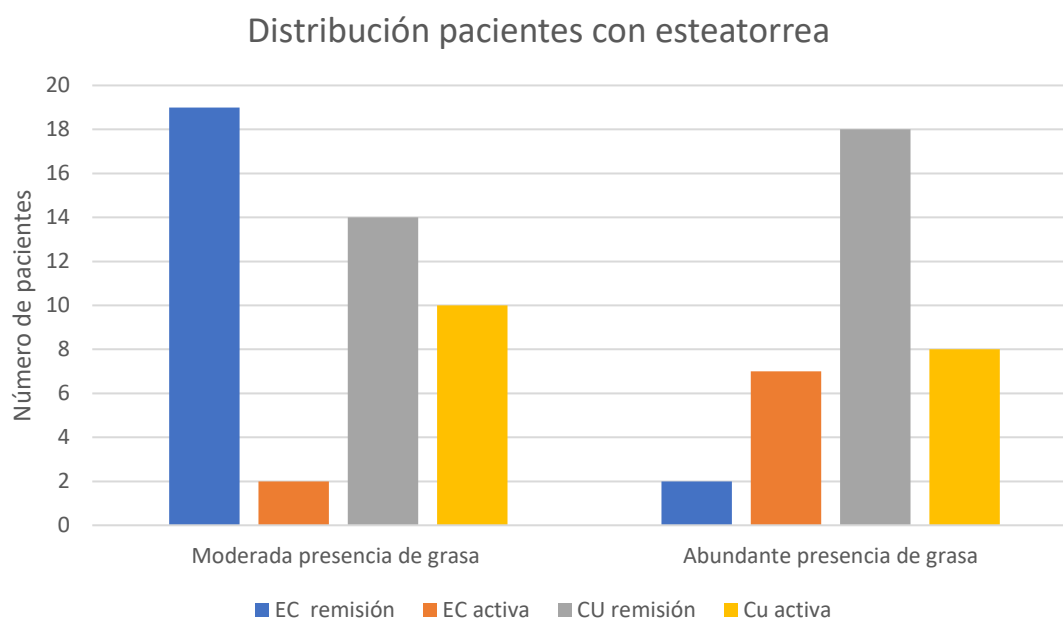


Figura 3.17. distribución de pacientes con esteatorrea según EC, CU, activo y remisión

De estos 80 pacientes con esteatorrea, a 13 de ellos se le había practicado una o varias resecciones intestinales o una colecistectomía, factores que aumentan la presencia de grasa en las heces

Este alto porcentaje de pacientes con malabsorción de grasa en pacientes con EC remisión coincide con los del estudio de Mena Bares *et al.*, en el que también detectaron un alto índice de pacientes con malabsorción [47]. Datos que también concuerdan con el estudio de Filipsson *et al.*, que detectó esta malabsorción de grasas en el 10% de los voluntarios con EC y que aumento hasta un 60% tras una intervención de resección intestinal [48]. Otro estudio realizado en niños con malabsorción en 2002 detecto la presencia de grasa en heces en el 100% de los pacientes con malabsorción moderada o grave [49].

Los pacientes con EII tienen controles rutinarios de CF, es por ello por lo que una vez enviadas al laboratorio estas muestras fecales, resulta más cómodo sacar datos sobre la malabsorción de estos pacientes, ya que como hemos visto en el presente estudio, los pacientes con EII tienen altos índices de esteatorrea y creatorrea. La detección precoz de estos hallazgos puede ayudar a los facultativos a dirigir ciertas intervenciones no solo con respecto a la nutrición, sino hacia el curso del tratamiento y el diagnóstico de otras complicaciones como la patología pancreática.

3.3.5. Aplicación del cribado CONUT como método rápido de detección de la desnutrición.

Las medidas antropométricas en el adulto con EII tampoco resultan ser por sí solas útiles para la detección de la desnutrición, ya que se precisan de datos de referencia previos, que, en muchas ocasiones, no disponen los pacientes para su seguimiento, además, sería necesario citar a los pacientes cada 6 meses en la consulta de nutrición, lo cual conlleva un alto coste.

En este Capítulo también se ha aplicado la escala CONUT (Tabla 3.20) en 171 pacientes extrahospitalarios para valorar el estado de desnutrición a nivel ambulatorio. En la Figura 3.18 se puede apreciar como en 142 (83%) de los individuos se obtuvieron valores entre 0 y 1, marcando un estado nutricional normal. En el resto se recogieron valores de desnutrición leve y dos de ellos alcanzaron una puntuación de 5, indicando un grado de desnutrición moderada (uno con EC activa y otro con CU remisión). De estos 28 pacientes, 12 de ellos estaban con CU en remisión, 4 con CU activa, 8 de ellos con EC activa y los 4 restantes estaban en el periodo de remisión de la EC

La albumina con niveles por debajo de 3,49 g/dL solo se dio en tres de los pacientes del estudio y el recuento total de linfocitos por debajo de 1,4 mg/dL solo se detectó en 27 pacientes. Y como se mencionó anteriormente en el apartado del perfil lipídico respecto al CT, había 81 pacientes con niveles de colesterol por encima de 200 mg/dL.

No se detectaron diferencias significativas EC o CU ni por estado de activo o remisión entre los pacientes respecto a la puntuación en la escala de CONUT. Como se puede ver en la Tabla 3.21.

Tabla 3.20. Puntuación *screening* CONUT.

Parámetros	Nivel de malnutrición			
	Normal	Leve	Moderado	Severo
Albúmina sérica g/dl	3,5 - 4,5	3,0 - 3,49	2,5 - 2,9	<2,5
Score	0	2	4	6
Colesterol mg/dl	>180	140 – 180	100 – 139	<100
Score	0	1	2	3
Recuento total linfocitos mg/dL	>1600	1200 – 1599	800 – 1199	<800
Score	0	1	2	3
Screening total score	0 -1	2 – 4	5 – 8	9 - 12

