

SIGNATURES BACTERIANES COM A EINES DE DIAGNÒSTIC DIFERENCIAL I MONITORATGE DE LES MALALTIES INFLAMATÒRIES INTESTINALS

Joan Amoedo Cibeira

Per citar o enllaçar aquest document:
Para citar o enlazar este documento:
Use this url to cite or link to this publication:

<http://hdl.handle.net/10803/674112>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

SIGNATURES BACTERIANES COM A EINES DE DIAGNÒSTIC DIFERENCIAL I MONITORATGE DE LES MALALTIES INFLAMATÒRIES INTESTINALS

Joan Amoedo Cibeira

Tesi Doctoral

2020

Per citar o enllaçar aquest document:

Para citar o enlazar este documento:

Use this url to cite or link to this publication:

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for-profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Tesi Doctoral

Signatures bacterianes com a eines de diagnòstic diferencial i monitoratge de les malalties inflamatòries intestinals

Joan Amoedo Cibeira

2020

Programa de doctorat en Biologia Molecular, Biomedicina i Salut

Director de la Tesi Doctoral

Prof. Dr. L. Jesús García Gil
Catedràtic de Microbiologia
Universitat de Girona

Candidat PhD

Joan Amoedo Cibeira

Tesi doctoral presentada complint els requisits per obtenir el títol de doctorat a la
Universitat de Girona



Certificat director tesi doctoral:

El Prof. Dr. Jesús García Gil, de la Universitat de Girona

DECLARO:

Que el treball titulat **Signatures bacterianes com a eines de diagnòstic diferencial i monitoratge de les malalties inflamatòries intestinals**, que presenta **Joan Amoedo Cibeira** per a l'obtenció del títol de doctor/a, ha estat realitzat sota la meva direcció.

I, perquè així consti i tingui els efectes oportuns, signo aquest document.

Prof. Dr. L. Jesús García Gil
Catedràtic de Microbiologia
Universitat de Girona

Girona 2020

La present tesi doctoral s'emmarca dins dels doctorats industrials, promoguts per la Generalitat de Catalunya, i realitzat sota l'empareda de l'empresa GoodGut SL, i en col·laboració amb la Universitat de Girona (UdG). Aquest tipus de doctorats pretén afavorir la transferència de coneixement assolit en l'entorn universitari i donar-li un valor afegit, transferint-lo al mon empresarial.

Així doncs, aquesta tesi doctoral s'ha realitzat amb el suport de la Secretaria d'Universitats i Recerca del Departament d'Economia i Coneixement de la Generalitat de Catalunya.



Agraïments

Mai hauria pensat que realitzar una tesi doctoral et podria portar a experimentar tantes emocions tant diferents i inclús contradictòries. He viscut moments plens d'alegria i optimisme barrejats amb d'altres moments més feixucs i pessimistes que m'arravataven el temps i la motivació per seguir endavant. Però sort he tingut molta gent que des de el minut 0 m'ha recolzat i animat en tot el camí que he hagut de seguir.

En primer lloc m'agradaria agrair a en **Jesús**, el meu director i company de tesi, tot el temps i paciència que m'ha dedicat. Gràcies per tot allò que m'has ensenyat i per haver-ho fet d'aquesta manera tant propera, com un pare que ensenya al seu fill, sempre amb humor, passió i optimisme. M'agradaria també agrair a en **Xevi**, que tot i el seu dia a dia atrafegat, sempre ha estat allà per ajudar-me sempre d'una manera propera i familiar.

GoodGut és ple de grans professionals que m'han ensenyat i recolzat en tot moment. Començant pel principi, la pionera d'aquesta tesi doctoral, la **Mariona Serra**. Et caracteritzes per ser una persona molt optimista cosa que ha fet, i fa, que les metes que semblen molt lluny estiguin sempre a tocar. Sempre has cregut en mi i això m'ha ajudat a trencar barreres que mai hauria pensat creuar. M'has fet créixer com a estudiant, com a professional i sobretot com a persona.

Agrair a la **Lia** i la **Marta** tot el que m'han ajudat i recolzat en el desenvolupament d'aquesta tesi doctoral. A part, també agrair-vos tot el que m'aporteu dia rere dia a la feina. **Lia** gràcies per ser com ets, professional, treballadora i constant, virtuts que ens contagies cada dia, i a tu **Marta**, gràcies per fer sortir sempre la teva alegria compaginada amb la teva bogeria que fan que gaudeixi de cada moment a la feina. Gràcies **Marta Serrano** per des de l'inici ajudar-me a créixer com a professional, gràcies **Sara** per tenir sempre un somriure a la cara i bones paraules que m'han ajudat en els moments més difícils i, per últim, gràcies **Rosor** per la teva alegria diària, que fa que els problemes es relativitzin.

Però GoodGut no seria el que és sense tots els professionals que dia a dia treballen en els diferents hospitals col·laboradors, que amb el seu esforç ens faciliten molt la feina. Grans professionals del Hospital Dr. Josep Trueta - IAS com l'**Anna**, l'**Aleix**, en **David Busquets**, la **Leya**, l'**Oriol**, en **David Julià**, la **Míriam Sàbat** entre d'altres. De l'hospital de Bellvitge, el Dr. **Guardiola**, la **Gemma**, en **Pau**, la **Blau** entre d'altres, de l'hospital

Agraïments

Germans Trias i Pujol el Dr. *Domènec*, la *Paola*, la *Míriam*, la *Fiorella*, l'*Ariadna* entre d'altres i per últim el Centro Médico Teknon amb el Dr. *Mearín* i l'*Imma*.

La tesi doctoral ha sigut una aventura on a part de totes les persones que l'han fet possible a nivell professional, amaga una gran part de persones, fora del àmbit professional, que m'han ajudat afrontar tots els reptes que m'ha suposat la realització d'aquesta tesi doctoral. M'agradaria agrair a la meva *mare* i al meu *pare* tot el seu esforç durant anys i anys, durant els quals sempre han cregut en mi i han estat presents per proporcionar-me totes les eines necessàries per tirar endavant i arribar fins on estic ara. A la meva germana, la *Cris*, la petita aventurera que m'ha ensenyat a desconnectar i a gaudir de les petites coses a partir d'excursions. Als meus *avis*, que amb el seu orgull m'han ajudat a creure que els límits no existeixen, als meus sogres, en *Pere* i la *M^a Rosa* que sempre han tingut bones paraules per animar-me i encoratjar-me, i a tota la meva família per sempre ser-hi d'una manera o una altra, *tietes*, *tiets* i *nanets/es*.

Malauradament, durant la tesi ha marxat gent estimada, i en especial vull recordar el meu tiet *Jordi* que, per culpa d'una maleïda malaltia anomenada Esclerosi Lateral Amiotròfica, ens va deixar abans d'hora. Has sigut una inspiració constant per a mi i una font d'energia que m'ha ajudat a superar els moments més complicats. Tot i la malaltia, mai em vas deixar d'animar i encoratjar-me per seguir endavant, i per aconseguir el més difícil, creure en mi.

També vull agrair a la família que s'escull, als meus amics i amigues. A tota la *Colla Pesigolla* que sempre ha estat allà per recolzar-me i alhora ajudar-me a desconnectar. Però en especial a l'*Anna*, en *Guillem* i en *Perpi*, els meus guies espirituals que sempre han tingut bones paraules per donar-me l'empenta necessària per seguir endavant.

Finalment m'agradaria tindre unes línies d'agraïment a la persona que més m'estimo i més m'ha ajudat en aquest llarg trajecte: la *Mireia*. Una persona que independentment de la tesi, sempre ha estat, està i estarà amb mi, la meva guia sobretot en els dies més foscos. M'has ajudat moltíssim i m'has facilitat increïblement les coses.

Llista d'abreviacions

MII	Malaltia Inflamatòria Intestinal
MC	Malaltia de Crohn
CU	Colitis Ulcerosa
SII	Síndrome de l'Intestí Irritable
Th	Cèl·lules T helper
IL	Interleucina
Treg	Cèl·lules T reguladores
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TNF-α	Factor α de necrosi tumoral
CRP	C-Reactive Protein
CF	Calprotectina Fecal
CDAI	Crohn's Disease activity index
IHB	Índex de Harvey-Bradshaw
IMP	Índex de Mayo Parcial
CDEIS	Índex de severitat de la malaltia de Crohn
SES-CD	Simple Endoscopic Score for Crohn's disease
UCEIS	Índex Endoscòpic de Severitat de la Colitis Ulcerosa
IEM	Índex endoscòpic de Mayo
5-ASA	àcid 5-aminosalicílic
MAdCAM-1	Molècula 1 d'adhesió de la cèl·lula vascular de la mucosa
IFX	Infliximab
ADA	Adalimumab
GOL	Golimumab
SII-D	Síndrome de l'Intestí Irritable amb comportament diarreic
SII-C	Síndrome de l'Intestí Irritable amb comportament restret
SII-M	Síndrome de l'Intestí Irritable amb comportament mixte
qPCR	Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa
ARNr	Àcid ribonucleic ribosòmic
SCFA	Short Chain Fatty Acids
GALT	Teixit limfoide associat al intestí
IgA	Immunoglobulina A
NOD2	Nucleotide oligomerization domain 2

Llista d'abreviacions

CARD9	Caspase recruitment domain-containing protein 9
ATG16L1	Autophagy-related 16-like 1
CLEC7A	C-type lectin domain family 7 member A
H	Subjectes sans
ADN	Àcid desoxiribonucleic
EUB	Eubacteris
FPRA	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
PHG-I	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> filogrup I
PHG-II	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> filogrup II
RUM	<i>Ruminococcus sp.</i>
ENT	Enterobacteriàcies
ECO	<i>Escherichia coli</i>
AKK	<i>Akkermansia muciniphila</i>
CLO	Clostridis
MSM	<i>Methanobrevibacter smithii</i>
BAC	Bacteroidetes
F	Forward
R	Revers
PR	Probe
TA	Temperatura Ambient
SENS	Sensibilitat
ESPE	Especificitat
VPP	Valor predictiu positiu
VPN	Valor predictiu negatiu
LR	Likelihood ratio

Llistat de Figures

Figura 1. Nivells de prevalença de la Malaltia Inflamatòria Intestinal al món.	3
Figura 2. Tipus d'afectació de la malaltia inflamatòria intestinal segons la localització; Afectació Ileal (A), colònica (B), Ileocolònica (C) i del tracte superior en la MC.	5
Figura 3. Tipus d'afectacions que pot presentar la CU.	7
Figura 4. Histologia de la mucosa del còlon en pacients amb MC i CU segons l'estat d'inflamació amb tinció Hematoxilina-eosina (×40).	10
Figura 5. Equilibri recíproc per a l'homeòstasi immune i la inflamació intestinal. L'estat normal està mediat per un equilibri recíproc entre les cèl·lules immunes (Treg vs. Th17) i les citocines que es segreguen per mantenir les condicions a l'intestí. Un desequilibri en les cèl·lules immunes condueix a la destrucció de les cèl·lules epitelials intestinals i a la invasió de la microbiota comensal.	11
Figura 6. Normalitat i lesions presents en la CU i la MC.	14
Figura 7. Teràpia farmacològica en la MII segons la severitat de la malaltia i la resposta a la teràpia.....	23
Figura 8. Composició i concentracions luminals d'espècies microbianes dominants en diverses regions del tracte gastrointestinal.	30
Figura 9. Composició a nivell de fílums segons diferents parts del cos.	31
Figura 10. Visió general de les tècniques utilitzades per caracteritzar la microbiota intestinal.	46
Figura 11. Regions conservades i variables de l'ARN ribosomal 16S.	47
Figura 12. Concentració d'ADN obtinguda en cada condició de conservació (n = 5). Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel test de Wilcoxon entre les dues condicions es troben representades per: *, p-valor < 0,05, **, p -valor < 0,01 i ***, p-valor < 0,001.....	68
Figura 13. Concentració d'ADN (ng DNA / g de femta) per a cada condició de conservació (n = 9) a) comparació entre congelació, nevera i TA; b) comparació TA a diferents temps a TA (4, 24, 48 i 72h). Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel test de Wilcoxon entre les condicions estan representades per: *, p-valor <0,05, **, p-valor <0,01 i ***, p-valor <0,001.	70
Figura 14. Regions utilitzades de la mostra de femta.....	71
Figura 15. Concentració d'ADN per a cada condició (n = 10). Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel test de Wilcoxon entre les dues condicions estan representades per: *, p-valor <0,05, **, p-valor <0,01 i ***, p-valor <0,001.	72
Figura 16. Concentració d'ADN (ng DNA / g de femta) per a cada kit d'extracció (n = 3): A; Nucleospin Soil, B; Qiagen amb "beads", C; Qiagen sense "beads", D; Maxwell amb "beads" i E; Maxwell sense "beads". Les diferències estadísticament significatives	

obtingudes pel test de Wilcoxon entre les dues condicions estan representades per: *, p-valor <0,05, **, p-valor <0,01 i ***, p-valor <0,001..... 73

