



MÁSTER
UNIVERSITARIO EN
INVESTIGACIÓN
Y MEDICINA
CLÍNICA



FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

TRABAJO FIN DE MÁSTER

PAPEL DE LAS CÉLULAS iNKTs EN LA CIRROSIS HEPÁTICA

Alumno: Benjamín Palomo Linares

Tutor: Esther Caparrós Cayuela

Curso: 2023-2024

INDICE

ABSTRACT	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
1. Interacción del Complejo Antígeno-CD1d con el TCR de las Células iNKT	6
2. Transducción de Señales Intracelulares	6
3. Secreción de Citocinas y Activación Inmunológica	6
4. Función de las Células iNKT	6
5. Papel de la traslocación bacteriana (BT) en cirrosis hepática	6
6. Inflamación Hepática y Células iNKT	8
7. Relación con Alteraciones Hemodinámicas	8
HIPÓTESIS	9
OBJETIVOS	9
METODOLOGÍA.....	10
1. Diseño del estudio:.....	10
2. Lugar del estudio:.....	10
3. Tiempo de ejecución del estudio:	10
4. Sujetos de estudio:.....	10
5. Criterios de inclusión:.....	12
6. Criterios de exclusión:.....	12
7. Variables a estudio:.....	12
8. Variables obtenidas:.....	12
9. Recogida de variables.....	13
10. Métodos de laboratorio	13
10.1 Procedimiento previo a la citometría de flujo:	13
10.2 Principio Básico de la Citometría de Flujo:.....	14
10.3 Análisis y presentación de datos en la citometría:.....	14
10.4 Controles y estándares:.....	15
10.5 Cuantificación y Análisis Estadístico.....	15
10.6 Materiales y reactivos necesarios:	16
10.7 Procedimiento secuencial del ELISA.....	16
PLAN DE TRABAJO	17
EXPERIENCIA DEL EQUIPO INVESTIGADOR	19
MARCO ESTRATÉGICO.....	19

MEDIOS DISPONIBLES PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO.....	20
JUSTIFICACIÓN	21
VIABILIDAD DEL PROYECTO.....	22
CAPACIDAD DEL PROYECTO DE APORTAR INFORMACIÓN RELEVANTE.....	22
CONTRIBUCIÓN DEL ALUMNO	23
BIBLIOGRAFÍA.....	24
ANEXO I	27
ANEXO II	29
ANEXO III (CÓDIGO COIR).....	30

ABSTRACT

Introduction

The hemodynamic consequences of bacterial translocation (BT) in advanced chronic liver disease are examined, and known. BT triggers the activation of the immune system and leads to a sustained inflammatory response. Proinflammatory cytokines exacerbate hemodynamic alterations in cirrhosis, especially at the hepatic, cardiovascular, and renal levels. The contribution of type I natural killer T cells (iNKTs) to chronic liver disease remains unknown.

Hypothesis

CD1d-mediated activation of type I natural killer T cells (iNKTs) with glycolipid antigens from intestinal bacteria predicts increased cardiac output and poor prognosis in patients with advanced chronic liver disease.

Objectives

Main Objective: To characterize iNKT levels in peripheral blood of cirrhotic patients. Detect circulating iNKTs and their subtypes (iNKT1, iNKT2, iNKT10, iNKT17). Analyze proinflammatory cytokines secreted by different iNKT subtypes: IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17. Secondary Objectives: Detect bacterial translocation (BT) in serum and subgroup patients according to BT+/BT-. Determine if there are statistically significant differences in the number of iNKTs in BT- cirrhotic patients compared to BT+. Do they have fewer iNKTs? Do they present a different microbiota or immunological profile?

Methodology

An experimental study will be conducted using whole blood samples from cirrhotic patients at the Hospital General de Alicante. The abundance of each iNKT subtype will be analyzed using flow cytometry, and proinflammatory cytokines secreted will be analyzed using ELISA (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17). Statistical analyses will be performed using the R bioinformatics software.

KEYWORDS: *Liver Cirrhosis; Natural Killer T-Cells; Antigens, CD1d; Intestinal Microbiota; Renal Insufficiency*

RESUMEN

Introducción

Las consecuencias hemodinámicas de la translocación bacteriana (BT) en la enfermedad hepática crónica avanzada son conocidos. La BT desencadena la activación del sistema inmunológico y conduce a una respuesta inflamatoria sostenida. Las citoquinas proinflamatorias promueven un empeoramiento de las alteraciones hemodinámicas durante la cirrosis, especialmente a nivel hepático, cardiovascular y renal. La contribución de las iNKTs a la enfermedad hepática crónica sigue siendo en parte desconocida.

Hipótesis

La activación mediada por CD1d de las células T natural killer tipo I (iNKTs) con antígenos de glicolípidos de bacterias intestinales predice un aumento del gasto cardíaco y un mal pronóstico en pacientes con enfermedad hepática crónica avanzada.

Objetivos

Objetivo principal: Caracterizar los niveles de iNKTs en sangre periférica de pacientes con cirrosis, detectar porcentaje de iNKTs circulantes y subtipos (iNKT1, iNKT2, iNKT10, iNKT17). así como de citoquinas secretadas por diferentes subtipos de iNKTs, entre ellos IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17.

Objetivos secundarios: Detectar traslocación bacteriana (BT) en suero y subdividir pacientes según BT+/BT-. Además, comprobar si hay diferencias estadísticamente significativas entre el número de iNKTs en los pacientes cirróticos BT- respecto a los BT+ y evaluar el perfil de microbiota intestinal.

Metodología

El estudio es un estudio experimental en el cual utilizaremos las muestras de sangre completa de pacientes con cirrosis pertenecientes al área de salud del Hospital General de Alicante, y mediante citometría de flujo estudiaremos la abundancia de cada subtipo de iNKTs. En estas muestras evaluaremos los niveles de citoquinas secretadas mediante ELISA (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17). Los análisis estadísticos se realizarán con el software de bioestadística R.

PALABRAS CLAVE: cirrosis hepática, células natural killer T, antígeno CD1d, microbiota intestinal, insuficiencia renal.

INTRODUCCIÓN

Las células T invariantes natural killer (iNKT) son un subtipo único de linfocitos T con características inmunes innatas y adaptativas (1). A diferencia de las células T convencionales que reconocen antígenos presentados por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), las células iNKT reconocen glicolípidos presentados por la molécula CD1d (2,3). Esta peculiaridad les confiere la capacidad de responder rápidamente a estímulos antigénicos, lo que las convierte en reguladores clave de la respuesta inmune.

La activación del receptor CD1 por células iNKT es un proceso fundamental que desencadena la respuesta inmune mediada por estas células.

Presentación de Antígenos por CD1d: Las células iNKT reconocen glicolípidos presentados por la molécula CD1d en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC), como los macrófagos, células dendríticas y células B (1,4,5). El CD1d es una molécula de clase I similar al MHC que tiene la capacidad de unir y presentar glicolípidos a las células iNKT.

1. Interacción del Complejo Antígeno-CD1d con el TCR de las Células iNKT: Una vez que un glicolípido se une a la molécula CD1d en la membrana de la APC, forma un complejo antígeno-CD1d. Este complejo es reconocido por el receptor de células iNKT, llamado TCR (T cell receptor). El TCR de las células iNKT reconoce específicamente tanto el glicolípido como la molécula CD1d, lo que activa la célula iNKT.

2. Transducción de Señales Intracelulares: La interacción entre el complejo antígeno-CD1d y el TCR desencadena una serie de eventos intracelulares que conducen a la activación de las células iNKT. Esto incluye la fosforilación de proteínas adaptadoras como la proteína quinasa C (PKC) y la fosfolipasa C (PLC), que a su vez activan cascadas de señalización como la vía del MAPK (quinasa activada por mitógenos) y la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K).