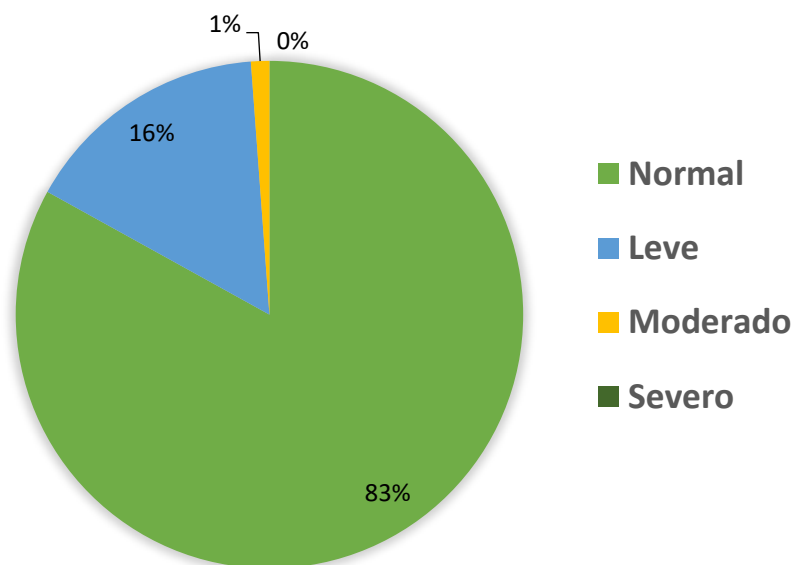


Figura 3.18. Distribuciones pacientes según puntuación CONUT.

Tabla 3.21. Análisis de ANOVA del índice del CONUT.

	Número sujetos	Media	Desviación estándar	F valor	P-Valor
EC REMISIÓN	39	0,53	0,78	1,44	0,23
EC ACTIVA	37	0,89	1,20		
CU REMISIÓN	63	0,75	0,92		
CU ACTIVA	32	0,50	0,80		

En los pacientes con un CONUT ≥ 2 se valoró la presencia de síntomas relacionados con la desnutrición como es, la diarrea, la pérdida de peso o el dolor abdominal. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.22. Tan solo un paciente de los 28 presentaban una pérdida de peso mayor de 3 o más kg en los últimos 3 meses, 8 de ellos presentaban diarreas, y 6 dolor abdominal.

Tabla 3.22. Pacientes con CONUT leve o moderado según factores de confusión

CONUT ≥ 2	EC REMISIÓN n=4	EC ACTIVA n=8	CU REMISIÓN n=12	CU ACTIVA n=4	Total
Dolor abdominal	0	3	1	2	6
Pérdida de peso ≥ 3kg	0	1	0	1	2
Diarrea	0	4	2	2	8
Sangrado	0	0	1	3	4

En total 8 pacientes presentaban uno o más de estos síntomas lo que supone que tan solo el 24% de los pacientes que presentaron como mínimo un nivel de leve desnutrición en el CONUT, presentaron síntomas, lo que nos indica que hay un alto número de pacientes en los que la desnutrición es silenciosa y no da sintomatología clínica, de ahí la importancia de la monitorización de estos parámetros de desnutrición en los pacientes con EII, tal y como recomienda la guía ESPEN, que indica que entre los pacientes con EII hay un alto grado de desnutrición y su detección debe analizarse tanto a la hora del diagnóstico como en revisiones posteriores y que estos screening de nutrición deben ser monitoreados con herramientas válidas. Otros estudios como el

llevado a cabo por Sanhu *et al.*, ya aplicaron screening nutricionales a pacientes ambulatorios con EII obteniendo resultados muy positivos de hasta un 96% de efectividad usando la herramienta MUST [50].

3.3.5.1. Estudio de la calprotectina fecal y su correlación con el cribado CONUT.

Los valores de referencia de CF están por debajo de los 50 g/dL. En el estudio de la EII la CF se presenta como uno de los marcadores de monitorización de la inflamación intestinal y por tanto debería ser considerado junto con otros marcadores para determinar el estado nutricional del paciente ya que la inflamación intestinal viene a alterar la absorción de nutrientes y por tanto el estado nutricional de los enfermos de EII. Como se puede observar en la Tabla 3.23 se obtuvieron diferencias significativas entre los diferentes grupos de la EII para el valor de la CF.

Tabla 3.23. Análisis estadístico de la CF (g/dL) en la población de EII.

	Número sujetos	Media	Desviación estándar	F valor	P-valor
EC REMISIÓN	39	100,7	189,8	18,98	1,63 10 ⁻¹⁰
EC ACTIVA	37	962,0	1554,0		
CU REMISIÓN	63	300,6	772,9		
CU ACTIVA	32	2257,5	2324,2		

Respecto al valor medio de la CF en los diferentes grupos de pacientes se han identificado diferencias significativas entre los grupos, entendiendo así que la enfermedad activa tiene un grado de inflamación mayor que la enfermedad en remisión, es por ello, por lo que los niveles de CF son mucho mayores en estos grupos de población. Si se observa la desviación estándar y en la Figura 3.19 los grupos de remisión tienen niveles de CF más parecidos y agrupados, por el contrario, entre los activos se puede encontrar pacientes con niveles de CF muy dispersos desde el 0 hasta más de 6000 g/dL.

Además, se estudió el valor de la CF entre los pacientes con un CONUT menor de 2 y aquellos con un valor superior a 2, obteniendo diferencias significativas entre ambos grupos. Concretamente, se obtuvo un valor medio de CF de 770 para los pacientes sin desnutrición y un valor de 2845 en los pacientes con CONUT ≥ 2 (P-valor = 0,03). El estudio de Jansen *et al.*, en 2016 ya arroja datos muy positivos para el empleo de herramientas de detección y monitoreo de la malnutrición en pacientes con EC correlacionaba la inflamación a través de la CF y la PCR y la malnutrición prediciendo

la evolución clínica a los 6 meses [51]. En el presente estudio no se detectaron diferencias significativas en la PCR entre los pacientes con valores CONUT ≥ 2 y entre los que tenían menos de 2 con un P-valor de 0,13.