Figura 17. Mitjana i desviació estàndard de l'abundància de FPRA normalitzada per l'abundància d'EUB per a cada kit d'extracció i per a cada condició (n = 3): A; Nucleospin Soil, B; Qiagen amb "beads", C; Qiagen sense "beads", D; Maxwell amb "beads" i E; Maxwell sense "beads". Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel test de Wilcoxon entre les dues condicions estan representades per: *, p-valor <0,05, **, p-valor <0,01 i ***, p-valor <0,001..... 74

Figura 18. Mitjana de valors de Ct de cada marcador normalitzat per EUB (FPRA, ECO, PHG-I, PHG-II, AKK, RUM, MSM i BAC) per a les malalties SII (n = 52) i MII (n = 52). Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel test de Mann-Whitney entre les dues condicions estan representades per: *, p-valor <0,05, **, p-valor <0,01 i ***, p-valor <0,001. 83

Figura 19. Mitjana de valors de Ct de cada marcador normalitzat per EUB (FPRA, ECO, PHG-I, PHG-II i AKK) per a les poblacions de MC i CU de Espanya (n = 17 per MC i n = 25 per CU) i Boston (n = 17 per MC i n = 5 per CU) . Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel test de Mann-Whitney entre les dues condicions estan representades per: *, p-valor <0,05, **, p-valor <0,01 i ***, p-valor <0,001..... 97

Figura 20. Mitjana de Ct de cada marcador normalitzat per EUB (FPRA, ECO, PHG-I, PHG-II i AKK) per les poblacions de MC i CU en activitat (n = 34 per MC i n = 47 per CU) i en remissió endoscòpica (n = 20 per MC i n = 32 per CU). Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel test de Mann-Whitney entre les dues condicions estan representades per: *, p-valor <0,05, **, p-valor <0,01 i ***, p-valor <0,001..... 98

Llistat de Taules

Taula 1. Classificació de Montreal de la Malaltia de Crohn.	4
Taula 2. Criteris diferencials entre la Malaltia de Crohn i la Colitis ulcerosa.....	16
Taula 3. Índex de Harvey-Bradshaw per la MC.....	18
Taula 4. Índex clínic de Mayo per la CU.....	19
Taula 5. Índex SES-CD per a la MC.	20
Taula 6. Qualitats del marcador ideal per monitoritzar l'activitat de la MII.....	21
Taula 7. Principals fàrmacs utilitzats per a tractar pacients amb la MII segons la tipologia de teràpia utilitzada.....	23
Taula 8. Criteris de Roma IV per la Síndrome del Intestí Irritable.	29
Taula 9. Reclutament de pacients amb MII i SII i subjectes H per centre participant. .	55
Taula 10. Reclutament de pacients amb MII i SII i subjectes H segons el capítol de la tesi.....	56
Taula 11. Marcadors microbians utilitzats en cada capítol.....	58
Taula 12. Primers (Forward i Revers) i sondes utilitzades en aquest treball dels següents marcadors EUB, FPRA, ECO, PHG-I, PHG-II, AKK, RUM, BAC, MSM, ENT i CLO. Totes les sondes es van marcar a 5' amb FAM (6-carboxyfluorescein) com a colorant "reporter" i amb TAMRA com a "quencher" o sufocador a l'extrem 3' per a les sondes FPRA i ECO, mentre que el BHQ1 es va utilitzar per a PHGI i PHGII. Les base R pot ser A o G; W pot ser A o T i Y pot ser C o T.....	59
Taula 13. Condicions de qPCR dels següents marcadors: EUB, FPRA, ECO, PHG-I, PHG-II, AKK, RUM, BAC, MSM, EN i CLO.	60
Taula 14. Mitjana dels valors de Cq dels diferent marcadors analitzats (FPRA, ECO, PHG-I, PHG-II i AKK) normalitzats per l'abundància d'EUB \pm desviació estàndard per a la condició A (pot estèril de 150 ml) i la condició B (tub col·lector 8ml) (n = 5). Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel test de Wilcoxon entre les dues condicions estan representades per: *, p-valor <0,05, **, p-valor <0,01 i ***, p-valor <0,001.....	68
Taula 15. Condicions de conservació de les mostres segons la temperatura i el temps post-deposició.....	68
Taula 16. Mitjana dels valors de Cq dels diferent marcadors analitzats (FPRA, CLO i ENB) normalitzats per l'abundància d'EUB \pm desviació estàndard per a cada condició de conservació. Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel test de Kruskal-Wallis entre les tres condicions estan representades per: *, p-valor <0,05, **, p-valor <0,01 i ***, p-valor <0,001.....	70

Taula 17. Mitjana dels valors de Cq dels diferent marcadors analitzats (FPRA, CLO i ENB) normalitzats per l'abundància d'EUB \pm desviació estàndard per a cada condició de conservació a TA (n = 9). Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel test de Kruskal-Wallis entre les quatre condicions estan representades per: *, p-valor <0,05, **, p-valor <0,01 i ***, p-valor <0,001.	70
Taula 18. Mitjana dels valors de Cq dels diferent marcadors analitzats (FPRA, CLO i ENB) normalitzats per l'abundància d'EUB \pm desviació estàndard per a cada condició (n = 10): Homogeneïtzat, regió superficial i regió interna. Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel t-test en el cas FPRA i ENB i el test de Wilcoxon per CLO estan representades per: *, p-valor <0,05, **, p-valor <0,01 i ***, p-valor <0,001.	72
Taula 19. Característiques dels pacients de MII i SII reclutats en l'estudi.....	83
Taula 20. Sensibilitat (SENS), especificitat (ESPE), valor predictiu positiu (VPP), valor predictiu negatiu (VPN), ràtio de probabilitat positiva (LR+) i la relació de probabilitat negativa (LR-) de la Calprotectina fecal a diferents punts de tall (50 μ g/g, 100 μ g/g, 150 μ g/g i 165 μ g/g) per a la discriminació de la Síndrome del Intestí Irritable i la Malaltia Inflamatòria Intestinal.....	84
Taula 21. Sensibilitat (SENS), especificitat (ESPE), valor predictiu positiu (VPP), valor predictiu negatiu (VPN), ràtio de probabilitat positiva (LR+) i la relació de probabilitat negativa (LR-) del RAID-Dx en la seva fase de definició (80% de les dades) i en la seva fase de validació (30% de les dades) per al diagnòstic diferencial de la SII i la MII.....	85
Taula 22. Característiques dels pacients de MII reclutats en l'estudi, tant agrupats en MII com separats en MC i CU.....	97
Taula 23. Sensibilitat (SENS), especificitat (ESPE), valor predictiu positiu (VPP), valor predictiu negatiu (VPN), ràtio de probabilitat positiva (LR+) i la relació de probabilitat negativa (LR-) de l'índex Harvey-Bradshaw (IHB), calprotectina fecal (millor tall de 200 μ g/g de femta) i RAID-Monitor (definició; 70% i validació; 30 %, de l'algoritme) per a la detecció de l'activitat endoscòpica en pacients de MC.	99
Taula 24. Sensibilitat (SENS), especificitat (SPEC), valor predictiu positiu (VPP), valor predictiu negatiu (VPN), ràtio de probabilitat positiva (LR +) i la relació de probabilitat negativa (LR-) de l'índex Harvey-Bradshaw (HBI) , calprotectina fecal (millor tall de 200 μ g / g, altres talls: 50 μ g / g, 100 μ g / g, i 250 μ g / g de femta) i monitor de RAID (definició; 70% i validació; 30 %, de l'algorisme) per a la detecció d'activitat que defineix la malaltia d'inflamació activa amb estàndards endoscòpics (SES-CD> 2).	100
Taula 25. Sensibilitat (SENS), especificitat (ESPE), valor predictiu positiu (VPP), valor predictiu negatiu (VPN), ràtio de probabilitat positiva (LR+) i la relació de probabilitat negativa (LR-) de l'índex Harvey-Bradshaw (IHB), calprotectina fecal (millor tall de 200 μ g/g de femta) i RAID-Monitor (definició; 70% i validació; 30 %, de l'algoritme) per a la detecció de l'activitat endoscòpica en pacients de CU.....	101
Taula 26. Sensibilitat (SENS), especificitat (ESPE), valor predictiu positiu (PPV), valor predictiu negatiu (NPV), ràtio de probabilitat positiva (LR+) i la relació de probabilitat	

negativa (LR-) de l'índex Harvey-Bradshaw (IHB), calprotectina fecal (millor tall de 200 $\mu\text{g/g}$ de femta) i RAID-Monitor (definició; 70% i validació; 30 %, de l'algoritme) per a la detecció de l'activitat endoscòpica en pacients de MC. 101

Taula de continguts

Agraïments	I
Llista de abreviacions	III
Llistat de Figures	V
Llistat de Taules	VII
Resum.....	XV
Resumen.....	XVII
Summary.....	XIX
INTRODUCCIÓ.....	1
1. MALALTIA INFLAMATÒRIA INTESTINAL	3
1.1 Prevalença i incidència de la MII.....	3
1.2 Malaltia de Crohn.....	4
1.3 Colitis Ulcerosa.....	6
1.4 Etiologia i factors que afecten a la MII.....	8
1.5 Patogènesi de la MII.....	10
1.6 Maneig clínic de la Malaltia Inflammatory Intestinal	12
2. LA SÍNDROME DE L'INTESTÍ IRRITABLE.....	27
2.1 La Síndrome del Intestí Irritable i el seu diagnòstic.....	28
3. LA MICROBIOTA INTESTINAL	30
3.1 Composició de la microbiota intestinal.....	30
3.2 Evolució de la microbiota intestinal.....	32
3.3 Funcions de la microbiota intestinal.....	33
3.4 Factors que determinen la composició de la microbiota intestinal	34
3.5 Modulació de la microbiota intestinal.....	36
3.6 La microbiota intestinal en la malaltia intestinal	38
3.7 Eines per a l'estudi de la microbiota intestinal	46
OBJECTIUS	49
MATERIAL I MÈTODES.....	53
1. RECLUTAMENT DE PACIENTS	55
2. RECOLLIDA I CONSERVACIÓ DE MOSTRES FECALS	56
3. ANÀLISIS DE LA CALPROTECTINA FECAL.....	57
4. EXTRACCIÓ I QUANTIFICACIÓ DEL ADN	57
5. QUANTIFICACIÓ DELS MARCADORS BACTERIANS PER qPCR	58
6. ANÀLISIS ESTADÍSTICS.....	60