3. Secreción de Citocinas y Activación Inmunológica: La activación de las células iNKT resulta en la secreción rápida de una variedad de citocinas, incluyendo el interferón gamma (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), y la interleucina 4 (IL-4), entre otros. Estas citocinas son potentes mediadores de la respuesta inmune, y desempeñan un papel crucial en la regulación de la inflamación, la activación de otras células inmunes y la modulación de la respuesta adaptativa (1,3–5).

4. Función de las Células iNKT: Las células iNKT desempeñan un papel fundamental en la regulación de la inflamación y la tolerancia inmunológica. Su capacidad para producir grandes cantidades de citocinas inmediatamente después de la activación las convierte en mediadores cruciales en la respuesta inmune, particularmente en la modulación de la inflamación.

5. Papel de la traslocación bacteriana (BT) en cirrosis hepática: La cirrosis hepática puede provocar una disfunción en la barrera intestinal, lo que significa que la pared del intestino delgado se vuelve más permeable. Esto permite que las bacterias y sus productos, como los lipopolisacáridos (LPS), atraviesen la barrera intestinal y entren en la circulación sanguínea (6–13).

Además, la cirrosis puede causar cambios en la composición y función de la microbiota intestinal, lo que se conoce como disbiosis. Estos cambios pueden favorecer el crecimiento de bacterias

patógenas y la disminución de las bacterias beneficiosas, lo que aumenta el riesgo de translocación bacteriana.

Otro factor a tener en cuenta es un aumento de la presión en la vena porta, lo que puede provocar congestión esplácnica y dilatación de las venas del tracto gastrointestinal. Esto puede comprometer la integridad de la mucosa intestinal y facilitar la translocación de bacterias desde el intestino hacia la circulación sistémica.

Por último, hay una evidencia sólida de que la cirrosis se asocia con disfunción del sistema inmunológico y de la hemostasia, incluida una disminución de la actividad fagocítica de los macrófagos hepáticos y una reducción en la producción de inmunoglobulinas. Estos cambios pueden hacer que el organismo sea menos capaz de combatir las bacterias que ingresan al torrente sanguíneo desde el intestino.

La traslocación bacteriana (BT) desencadena la activación del sistema inmunológico y conduce a una respuesta inflamatoria sostenida (10,11,13–15). Las citoquinas proinflamatorias promueven un empeoramiento de las alteraciones hemodinámicas durante la cirrosis, especialmente a nivel hepático, cardiovascular y renal (5,14,16–21). La contribución de las iNKTs a la enfermedad hepática crónica sigue siendo desconocida. Ver Figura 1.

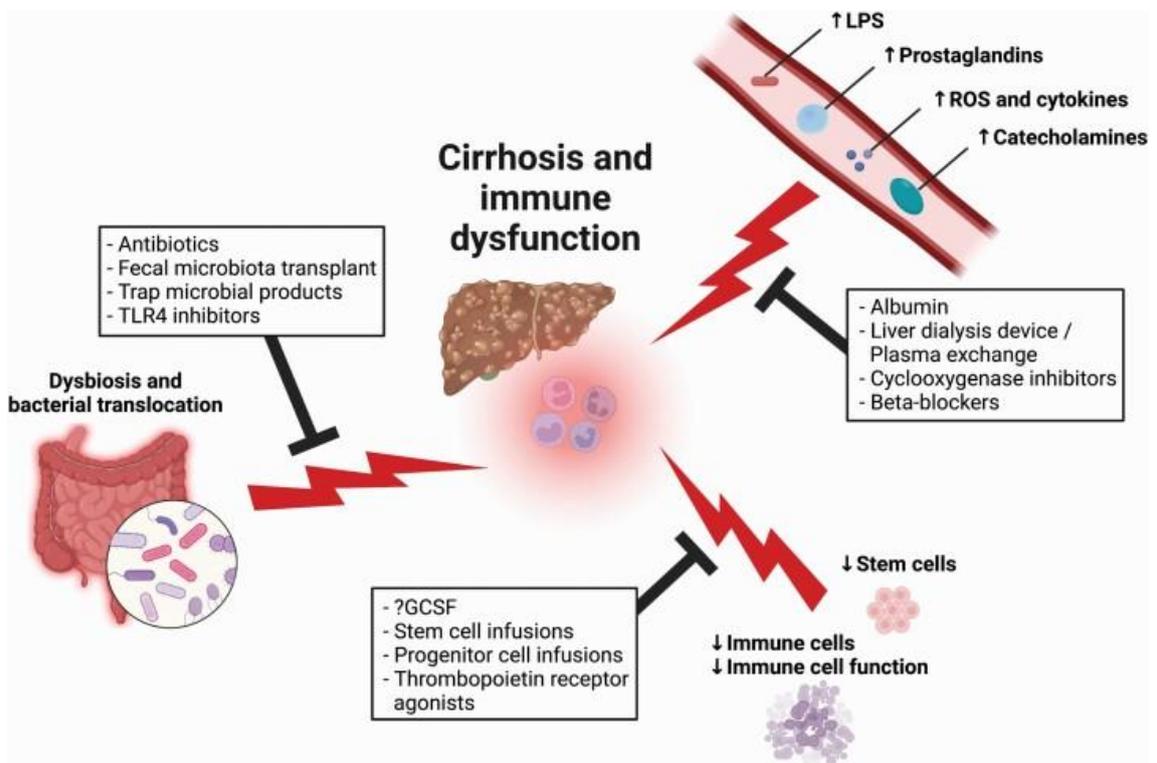


Figura 1. Efectos globales de la cirrosis en la inflamación y disfunción inmunológica y endotelial (22).

6. **Inflamación Hepática y Células iNKT:** Como se ha comentado antes, la inflamación hepática es un proceso patológico que involucra la activación excesiva de la respuesta inmune en el hígado. Las células iNKT han emergido como participantes clave en la patogénesis de diversas enfermedades hepáticas, incluyendo la hepatitis viral, la enfermedad hepática alcohólica y la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA).

En el contexto de la inflamación hepática, las células iNKT pueden ser activadas por glicolípidos endógenos liberados durante el estrés celular o la lesión tisular. Una vez activadas, estas células liberan una serie de citocinas proinflamatorias (23–26), como el TNF- α e IFN- γ , que promueven la inflamación, la lesión hepática y la fibrosis, contribuyendo aún más a la rigidez estructural de los vasos hepáticos y a la hipertensión portal. Ver Figura 2.