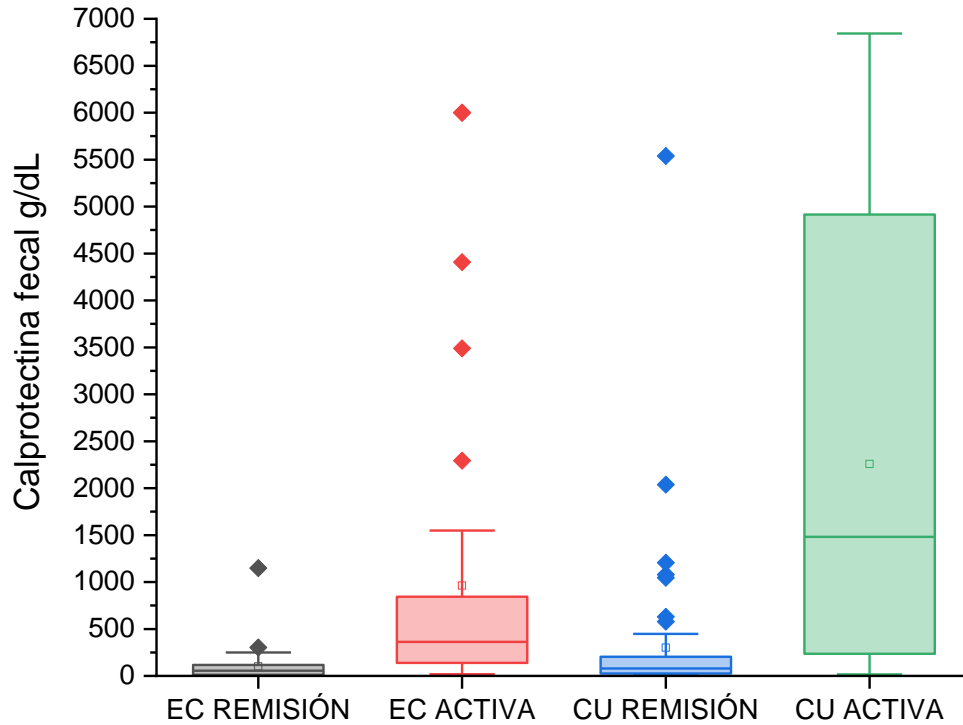


Figura 3.19. Dispersión y simetría de los niveles de CF entre los pacientes con EII.

3.4. CONCLUSIONES

En este Capítulo se han encontrado niveles correspondientes a la deficiencia de hierro en más del 55% de los participantes del estudio y valores correspondientes a la ferropenia en el 31,5% de los participantes. Aunque no se registraron diferencias significativas en el perfil del hierro (hierro sérico, ferritina, transferrina, hemoglobina e IST) entre los pacientes con CU y EC, ni entre activos y remisión, se han observado valores más bajos de hierro sérico y hemoglobina entre la población activa, lo que puede suponer un ser parámetros útiles de monitorear para la detección precoz de la anemia.

En el estudio del perfil lipídico (CT, HDL, LDL y triglicéridos) tampoco se han encontrado diferencias significativas entre los pacientes con CU y EC, ni en los diferentes estadios de la enfermedad, aunque se encontraron niveles de hipercolesterolemia en el 50% de los pacientes con EII. Además, tras el cálculo del

riesgo de aterogenia con el índice de Castelli se observó que el 45,5% de los participantes tenían riesgo cardiovascular.

En el estudio de la malabsorción en los pacientes con EII mediante la visualización microscópica de las heces, se detectó amilorrrea en más del 10% de los pacientes, creatorrea en el 46% y esteatorrea o grasa en heces en un 44% de los estudiados. Encontrando los peores resultados de digestión en las heces de pacientes con EII en remisión.

Finalmente, la aplicación de la escala de valoración nutricional CONUT permitió identificar una desnutrición moderada en el 18% de los individuos. Esta herramienta podría ser útil para prevenir casos graves de desnutrición e ingresos hospitalarios. Además, los pacientes con $\text{CONUT} \geq 2$ mostraron un valor de CF mayor que los pacientes con $\text{CONUT} < 2$.

La atención primaria ha experimentado un gran desarrollo en todo el mundo, con mejoras muy importantes en la atención sanitaria de la población. Parece el marco ideal para el diseño y establecimiento de estrategias de cribado nutricional, cuando todavía es posible actuar sobre las fases presintomáticas [48]. En los pacientes con EII el análisis del metabolismo del hierro y el perfil lipídico y la monitorización de la CF suponen los análisis básicos para el control del paciente, partiendo de estas muestras se podrá hacer un cribado más específico sobre el estado nutricional de los pacientes, por lo que no supone ningún esfuerzo más para el paciente, ya que en una misma visita y con una misma muestra se puede hacer una radiografía sobre su estado nutricional y detectar posibles riesgos actuando de manera precoz y preventiva sobre la salud de los pacientes y en conjunto con otros profesionales de la salud como los nutricionistas para dirigir un tratamiento lo más individualizado al paciente.

3.5. BIBLIOGRAFÍA

1. World Gastroenterology Organisation. Disponible en: <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/inflammatory-bowel-disease-ibd/inflammatory-bowel-disease-ibd-spanish>. (Acceso 05/09/23)
2. Martínez Gómez, M. J., Melián Fernández, C., & Romeo Donlo, M. (2016). Nutrición en enfermedad inflamatoria intestinal. *Nutrición hospitalaria*, 33, 59-62.
3. Homepage | Crohn's & Colitis Foundation. Disponible en: <https://www.crohnscolitisfoundation.org/>. (Acceso 05/09/23)
4. Kang, Y., Kim, S., Kim, S. Y., & Koh, H. (2015). Effect of short-term partial enteral nutrition on the treatment of younger patients with severe Crohn's disease. *Gut and liver*, 9, 87.
5. Bischoff, S. C., Escher, J., Hébuterne, X., Kłęk, S., Krznaric, Z., Schneider, S. & Forbes, A. (2020). ESPEN practical guideline: Clinical Nutrition in inflammatory bowel disease. *Clinical Nutrition*, 39, 632-653.
6. Márquez, M. F., Martínez, Á. H., Duarte, Á. R., & Cobián, R. R. (2015). Estado actual del tratamiento de la colitis fulminante. *Cirugía Española*, 93, 276-282.
7. Martínez Gómez, M. J., Melián Fernández, C., & Romeo Donlo, M. (2016). Nutrición en enfermedad inflamatoria intestinal. *Nutrición hospitalaria*, 33, 59-62.
8. Detsky, A. S., Baker, J. P., Johnston, N., Whittaker, S., Mendelson, R. A., & Jeejeebhoy, K. N. (1987). What is subjective global assessment of nutritional status? *Journal of parenteral and enteral nutrition*, 11, 8-13.
9. Alayón, C. G., Crespo, C. P., Pedrosa, S. M., Benítez, J. M., Flores, E. I., Rodríguez, I. S. & García-Sánchez, V. (2018). Prevalence of iron deficiency without anaemia in inflammatory bowel disease and impact on health-related quality of life. *Gastroenterología y Hepatología*, 41, 22-29.
10. Gomollón, F., & Gisbert, J. P. (2013). Current management of iron deficiency anemia in inflammatory bowel diseases: a practical guide. *Drugs*, 73, 16, 1761-1770.
11. Kuzuya, M., Kanda, S., Koike, T., Suzuki, Y., & Iguchi, A. (2005). Lack of correlation between total lymphocyte count and nutritional status in the elderly. *Clinical Nutrition*, 24, 427-432.
12. Faintuch, J., Cabraitz Jr, R., Neto, A. M., Salem, M. Z., Yagi, O. K., Leme, R. B. A., Zilberstein, B., Ceconello, I. & Pinotti, H. W. (1992). Prognostic interest of cholesterol levels in malnourished patients with esophageal carcinoma. *Clinical Nutrition*, 11, 352-357.