RESULTATS	61
CAPÍTOL I Optimització del procés d'extracció d'ADN per a l'estudi de la microbiota intestinal	63
1. INTRODUCCIÓ.....	65
2. RESULTATS.....	67
2.1 Conservació de la mostra	67
2.2 Homogeneïtzació de la mostra	71
2.3 Kit d'extracció d'ADN.....	72
3. DISCUSSIÓ.....	74
CAPÍTOL II RAID-Dx: Nou mètode no invasiu per al diagnòstic diferencial de la Síndrome de l'Intestí Irritable i la Malaltia Inflamatòria Intestinal.....	77
1. INTRODUCCIÓ.....	79
2. MATERIAL I MÈTODES DE L'ESTUDI.....	80
2.1 Població d'estudi	80
2.2 Calprotectina fecal.....	81
2.3 Conservació, transport i extracció de ADN	81
2.4 Quantificació dels marcadors bacterians per qPCR	81
2.5 Definició del RAID-Dx	82
2.6 Eines estadístiques.....	82
3. RESULTATS.....	83
3.1 Dades demogràfiques	83
3.2 Marcadors bacterians en el diagnòstic diferencial entre MII i SII	83
3.3 La Calprotectina Fecal en el diagnòstic diferencial de la SII.....	84
3.4 RAID-Dx en el diagnòstic diferencial de la SII	85
4. DISCUSSIÓ.....	86
CAPÍTOL III RAID-Monitor: Un nou mètode no invasiu per monitoritzar l'activitat endoscòpica en pacients amb Malaltia Inflamatòria Intestinal	90
1. INTRODUCCIÓ.....	92
2. MATERIAL I MÈTODES DE L'ESTUDI.....	93
2.1 Població d'estudi	93
2.2 Monitorització de l'activitat endoscòpica	94
2.3 Índex clínics	95
2.4 Calprotectina fecal.....	95
2.5 Conservació, transport i extracció de DNA	95
2.6 Quantificació dels marcadors bacterians per qPCR	95

2.7	Definició del RAID-Monitor.....	95
2.8	Eines estadístiques.....	96
3.	RESULTATS.....	96
3.1	Dades demogràfiques	96
3.2	Marcadors bacterians entre poblacions	97
3.3	Marcadors bacterians per monitoritzar l'activitat en la MII	98
3.4	Comparativa de RAID-Monitor, Índex clínic i Calprotectina Fecal en pacients amb MC.....	98
3.5	Comparativa de RAID-Monitor, Índex clínic i Calprotectina Fecal en pacients amb CU	100
4.	DISCUSSIÓ.....	102
	DISCUSSIÓ GENERAL.....	105
	CONCLUSIONS	114
	BIBLIOGRAFIA	117

Resum

La Malaltia Inflamatòria Intestinal (MII) és un grup de patologies de base immune que afecten al tracte digestiu, provocant processos inflamatoris crònics. Dintre d'aquest grup, la Malaltia de Crohn (MC) i la Colitis Ulcerosa (CU) són els tipus més comuns. Els signes i símptomes de la MII són molt diversos i poden oscil·lar entre lleus i crítics. Aquesta simptomatologia pot ser compartida amb d'altres trastorns intestinals com podria ser la Síndrome del Intestí Irritable (SII) la qual cosa complica el diagnòstic. La colonoscòpia és el mètode d'elecció per discriminar entre MII i SII. No obstant, no és recomanable el seu ús habitual degut al seu caràcter invasiu.

La MII inclou períodes d'activitat inflamatòria alternats amb períodes de remissió, fet que fa que sigui necessari el seguiment continuat de l'activitat de la malaltia per poder adaptar adequadament la pauta terapèutica. Així doncs, tot i els avenços constants en Medicina, són necessaris nous mètodes que facilitin, d'una manera no invasiva, el diagnòstic i el monitoratge de la MII.

Durant els últims anys, les comunitats microbianes que habiten l'intestí humà han estat relacionades amb un bon nombre de malalties, entre les que destaca la MII. La identificació de signatures microbiològiques en mostres fecals de pacients amb MII i SII podria ser útil per diagnosticar, monitoritzar i, fins i tot, predir-ne resultats terapèutics. L'anàlisi de la microbiota intestinal a partir d'una mostra fecal és un procés senzill i ràpid. La metodologia emprada per estudiar-la ha estat en part definida i optimitzada en aquest treball. A partir d'aquesta metodologia, s'han desenvolupat dos mètodes no invasius basats en la identificació de signatures bacterianes fecals en la MII i la SII amb diferents finalitats.

El primer mètode definit en aquesta tesi ha estat RAID-Dx. Es tracta d'un procediment no invasiu capaç de discriminar la SII de la MII amb una sensibilitat del 88,2% i una especificitat del 94,1%. Aquest mètode ha estat definit i validat internament amb una cohort de 104 pacients. En paral·lel, s'ha definit un segon mètode, anomenat RAID-Monitor, que permet monitoritzar l'activitat endoscòpica en pacients de MC i CU. Per al desenvolupament de RAID-Monitor, es van incloure 54 pacients diagnosticats de MC i 79 de CU. Aquesta metodologia ha estat capaç de determinar l'activitat endoscòpica en pacients de MC amb una sensibilitat del 90,0% i una especificitat del 81,2%, mentre que

Resum

en la CU, la sensibilitat i la especificitat obtingudes amb RAID-Monitor van ser del 88,2% i el 94,1%, respectivament.

Els resultats obtinguts en aquest treball reforcen la idea inicial sobre la utilitat de signatures moleculars de la microbiota intestinal i obre la porta a la seva aplicació en altres malalties que cursen acompanyades de canvis en l'estructura i la composició de la microbiota. Tot i els avenços en l'estudi de la microbiota humana, cal seguir explorant la relació entre la microbiota i la salut amb l'objectiu de desenvolupar i posar a disposició de la Medicina nous mètodes de suport al diagnòstic i el monitoratge.

Resumen

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) es un grupo de patologías de base inmune que afectan el tracto digestivo, provocando procesos inflamatorios crónicos. La Enfermedad de Crohn (EC) y la Colitis Ulcerosa (CU) son los tipos más comunes. Los signos y síntomas de la EII son muy diversos y pueden oscilar de leves a críticos. Esta sintomatología puede ser compartida con otros desórdenes intestinales como podría ser el Síndrome del Intestino Irritable (SII), lo que complica el diagnóstico. La colonoscopia es el método elegido para discriminar entre MII y SII. Sin embargo, no es recomendable su uso habitual debido a su carácter invasivo.

La EII incluye periodos de actividad inflamatoria alternados con períodos de remisión, lo que hace que sea necesario el seguimiento continuado de la actividad de la enfermedad para adaptar adecuadamente la pauta terapéutica a seguir. Así pues, a pesar de los avances constantes en Medicina, son necesarios nuevos métodos que faciliten, de una manera no invasiva, el diagnóstico y la monitorización de la EII.

Durante los últimos años las comunidades microbianas que habitan el intestino humano han sido relacionadas con un buen número de enfermedades, entre las que destaca la EII. La identificación de firmas microbiológicas en muestras fecales de pacientes con EII y SII podría ser útil para diagnosticar, monitorizar e incluso, predecir resultados terapéuticos. El análisis de la microbiota intestinal a partir de una muestra fecal es un proceso sencillo y rápido. En este trabajo se ha definido y optimizado una parte de metodología para su estudio. A partir de esta metodología se han desarrollado dos métodos no invasivos basados en la identificación de firmas bacterianas fecales en la EII y el SII con diferentes finalidades.

El primer método definido en esta tesis ha sido RAID-Dx. Se trata de un procedimiento no invasivo capaz de discriminar la SII de la EII con una sensibilidad del 88,2% y una especificidad del 94,1%. Este método ha sido definido y validado internamente con una cohorte de 104 pacientes. En paralelo, se ha definido un segundo método, llamado RAID-Monitor, que permite monitorizar la actividad endoscópica en pacientes de EC y CU. Para el desarrollo de RAID-Monitor, se incluyeron 54 pacientes diagnosticados de EC y 79 de CU. Esta metodología ha sido capaz de determinar la actividad endoscópica en pacientes de EC con una sensibilidad del 90,0% y una especificidad del 81,2%, mientras que, en

Resumen

CU la sensibilidad y la especificidad obtenidas con RAID-Monitor fueron del 88,2% y el 94,1%, respectivamente.

Los resultados obtenidos en este trabajo refuerzan la idea inicial sobre la utilidad de firmas moleculares de la microbiota intestinal y abre la puerta a su aplicación en otras enfermedades que cursan acompañadas de cambios en la estructura y la composición de la microbiota. A pesar de los avances en el estudio de la microbiota humana, debemos seguir explorando la relación entre la microbiota y la salud con el objetivo de desarrollar y poner a disposición de la Medicina nuevos métodos de apoyo al diagnóstico y a la monitorización.

Summary

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a group of immune-based pathologies that affect the digestive tract, causing chronic inflammatory diseases processes. Within this group, Crohn's Disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC) are the most common types. The signs and symptoms of IBD are very diverse and can range from mild to critical. This symptomatology can be shared with other intestinal disorders such as Irritable Bowel Syndrome (IBS), which complicates the diagnosis. Colonoscopy is the method of choice to discriminate between disorders. However, its regular use is not recommended due to its invasiveness.

The chronic nature of IBD includes periods of inflammatory activity alternated with periods of remission, which makes regular monitoring of disease activity necessary to adequately adapt the therapeutic regimen. Thus, despite constant advances in medicine, new non-invasive methods that allow IBD diagnosis and monitoring are needed.

In recent years, the microbial communities that inhabit the human intestine have been associated with different diseases, among which IBD stands out. Identifying microbiological signatures in faecal samples from patients with IBD and IBS could be useful to diagnose, monitor, and even predict therapeutic results. The study of the intestinal microbiota using faecal samples, is a simple and quick process. The methodology used for its study has been defined and optimized in this work. In this doctoral thesis, two non-invasive methods based on the identification of faecal bacterial signatures in IBD and IBS have been developed using this methodology with different purposes.

The first method defined in this thesis is RAID-Dx. It is a non-invasive method capable of discriminating IBS from IBD with a sensitivity of 88.2% and a specificity of 94.1%. This method has been defined and validated internally with a cohort of 104 patients. In parallel, a second method, called RAID-Monitor, has been defined. It allows monitoring the endoscopic activity in CD and UC patients. For the development of RAID-Monitor, 54 patients diagnosed with CD and 79 with UC were recruited. This methodology has been capable of assessing endoscopic activity in CD patients with a sensitivity of 90.0% and a specificity of 81.2%. In terms of UC, the sensitivity and specificity obtained with RAID-Monitor were 88.2% and 94.1%, respectively.

Summary

The results obtained in this work reinforce the initial idea about the utility of intestinal microbiota molecular signatures and open the door to its application in other diseases in which changes in the structure and composition of the microbiota have also been reported. Despite the advances in the study of human microbiota, the relationship between the microbiota and health must continue to be explored with the aim of providing Medicine with new methods to support diagnosis and monitoring.

1

Introducció

1. MALALTIA INFLAMATÒRIA INTESTINAL

La Malaltia Inflamatòria Intestinal (MII) és un trastorn idiopàtic i recurrent de base immune que afecta al tracte digestiu provocant processos inflamatoris crònics. La Malaltia de Crohn (MC) i la Colitis ulcerosa (CU) són els tipus més comuns en la MII, encara que presenten certes diferències: predisposició genètica, factors de risc, diferències clíniques, endoscòpiques i histològiques, ambdues malalties comparteixen bastants característiques. La naturalesa crònica de la malaltia inclou períodes d'activitat inflamatòria (fase activa o fase de brot) de gravetat i durada variable, alternats amb períodes de remissió (fase inactiva) de duració també variable [1,2].