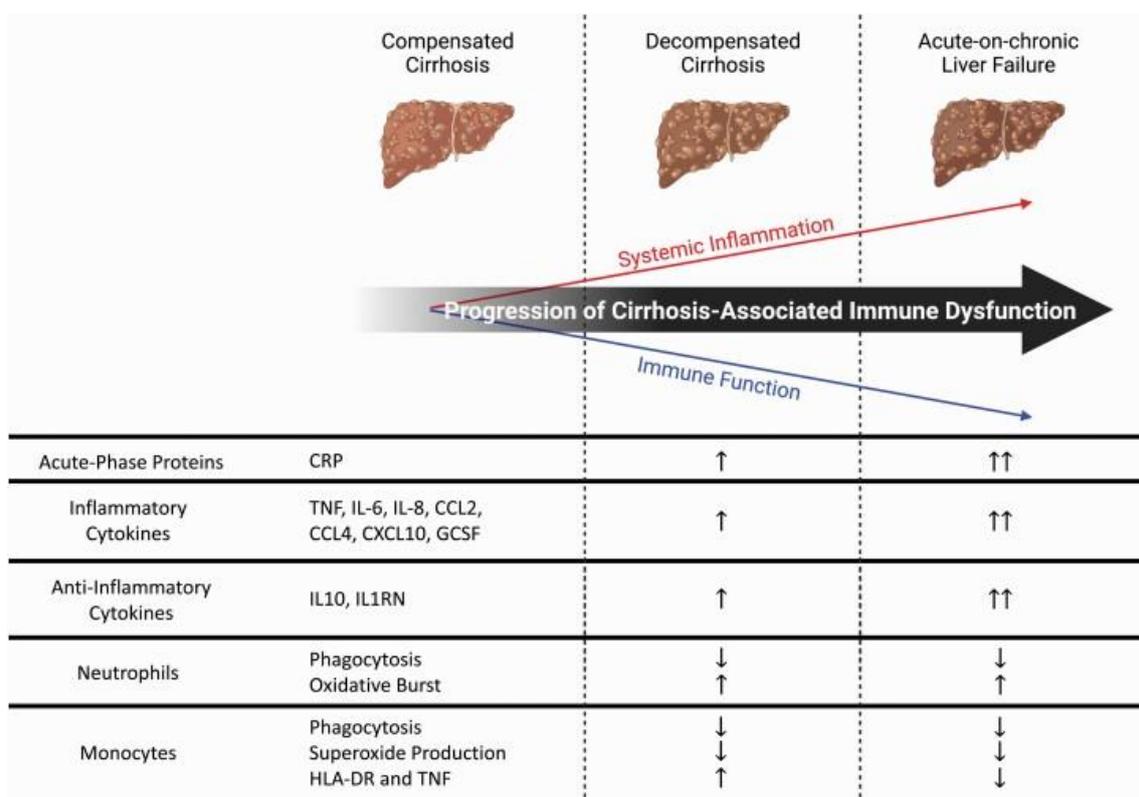


Figura 2. Evolución de la cirrosis y su relación con el sistema inmunitario (22).

7. **Relación con Alteraciones Hemodinámicas:** La inflamación hepática inducida por las células iNKT puede desencadenar una serie de respuestas hemodinámicas. Por ejemplo, la liberación de TNF- α puede aumentar la permeabilidad vascular y promover la extravasación de células inflamatorias hacia el tejido hepático, exacerbando la inflamación. Además, la activación de células iNKT puede estimular la producción de mediadores vasoactivos, como el óxido nítrico, que contribuyen a la vasodilatación y la disfunción endotelial.

Dicha vasodilatación excesiva y patológica conlleva a una disminución de la resistencia vascular sistémica (SVR) lo que desencadena en un menor flujo sanguíneo renal agravando la enfermedad hepato-renal. Esta condición patológica se caracteriza por la disfunción renal que

ocurre como consecuencia de la enfermedad hepática avanzada, especialmente en la cirrosis. La SVR puede disminuir como resultado de la vasodilatación sistémica causada por la producción y liberación de vasodilatadores endógenos en respuesta a la vasodilatación esplácnica y la hipertensión portal asociadas con la enfermedad hepática (17,20,23,27).

La inflamación hepática mediada por células iNKT puede desempeñar un papel importante en la génesis de alteraciones renales. En primer lugar, puede contribuir a una disminución del flujo sanguíneo renal efectivo, lo que agrava la disfunción renal y puede contribuir al desarrollo de la insuficiencia renal. Se ha demostrado que la inflamación hepática crónica está asociada con cambios en la hemodinámica renal, incluyendo la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona y la vasoconstricción renal, que pueden contribuir a la disfunción renal.

Además, puede llevar a una redistribución del flujo sanguíneo hacia otros órganos, como el cerebro y el corazón, lo que puede contribuir a complicaciones como la encefalopatía hepática y la insuficiencia cardíaca (5,14,27–29).

Además, la liberación de citocinas proinflamatorias por células iNKT activadas puede inducir directamente la lesión renal y la fibrosis, exacerbando la disfunción renal en el contexto de la enfermedad hepática.

HIPÓTESIS

La hipótesis sobre la que partimos es que la activación mediada por CD1d de las células iNKTs con antígenos de glicolípidos de bacterias intestinales se correlaciona con un aumento del gasto cardíaco y es un factor de mal pronóstico en pacientes con enfermedad hepática crónica avanzada (2,3,23,24,30–33). El perfil de activación inmunológico se puede correlacionar con una peor evolución hemodinámica, cardíaca y renal en el contexto de la enfermedad hepato-renal crónica.

OBJETIVOS

Como objetivos principales tenemos caracterizar los niveles de iNKTs en sangre periférica de pacientes con cirrosis, detectar iNKTs circulantes y los subtipos existentes (iNKT1, iNKT2, iNKT10, iNKT17). Además, también se pretende medir las citoquinas secretadas por diferentes subtipos de iNKTs, entre ellas IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17.

Otros objetivos secundarios son detectar si existe BT en el suero de estos pacientes y subdividirlos en dos grupos según BT(+)/BT(-).

También comprobar si hay diferencias estadísticamente significativas entre el número de iNKTs en los pacientes cirróticos BT(-) respecto a los BT(+) y evaluar si existen diferencias estadísticamente significativas en abundancia relativa de iNKTs y niveles de citoquinas.

Por último, comprobar si existen perfiles de microbiota intestinal o inmunológico diferentes en función del análisis de los datos.

METODOLOGÍA

1. Diseño del estudio:

El estudio es un estudio experimental transversal, donde se estratifican los pacientes en función de sus características clínicas y epidemiológicas, comparándose los valores obtenidos entre los distintos subgrupos y con el grupo control sano.

Los grupos de pacientes principales son pacientes con cirrosis hepática separados en 4 grupos distintos en función de la etiología de la cirrosis:

- Alcohólica/tóxica (uso de sustancias tanto fármacos como tóxicos de abuso).
- Infecciosa (principalmente hepatitis virales).
- Metabólica (hígado graso y similares).
- Autoinmune (cualquier trastorno autoinmune con afectación hepática que desencadene cirrosis).

Cabe recalcar la posibilidad de realizar subgrupos dentro de cada uno de los principales si los datos indican la posibilidad de dicho análisis.

2. Lugar del estudio:

La recogida de muestras se realizará en el Hospital General Universitario de Alicante, desde donde se transportarán al laboratorio de Inmunología de la Universidad Miguel Hernández de Elche (edificio Muhammad Al-Shafra, en el campus de San Juan de Alicante) donde se procesarán para su análisis por citometría de flujo y análisis estadístico.

3. Tiempo de ejecución del estudio:

La duración del estudio será de 2 años y tendrá como fecha de inicio enero del 2024 hasta enero del 2026.

4. Sujetos de estudio:

Número y muestreo:

Para asegurar una potencia estadística adecuada, se estima el tamaño muestral necesario utilizando un nivel de significancia (α) de 0.05 y una potencia estadística ($1-\beta$) de 0.8, que son los valores habitualmente utilizados.

El tamaño del efecto esperado (d de Cohen) se puede ajustar según la variabilidad esperada de los datos. Un tamaño de efecto pequeño, medio y grande corresponden a valores de 0.2, 0.5 y 0.8 respectivamente.

Dado que en este caso no tenemos conocimiento del efecto esperado, se asume un tamaño de efecto medio ($d=0.5$) para realizar el cálculo del tamaño muestral.

Para detectar un tamaño de efecto medio ($d=0.5$) con un nivel de significancia de 0.05 y una potencia estadística de 0.8, se requiere un tamaño muestral de 11 individuos por grupo. En total, se necesitarían 55 individuos para el estudio completo.

Ahora bien, dado que se desconoce el tamaño del efecto medio, se realizará un análisis de sensibilidad para evaluar el impacto del tamaño del efecto en el tamaño muestral necesario.