13. Cabré Gelada, E. (2007). Nutrición y enfermedad inflamatoria intestinal. *Nutrición Hospitalaria*, 22, 65-73
14. García Luna, P. P., & López Gallardo, G. (2007). Evaluación de la absorción y metabolismo intestinal. *Nutrición Hospitalaria*, 22, 5-13.
15. Serrano, M. M., Beneit, M. S., Santurino, M. M., Armesilla, M. C., de Espinosa, M. G. M., & del Cerro, J. P. (2007). Técnicas analíticas en el estudio de la composición corporal. Antropometría frente a sistemas de bioimpedancia bipolar y tetrapolar. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*, 27, 11-19.
16. De-León-Rendón, J. L., López-Pérez, R. Y., Gracida-Mancilla, N. I., Jiménez-Bobadilla, B., Alarcón-Bernés, L., Mendoza-Ramírez, S., & Villanueva-Herrero, J. A. (2021). La escala control nutricional (CONUT): una herramienta prometedora para el cribado nutricional y como predictor de severidad en la colitis ulcerosa crónica idiopática. *Revista de Gastroenterología de México*, 86, 110-117.
17. Calleja Fernández, A., Vidal Casariego, A., Cano Rodríguez, I., & Ballesteros Pomar, M. D. (2015). Eficacia y efectividad de las distintas herramientas de cribado nutricional en un hospital de tercer nivel. *Nutrición Hospitalaria*, 31, 2240-2246.
18. Laboratorio de investigación de enfermedades gastrointestinales. Disponible en: <https://gastrolabperu.com/userfiles/cms/examen/documento/grasa.fecal.sudan.pdf> (Acceso 05/09/23)
19. Drummey, G. D., Benson Jr, J. A., & Jones, C. M. (1961). Microscopical examination of the stool for steatorrhea. *New England Journal of Medicine*, 264, 85-87.
20. Wells, C. W., Lewis, S., Barton, R. J., & Corbett, S. (2006). Effects of changes in hemoglobin level on quality of life and cognitive function in inflammatory bowel disease patients. *Inflammatory bowel diseases*, 12, 123-130.
21. Alayón, C. G., Crespo, C. P., Pedrosa, S. M., Benítez, J. M., Flores, E. I., Rodríguez, I. S., Medina, R. M. & García-Sánchez, V. (2018). Prevalence of iron deficiency without anaemia in inflammatory bowel disease and impact on health-related quality of life. *Gastroenterología y Hepatología (English Edition)*, 4, 22-29.
22. Pasricha, S. R., Tye-Din, J., Muckenthaler, M. U., & Swinkels, D. W. (2021). Iron deficiency. *The Lancet*, 397, 233-248.

23. Chaubal, A., Pandey, V., Choksi, D., Poddar, P., Ingle, M., Phadke, A., & Sawant, P. (2017). Anemia in patients with ulcerative colitis in remission: A study from western India. *Indian Journal of Gastroenterology*, 36, 361-365
24. Portela, F., Lago, P., Cotter, J., Gonçalves, R., Vasconcelos, H., Ministro, P., Lopes, S., Eusébio, M., Morna, H., Cravo, M. & Magro, F. (2016). Anaemia in patients with inflammatory bowel disease-a nationwide cross-sectional study. *Digestion*, 93, 214-220.
25. Ott, C., Liebold, A., Taksas, A., Strauch, U. G., & Obermeier, F. (2012). High prevalence but insufficient treatment of iron-deficiency anemia in patients with inflammatory bowel disease: results of a population-based cohort. *Gastroenterology research and practice*, 2012, 1-7.
26. Werner, T., Wagner, S. J., Martínez, I., Walter, J., Chang, J. S., Clavel, T., & Haller, D. (2011). Depletion of luminal iron alters the gut microbiota and prevents Crohn's disease-like ileitis. *Gut*, 60, 325-333.
27. Zimmermann, M. B., Chassard, C., Rohner, F., N'goran, E. K., Nindjin, C., Dostal, A., Utzinger, J., Ghattas, H., Lacroix, C. & Hurrell, R. F. (2010). The effects of iron fortification on the gut microbiota in African children: a randomized controlled trial in Cote d'Ivoire. *The American journal of clinical nutrition*, 92, 1406-1415.
28. Bhandari, S., Pereira, D. I., Chappell, H. F., & Drakesmith, H. (2018). Intravenous irons: from basic science to clinical practice. *Pharmaceuticals*, 11, 82-102.
29. Maaser, C., Sturm, A., Vavricka, S. R., Kucharzik, T., Fiorino, G., Annesse, V., V., Calabrese, E., Baumgart, D.C., Bettenworth, D., Borralho Nunes, P. and Burisch, J. & European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO] and the European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology [ESGAR]. (2019). ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications. *Journal of Crohn's and Colitis*, 13, 144-164K.
30. Jiménez, A., Simian, D., & Quera, R. (2017). Mortalidad en enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterol. latinoam*, 28, 231-237.
31. Barreiro, A. E., Villarino, A. A., & Teresa, M. Influencia de la nutrición y hábitos de vida en el riesgo cardiovascular en la EII.
32. ¿Es todo malo en el colesterol? Disponible en: <https://www.centralmedica.es/blogmedico/37-es-todo-malo-en-el-colesterol>. (Acceso 05/09/23).
33. Castelli, W. P. (1984). Epidemiology of coronary heart disease: the Framingham study. *The American journal of medicine*, 76, 4-12.