1.1 Prevalença i incidència de la MII

La MII ha esdevingut una malaltia global, tot i això, la seva incidència i prevalença varia molt segons la regió geogràfica. En països industrialitzats, la seva incidència ha augmentat darrerament, on s'estima que al voltant de 2,5 milions de residents europeus i 1 milió en els Estats Units presenten la MII. A més, la MII ha presentat un increment de la seva incidència en països recentment industrialitzats d'Àsia, Sud Amèrica i Àfrica degut a que les seves societats s'han tornat més occidentals [3,4].

Tot i que la prevalença de la MII continua augmentant en països de l'Amèrica del Nord, Europa, Austràlia i Nova Zelanda [5] en països recentment industrialitzats és baixa, tot i això, donat al increment en la incidència d'aquesta malaltia en aquests països, es preveu que la seva prevalença pugui augmentar en els pròxims anys (Figura 1).

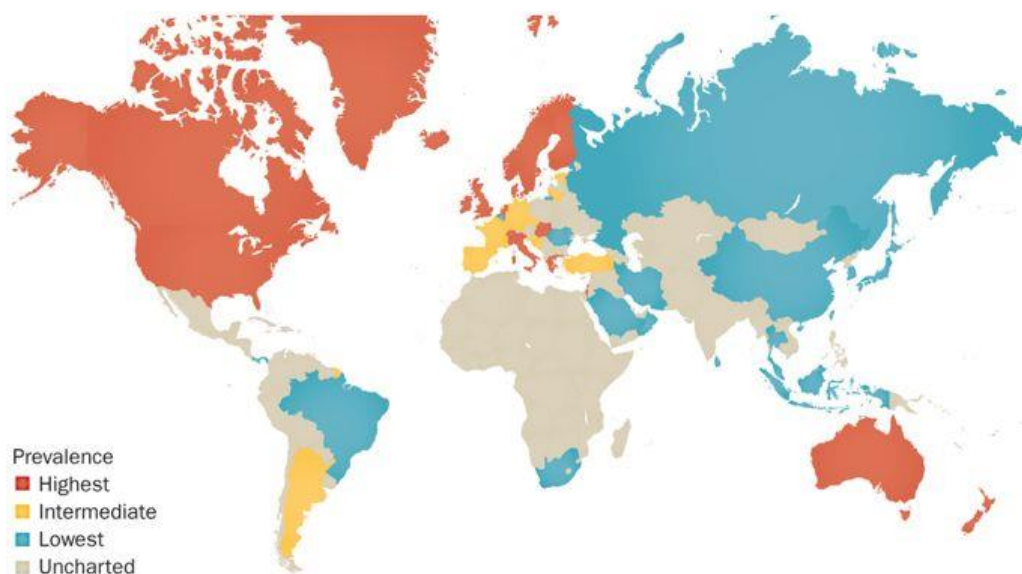


Figura 1. Nivells de prevalença de la Malaltia Inflamatòria Intestinal al món [3].

La CU és més prevalent que la MC. A Nord Amèrica i a Europa és on trobem la major incidència i prevalença de la malaltia amb una incidència que varia d'entre els 9 i els 20 casos per cada 100.000 habitants per any, i una prevalença de 156 a 291 casos per cada 100.000 persones [1]. En canvi, la incidència de la MC es de 2 a 20 casos per cada 100.000 habitants [6].

1.2 Malaltia de Crohn

1.2.1 Classificació de la MC

La MC és una malaltia inflamatòria que pot arribar a afectar qualsevol part del tracte digestiu, des de la boca fins l'anus [7]. Es pot classificar fenotípicament en diferents subtipus segons la seva localització, el seu comportament i la seva gravetat. La classificació de la MC, ajuda a estratificar els pacients i a escollir la millor pràctica terapèutica segons la seva classificació ja que aquesta, pot ser una important predictora del curs i de les complicacions de la malaltia.

El 1998 es va introduir la classificació de Viena amb la intenció de classificar els diferents fenotips clínics de la MC [8,9]. No obstant, uns anys després (2005), un grup d'experts va presentar al congrés mundial de Gastroenterologia una adaptació de la classificació de Viena: la classificació de Montreal [10,11]. Aquesta classificació es troba acceptada pels consensos internacionals i és la que s'utilitza actualment per classificar la MC. La classificació de Montreal considera 3 apartats (Taula 1): l'edat d'aparició de la malaltia, la localització i el comportament de la mateixa.

Taula 1. Classificació de Montreal de la Malaltia de Crohn.

Paràmetre	Classificació
a) Edat aparició malaltia	A1: Edat ≤ 16 anys
	A2: Edat 17 – 40 anys
	A3: Edat > 40 anys
b) Localització afectació	L1: Ili terminal
	L2: Còlon
	L3: Ileocolònica
	L4: Tracte digestiu superior
c) Comportament afectació	B1: Inflamatori
	B2: Estenosat
	B3: Fistulitzant

La MC pot afectar a persones de qualsevol edat, tot i que la majoria de pacients són adults joves entre els 16 i els 30 anys. La classificació de Montreal divideix l'edat de debut de la malaltia en diferents apartats: A1 per a pacients amb una edat de diagnòstic inferior o igual als 16 anys, A2 per a pacients que debuten amb una edat d'entre els 17 i els 40 anys i A3 com aquells que debuten amb una edat superior als 40 anys [12].

Segons la localització de l'activitat inflamatòria, trobem pacients que només presenten afectat l'últim segment de l'ili (L1), d'altres en els que la malaltia es limita al tram del còlon (L2), d'altres que presenten ambdós trams afectats (L3), i per últim, pacients que presenten afectada alguna regió del tracte digestiu superior (Figura 2). L'afectació ileal i la del tracte superior és més freqüent en persones diagnosticades de MC abans dels 20 anys, mentre que l'afectació colònica és més freqüent en pacients majors de 60 anys.

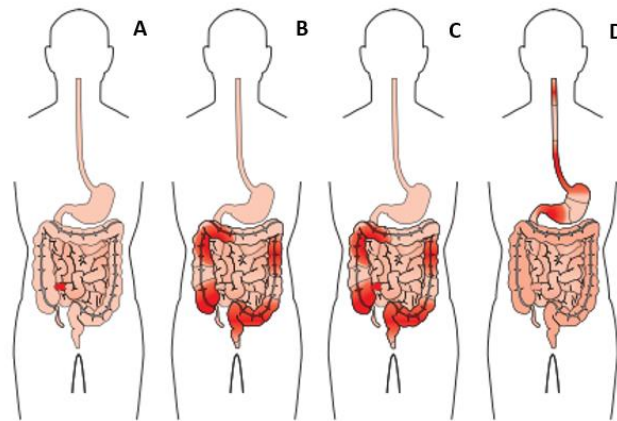


Figura 2. Tipus d'afectació de la malaltia inflamatòria intestinal segons la localització: Afectació ileal (A), colònica (B), lleocolònica (C) i del tracte superior en la MC [2].

Mentre que la ubicació de l'afectació és majoritàriament estable, el comportament de la MC varia substancialment durant el curs de la malaltia [13]. Segons el comportament, podem trobar la MC amb comportament inflamatori (B1), estenosat (B2) i fistulitzant (B3), podent aprofundir fins a la capa més interna del teixit intestinal afectat.

1.2.2 Simptomatologia de la MC

Els signes i símptomes de la MC són molt diversos i poden oscil·lar entre lleus i crítics. Sovint es manifesten gradualment, no obstant, a vegades es presenten de forma sobtada sense previ avís. Quan la malaltia entra en fase de remissió, el pacient està asimptomàtic.

Alguns dels signes i símptomes que pot desencadenar la MC en estat actiu poden ser: diarrea, dolor i còlics abdominals, febre, cansament, sang en les femtes, aftes a la boca, disminució de la gana, pèrdua de pes entre d'altres [2].

A més, els pacients amb MC poden presentar manifestacions extraintestinals, les quals no sempre es correlacionen amb el grau d'activitat, com inflamació de la pell, ulls i articulacions, inflamació del fetge o de les vies biliars, retard de creixement o en el desenvolupament sexual en nens entre d'altres. A més, la MC pot donar lloc a una o més de les següents complicacions:

- **Obstrucció intestinal:** En els pacients de MC que presenten alt comportament estenosant es pot produir una obstrucció del pas del contingut digestiu. En aquests casos es possible que es necessiti de cirurgia per extirpar la part afectada de l'intestí.
- **Úlceres:** La inflamació crònica pot provocar úlceres en qualsevol part del tub digestiu, inclús en la boca, l'anus i la regió genital.
- **Fístules:** A vegades, les úlceres es poden estendre per tota la paret intestinal i generar una connexió anormal entre diferents parts del cos. Poden aparèixer fístules entre l'intestí i la pell, o entre l'intestí i un altre òrgan. Les fístules més freqüents es presenten en regions properes a la zona anal. En alguns casos, les fístules es poden infectar i formar abscessos que poden posar en risc la vida sinó es tracten.
- **Desnutrició:** La diarrea, el dolor abdominal i els còlics poden dificultar l'alimentació o la capacitat de l'intestí d'absorbir suficients nutrients per mantenir-se nodrits. També és freqüent presentar anèmia degut a la deficiència de ferro o vitamina B12 que provoca la malaltia.
- **Càncer colorectal:** Quan la MC afecta al còlon, pot incrementar el risc de presentar càncer colorectal.

1.3 Colitis Ulcerosa

1.3.1 Classificació de la CU

La CU és una malaltia inflamatòria que provoca una inflamació persistent i aftes en el tub digestiu. A diferència de la MC, l'extensió de la CU és limitada al còlon [14]. La CU normalment implica el recte i es pot estendre de manera contínua pel còlon proximal i fins i tot fins al cec. L'extensió de les lesions en la CU té una implicació pronòstica i terapèutica molt important. Així doncs, la CU es classifica en diferents subtipus segons la gravetat i la magnitud de la malaltia seguint la classificació de Montreal [15]. Segons l'extensió de la malaltia la CU (Figura 3) es pot classificar en:

- **Proctitis ulcerosa (E1):** La inflamació es limita al recte, la zona més propera a l'anus. El sagnat rectal pot ser l'únic signe de la malaltia. Aquesta forma de CU sovint és la més lleu.
- **Proctosigmoiditis:** La inflamació afecta tant al recte com al sigma, l'extrem inferior del còlon. Els signes i símptomes són diarrea amb sang, dolor i rampes abdominals, així com el tenesme (impossibilitat defecatòria tot i la necessitat).
- **Colitis esquerra (E2):** La inflamació s'extén des del recte fins al còlon descendent. Els signes i símptomes poden ser els anteriors amb possibilitat de pèrdua de pes involuntàriament.
- **Pancolitis (E3):** De forma general la pancolitis afecta tot el còlon i causa episodis de diarrea amb sang, que poden ser greus, dolor i rampes abdominals, fatiga i pèrdua de pes significativa.

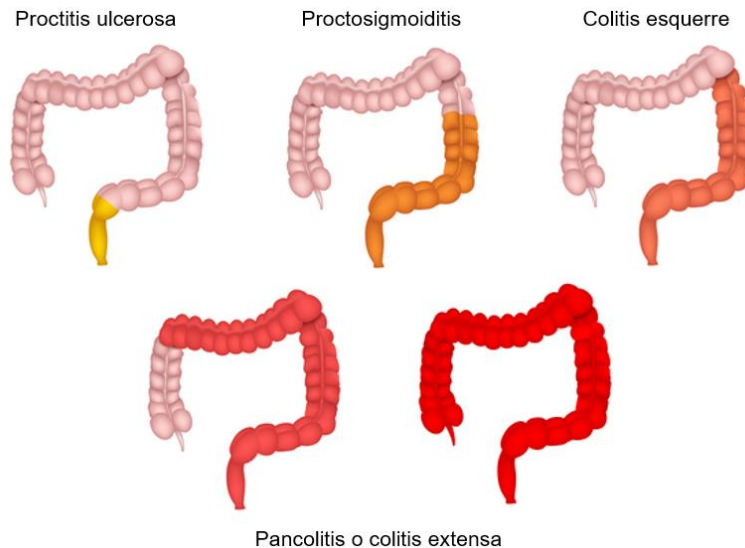


Figura 3. Tipus d'afectacions que pot presentar la CU.