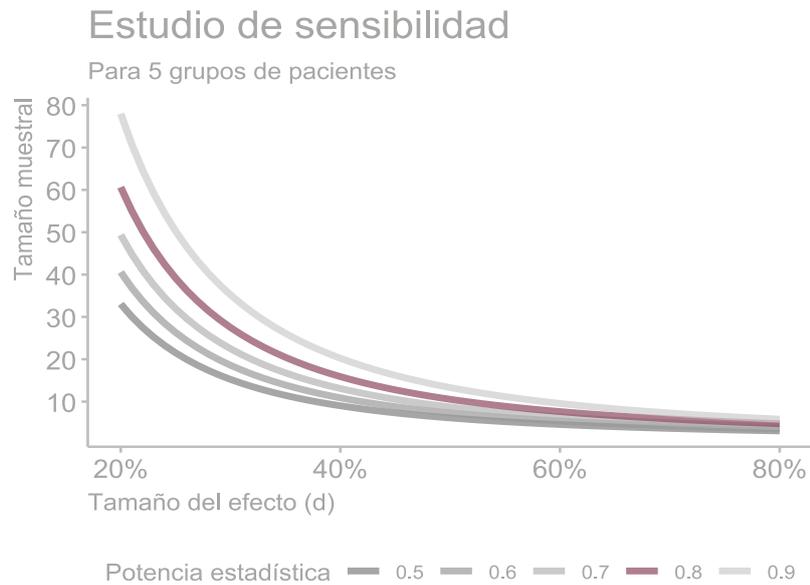


Figura 3. Estudio del tamaño muestral en función del efecto “d”. Elaboración propia.

El trabajo se llevará a cabo mediante un muestreo consecutivo de las muestras de sangre con petición de analítica sanguínea recibidas en el servicio de Análisis Clínicos del HGUA durante un período de 18 meses, comprendido entre enero de 2024 y julio de 2026. Se incluirán todos los pacientes pertenecientes al Departamento de Salud de Alicante-Hospital General, independientemente de su edad o sexo. Las muestras pueden proceder tanto de atención primaria, hospitalización, urgencias o consultas externas.

El trabajo se llevará a cabo mediante un muestreo consecutivo de las muestras de sangre con petición de analítica sanguínea recibidas en el servicio de Análisis Clínicos del HGUA durante un período de 18 meses, comprendido entre enero de 2024 y julio de 2026. Se incluirán todos los pacientes pertenecientes al Departamento de Salud de Alicante-Hospital General, independientemente de su edad o sexo. Las muestras pueden proceder tanto de atención primaria, hospitalización, urgencias o consultas externas.

5. Criterios de inclusión:

Paciente con cirrosis, procedente de cualquier servicio del hospital general de Alicante, independientemente del grado de cirrosis o si está en tratamiento o no.

Todas las muestras deben cumplir con los estándares de recogida y procesamiento para la viabilidad de muestras de sangre para hemograma y bioquímica.

6. Criterios de exclusión:

Pacientes que además de la cirrosis hepática presenten alguna enfermedad autoinmune (a excepción del grupo de las hepatitis autoinmunes) que pudiera interferir en los valores analíticos a medir y pudiera distorsionar la representatividad de los resultados.

Muestras mal recogidas, con volumen insuficiente de muestra o degradadas.

7. Variables a estudio:

Edad (años)

Sexo (masculino/femenino)

Etiología de la cirrosis/antecedentes clínicos relevantes

Grado de cirrosis

8. Variables obtenidas:

Niveles circulantes de iNKT (y sus distintas poblaciones celulares)

iNKT tipo 1 (iNKT-1)

iNKT tipo 2 (iNKT-2)

iNKT tipo 17 (iNKT-17)

Niveles de citoquinas proinflamatorias

Interleucina-1 (IL-1)

Interleucina-6 (IL-6)

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

Interleucina-12 (IL-12)

Interleucina-18 (IL-18)

Interleucina-23 (IL-23)

Interferón gamma (IFN- γ)

Factor de necrosis tumoral beta (TNF- β)

Niveles de citoquinas antiinflamatorias en sangre:

Interleucina-4 (IL-4)

Interleucina-10 (IL-10)

Interleucina-13 (IL-13)

Factor transformante del crecimiento beta (TGF- β)

Interleucina-1 receptor antagonista (IL-1Ra)

Interleucina-11 (IL-11)

Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)

Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)

9. Recogida de variables

Todos los datos del estudio se recogen en una base de datos en una hoja de cálculos (Excel) para su posterior análisis estadístico. Se anonimizan los pacientes asignándoles un código numérico para trabajar con confidencialidad.

10. Métodos de laboratorio

Cada cierto tiempo se realizan analíticas de control a los pacientes con cirrosis, por lo tanto, cuando se realice la extracción y se procese en el laboratorio del hospital también podremos utilizar la muestra trasladándola a nuestro laboratorio y realizar los análisis pertinentes para el estudio.

CITOMETRÍA DE FLUJO

Para realizar citometría de flujo en leucocitos, es necesario primero separarlos de la sangre total. Esto puede lograrse utilizando las diferencias en la densidad de las células.

10.1 Procedimiento previo a la citometría de flujo:

1. Recogida de la Muestra de Sangre: Se toma una muestra de sangre periférica, usualmente de la vena del brazo del individuo. Se recoge en tubos anticoagulantes que contienen EDTA u otro anticoagulante como Citrato para evitar la coagulación.
2. Dilución de la Sangre: La muestra de sangre se diluye con un tampón apropiado. Esto asegura que los glóbulos blancos estén suspendidos uniformemente y no aglomerados.
3. Preparación del Gradiente de Densidad: Se prepara un gradiente de densidad utilizando un medio de densidad, como Ficoll-Paque. El gradiente se prepara en tubos de centrifugación, colocando el medio de densidad en la parte inferior y la muestra de sangre diluida encima.
4. Centrifugación: Los tubos se centrifugan a una velocidad y tiempo específicos. Durante la centrifugación, los glóbulos blancos, que son más livianos que los glóbulos rojos, migran hacia la interfaz entre el medio de densidad y el plasma.

5. Recogida de la Fracción de Leucocitos: Después de la centrifugación, la fracción que contiene los leucocitos se recoge cuidadosamente de la interfaz entre el medio de densidad y el plasma. Esta fracción se transfiere a un nuevo tubo de centrifugación.

6. Lavado de los Leucocitos: La fracción de leucocitos se lava con un tampón adecuado para eliminar cualquier residuo de medio de densidad y plaquetas, en solución salina tamponada con fosfato (PBS) al 1%, para obtener una concentración final de células de aproximadamente 1×10^6 células/ml.

Una vez que los leucocitos han sido separados de la sangre total, se pueden utilizar para realizar citometría de flujo. Los leucocitos se tiñen con anticuerpos fluorescentes específicos para los marcadores de superficie celular que requerimos en nuestro caso los que identifican células iNKT (NKT receptor, CD3, CD56...), y luego se analizan y clasifican en un citómetro de flujo según su fluorescencia y dispersión de luz. Esto permite la caracterización y cuantificación de diferentes subpoblaciones de linfocitos iNKT en la muestra de sangre. Tras la incubación de las células con los anticuerpos estas se lavan con PBS para eliminar el exceso de anticuerpos no unidos.

10.2 Principio Básico de la Citometría de Flujo:

En la citometría de flujo, las células en suspensión pasan individualmente a través de un láser en un flujo continuo. Los detectores miden la dispersión de la luz y la fluorescencia emitida por las células, proporcionando información sobre sus características físicas (como tamaño y granularidad) y químicas (como la expresión de proteínas marcadas con fluorocromos).

Forward Scatter (FSC): La dispersión de luz hacia adelante (FSC) mide el tamaño de la célula. Un FSC alto indica células más grandes, mientras que un FSC bajo indica células más pequeñas. De esta forma podemos saber que tipos de células se detectan.