34. Zubiaga Toro, L., Ruiz-Tovar, J., Giner, L., González, J., Aguilar, M. D. M., García, A., Calpena, R. & Durán, M. (2016). Valoración del riesgo cardiovascular después de gastrectomía vertical: comparativa del IMC, la adiposidad, el índice de Framingham y el índice aterogénico como marcadores del éxito de la cirugía. *Nutrición Hospitalaria*, 33, 832-837.
35. García Díaz, J. D.; Mesa Latorre, J. M.; Valbuena Parra, A. R.; Corps Fernández, D. (2016). *Protocolo diagnóstico de las dislipidemias. Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12, 1107-1110.
36. Soh, H., Im, J. P., Han, K., Park, S., Hong, S. W., Moon, J. M., & Kim, J. S. (2020). Crohn's disease and ulcerative colitis are associated with different lipid profile disorders: a nationwide population-based study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 51, 446-456.
37. Biyyani, R. S. R. S., Putka, B. S., & Mullen, K. D. (2010). Dyslipidemia and lipoprotein profiles in patients with inflammatory bowel disease. *Journal of clinical lipidology*, 4, 478-482.
38. Ripollés Piquer, B., Nazih, H., Bourreille, A., Segain, J. P., Huvelin, J. M., Galmiche, J.-P., & Bard, J.-M. (2006). Altered lipid, apolipoprotein, and lipoprotein profiles in inflammatory bowel disease: consequences on the cholesterol efflux capacity of serum using Fu5AH cell system. *Metabolism*, 7, 55-62.
39. Fan, F., Mundra, P. A., Fang, L., Galvin, A., Moore, X. L., Weir, J. M., & Dart, A. M. (2015). Lipidomic profiling in inflammatory bowel disease: comparison between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*, 21, 1511-1518.
40. Ferreiro, R., Lopez-Diaz, J., Lorenzo, A., Dominguez-Munoz, J. E., & Barreiro-de Acosta, M. (2017). P204 Lipid profile in inflammatory bowel disease under maintenance with anti-TNF: a prospective longitudinal cohort study. *Journal of Crohn's and Colitis*, 11, S180-S180.
41. Nuñez, P., Mateo, S. G., Quera, R., & Gomollón, F. (2021). La enfermedad inflamatoria intestinal y los riesgos de enfermedad cardiovascular. *Gastroenterología y Hepatología*, 44, 236-242.
42. Ramos, L. R., Sachar, D. B., DiMaio, C. J., Colombel, J. F., & Torres, J. (2016). Inflammatory bowel disease and pancreatitis: a review. *Journal of Crohn's and Colitis*, 10, 95-104.
43. Garrido Gómez, E., López San Román, A., & Bermejo San Jose F. (2008). Idiopathic pancreatitis in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2, 237-240.

44. Rustemovic, N., Ravic, K. G., Čavka, S. Č., Anzulovic, D., Brljak, J., Rogic, D. & Kuzman, M. R. (2009). P081-Pancreatic insufficiency in inflammatory bowel disease. Assessment by fecal elastase-1. *Journal of Crohn's and Colitis*, 1, S43.
45. Massironi, S., Rossi, R. E., Cavalcoli, F. A., Della Valle, S., Fraquelli, M., & Conte, D. (2013). Nutritional deficiencies in inflammatory bowel disease: therapeutic approaches. *Clinical nutrition*, 32, 904-910.
46. Rodríguez-Rodríguez, E., Aparicio, A., López-Sobaler, A. M., Ortega, R. M. (2011). Vitamin D status in a group of Spanish schoolchildren. *Minerva Pediátrica*. 63, 11-18.
47. Mena Bares, L. M., Benítez Cantero, J. M., Iglesias Flores, E., Gros Alcalde, B., Moreno Ortega, E., Maza Muret, F. R., Carmona Asenjo, E., García Sánchez, M. V. & Vallejo Casas, J.A., J. A. (2019). Malabsorción de ácidos biliares en pacientes con diarrea crónica y enfermedad de Crohn. *Revista española de enfermedades digestivas*, 36, 40-45.
48. Filipsson, S., Hultén, L., & Lindstedt, G. (1978). Malabsorption of fat and vitamin B12 before and after intestinal resection for Crohn's disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 13, 529-536.
49. Dini, E., Toro, O., & Azuaje, A. (2002). Sudan III y esteatocrito en la detección de grasa fecal en niños desnutridos. *GEN*, 73-83.
50. Sandhu, A., Mosli, M., Yan, B., Wu, T., Gregor, J., Chande, N., Ponich, T., Beaton, M., Rahman, A. (2015). Self-Screening for Malnutrition Risk in Outpatient Inflammatory Bowel Disease Patients Using the Malnutrition Universal Screening Tool (MUST). *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 40, 507-510.
51. Jansen, I., Prager, M., Valentini, L., & Büning, C. (2016). Inflammation-driven malnutrition: a new screening tool predicts outcome in Crohn's disease. *British Journal of Nutrition*, 116, 1061-1067.
52. Salinas, M., Flores, E., Blasco, A., López-Garrigós, M., Puche, C., Asencio, A., & Leiva-Salinas, C. (2020). CONUT: a tool to assess nutritional status. First application in a primary care population. *Diagnosis*, 8, 373-376.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

La problemática principal abordada en esta Tesis ha sido el desarrollo de diferentes métodos analíticos que permitan seguir estudiando la EII y que mediante la monitorización de VOCs en muestras clínicas y el desarrollo de modelos quimiométricos se puedan generar herramientas que ayuden en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad EII. Los resultados obtenidos demuestran que las muestras clínicas de sangre, orina y heces de pacientes con EII contiene una alta riqueza de información que se pasa por alto en los análisis rutinarios que se realizan para el diagnóstico de la enfermedad.

Los métodos analíticos desarrollados en esta Tesis Doctoral y basados en la GC acoplada a MS e IMS han demostrado un gran potencial para la clasificación de pacientes con EII, así como para la diferenciación entre los diferentes estadios de la enfermedad (enfermedad activa o en remisión).

Ambas técnicas son no invasivas, son rápidas y robustas siendo una útil alternativa o complemento a los métodos de diagnósticos actuales más agresivos, ayudando así a la calidad de vida del paciente.

Mediante la estrategia metabolómica dirigida se pudieron identificar marcadores específicos presentes en las muestras analizadas. Sin embargo, dependiendo del conjunto de muestras y la matriz utilizada se pueden obtener resultados contradictorios. Este hecho, unido a la importante variabilidad dentro de cada grupo, justifica la necesidad de realizar modelos quimiométricos que permitan trabajar con toda la huella dactilar de las muestras, sin establecer marcadores específicos.