La CU també es pot classificar, a partir de l'escala de Montreal, segons la seva gravetat. La CU pot ser debilitant i algunes vegades provocar complicacions que poden posar en risc la vida del pacient. El 48% dels pacients que pateixen CU es troben en estat de remissió (S0), el 30% presenta una activitat lleu (S1), el 20% presenta una activitat moderada (S2) i només entre un 1 i un 2% de la població presenta una activitat greu (S3) [16].

1.3.2 Simptomatologia de la CU

La CU és una malaltia complexa i és per això que els seus símptomes poden variar, segons la gravetat de la inflamació i segons la regió del còlon que es trobi afectada. Algunes dels

signes i símptomes més habituals són la diarrea, presència de sang en femtes, dolor abdominal, urgència defecatòria, incontinença fecal, incapacitat per defecar tot i la urgència defecatòria, pèrdua de pes, cansament, febre entre d'altres [1].

En els casos més greus, la CU pot presentar majors complicacions com serien l'hemorràgia intestinal greu, perforació del còlon, deshidratació greu, malaltia hepàtica, osteoporosis, inflamació de la pell, articulacions i ulls, entre d'altres. Una de les complicacions més conegudes és l'increment del risc a desenvolupar càncer colorectal.

Tot i que la CU no té cura, el tractament pot reduir en gran mesura els signes i els símptomes clínics de la malaltia inclús pot provocar la remissió a llarg termini de la malaltia.

1.4 Etiologia i factors que afecten a la MII

Actualment, la causa que provoca la malaltia roman desconeguda, no obstant, tot i que en el passat es sospitava que estava relacionada amb la dieta i l'estrès, actualment se sap que tot i que aquests factors poden influenciar en la malaltia, no són els causants de la mateixa. És probable que diferents factors, com els factors hereditaris i el fet de que el sistema immunitari no funcioni adequadament intervinguin en la seva aparició. Existeix la teoria de que la presència d'un virus o bacteri sigui el desencadenant de la malaltia. El sistema immunitari tracta de combatre microorganismes invasors i degut a una resposta immunitària anormal pot ser que es provoqui també una resposta envers a les cèl·lules del tub digestiu.

Així doncs, tot i no conèixer l'origen exacte de la malaltia, existeixen diferents factors de risc que fan que la probabilitat a desenvolupar una MII sigui major. Aquests poden actuar diferent segons el tipus de malaltia (MC o CU), no obstant, ambdues malalties afecten aproximadament el mateix nombre de dones que d'homes.

La MII pot aparèixer a qualsevol edat, tot i això, és més probable que es presenti durant la joventut. La majoria de les persones que contrauen la MC o la CU reben el diagnòstic generalment abans dels 30 anys tot i que un nombre no menyspreable de persones podrien no patir la malaltia fins després dels 60 anys [17]. Encara que la MII pot afectar a qualsevol grup ètnic, les persones caucàsiques corren un major risc de patir-la. No obstant, la incidència de la malaltia cada cop és major en persones de raça africana que viuen a Amèrica del Nord i al Regne Unit [18]. També s'ha demostrat que el risc de patir

una MII augmenta si tens un parent proper que pateix la malaltia. Doncs una de cada cinc persones amb MII té un familiar que també pateix aquesta malaltia.

Els factors genètics tenen un paper important amb la identificació de més de 150 gens identificats de susceptibilitat a la MII. No obstant això, aproximadament dos terços dels pacients amb MII no presenten cap defecte genètic identificable, cosa que suggereix que la microbiota intestinal i els factors ambientals tenen un paper important [19].

Durant la darrera meitat del segle XX hi ha hagut un increment significatiu de la incidència i de la prevalença de la MII en països industrialitzats. A més, aquest increment en les darreres dècades s'ha estès en regions que abans eren considerades de baix risc, com Àsia i l'Europa de l'Est [20]. Aquest increment arreu del món es pot explicar en gran part pels canvis en els factors ambientals produïts en aquestes regions. Els factors ambientals que s'han proposat per tenir un paper important en l'aparició de la MII són el tabaquisme, la dieta, els fàrmacs, l'estrès i l'estil de vida [21,22].

El tabaquisme és un factor que presenta efectes adversos segons el tipus de MII. Mentre que en la MC el tabaquisme està associat a un curs de malaltia més agressiu i a un major risc de cirurgia intestinal [23,24], en la CU el cessament del tabac sovint provoca la recaiguda de la malaltia, a més els pacients amb CU fumadors acostumen a presentar malalties més suaus i una menor probabilitat de cirurgia intestinal [24,25].

Certs estudis han evidenciat que la dieta occidental rica en sucre refinat i baixa en fibra és un clar factor de risc per a la MII [26,27]. L'augment del consum de la dieta occidental es considera un dels motius de la creixent incidència de la MII a Àsia. Les dades del NHS sobre 170.776 subjectes van mostrar que la ingesta d'una mitjana de 24,3 g de fibra al dia redueix el risc de desenvolupar la MC en un 40% dels subjectes. Una anàlisi posterior va demostrar que aquest benefici era més elevat en la fibra soluble present en fruites, mentre que la fibra insoluble de llegums, cereals integrals i cereals no va presentar cap efecte [28]. Curiosament, en el risc de patir CU, la quantitat i el tipus de fibra no van tenir cap impacte significatiu [28].

Alguns medicaments disponibles com els anticonceptius, tractaments antiinflamatoris no esteroïdes i els antibiòtics han estat sovint relacionats amb l'inici i el curs de la MII. Un metanàlisi amb 14 estudis inclosos i amb un total de 75.815 pacients va mostrar un major risc de desenvolupar MC amb l'ús d'anticonceptius i un augment menor en els pacients amb CU [29]. Altres medicaments antiinflamatoris com l'ibuprofè, el naproxè sòdic i el

diclofenac sòdic, entre d'altres, poden actuar causant inflamació en l'intestí empitjorant la malaltia en aquells pacients ja diagnosticats [30]. Per últim, els antibiòtics, afectant la microbiota intestinal, poden modular la resposta immune a l'intestí podent ser un factor de risc per a la malaltia intestinal.

1.5 Patogènesi de la MII

El tracte gastrointestinal està exposat constantment a diversos antígens que es troben en bacteris i aliments. En absència d'inflamació intestinal, l'homeòstasi intestinal es manté suprimint les respostes immunes excessives als antígens estrangers. La MII és un trastorn idiopàtic que inclou inflamació crònica i una desregulació de la resposta inflamatòria immunològica; per tant, bona part de la investigació sobre la patogènesi de la MII s'ha centrat en el sistema immune. Tot i que gran part de la patogènesi de la MII segueix desconeguda, es coneix que la patogènesi tant de la CU com de la MC implica a factors genètics, canvis en la microbiota intestinal i cèl·lules de resposta immune, incloent a les cèl·lules immunes i les citocines produïdes [31].

Les cèl·lules immunes segreguen productes que participen activament en la iniciació i en la preservació de la inflamació, provocant danys en el teixit intestinal. En pacients amb MII, les lesions del còlon mostren una infiltració excessiva de cèl·lules immunes provocant una devastació dels teixits (Figura 4).

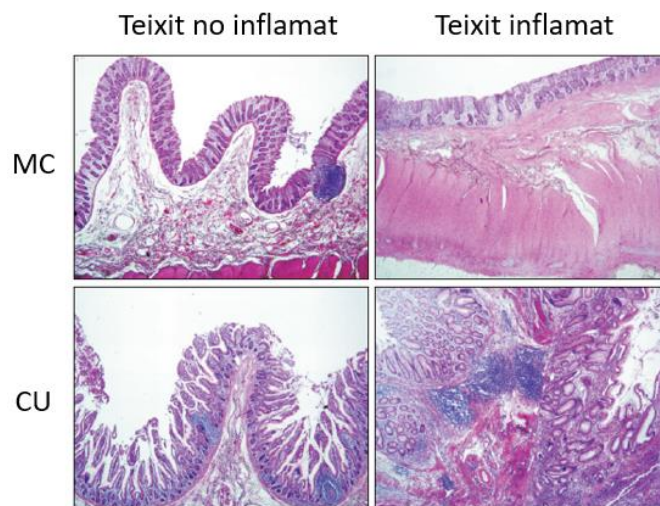


Figura 4. Histologia de la mucosa del còlon en pacients amb MC i CU segons l'estat d'inflamació amb tinció Hematoxilina-eosina (x40) [32].

Entre les diferents cèl·lules immunes, les investigacions sobre la patogènesi de la MII s'han centrat en l'estudi de les cèl·lules T, especialment les cèl·lules T helper (Th). Tradicionalment, es creia que les cèl·lules Th1 jugaven un paper important en la

patogènesi relacionada amb la cronicitat de la inflamació intestinal, especialment en els pacients amb MC, i que les cèl·lules Th2 tenien un paper important en la CU [33]. No obstant, recentment s'ha evidenciat el paper crític que presenten en el desenvolupament de la inflamació intestinal les cèl·lules T Th17, les quals secreten la interleucina (IL) 17, i les cèl·lules T reguladores (Treg) productores de la IL-10 (Figura 5).

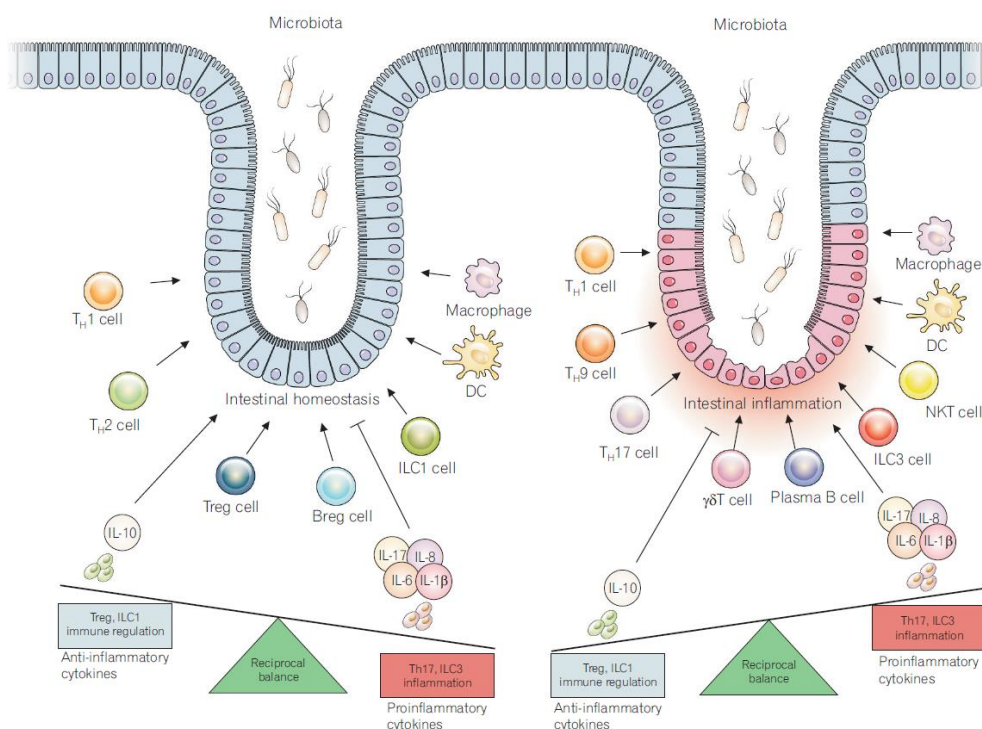


Figura 5. Equilibri recíproc per a l'homeòstasi immune i la inflamació intestinal. L'estat normal està mediat per un equilibri recíproc entre les cèl·lules immunes (Treg vs. Th17) i les citocines que es segreguen per mantenir les condicions a l'intestí. Un desequilibri en les cèl·lules immunes condueix a la destrucció de les cèl·lules epitelials intestinals i a la invasió de la microbiota comensal [32].