Side Scatter (SSC): La dispersión de luz lateral (SSC) mide la complejidad interna de la célula, como la presencia de gránulos o inclusiones. Un SSC alto sugiere células con mayor granularidad (como los granulocitos), y un SSC bajo sugiere células con menos complejidad interna (como los linfocitos).

Fluorescencia: Los detectores de fluorescencia miden la emisión de luz de los fluorocromos conjugados a anticuerpos que se unen a moléculas específicas en la superficie. La intensidad de fluorescencia en distintos canales dependerá de la cantidad de moléculas específicas presentes en la célula a las que se unan los distintos fluorocromos. Permiten la identificación de múltiples parámetros simultáneamente. Como los que nos interesan a nosotros para detectar el subtipo de célula iNKT.

10.3 Análisis y presentación de datos en la citometría:

1. Histogramas: Gráficas de una sola variable (por ejemplo, intensidad de fluorescencia en un canal específico). Muestran la distribución de una característica particular en la población celular. Un pico en el histograma indica una subpoblación de células con características similares.

2. Diagramas de Dispersión (Dot Plots): Gráficas bidimensionales que muestran dos parámetros a la vez (por ejemplo, FSC vs. SSC, o dos canales de fluorescencia diferentes). Cada punto representa una célula. Las agrupaciones de puntos indican subpoblaciones de células con características similares en ambos parámetros.

3. Gráficos de Contorno y Densidad: Variaciones de los diagramas de dispersión que muestran la densidad de células en diferentes regiones. Ayudan a identificar poblaciones densas que pueden no ser visibles en un simple diagrama de dispersión.

4. Gating (Puertas de Selección): El proceso de seleccionar subpoblaciones de células en los diagramas de dispersión o histogramas para análisis más detallado. Las puertas se dibujan alrededor de regiones de interés en los gráficos para aislar poblaciones específicas basadas en características definidas (por ejemplo, células T CD4+).

Hay principalmente dos tipos: Hierarchical Gating- Selección secuencial de subpoblaciones en múltiples pasos (por ejemplo, primero seleccionar linfocitos basados en FSC/SSC, luego seleccionar células CD3+ dentro de esa población). Boolean Gating- Uso de combinaciones lógicas (AND, OR, NOT) para definir subpoblaciones basadas en múltiples parámetros.

10.4 Controles y estándares:

Controles Negativos: Muestras que no deberían expresar la proteína de interés (usualmente células no teñidas o teñidas con isotipo control). Ayudan a establecer el umbral de fluorescencia para distinguir células positivas de negativas.

Controles Positivos: Muestras que expresan la proteína de interés de manera conocida. Validan que el ensayo está funcionando correctamente y que los anticuerpos están etiquetando las células adecuadamente.

10.5 Cuantificación y Análisis Estadístico

Proporciones y Frecuencias: Determinar el porcentaje de subpoblaciones específicas dentro de la población total. Media, Mediana e Intensidad Media de Fluorescencia (MFI): Medidas de la intensidad de señal para comparar niveles de expresión de proteínas entre diferentes muestras o condiciones.

La citometría de flujo permite un análisis detallado de las características celulares, y la interpretación de los resultados requiere una comprensión tanto de los parámetros técnicos (FSC, SSC, fluorescencia...) como del contexto biológico de las células estudiadas.

ELISA

Para realizar el ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) en la determinación de las citoquinas en sangre se necesitan los siguientes materiales y reactivos.

10.6 Materiales y reactivos necesarios:

Placa de microtitulación con pocillos.

Anticuerpo capturador específico para la citoquina de interés.

Muestra de sangre (suero o plasma).

Anticuerpo detector específico para la citoquina, conjugado con una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, HRP).

Sustrato cromogénico (por ejemplo, TMB - tetrametilbenzidina).

Solución de parada (por ejemplo, ácido sulfúrico).

Tampón de bloqueo (por ejemplo, BSA - albúmina sérica bovina).

Tampón de lavado (PBS-T - solución salina tamponada con fosfatos y Tween 20).

Estándares de citoquina conocidos para generar una curva estándar.

Lectora de placas ELISA para medir la absorbancia.

10.7 Procedimiento secuencial del ELISA

Recubrimiento de la placa: Se añade el anticuerpo capturador específico para la citoquina en los pocillos de la placa de microtitulación. La placa se incuba durante la noche a 4°C para permitir que el anticuerpo se adhiera a los pocillos. Después de la incubación, se lava la placa varias veces con tampón de lavado para eliminar el exceso de anticuerpo no unido.

Bloqueo: Se añade una solución de bloqueo (como BSA) a los pocillos para bloquear los sitios libres y reducir la unión no específica. La placa se incuba durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Se realiza otro lavado para eliminar el exceso de solución de bloqueo.

Añadir las muestras y estándares: Se añaden las muestras de suero o plasma, así como los estándares de citoquinas conocidos, en los pocillos correspondientes. La placa se incuba durante 1-2 horas a temperatura ambiente o a 4°C durante la noche. Se realizan lavados extensivos para eliminar las citoquinas no unidas.

Añadir el anticuerpo detector: Se añade el anticuerpo detector conjugado con la enzima a cada pocillo. La placa se incuba durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Nuevamente, se lava la placa varias veces para eliminar el anticuerpo detector no unido.

Añadir el sustrato: Se añade el sustrato cromogénico (como TMB) a cada pocillo. La placa se incuba durante 15-30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad para permitir que se desarrolle el color.

Detener la reacción: Se añade una solución de parada (como ácido sulfúrico) para detener la reacción enzimática. El color cambiará, y la intensidad del color es proporcional a la cantidad de citoquina presente en la muestra.

Lectura de la placa: Se mide la absorbancia en una lectora de placas ELISA a una longitud de onda específica (normalmente 450 nm). Los resultados se comparan con la curva estándar para determinar la concentración de citoquinas en las muestras.

Interpretación de resultados: La absorbancia medida se compara con los valores de los estándares conocidos para generar una curva estándar.

La concentración de citoquinas en las muestras se determina extrapolando las absorbancias de las muestras en la curva estándar.

Los resultados proporcionan una cuantificación precisa de las citoquinas presentes en la sangre, lo que puede ser útil para estudios de respuesta inmune, diagnóstico de enfermedades y monitoreo de tratamientos.

PLAN DE TRABAJO

A continuación, se describen las diferentes tareas que deben ser ejecutadas:

- Tarea 1: Planteamiento del proyecto de investigación.
- Tarea 2: Reclutamiento de muestras de interés.
- Tarea 3: Preparación las muestras de sangre para aislamiento de células iNKT de sangre.
- Tarea 4: Optimización del protocolo de citometría de flujo para la detección de células iNKT.
- Tarea 5: Detección y cuantificación de células iNKT mediante citometría de flujo.
- Tarea 6: Realización de ensayos ELISA para la detección/cuantificación de citoquinas específicas secretadas al torrente sanguíneo.
- Tarea 7: Recogida y análisis de datos obtenidos de citometría de flujo y ELISA.
- Tarea 8: Interpretación de resultados y obtención de conclusiones.
- Tarea 9: Comunicación de los resultados y conclusiones obtenidas.

2. Distribución de tareas del equipo investigador

El equipo investigador está formado por:

- **Benjamín Palomo Llinares:** Microbiólogo residente del HGUE, responsable de la citometría de flujo y ELISA.
- **Esther Caparrós Cayuela:** Profesora Titular en el área de Inmunología del Depto de Medicina Clínica, Facultad de Medicina de la UMH, responsable de la citometría de flujo, conclusiones del estudio y escritura de la publicación.

- **Oriol Juanola Juárez:** Profesor Ayudante Doctor del área de Inmunología del Depto de Medicina Clínica, Facultad de Medicina de la UMH, responsable del ELISA, recolección de las muestras, análisis de los resultados y escritura de la publicación.
- **Rubén Francés Guarinos:** Catedrático en el área de Inmunología del Depto de Medicina Clínica, Facultad de Medicina de la UMH, responsable de análisis de resultados y escritura de la publicación.