Las estrategias metabolómicas no dirigidas propuestas con permitieron obtener un éxito de la clasificación del 100% para discriminar entre pacientes con EII y voluntarios sanos tanto usando las muestras de orina como de suero. Sin embargo, sólo las muestras de suero son adecuadas para discriminar entre pacientes con EII en fase activa o en remisión.

A pesar de estos resultados, se debe seguir investigando estas metodologías, aumentando el número de muestras, además de evaluar la influencia en la clasificación de las otras enfermedades inflamatorias.

El estudio del metabolismo del hierro, el perfil lipídico y el estado nutricional de los pacientes con EII ha permitido valorar la malnutrición y desnutrición entre las diferentes

entidades de la enfermedad (CU o EC). Así como en los diferentes estadios de la enfermedad (activa o en remisión).

Se ha detectado deficiencia de hierro en más del 55% de los enfermos de EII estudio observando ferropenia en el 31,5% de los participantes. Aunque no se encontraron diferencias significativas en el perfil del hierro (hierro sérico, ferritina, transferrina, hemoglobina e IST) entre los pacientes con CU y EC, ni entre activos y remisión. Si se apreciaron valores más bajos de hierro sérico y hemoglobina entre la población activa, lo que puede suponer un ser parámetros útiles de monitorear para la detección precoz de la anemia.

Aunque se encontraron niveles de hipercolesterolemia en el 50% de los pacientes con EII, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos estudiados el perfil lipídico (colesterol, HDL, LDL y triglicéridos). Además, el riesgo de aterogenia calculado con índice de Castelli mostró que el 45,5% de los participantes tenían con riesgo cardiovascular.

En el estudio de la malabsorción mediante la visualización microscópica de las heces se detectó amilorrrea en más del 10% de los pacientes, creatorrea en el 46% y esteatorrea o grasa en heces en un 44% de los estudiados. Observando los peores datos de digestión en las heces en pacientes en remisión.

La escala de valoración nutricional CONUT ha demostrado ser una herramienta útil para prevenir casos graves de desnutrición e ingresos hospitalarios y su aplicación en esta Tesis demostró que el 18% de los pacientes presentaban una desnutrición moderada. Finalmente, los estudios de los valores de CF en los pacientes con CONUT ≥ 2 fueron mayores que los obtenidos en paciente con CONUT < 2 .

ANEXOS



PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

La presente Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones, que se han presentado en Congresos Nacionales:

Application of untargeted volatile profiling in inflammatory bowel disease research.

Arroyo-Manzanares, N.; García-Nicolás, M.; Abellán-Alfocea, F.; Prieto-Baeza, L.; del Val Oliver, B.; Zarauz-García, J.; Sáenz, L.; Viñas, P.

Analytical and Bioanalytical Chemistry 2023,1-9.

<https://doi.org/10.1007/s00216-023-04748-x>

Presentado como comunicación oral en “VII Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia”, Murcia (2022).



Ion Mobility Spectrometry for the Metabolomic Study of Inflammatory Bowel Disease Using the Volatile Organic Compounds Profile in Human Serum and Urine.

García-Nicolás, M.; Pérez-Álvarez, M. C.; Abellán-Alfocea, F.; Arroyo-Manzanares, N.; Campillo, N.; del Val-Oliver, B.; Jiménez-Santos, E.; Zarauz-García, J.; Sáenz, L.; Viñas, P.

Chemosensors 2023, 11, 139.

<https://doi.org/10.3390/chemosensors11020139>



Índice CONUT como método de detección de desnutrición silenciosa en la enfermedad inflamatoria intestinal.

Sáenz-Mateos, L. F.; Abellán-Alfocea, F.; Cadenas-García, V.; Pérez-Laserna, A., Aradra-Romera, R.; Zarauz García, J. M.

Presentado como poster en el “XXIX Congreso Andaluz de la Sociedad Andaluza de Análisis Clínicos y Medicina del Laboratorio”, Granada 2023.



ABREVIATURAS



ABREVIATURAS

AINES – Antiinflamatorios no esteroideos

ANCA – Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos

ANOVA – Análisis de la mutivarianza

ASCA – Anticuerpos anti-saccharomyces cerevisiae

CC – Corriente continua

CD – Descarga de corona

CDAI – Índice de actividad de la enfermedad de Crohn

CDEIS – Índice endoscópico de severidad de la enfermedad de Crohn

CF – Calprotectina fecal

CI – Ionización química

CMV – Citomegalovirus

CONUT – Método de control nutricional

CR – Tasa de clasificación

CT – Colesterol total

CU – Colitis ulcerosa

EC – Enfermedad de Crohn

ECCO - Organización Europea de Crohn y Colitis

EI – Impacto electrónico

EII – Enfermedad Inflamatoria Intestinal

ELISA - Enzimoimmunoanálisis de adsorción

ESI – Electroionización por electrospray

ESPEN – Sociedad Europea de Nutrición Clínica y Metabolismo

FT-ICR-MS – Espectrometría de masas por resonancia de ciclotrón iónico con transformación de fourier

GC – Cromatografía de gases

GWAS – Estudios de asociación del genoma

H¹- RMN – Espectroscopia por resonancia magnética nuclear de protones

HDL – Lipoproteínas de alta densidad

HGB – Hemoglobina

HRMS – Espectrometría de masas de alta resolución

HS – Espacio de cabeza

IC – Intervalo confianza

IL– Interleucina

IMS – Espectrometría de movilidad iónica

IQR – Rango intercuartílico

IST – Índice de saturación de la transferrina

IT – Trampa de iones

LC - Cromatografía líquida

LDL – Lipoproteínas de baja densidad

LF – Lactoferrina fecal

LOQ – Límite de cuantificación

LSD – Diferencia mínima significativa

m/z – Relación masa carga

MRM – Monitorización de reacción múltiple

MS – Espectrometría de masas

MS/MS – Espectrometría de masas en tandem

MSI-CE – Electroforesis capilar de inyección multisegmento

NIST – National Institute of Standards and Technology

OMS- Organización Mundial de la Salud

OPLS-DA – Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales

PCA – Análisis de componentes principales

PCR – Proteína C reactiva

Q – Cuadrupolo

QqQ – Triple cuadrupolo

QC - Control de calidad

RF – Radiofrecuencia

RIP – Pico de iones reactantes

SCAN – Adquisición de datos por barrido completo

SIM – Monitorización de iones seleccionados

SIR – Grabación de iones seleccionados

S/N – Señal/Ruido

SNP – Polimorfismo de nucleótido único

SPME – Microextracción en fase sólida

SUS – Estructuras compartidas únicas

TNF– Factor de necrosis tumoral

TOF – Tiempo de vuelo

UCEIS – Índice endoscópico de severidad en colitis ulcerosa

UV – Varianza unitaria

VCM – Volumen corpuscular medio

VEB – Virus de Epstein-Barr

VHB – Virus Hepatitis B

VHC – Virus Hepatitis C

VIP – Influencia variable en las proyecciones

VOCS – Compuestos orgánicos volátiles

V.R. – Valores de referencia

VSG – Velocidad de sedimentación glomerular

ÍNDICE DE TABLAS



INTRODUCCIÓN.