Les cèl·lules Th17 i la IL-17 s'han trobat de forma massiva en infiltrats de la mucosa intestinal inflamada de pacients amb MII [34]. A més, s'ha evidenciat que la inhibició de les cèl·lules Th17 pot disminuir el desenvolupament de la colitis aguda reduint la inflamació [35]. La IL-17 és una citocina pro-inflamatòria que activa STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), que estimula fortament la resposta inflamatòria. La producció excessiva de la IL-17 s'ha relacionat amb la progressió de la MII [36]. Seguint aquesta línia, els nivells de IL-17 es van trobar incrementats en la mucosa inflamada de pacients amb MII, tant de pacients amb MC com amb CU [37]. Per tant, la IL-17 desenvolupa un paper fonamental en la patogènesi de la MII.

Una altra citocina clau que intervé en la patogènesi de la MII és el factor α de necrosi tumoral (TNF- α) [38]. El TNF- α promou l'expressió d'altres citocines pro-inflamatòries com la IL-1, la IL-6 entre d'altres. A més, en pacients amb MC i CU s'ha correlacionat

els nivells de TNF- α en sèrum amb la gravetat clínica de la malaltia [39]. Aquest coneixement ha permès desenvolupar certs fàrmacs anti-TNF que presenten taxes més elevades d'inducció i manteniment de la remissió en pacients amb MII en comparació amb altres teràpies convencionals [40].

Les cèl·lules Treg també s'associen amb la patogènesi de la MII. Aquestes cèl·lules presenten un paper crític en la preservació de l'homeòstasi immune i l'establiment de la inflamació en resposta a antígens estrangers de patògens i no contra bacteris comensals. El funcionament incorrecte d'aquestes cèl·lules pot provocar un trastorn inflamatori. Mutacions en la IL-10, IL produïda per les cèl·lules Treg, provoquen un funcionament aberrant de les cèl·lules Treg i alhora, una major susceptibilitat a la MII [41]. Certs estudis en models animals han evidenciat que mentre que la falta de cèl·lules Treg fa augmentar la progressió de la CU, l'alliberació de IL-10 pot fer disminuir la progressió de la malaltia [42]. Així doncs, la IL-10 és una citocina immunosupressora que podria tenir valor terapèutic per al tractament de la MII crònica [43].

La comunicació de cèl·lules T amb microorganismes del tracte gastrointestinal és essencial per mantenir la immunitat intestinal [44]. El procés de diferenciació de les cèl·lules Th17 està determinat per diferents factors, entre els quals destaca la composició de la microbiota endògena present a l'intestí [45]. Això s'ha evidenciat en models animals, on en ratolins lliures de gèrmens i amb presència d'antibiòtic, es redueix considerablement la diferenciació de les cèl·lules Th17 a l'intestí [46,47].

1.6 Maneig clínic de la Malaltia Inflamatòria Intestinal

L'estudi de la MII és un repte constant que presenten els metges que tracten aquest trastorn ja que s'han de tractar els següents aspectes: diagnòstic, pronòstic, avaluació de l'activitat i la gravetat de la malaltia, així com avaluar l'efecte de la teràpia. Per a cadascun d'aquests aspectes, no hi ha un examen o prova per excel·lència, sinó que cal tenir en compte la combinació de símptomes, exàmens clínics, índexs de laboratori, radiologia i endoscòpia amb histologia per realitzar el diagnòstic, avaluar la gravetat i predir l'evolució de la malaltia. És per això, que existeix una recerca constant de marcadors amb finalitat diagnòstica, per avaluar l'activitat de la malaltia, per a la predicció de recaiguda i pel seguiment de la teràpia en la MII.

1.6.1 Diagnòstic de la MII

El diagnòstic de la MII en adults requereix un examen físic complet i una revisió de la història del pacient. El seu diagnòstic ha de ser precoç i precís ja que és important per al curs de la malaltia, guiant en el maneig del pacient i en les decisions terapèutiques. Existeixen diferents trastorns intestinals que poden cursar amb simptomatologia compatible amb la MII i és per això que, a més de basar-se en aspectes clínics, es requereixen diverses proves, incloent-hi proves de sang, examen de femta, endoscòpia, biòpsies i estudis d'imatge per tal d'excloure altres causes i confirmar el diagnòstic de la MII.

El procés de diagnòstic inicial ha d'incloure una història clínica completa, una exploració física, una analítica general i una demostració morfològica de la presència de lesions compatibles, a més de l'exclusió d'altres malalties que puguin presentar simptomatologies semblants com les malalties infeccioses.

Proves d'imatge en el diagnòstic de la MII

Com a eina diagnòstica, les tècniques d'imatge són primordials i necessàries per establir el diagnòstic perquè permeten visualitzar de forma directa la mucosa intestinal i obtenir mostres de biòpsia. Entre aquestes eines destaquen la ecografia, que en alguns casos resulta necessària per a determinar la ubicació del procés inflamatori i descartar altres malalties amb simptomatologia semblant, la radiografia abdominal, la tomografia computada i la ressonància magnètica que són de gran utilitat per diagnosticar complicacions com la estenosis i les fístules a més de determinar la localització afectada, i, per últim, les proves endoscòpiques com la gastroscòpia i la colonoscòpia. L'endoscòpia té un paper fonamental en el diagnòstic, però també en el maneig i tractament de la MII.

En pacients amb presentacions clíniques que suggereixen un diagnòstic de MII, l'avaluació inicial ha d'incloure una colonoscòpia fins al ili terminal. La colonoscòpia amb ileoscòpia permet tant la visualització directa del còlon i de l'ili terminal, com realitzar biòpsies necessàries [48]. En la MC, que pot afectar tant el còlon com l'ili de manera discontinua, s'observen petites ulceracions superficials aftoides (Figura 6). En malalties més greus, la malaltia s'extén transmuralment amb afectacions que poden arribar fins a la capa serosa, i les ulceracions mucoses es fusionen per formar ulceracions longitudinals més profundes. En aquests casos es pot observar un engrossiment de la paret intestinal i en conseqüència, un estrenyiment del lumen intestinal. Les manifestacions extramurals en la MC donen lloc a fístules, abscessos, adhesions entre d'altres.

En la CU, que afecta exclusivament el còlon, l'afectació s'extén de manera distal a proximal de forma continuada. En la CU es poden observar petites erosions superficials, mentre que en les malalties més greus la mucosa es pot engrossir a causa d'una infiltració de cèl·lules a la làmina pròpia [49].

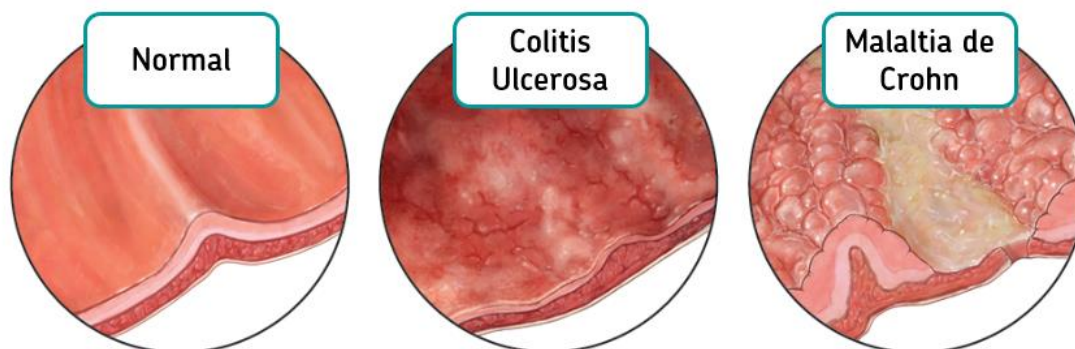


Figura 6. Normalitat i lesions presents en la CU i la MC.

Una de les metodologies que recentment està a l'alça és l'endoscòpia per càpsula. La càpsula és una eina que ha demostrat ser valuosa per avaluar la mucosa de l'intestí prim, regió difícilment accessible mitjançant l'endoscòpia convencional. Si les proves convencionals d'imatge donen negatiu, la càpsula és una bona metodologia per a pacients que presenten indicadors de malaltia orgànica com dolor abdominal inexplicat juntament amb algun altre símptoma (per exemple, pèrdua de pes, anèmia) o un historial familiar relacionat amb la MII. Així doncs, aquesta metodologia permet o bé confirmar un diagnòstic negatiu o bé descobrir evidències prèviament no detectades per altres metodologies d'inflamació i MII [50].

Marcadors pel diagnòstic de la MII

Existeixen certs biomarcadors inflamatoris que poden ser útils per determinar la presència d'inflamació sistèmica, però que no poden assegurar el diagnòstic de la MII. Els principals marcadors que trobem que poden ajudar al diagnòstic de la MII són la proteïna C reactiva (CRP) i la Calprotectina fecal (CF).

La Proteïna C Reactiva és una de les proteïnes de la fase aguda més importants en els humans [51]. És una proteïna pentamèrica, formada per cinc monòmers que en circumstàncies normals és produïda per hepatòcits en quantitats baixes (<1 mg/l). Tot i això, després d'episodis inflamatoris, els hepatòcits augmenten ràpidament la producció de CRP sota la influència de la IL-6, el factor de necrosi tumoral (TNF- α) i IL-1b podent arribar a assolir nivells màxims en sèrum d'entre 350 i 400 mg/l [52]. En casos

d'inflamacions lleus o infeccions víriques els nivells de CRP es troben entre 10 i 40 mg/l i una inflamació activa intensa o una infecció bacteriana generalment genera uns nivells de CRP d'entre 50–200 mg /l. Els nivells més elevats (> 250 mg/l) generalment els trobem en condicions greus [53,54].

La CRP té una vida mitjana curta, d'unes 19 hores, en comparació amb altres proteïnes de fase aguda i, per tant, aquesta augmenta abans de l'aparició de la inflamació i disminueix ràpidament després de la resolució de la inflamació [55]. Tot i que la CRP es troba augmentada en la majoria de les malalties inflamatòries, inclosa la MII, hi ha una heterogeneïtat notable en la resposta de la CRP entre la MC i la CU. Mentre que la MC està associada a uns nivells elevats de CRP, la CU presenta un augment de la CRP poc significatiu o inclús absent [56,57]. No obstant, la CRP pot ser útil en CU com a marcador de resposta als esteroides en els brots greus de CU. A més, tot i que la CRP és un bon test per detectar una inflamació sistèmica, no és prou sensible ni específic per a ser utilitzat sol en la MII.

La calprotectina fecal és una proteïna petita d'unió al calci descobert per primera vegada el 1980. Aquesta proteïna que pot tenir propietats antimicrobianes representa el 60% del contingut proteic del citosol present en neutròfils [58], no obstant, també s'ha detectat en monòcits i macròfags, encara que a concentracions inferiors. En estats inflamatoris, els neutròfils polimorfonuclears migren cap a la mucosa intestinal afectada des de la circulació i allà alliberen al lumen quantitats elevades de Calprotectina que s'acaba excretant amb les femtes on es pot detectar de manera no invasiva [59]. La concentració de calprotectina en els excrements s'ha demostrat que es correlaciona bé amb l'activitat inflamatòria i per tant, presenta bones propietats per ser utilitzat com a marcador per al diagnòstic de la MII. A més, la CF en les femtes, es troba distribuïda de forma homogènia i és estable fins a 7 dies a temperatura ambient característiques que li donen més valor a aquest marcador [60].