Las distintas partes del trabajo son:

1. Planteamiento del proyecto de investigación: Realizado por Benjamín Palomo Llinares mediante este trabajo.
2. Reclutamiento de pacientes/muestras de interés: A cargo de Benjamín Palomo Llinares y Oriol Juanola Juárez.
3. Preparación de las muestras: Llevado a cabo por personal técnico de laboratorio del hospital, supervisado por Benjamín Palomo Llinares.
4. Optimización del protocolo de citometría de flujo/ELISA: Realizada por Esther Caparrós Cayuela y Oriol Juanola Jurez.
5. Detección y cuantificación de células iNKT/citoquinas mediante citometría de flujo/ELISA: Llevada a cabo por Esther Caparrós Cayuela y Benjamín Palomo Llinares. Supervisado y ejecutado por Oriol Juanola Juárez.
6. Recogida de datos/inclusión en la base de datos: Realizada por Benjamín Palomo Llinares y el análisis de los mismos por Rubén Francés Guarinos.
7. Análisis estadístico de los resultados: Realizado por Benjamín Palomo Llinares, Esther Caparrós Cayuela y Rubén Francés Guarinos.
8. Interpretación de resultados y discusión: Realizada por todo el equipo.
9. Comunicación de los resultados y conclusiones obtenidas: Llevada a cabo por todo el equipo

Cronograma de las actividades

Trimestres	1	2	3	4	5	6	7	8
Planteamiento del proyecto de investigación	✗							
Reclutamiento pacientes		✗ ✗	✗	✗	✗	✗		
Preparación de muestras		✗	✗	✗	✗	✗		
Optimización protocolos	✗	✗						
Citometría/ELISA analítica		✗	✗	✗	✗	✗		
Recogida de datos		✗	✗	✗	✗	✗		
Análisis estadístico						✗	✗	
Interpretación resultados						✗	✗	✗
Comunicación conclusiones								✗

EXPERIENCIA DEL EQUIPO INVESTIGADOR

El Grupo de Inmunobiología Hepática e Intestinal de la Universidad Miguel Hernández (UMH) de Elche se dedica a la investigación de las enfermedades crónicas del hígado y del intestino, como la cirrosis hepática y la enfermedad de Crohn. Este grupo, liderado por el Dr. Rubén Francés, se enfoca en estudiar los mecanismos inmunológicos y moleculares que subyacen a estas condiciones.

Uno de sus estudios recientes ha destacado la importancia de una proteína llamada LSEctin en la respuesta inmunológica del hígado. La investigación mostró que la reducción de los niveles de esta proteína puede aumentar un tipo específico de células inmunológicas, sugiriendo que restaurar estos niveles podría ayudar a recuperar funciones hepáticas alteradas por la cirrosis (OndaCero).

https://www.ondacero.es/emisoras/comunidad-valenciana/elche/noticias/estudio-medicina-clinica-umh-apunta-posible-recuperacion-higado-afectado-cirrosis_202404106616924e17c56e0001581fda.html

Además, el grupo ha realizado estudios significativos sobre la enfermedad de Crohn, identificando el papel de microRNAs en la progresión de esta enfermedad. Los microRNAs, que regulan procesos celulares cruciales, se han propuesto como biomarcadores y objetivos terapéuticos para mejorar el tratamiento de la enfermedad de Crohn (Ultima Hora).

<https://www.ultimahora.es/noticias/comunidades/2024/04/15/2144519/estudio-liderado-por-umh-muestra-nueva-perspectiva-sobre-mecanismos-progresion-enfermedad-crohn.html>

Estos trabajos reflejan la capacidad del grupo para abordar problemas complejos mediante enfoques innovadores y colaboraciones con otras instituciones de investigación, lo que contribuye al avance en el tratamiento de enfermedades hepáticas e intestinales.

MARCO ESTRATÉGICO

Utilidad y aplicabilidad práctica

Se ha observado que los pacientes con cirrosis hepática presentan alteraciones en la frecuencia y la función de las células iNKT. Esto sugiere que este tipo de células están involucradas en la progresión de la enfermedad y podrían ser un marcador de disfunción hepática y/o hemodinámica y renal.

Modificar la actividad de las células iNKT podría ofrecer nuevas oportunidades terapéuticas. Por ejemplo, la activación de células iNKT podría ser beneficiosa en ciertas etapas de la enfermedad, mientras que la inhibición de su actividad podría ser más adecuada en etapas de inflamación aguda. Y aunque faltan más estudios adicionales y mayor conocimiento en profundidad del rol que desempeñan, su comprensión sin duda ayudará a la patogénesis de la cirrosis y puede que de otras enfermedades asociadas.

Comprender cómo estas células contribuyen a la patogénesis de la cirrosis podría no solo abrir nuevas vías para el tratamiento y la gestión de esta enfermedad crónica, mejorando así la calidad de vida de los pacientes y reduciendo la mortalidad asociada con la cirrosis hepática, sino disminuir el impacto socio-económico que ella tiene en el sistema nacional de salud.

Investigar las células iNKT no solo aporta conocimiento fundamental sobre la inmunología hepática, sino que también podría conducir al desarrollo de terapias innovadoras que podrían cambiar el curso de la enfermedad cirrótica y de nuevos fármacos con base inmunológica.

Además, ayudaría indirectamente a aumentar el conocimiento general del sistema inmunológico humano y como éste se comporta en diferentes fases de la inflamación aguda y crónica, proporcionando una visión más global de este órgano-sistema de defensa que es el sistema inmunológico.

MEDIOS DISPONIBLES PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO.

Para la realización del proyecto contamos con los recursos tanto materiales, humanos y financieros necesarios. Estos se enumeran a continuación.

Recursos materiales y técnicos:

- Ordenadores
- Muestras de sangre de pacientes
- Pipetas
- Tubos de citometría
- Reactivos para las distintas pruebas
- Centrífugas
- Citómetro de flujo
- Placas para ELISA
- Lector de placas o espectrofotómetro de microplacas ELISA
- Material de protección (guantes, mascarillas...)

Recursos humanos:

No se solicita presupuesto para recursos humanos. El equipo investigador está estabilizado y cuenta con los conocimientos necesarios para su ejecución completa.

Presupuesto:

Se solicitará financiación para realización de este proyecto en convocatorias públicas para ello. Así mismo, se solicitará la aprobación por parte del Comité de ética del Hospital General de Alicante para la ejecución.

-Material aislamiento celular: 3500 euros.

-Anticuerpos para detección de subpoblaciones iNKT: 6 anticuerpos x 450 euros/anticuerpo = 2700 euros.

-Análisis por citometría flujo (precio/hora= 141,58 euros x 25 horas) = 3539,5 euros

-Kits de ELISA: 16 citoquinas x 550 euros/ELISA= 8800 euros

TOTAL PROYECTO= 18.539,5 euros

JUSTIFICACIÓN

La cirrosis hepática supone para los pacientes un impacto en su calidad de vida muy importante debido a las complicaciones a medio y largo plazo que conlleva, como hemos comentado anteriormente. Dada la creciente carga de la cirrosis hepática a nivel global y la limitada comprensión de su inmunopatología, este estudio es esencial para avanzar en el conocimiento de los mecanismos subyacentes a la enfermedad.

Si conseguimos entender a nivel celular y molecular la génesis de la fibrosis parenquimatosa hepática probablemente consigamos o bien frenarla o incluso siendo optimistas revertir ciertos efectos nocivos.

Es ahí donde las células iNKT se han mostrado relevantes y un punto clave en la comprensión de la cirrosis.