Tabla I.1. Criterios de Lennard-Jones para el diagnóstico de la EII	20
Tabla I.2. Manifestaciones clínicas de la EC y la CU	21
Tabla I.3. Valores normales de un hemograma	22
Tabla I.4. Papel de la combinación de autoanticuerpos en la enfermedad inflamatoria intestinal	27
Tabla I.5. Índice endoscópico de severidad en colitis ulcerosa	30
Tabla I.6. Índice endoscópico de severidad en enfermedad de Crohn	31
Tabla I.7. Principales fórmulas orales de 5-ASA	33
Tabla I.8. Principales agentes biológicos	35
Tabla I.9. Clasificación de Montreal para la EC	37
Tabla I.10. Clasificación de Montreal para la CU	37
Tabla I.11. Índice de Harvey Bradshaw para la EC	38
Tabla I.12. Índice de Truelove-Witts para la CU	39
Tabla I.13. Índice de actividad de la Clínica Mayo para la gravedad de la colitis ulcerosa.	40

CAPÍTULO 1.

Tabla 1.1. Características clínicas y demográficas de los pacientes a estudio.	80
Tabla 1.2. Compuestos detectados e identificados en las muestras de suero	86

CAPÍTULO 2.

Tabla 2.1. Datos demográficos de los pacientes control sanos y con EII	102
Tabla 2.2. VOCs identificados por HS-GC-IMS en muestras de orina y suero	111
Tabla 2.3. Curvas de calibración, y parámetros de calidad de los compuestos identificados por HS-GC-IMS en las muestras de orina y suero, usando como respuesta analítica la suma de intensidad del monómero y dímero	115
Tabla 2.4. Concentraciones medias ($\mu\text{g/mL}$) y desviación típica de los VOCs identificados en cada categoría, incluidos los resultados de la prueba LSD para las muestras de orina	116
Tabla 2.5. Concentraciones medias ($\mu\text{g/mL}$) y desviación típica de los VOCs identificados en cada categoría, incluidos los resultados de la prueba LSD para las muestras de suero.	116

Tabla 2.6. Selección del pretratamiento de los datos HS-GC-IMS y modelo quimiométrico para la clasificación de muestras de orina y suero entre pacientes sanos y enfermos.....	120
Tabla 2.7. Selección del pretratamiento de los datos HS-GC-IMS y modelo quimiométrico para la clasificación de muestras de suero y orina entre pacientes con EII con la enfermedad activa o en remisión.....	121

CAPÍTULO 3.

Tabla 3.1. Datos demográficos de los pacientes con EC y CU activos y en remisión	134
Tabla 3.2. Tipos de tubos utilizados y parámetros analizados en cada extracción ...	137
Tabla 3.3. Clasificación de la digestión según grasa fecal	138
Tabla 3.4. Incidencia de pacientes con CU, EC, activos y remisión, según los parámetros del metabolismo del hierro	140
Tabla 3.5. Análisis estadístico del hierro sérico ($\mu\text{g/dL}$) en la población de EII	142
Tabla 3.6. Análisis estadístico de la ferritina ($\mu\text{g/dL}$) en la población de EII.....	143
Tabla 3.7. Análisis estadístico del IST (%) en la población de EII.....	144
Tabla 3.8. Análisis estadístico de la HGB (g/dL) en la población de EII	145
Tabla 3.9. Análisis estadístico del VCM (fL) en la población de EII.....	146
Tabla 3.10. Análisis estadístico de la PCR (mg/dL) en la población de EII	147
Tabla 3.11. Incidencia de pacientes con déficit de hierro, ferropenia y anemia.....	150
Tabla 3.12. Valores normales de los parámetros lipídicos	152
Tabla 3.13. Incidencia de pacientes con CU, EC, activos y remisión, según los parámetros del metabolismo lipídico.....	152
Tabla 3.14. Análisis estadístico del CT (mg/dL) en la población de EII.....	153
Tabla 3.15. Análisis estadístico de los triglicéridos (mg/dL) en la población de EII. ..	154
Tabla 3.16. Análisis estadístico del HDL (mg/dL) en la población de EII.....	154
Tabla 3.17. Análisis estadístico del LDL en la población de EII	155
Tabla 3.18. Distribución de pacientes con riesgo aterogénico en la población con EII	158
Tabla 3.19. Análisis estadístico del índice de Castelli en la población de e EII	159
Tabla 3.20. Puntuación screening CONUT.....	165
Tabla 3.21. Análisis de ANOVA del índice del CONUT.....	166
Tabla 3.22. Pacientes con CONUT leve o moderado según factores de confusión. .	166
Tabla 3.23. Análisis estadístico de la calprotectina (g/dL) en la población de EII.....	167