No obstant això, la CF no és específica de la MII i pot ser elevada en altres afeccions gastrointestinals. També s'ha observat que la CF pot presentar una variació considerable del dia a dia en les concentracions de CF entre els individus, tot i que els estudis han estat contradictoris. A més, les concentracions de calprotectina fecal poden variar amb l'edat [61].

Diagnòstic diferencial entre la MC i la CU

A la pràctica, també és important realitzar el diagnòstic diferencial entre ambdós subtipus principals de MII, la MC i la CU. Per fer-ho, s'utilitzen certes diferències clíniques, endoscòpiques i histològiques (Taula 2). A més, recentment s'ha proposat que el patró d'anticossos ASCA (habitualment positius en la MC) i ANCA (habitualment positius en la CU) podrien esdevenir un bon mètode per discriminar entre ambdues entitats [62]. No obstant, altres autors suggereixen que la seva utilitat en la practica clínica és molt limitada [63,64].

Taula 2. Criteris diferencials entre la Malaltia de Crohn i la Colitis ulcerosa.

	Malaltia de Crohn	Colitis Ulcerosa
Clínica		
Rectorràgies	Comuns	Sempre
Massa abdominal	Freqüent	Poc freqüent
Dolor abdominal	Freqüent	Poc freqüent
Pèrdua de pes	Freqüent	Poc freqüent
Febre	Freqüent	Poc freqüent
Fístules	Comuns	Rares
Abscessos	Comuns	Rars
Malaltia Perianal	Comú	Rara
Estenosis intestinal	Freqüent	Poc freqüent
Endoscòpia		
Superfície mucosa	Normal o nodular	Granular
Úlceres	Quasi sempre	Només en greus
Úlceres aftoses	Freqüents	Estrany
Afecció rectal	25-50 % casos	95 % casos
Distribució lesions	Discontínua (>90%)	Contínua (90 %)
Estenosi	Freqüent	Poc freqüent
Pseudopòlips	Poc freqüents	Freqüents
Ili afectat	Freqüent	< 10 %
Histologia		
Granulomes	Freqüent	Estrany
Inflamació discontínua	Freqüent	Estrany
Depleció de mucina	Poc freqüent	Freqüent
Distorsió discontínua de les criptes	Estrany	Freqüent
Canvis neuronals	Freqüent	Estrany

1.6.2 Monitoratge de l'activitat en la MII

Els pacients diagnosticats de MII alternen períodes d'activitat amb d'altres de remissió, és per això, que és molt important realitzar un seguiment exhaustiu i continu de l'activitat de la malaltia. Un correcte seguiment de l'estat d'activitat de la malaltia és indispensable per tal de poder adaptar eficaçment la pauta terapèutica.

Al llarg dels anys, s'han desenvolupat diversos sistemes de classificació i puntuació de l'activitat en la MII amb l'objectiu d'ajudar a definir més eficientment l'estat de la malaltia i l'eficàcia de la teràpia. Actualment, existeixen diferents metodologies per definir l'activitat o la remissió inflamatòria en pacients amb MII, entre elles hi destaquen els paràmetres clínics, els paràmetres endoscòpics i els paràmetres biològics.

Paràmetres clínics

El maneig tradicional de l'activitat en la MII ha estat estretament relacionat amb el seguiment dels símptomes clínics presents en els pacients complementat amb les eines d'avaluació endoscòpica. L'avaluació de l'activitat en la MC i la CU no resulta fàcil, principalment, per a l'heterogeneïtat presentada per ambdues malalties i pel fet de presentar episodis d'activitat i de remissió. Això ha portat a desenvolupar diferents índexs clínics d'activitat, que basant-se en variables concretes i objectives, permeten establir la gravetat del brot i avaluar l'eficàcia dels tractaments.

En la MC, l'índex d'activitat de malaltia de Crohn o CDAI (Crohn's Disease activity index) és l'eina més utilitzada per avaluar la resposta al tractament en els assajos clínics [65]. Tot i ser un bon índex, el seu càlcul és complex i inclou vuit ítems, entre els quals hi ha l'hematòcrit i un examen físic extens, és per això que rarament és usat en pràctiques clíniques habituals. A més, la variabilitat entre observadors és elevada fins i tot entre metges experimentats.

L'índex de Harvey-Bradshaw (IHB) és més senzill d'utilitzar que l'índex anterior, ja que és més curt i facilita la recollida de les dades, a més, s'ha demostrat que les puntuacions d'aquest índex es relacionen estretament amb les puntuacions del CDAI. L'IHB té cinc variables (inclòs el benestar general, la gravetat del dolor abdominal, el nombre de femtes líquides, la presència de massa abdominal i la presència d'altres complicacions). La remissió en aquest índex està definida amb una puntuació inferior o igual a 4 punts (Taula 3).

Taula 3. Índex de Harvey-Bradshaw per la MC.

Síntomes	Gravetat	Puntuació
1. Estat general	Bé	0
	Regular	1
	Malament	2
	Molt malament	3
	Extremadament malament	4
2. Dolor abdominal	Cap dolor	0
	Una mica de dolor	1
	Dolor moderat	2
	Molt de dolor	3
3. Deposicions diarreïques	Nº de deposicions al dia	
4. Massa abdominal	No	0
	Massa dubtosa	1
	Massa definida	2
	Massa definida amb sensibilitat	3
5. Complicacions	Artràlgies	
	Uveïtis	
	Eritema	
	Piodèrnia	
	Úlceres	
	Abscessos	
TOTAL PUNTUACIÓ		

En la CU, existeixen 17 índexs clínics que avaluen els símptomes dels pacients, vuit dels quals ho fan independentment de la puntuació endoscòpica o dels marcadors bioquímics. Un dels més utilitzats, tant a la pràctica clínica com en assajos clínics és l'índex de Mayo parcial (IMP), que inclou com als dos únics símptomes avaluats, la freqüència del trànsit intestinal i el sagnat rectal. Un avantatge important d'aquest índex, ha sigut la incorporació de les troballes endoscòpiques en la valoració, essent de gran utilitat per avaluar amb major objectivitat la resposta als tractaments farmacològics (Taula 4). La remissió d'aquest índex es troba definida amb una puntuació igual o inferior a dos punts.

Taula 4. Índex clínic de Mayo per la CU.

Síntomes	Gravetat	Puntuació
1. Freqüència defecatòria	Normal	0
	1-2 deposició/dia més de l'habitual	1
	3-4 deposició/dia més de l'habitual	2
	> 4 deposició/dia més de l'habitual	3
2. Hemorràgia rectal	Cap	0
	Fils hemàtics en algunes deposicions	1
	Sagnat visible en la majoria de les deposicions	2
	Sagnat sense femtes	3
3. Aparència endoscòpica de la mucosa	Normal	0
	Malaltia lleu	1
	Malaltia moderada	2
	Malaltia greu	3
4. Valoració mèdica	Normal	0
	Lleu	1
	Moderada	2
	Greu	3

No obstant, aquests índexs clínics es basen en la simptomatologia del pacient essent uns criteris subjectius, i per tant, presenten una baixa correlació amb la inflamació de la mucosa [66,67]. Per resoldre aquest problema s'han proposat, a part de la realització de proves d'imatge com la colonoscòpia, diferents biomarcadors no invasius com a marcadors potencials de l'activitat en la MII.

Paràmetres endoscòpics

En la MII, la curació de la mucosa és el principal objectiu quan es valora endoscòpicament l'activitat de la malaltia. Aquesta curació, hauria d'implicar l'absència d'ulceracions i erosions. No obstant això, actualment no hi ha una definició validada de curació de la mucosa en la MII.

La colonoscòpia es considera el “gold Standard” per avaluar la curació de la mucosa intestinal d'aquests pacients. S'han utilitzat nombrosos índexs endoscòpics tant per la MC com per la CU en assajos clínics.

En la MC, s'han elaborat índexs endoscòpics validats per a l'avaluació de l'activitat endoscòpica. L'Índex de severitat de la malaltia de Crohn (CDEIS) és l'eina més utilitzada en assajos clínics, mentre que la puntuació endoscòpica simple de la malaltia

de Crohn (SES-CD) és una versió lleugerament simplificada del mateix índex. El CDEIS examina quatre variables endoscòpiques (presència d'ulceració profunda, ulceració superficial, longitud de la mucosa ulcerada i longitud de la mucosa afectada) en cadascuna de les ubicacions següents: recte, còlon sigmoide i esquerre, còlon transvers, còlon dret i ili. Tot i que el CDEIS és un índex reproducible i validat, és complex i requereix més de 30 entrades per assolir la puntuació final. El SES-CD es correlaciona bé amb el CDEIS, però és menys complex. Les característiques endoscòpiques (mida de l'úlcer, extensió de les superfícies ulcerades, extensió de superfícies amb qualsevol altra lesió i estenosi) es puntuen de 0 a 3 en funció de la gravetat o l'extensió en cadascuna de les cinc localitzacions colorectals avaluades pel CDEIS (Taula 5). La remissió endoscòpica es defineix amb un SES-CD ≤ 2 punts.

Taula 5. Índex SES-CD per a la MC.

Variable	0	1	2	3
Mida úlcer	No	0,1 – 0,5 cm	0,5 – 2 cm	> 2 cm
Superfície ulcerada	No	< 10 %	10 – 30 %	> 30 %
Superfície afectada	Cap	< 50 %	50 – 75 %	> 75 %
Estenosis	No	Única amb pas	Múltiple franquejable	Infranquejable

SES-CD total (rang 0-60) = suma de les puntuacions del ili, còlon dret, transvers, esquerre i recte per cada variable (0 – 15 punts per cada segment)

En la CU, els índexs més utilitzats són l'índex Endoscòpic de Severitat de la Colitis Ulcerosa (UCEIS) i l'índex endoscòpic de Mayo (IEM) [68]. L'índex UCEIS és l'únic índex endoscòpic validat per la CU. Aquest índex és senzill d'utilitzar en la pràctica clínica, ja que només cal que l'endoscopista classifiqui el patró vascular, el sagnat i les erosions o ulceracions presents. Mentre que aquest índex redueix la variació entre endoscopistes i permet unificar la manera de descriure l'activitat de la CU, l'UCEIS no descriu l'extensió de la malaltia i no discrimina entre activitat lleu, moderada o greu [69]. L'índex IEM tot i no estar validat formalment, ha estat l'estàndard per a avaluar l'activitat de la malaltia en assajos clínics en adults. L'índex complementa l'IMP afegint la avaluació de la endoscòpia i avalua quatre components, cadascun amb un màxim de puntuació de 3. L'objectiu de la remissió és un IEM ≤ 1 . Aquest punt de tall s'associa amb una taxa de colectomia més baixa [70].

Tot i l'alta capacitat de la colonoscòpia, aquest mètode no és adequat pel seguiment regular de la malaltia degut al seu caràcter invasiu, als costos que implica i a la baixa acceptació existent per part del pacient [67,68,71]. L'accessibilitat a nous marcadors no invasius que presentin bona correlació amb l'activitat clínica, endoscòpica i histològica és de màxima rellevància en la pràctica clínica habitual per tal d'evitar la realització repetida de processos invasius.

Marcadors en l'activitat de la MII

En les últimes dècades, els estudis per cercar marcadors biològics en la MII han incrementat. Això és degut principalment per la necessitat de trobar una mesura objectiva de l'activitat de la malaltia, degut a que sovint la simptomatologia és subjectiva, i una mesura que eviti procediments invasius (endoscòpics) que sovint són una càrrega per al pacient i pels hospitals.

El marcador ideal per la MII ha de tenir moltes qualitats entre les que destaquen el fàcil ús, la rapidesa i la reproductibilitat, entre d'altres (Taula 6). A més, hauria de ser específic per a la malaltia, detectant l'activitat de la malaltia i supervisant l'efecte del tractament [72].

Taula 6. Qualitats del marcador ideal per monitoritzar l'activitat de la MII.