La investigación de los linfocitos iNKT y las citoquinas en esta patología no solo ampliará nuestro entendimiento científico, sino que también puede tener implicaciones clínicas significativas, mejorando los resultados de los pacientes afectados por esta condición debilitante en muchos otros órgano-sistemas del cuerpo.

El proyecto se justifica por la aportación de nueva información, obtendremos datos sobre el perfil inmunológico de estos pacientes, pudiendo evidenciar las diferencias inmunológicas con pacientes sanos y entre los distintos subgrupos.

Esta investigación tiene el potencial de proporcionar una comprensión más profunda de la inmunopatología de la cirrosis, lo que podría llevar a la identificación de nuevos biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. Lo que a su vez conllevaría a un manejo precoz de la cirrosis, una mejor vigilancia de los pacientes y por consiguiente a menor riesgo de complicaciones derivadas de la propia cirrosis.

Además, los hallazgos podrían abrir nuevas vías para el desarrollo de terapias inmunomoduladoras específicas dirigidas a los linfocitos iNKT y las citoquinas, mejorando así el manejo y tratamiento de la cirrosis hepática.

La mayoría de los estudios relacionados hacen indicar que el estudio de estas células juega un papel clave en la enfermedad, es por ello por lo que este estudio, por sus características de diseño reclutando pacientes reales y estratificándolos en varios grupos puede ser un primer paso en la mejora de la calidad de vida de estos pacientes. Ya que no solo se limita a ensayos en modelos animales ni tampoco se limita a describir la asociación entre sistema inmunológico y cirrosis, sino que pretende caracterizar que subtipos celulares están implicados y si existe un perfil inmunológico predominante o característico que pueda ayudar al clínico en su día a día. Creemos que esta búsqueda de información aporta valor a la investigación

VIABILIDAD DEL PROYECTO

Este proyecto es viable debido a que el acceso a las muestras de trabajo es relativamente fácil ya que algunos de los investigadores que forman parte de él trabajan en el SNS, donde se lleva a cabo el estudio.

El mismo se realiza utilizando muestras de sangre de pacientes, de forma que nuestra investigación no alterará ni causará ningún daño extra a los pacientes. Además, el procesamiento de la sangre para el estudio forma parte de la práctica clínica habitual del laboratorio de Análisis Clínicos, lo que hace el proyecto todavía más viable.

Se cuenta con los recursos económicos para cubrir los gastos del proyecto, contamos con un presupuesto que cubre tanto el gasto de personal contratado como el material fungible.

Así mismo a nivel personal se cuenta con las herramientas intelectuales y el tiempo necesario que se requiere para la investigación. Se trata de un proyecto compartido con personal de investigación de la UMH y el Hospital General Universitario de Alicante que nos proporcionan las muestras y los pacientes para el estudio y la documentación necesaria para el uso correcto de las mismas.

CAPACIDAD DEL PROYECTO DE APORTAR INFORMACIÓN RELEVANTE

Como se ha comentado anteriormente el objetivo del presente estudio caracterizar las células iKNT y ver su relación con la cirrosis.

Una vez obtengamos todos los datos necesarios de las muestras y se lleve a cabo el análisis de los mismos, obtendremos una estadística y con ella podremos confirmar nuestra hipótesis.

Con dichos datos podremos conocer si nos encontramos ante unos posibles biomarcadores y predictores de enfermedad hepática y también de cuál es la relación que existe entre la cirrosis y este tipo de células.

CONTRIBUCIÓN DEL ALUMNO

El alumno Benjamín Palomo Llinares ha llevado a cabo el diseño del proyecto.

También participará en cada una de las tareas requeridas para el estudio en mayor o menor medida, asumiendo responsabilidades progresivamente y de acuerdo con su nivel de destreza en cada una de ellas. Una vez se disponga de los datos analizados participará junto con los investigadores principales en la interpretación de estos y en la redacción y presentación de los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL, Baker A. Cellular and molecular immunology. Ninth edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2018. 565 p.
2. Ishikawa S, Ikejima K, Yamagata H, Aoyama T, Kon K, Arai K, et al. CD1d-restricted natural killer T cells contribute to hepatic inflammation and fibrogenesis in mice. *J Hepatol.* junio de 2011;54(6):1195-204.
3. Jia H, Chen J, Zhang X, Bi K, Zhou H, Liu T, et al. IL-17A produced by invariant natural killer T cells and CD3+ CD56+ α Galcer-CD1d tetramer- T cells promote liver fibrosis in patients with primary biliary cholangitis. *J Leukoc Biol.* noviembre de 2022;112(5):1079-87.
4. Swain MG. Natural killer T cells within the liver: conductors of the hepatic immune orchestra. *Dig Dis Basel Switz.* 2010;28(1):7-13.
5. Loscalzo J, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, editores. *Harrison's principles of internal medicine.* 21st edition. New York: McGraw Hill; 2022. 1 p.
6. Acharya C, Sahingur SE, Bajaj JS. Microbiota, cirrhosis, and the emerging oral-gut-liver axis. *JCI Insight.* 5 de octubre de 2017;2(19):e94416, 94416.
7. Albhaisi SAM, Bajaj JS, Sanyal AJ. Role of gut microbiota in liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1 de enero de 2020;318(1):G84-98.
8. Albillos A, de Gottardi A, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. *J Hepatol.* marzo de 2020;72(3):558-77.
9. Kim SE, Park JW, Kim HS, Jang MK, Suk KT, Kim DJ. The Role of Gut Dysbiosis in Acute-on-Chronic Liver Failure. *Int J Mol Sci.* 28 de octubre de 2021;22(21):11680.
10. Trebicka J, Macnaughtan J, Schnabl B, Shawcross DL, Bajaj JS. The microbiota in cirrhosis and its role in hepatic decompensation. *J Hepatol.* julio de 2021;75 Suppl 1(Suppl 1):S67-81.
11. Solé C, Guilly S, Da Silva K, Llopis M, Le-Chatelier E, Huelin P, et al. Alterations in Gut Microbiome in Cirrhosis as Assessed by Quantitative Metagenomics: Relationship With Acute-on-Chronic Liver Failure and Prognosis. *Gastroenterology.* enero de 2021;160(1):206-218.e13.
12. Fang J, Yu CH, Li XJ, Yao JM, Fang ZY, Yoon SH, et al. Gut dysbiosis in nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis, diagnosis, and therapeutic implications. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:997018.
13. Ponziani FR, Bhoori S, Castelli C, Putignani L, Rivoltini L, Del Chierico F, et al. Hepatocellular Carcinoma Is Associated With Gut Microbiota Profile and Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatol Baltim Md.* enero de 2019;69(1):107-20.
14. Farreras-Rozman. *Medicina Interna. Metabolismo y Nutrición. Endocrinología* [Internet]. Elsevier; 2014 [citado 29 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20130183171>
15. Liu S, Yang X. Intestinal flora plays a role in the progression of hepatitis-cirrhosis-liver cancer. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023;13:1140126.