ÍNDICE DE FIGURAS



INTRODUCCIÓN

Figura I.1. Esquema de afectación de la EC	6
Figura I.2. Esquema de afectación de la CU.	6
Figura I.3. Incidencia de EII España en 2017.	9
Figura I.4. Poblaciones celulares clave y mediadores de la homeostasis del intestino y patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal.....	11
Figura I.5. Microbiota intestinal y disbiosis en EII.	13
Figura I.6. Características y síntomas de la EII.	17
Figura I.7. Manifestaciones cutáneas.....	19
Figura I.8. Utilidad de la CF durante la evolución de la EII.	25
Figura I. 9. Kit de detección de CF basado en la inmunocromatografía.....	26
Figura I.10. Mutación del gen NOD2/CARD en la EC.....	28
Figura I.11. Cápsula endoscópica.....	29
Figura I.12. Imagen colonoscopia CU severa con pérdida de patrón vascular.	29
Figura I.13. Línea actual de tratamiento de la EII.	32
Figura I.14. Métodos analíticos previamente descritos para la detección de la EII.	42
Figura I.15. Flujo de trabajo en metabolómica dirigida y no dirigida.	44
Figura I.16. Esquema detallado sobre el flujo de trabajo del análisis metabolómico no dirigido.....	45
Figura I.17. Representación muestreo en espacio de cabeza.....	47
Figura I.18. Diagrama de flujo de los elementos constituyentes de un MS convencional.	49
Figura I.19. Esquema de un analizador de masas cuadrupolo simple convencional. .	51
Figura I.20. Esquema completo de un instrumento GC-MS.....	53
Figura I.21. Esquema general de un espectrómetro de movilidad iónica.....	57
Figura I.22. Ejemplo de espectro de separación de compuestos orgánicos por GC-IMS	59

CAPÍTULO 1

Figura 1.1. Optimización del volumen de muestra (A) y tiempo de incubación (B). ...	84
Figura 1.2. Cromatograma HS-GC-MS de un suero humano donde se muestran los compuestos identificados.....	86
Figura 1.3. Diagrama de probabilidad normal de residuos.	87
Figura 1.4. Gráfico de puntuación del modelo PCA para diferenciar entre individuos sanos sin EII y pacientes con EII.	88
Figura 1.5. Separación de muestras de EII y voluntarios sanos sin EII.	89

Figura 1.6. Gráfico de permutaciones para el modelo OPLS-DA utilizando 50 permutaciones aleatorias.....	90
Figura 1.7. Gráfico de influencia variable en las proyecciones (VIP) para la clasificación de pacientes con EII	91
Figura 1.8. Análisis gráfico de estructuras compartidas y únicas (SUS) comparando modelos OPLS-DA específicos de género (femenino (eje x) y masculino (eje y)) para diferenciar entre voluntarios sanos sin EII y pacientes con EII.....	92

CAPÍTULO 2

Figura 2.1. Área sumatoria de marcadores obtenidos para optimización de volumen con muestras de suero (A) y orina (B).	106
Figura 2.2. Superficie de respuesta estimada obtenida en la optimización del método HS-GC-IMS para las muestras de suero (A) y orina (B), utilizando un diseño compuesto central (23 + estrella, centrado en las caras), con tres puntos centrales espaciados.	107
Figura 2.3. Mapas topográficos obtenidos temperatura del tubo de deriva entre 60 y 90 °C utilizando un método univariante para el suero.	108
Figura 2.4. Mapas topográficos obtenidos con el método HS-GC-IMS optimizado para las muestras de suero y orina de un paciente con EII activa.....	109
Figura 2.5. Espectros obtenidos tras el análisis de muestras de orina de pacientes con EII activa, en remisión y de los voluntarios sanos sin EII.	110
Figura 2.6. Espectros obtenidos tras el análisis de muestras de suero de pacientes con EII activa, en remisión y de los voluntarios sanos sin EII.	110
Figura 2.7. Mapas topográficos mostrando la identificación de los compuestos orgánicos volátiles en las muestras de orina (A) y suero (B).....	112
Figura 2.8. Comparación de la intensidad de los compuestos identificados en las muestras de orina (A) y suero (B) de cada categoría	113
Figura 2.9. Diagrama de probabilidad normal residual obtenido a partir de muestras de orina.	118
Figura 2.10. Diagrama de probabilidad normal residual obtenido a partir de muestras de suero.....	119
Figura 2.11. (A) Gráfico de <i>score</i> del modelo binario OPLS-DA utilizando datos normalizados con respecto a la intensidad RIP y el escalado UV para discriminar entre orina de enfermos y sanos. (B) Gráfico de <i>score</i> del modelo OPLS-DA binario utilizando datos normalizados con respecto a la intensidad RIP y el escalado UV para discriminar entre la orina de pacientes con EII en fase activa o en remisión.....	122

Figura 2.12. (A) Gráfico de score del modelo OPLS-DA binario utilizando escalado UV para discriminar entre el suero de voluntarios con EII enfermos y sanos. (B) Gráfico de score del modelo OPLS-DA binario utilizando datos normalizados con respecto a la intensidad RIP y el escalado UV para discriminar entre el suero de pacientes con EII en fase activa o en remisión 123

CAPÍTULO 3

Figura 3.1. (A) Incidencia de la EC, CU y EII no clasificada y (B) distribución del estado de la enfermedad en la población de estudio 133

Figura 3.2. Tubos de recolección de muestras de orina y sangre..... 136

Figura 3.3. Muestra de heces al microscopio, a la derecha una mala digestión de la grasa con presencia de gotas y a la izquierda detección de almidón y fibra en heces. 139

Figura 3.4. Dispersión y simetría del nivel de hierro sérico entre los pacientes con EII. 142

Figura 3.5. Dispersión y simetría del nivel de ferritina entre los pacientes con EII. 144

Figura 3.6. Dispersión y simetría del nivel de IST entre los pacientes con EII. 145

Figura 3.7. Dispersión y simetría del nivel de HGB entre los pacientes con EII. 146

Figura 3.8. Dispersión y simetría del nivel de VCM entre los pacientes con EII. 147

Figura 3.9. Dispersión y simetría de los niveles de PCR entre los pacientes con EII 148

Figura 3.10. Dispersión y simetría del nivel de CT en los pacientes con EII. 153

Figura 3.11. Dispersión y simetría del nivel de triglicéridos en los pacientes con EII. 154

Figura 3.12. Dispersión y simetría del nivel de HDL en los pacientes con EII..... 155

Figura 3.13. Dispersión y simetría del nivel de LDL en los pacientes con EII. 156

Figura 3.14. Pacientes con heces patológicas entre nuestra población de EII. 160

Figura 3.15. Distribuciones pacientes con amilorrrea según EC, CU, activo y remisión. 161

Figura 3.16. Distribuciones pacientes con creatorrea según EC, CU, activo y remisión. 162

Figura 3.17. Distribuciones pacientes con esteatorrea según EC, CU, activo y remisión. 163

Figura 3.18. Distribuciones pacientes según puntuación CONUT. 165

Figura 3.19. Dispersión y simetría de los niveles de CF entre los pacientes con EII. 168