16. Pose E, Piano S, Juanola A, Ginès P. Hepatorenal Syndrome in Cirrhosis. *Gastroenterology*. abril de 2024;166(4):588-604.e1.
17. Jung CY, Chang JW. Hepatorenal syndrome: Current concepts and future perspectives. *Clin Mol Hepatol*. octubre de 2023;29(4):891-908.
18. Gerbes AL. Liver Cirrhosis and Kidney. *Dig Dis*. 2016;34(4):387-90.
19. Simon TG, Roelstraete B, Hagström H, Sundström J, Ludvigsson JF. Non-alcoholic fatty liver disease and incident major adverse cardiovascular events: results from a nationwide histology cohort. *Gut*. septiembre de 2022;71(9):1867-75.
20. Matchett CL, Simonetto DA, Kamath PS. Renal Insufficiency in Patients with Cirrhosis. *Clin Liver Dis*. febrero de 2023;27(1):57-70.
21. Piano S, Romano A, Di Pascoli M, Angeli P. Why and how to measure renal function in patients with liver disease. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. enero de 2017;37 Suppl 1:116-22.
22. Hasa E, Hartmann P, Schnabl B. Liver cirrhosis and immune dysfunction. *Int Immunol*. 6 de septiembre de 2022;34(9):455-66.
23. Gao B, Radaeva S. Natural killer and natural killer T cells in liver fibrosis. *Biochim Biophys Acta*. julio de 2013;1832(7):1061-9.
24. Wang H, Yin S. Natural killer T cells in liver injury, inflammation and cancer. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;9(8):1077-85.
25. Gao B, Radaeva S, Park O. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. *J Leukoc Biol*. septiembre de 2009;86(3):513-28.
26. Wehr A, Baeck C, Heymann F, Niemietz PM, Hammerich L, Martin C, et al. Chemokine receptor CXCR6-dependent hepatic NK T Cell accumulation promotes inflammation and liver fibrosis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 de mayo de 2013;190(10):5226-36.
27. Heine GH, Sester U, Köhler H. [Volume retention in heart failure, nephrotic syndrome, and liver cirrhosis]. *Internist*. noviembre de 2006;47(11):1136, 1138-40, 1142-4.
28. Gupta K, Bhurwal A, Law C, Ventre S, Minacapelli CD, Kabaria S, et al. Acute kidney injury and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 14 de julio de 2021;27(26):3984-4003.
29. Kong APS, Lau ESH, O CK, Luk AOY, Yip TCF, Chow EYK, et al. Advanced liver fibrosis predicts heart failure and hospitalizations in people with type 2 diabetes: A prospective cohort study from Hong Kong Diabetes Register. *Diabetes Res Clin Pract*. agosto de 2023;202:110825.
30. Schruppf E, Tan C, Karlsen TH, Sponheim J, Björkström NK, Sundnes O, et al. The biliary epithelium presents antigens to and activates natural killer T cells. *Hepatol Baltim Md*. octubre de 2015;62(4):1249-59.
31. Durante-Mangoni E, Wang R, Shaulov A, He Q, Nasser I, Afdhal N, et al. Hepatic CD1d expression in hepatitis C virus infection and recognition by resident proinflammatory CD1d-reactive T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 de agosto de 2004;173(3):2159-66.

32. Yanagisawa K, Yue S, van der Vliet HJ, Wang R, Alatrakchi N, Golden-Mason L, et al. Ex vivo analysis of resident hepatic pro-inflammatory CD1d-reactive T cells and hepatocyte surface CD1d expression in hepatitis C. *J Viral Hepat.* agosto de 2013;20(8):556-65.
33. Park O, Jeong WI, Wang L, Wang H, Lian ZX, Gershwin ME, et al. Diverse roles of invariant natural killer T cells in liver injury and fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Hepatology* Baltim Md. mayo de 2009;49(5):1683-94.

ANEXO I

Consentimiento informado al paciente:

PAPEL DE LAS CÉLULAS iNKT EN LA CIRROSIS HEPÁTICA

Investigador Principal

Benjamín Palomo Llinares

Hospital General Universitario de Elche/ Universidad Miguel Hernández de Elche

benjamin.palomo@graduado.umh.es

El propósito de este estudio es comprender mejor la patología de la cirrosis hepática mediante la recolección y el análisis de datos clínicos y muestras de sangre de los pacientes. En particular, queremos medir los niveles de citoquinas y células inmunológicas (células iNKT) en su sangre para identificar posibles marcadores que puedan ayudar en el diagnóstico, progresión y tratamiento de esta enfermedad.

Si decide participar en este estudio, se le solicitará que:

1. Nos permita acceder a su historial clínico para recabar información relevante sobre su patología.
2. Nos autorice a recolectar o a extraer en su defecto muestras de sangre para analizar al menos 1 en la duración del estudio.

- La extracción de sangre puede causar molestias menores, como dolor en el lugar de la punción, hematomas, mareos o desmayos. Todos los procedimientos serán realizados por personal capacitado para minimizar estos riesgos.

- No hay beneficios directos para usted como participante. Sin embargo, la información obtenida puede contribuir significativamente al conocimiento médico sobre la cirrosis hepática y potencialmente beneficiar a futuros pacientes.

Toda la información recopilada en este estudio será confidencial y se utilizará únicamente con fines de investigación. Sus datos serán codificados para que no se le pueda identificar personalmente. Solo el equipo de investigación tendrá acceso a los códigos y la información identificable.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Puede decidir no participar o retirarse del estudio en cualquier momento sin que esto afecte su atención médica actual o futura.

Si tiene alguna pregunta sobre el estudio, sus derechos como participante o desea retirarse del estudio, puede contactar a Benjamín Palomo Llinares a través del correo electrónico arriba proporcionado.

He leído la información anterior o me la han explicado. He tenido la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido respondidas satisfactoriamente. Entiendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio en cualquier momento. Al firmar este formulario, doy mi consentimiento para participar en este estudio.

Nombre del Participante

Firma del Participante

Fecha

Nombre del Investigador

Firma del Investigador

Fecha

ANEXO II

Formulario de Revocación de Consentimiento Informado

Título del ensayo clínico: PAPEL DE LAS CÉLULAS iNKT EN LA CIRROSIS HEPÁTICA

Nombre del participante:

Número de identificación del participante (si aplica):

Investigador principal: Benjamín Palomo Llinares

Contacto del investigador principal: benjamin.palomo@graduado.umh.es

DECLARACIÓN DE REVOCACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he decidido retirar mi consentimiento para participar en el ensayo clínico mencionado anteriormente. Entiendo que mi decisión de retirar el consentimiento no afectará de ninguna manera la calidad de la atención médica que recibiré en el futuro ni mi relación con el personal médico del estudio.

Entiendo que, al retirar mi consentimiento, ya no participaré en las actividades relacionadas con este ensayo clínico, y cualquier muestra biológica adicional, información o datos recopilados después de la fecha de esta revocación no serán utilizados para los fines de este estudio.

DECLARACIÓN DEL PARTICIPANTE:

Declaro que he leído y comprendido la información proporcionada en este formulario y que he tenido la oportunidad de hacer preguntas sobre mi participación en el ensayo clínico. Mi decisión de retirar mi consentimiento es voluntaria y no ha sido influenciada por coacción o presión externa.

Nombre y firma del participante: _____

Fecha: _____

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR O REPRESENTANTE DEL ESTUDIO:

He discutido con el participante la decisión de retirar su consentimiento y he respondido a todas sus preguntas. Confirmando que he recibido este formulario de revocación de consentimiento informado firmado por el participante.

Nombre y Firma del investigador/representante del estudio: _____

Fecha: _____

ANEXO III (CÓDIGO COIR)



Elche, 6/03/2024

El Secretario del Comité de Ética e Integridad en la Investigación (CEII), constata que se ha presentado en la Oficina de Investigación Responsable, la solicitud de evaluación del TFG/TFM:

Tutor/a	Esther Caparrós Cayuela
Estudiante	Benjamín Palomo Linares
Tipo de actividad	2. TFM (Trabajo Fin de Máster)
Grado/Máster	Máster Universitario en Investigación en Medicina Clínica
Título del TFG/TFM	Planteamiento de un proyecto de caracterización de células iNKT en sangre periférica de pacientes con cirrosis.
Código provisional	240305082332

Dicha actividad de investigación ha sido admitida a trámite para su evaluación por la Oficina de Investigación Responsable y, si procede, por el Comité de Ética e Integridad en la Investigación de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Atentamente,

Alberto Pastor Campos
Secretario CEII
Jefe de la Oficina de Investigación Responsable
Vicerrectorado Investigación y Transferencia

Página 1 de 15