Realització del test	Qualitats
Simple	Específic per malaltia
Fàcil de realitzar	Capaç de mesurar objectivament l'activitat de la malaltia
No invasiu	Capaç de predir el curs de la malaltia
Barat	Capaç de monitoritzar l'efecte dels tractaments
Ràpid	Tenir un valor pronòstic per avaluar la morbiditat i la mortalitat
Reproduïble entre laboratoris i entre individus	

Tot i que l'existència d'un marcador ideal per a la MII facilitaria molt la tasca del gastroenteròleg o cirurgià que tractés aquests pacients, actualment cap marcador per si sol ha demostrat posseir totes les qualitats enumerades anteriorment. No obstant, s'han identificat alguns marcadors interessants com serien la CRP i la CF.

La concentració de la CRP és correlaciona dèbilment amb l'activitat endoscòpica en pacients amb MC i CU, on pacients en estat actiu poden presentar nivells normals de CRP i pacients en remissió poden tenir nivells elevats de CRP [73–75]. Tot i això, alguns

estudis han relacionat la reducció dels nivells de CRP amb la resposta al tractament en aquests pacients [76]. Així doncs, l'ús de la CRP en la pràctica clínica com a marcador de rutina per determinar l'activitat de la MII és poc útil en algunes situacions.

La lactoferrina és una glicoproteïna que conté ferro i és secretada per la majoria de les membranes mucoses. És el component principal dels grànuls polimorfonuclears secundaris presents en els leucòcits, que són les cèl·lules principals de la resposta inflamatòria aguda. Quan hi ha inflamació a l'intestí, els leucòcits envaeixen la mucosa, la qual cosa produeix un augment en l'excreció de lactoferrina en les femtes [77,78]. Diversos autors han demostrat que les concentracions de lactoferrina són significativament més elevades en pacients amb MII en estat actiu en comparació amb aquells pacients en fase de remissió [78,79].

Avui en dia, el biomarcador més utilitzat en la pràctica clínica és la CF. La CF a més d'utilitzar-la en el diagnòstic de la MII també presenta una bona correlació amb l'activitat de la malaltia i, a més, pot ser un predictor útil per a la predicció de recaiguda o de la resposta a la teràpia en la MII. La CF s'ha utilitzat com a marcador de seguiment en pacients diagnosticats de MII. Segons els assajos recents, la sensibilitat de la CF per detectar l'activitat de la mucosa oscil·la entre el 70% i el 100% i l'especificitat oscil·la entre el 44% i el 100%, depenent el punt de tall utilitzat [80].

Tot i els seu ús generalitzat i els bons resultats que ofereix, la CF requereix d'un punt de tall predeterminat per al seguiment de l'activitat de la MII que no està ben consolidat. Això és degut a la gran variabilitat derivada de la diversitat de dissenys emprats en els diferents estudis, especialment pel que fa a la definició de la remissió i al punt de tall utilitzat [81,82]

Per tant, la recerca de nous marcadors no invasius per al seguiment de l'activitat de la malaltia amb una precisió més elevada que la CRP, la lactoferrina i la CF continua.

1.6.3 Tractament en la MII

La MII no presenta cura, a banda de la proctocolectomia total en la CU, i es per això que els tractaments actuals es centren en la inducció i el manteniment de la remissió clínica de la malaltia [83]. A més dels símptomes clínics, la curació de la mucosa intestinal es considera l'objectiu essencial de la teràpia en la MII. La cicatrització de la mucosa està associada a una reducció de les hospitalitzacions, de la necessitat de cirurgies i a una menor taxa de complicacions de la malaltia [84,85].

L'elecció de la teràpia farmacològica es basa en la localització de la malaltia i en la gravetat d'aquesta, així com en les manifestacions intestinals i extraintestinals. Quan la teràpia escollida no aconsegueix una inducció de la remissió dels símptomes en un període d'assaig raonable, el metge sovint es planteja un altre enfocament terapèutic fins a controlar els símptomes i es pugui iniciar la teràpia de manteniment.

El medicament ideal ha de ser eficaç, segur, senzill d'administrar i assequible. També ha de tenir pocs efectes secundaris. Però el cert és que no hi ha una teràpia ideal per al global de la MII, i es necessari adaptar el tractament a les necessitats de cada persona.

Actualment, hi ha cinc categories bàsiques de medicaments utilitzats en el tractament de la MII que s'utilitzen en funció del estat de la malaltia, de la severitat de la mateixa i de la resposta als tractaments (Figura 7).

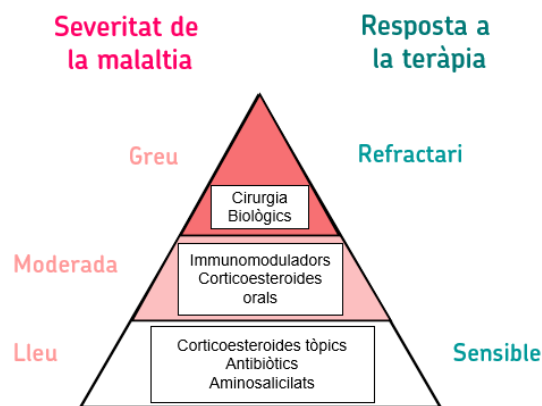


Figura 7. Teràpia farmacològica en la MII segons la severitat de la malaltia i la resposta a la teràpia.

Així doncs, els grups principals de tractament per a la MII són: els aminosalicilats, els corticoides, els immunomoduladors, els antibiòtics i els agents biològics. Els principals fàrmacs dins de cada tipologia de teràpia els trobem esmentats en la taula 7.

Taula 7. Principals fàrmacs utilitzats per a tractar pacients amb la MII segons la tipologia de teràpia utilitzada.

Tipologia de teràpia	Fàrmac
Aminosalicilats	Mesalazina i Sulfasalazina
Corticoesteroides	Prednisona, Budesonida i Prednisolona
Immunomoduladors	Azatioprina, Ciclosporina i Metotrexat
Antibiòtics	Ciprofloxacina i Metronidazole
Agents biològics	Adalimumab, Infliximab i Vedolizumab, entre d'altres.

Aminosalicilats

Els aminosalicilats són un dels compostos més utilitzats per a la CU que contenen àcid 5-aminosalicílic (5-ASA). La Mesalazina i la Sulfasalazina són els fàrmacs més utilitzats. Aquests medicaments, que es poden administrar per via oral o per via rectal, presenten efectes antiinflamatoris múltiples, incloent la inhibició de la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, els limfòcits B i diverses citocines inflamatòries. Així doncs, són eficaços per tractar episodis lleus i moderats principalment en pacients amb CU, a més de prevenir les recaigudes i mantenir la remissió [86]. Per contra, la sulfasalazina presenta efectes secundaris en fins a un 40% dels pacients causant nàusees, mal de cap, malestar en l'estòmac o fatiga.

Malauradament, els 5-ASA tenen poca eficàcia en pacients amb MC i no s'han observat efectes clínics en aquests pacients ni en fase activa ni en fase de remissió [87,88].

Corticoesteroides

Els corticosteroides són antiinflamatoris potents i d'acció ràpida que s'utilitzen en fases de brot o empitjorament de la malaltia [89]. Els corticoesteroides més utilitzats són la prednisona i la prednisolona. Aquests, es poden utilitzar per via intravenosa, en els brots greus, i també per via oral.

La majoria dels pacients noten una millora dels símptomes als dies posteriors a l'inici dels corticoides. A més de la seva acció antiinflamatòria, els corticoides també són immunosupressors. Això significa que disminueixen l'activitat del sistema immunitari incrementant la probabilitat de patir infeccions.

Els corticoesteroides no són eficaços en la prevenció dels brots de la malaltia, i és per això que no es recomanen com a teràpia de manteniment en la MII i només es recomanen per a ús, a curt termini i en dosis baixes, per establir la remissió del pacient [90]. Aquesta tipologia de tractament poden presentar diversos efectes secundaris que variaran en funció de la durada del tractament. Mentre que pacients que es tracten durant un curt termini poden presentar efectes lleus com augment de pes, retenció de líquids, acné entre d'altres, els pacients amb tractaments de llarga durada poden presentar efectes més nocius com fragilitat en la pell, dolors musculars i en les articulacions, canvis en la distribució del greix en el cos, entre d'altres [91].

Immunomoduladors

Els fàrmacs immunomoduladors debiliten i modulen l'activitat del sistema immunitari disminuint la resposta inflamatòria. Aquests medicaments es recomanen principalment a aquells pacients diagnosticats de MC o CU que no responen als aminosalicilats i als corticoides o que presenten efectes secundaris a aquests últims o aquells pacients als qual se'ls vol mantenir l'estat de remissió [92].

Per tal d'accelerar la resposta durant els brots actius de la malaltia, els fàrmacs immunomoduladors es poden combinar amb corticoides, no obstant, es requereixen dosis més baixes dels segons per tal de minimitzar els seus efectes secundaris. Aquest procediment permet retirar abans els corticoides eliminant els possibles efectes que aquests puguin tenir sobre el pacient. L'azatioprina i la mercaptopurina són els fàrmacs immunomoduladors més segurs, no obstant, presenten efectes secundaris com molèsties gastrointestinals, nàusees, vòmits i cansament. Per controlar la possible aparició d'efectes secundaris, els pacients s'han d'anar realitzant anàlisis de sang durant el tractament. Altres fàrmacs semblants dintre dels immunomoduladors serien la ciclosporina i el tacrolimus per la CU i el metotrexat per la MC [93].

Els dos primers fàrmacs s'utilitzen generalment per evitar el rebuig d'un transplantament d'òrgans, no obstant, han demostrat la seva eficàcia per tractar brots de CU que no responen a corticoides [94,95]. Per altra banda, el metotrexat ha demostrat eficàcia per la remissió en la MC, no obstant, presenta certs efectes secundaris que fan que es necessiti un constant seguiment del pacient [96].

Antibiòtics

Els antibiòtics s'utilitzen freqüentment com a enfocament de tractament primari en la MII, tot i que no s'ha identificat cap agent infecció específic com la causa d'aquestes malalties. Tot i això, els investigadors creuen que els antibiòtics poden ajudar a controlar els símptomes de la malaltia intestinal reduint els bacteris intestinals i suprimint directament el sistema immunitari de l'intestí. Dintre dels antibiòtics més utilitzats trobem el metronidazol i la Ciprofloxacina [97,98].

Aquests antibiòtics també poden ser efectius com a teràpia a llarg termini en algunes persones amb MII, en particular els pacients amb MC, que cursen amb febre o que presenten fístules o abscessos recurrents a prop de la regió anal. Tot i que és útil en persones amb MC, els antibiòtics generalment no es consideren útils per a aquelles

persones amb CU, ja sigui per mantenir la remissió o en situacions agudes [97]. Així doncs, tot i que els antibiòtics tenen certa eficàcia en la inducció de la remissió en la MII, especialment en la MC, el seu ús no és recomanable per les directrius internacionals i actualment només es recomana en la reservoritis [99].

Anticossos monoclonals (“Biològics”)

A finals dels anys noranta van aparèixer al mercat els tractaments biològics. Aquests són anticossos monoclonals que interfereixen amb la resposta inflamatòria del cos en la MII dirigint-se a components moleculars específics del procés inflamatori com les citocines, proteïnes entre d’altres.

Existeixen diverses classes de biològics per al tractament de la MII. Principalment es poden dividir en aquells que inclouen inhibidors de citocines com el TNF- α , la IL-12 i la IL-23 i els anticossos bloquejadors de la integrina [100].

Com s’ha comentat amb anterioritat, la citocina pro-inflamatòria TNF- α presenta un paper fonamental en el desenvolupament i la progressió de la MII. Els fàrmacs contra el TNF- α s’uneixen a aquesta molècula i impedeixen que aquesta citocina s’uneixi als seus receptors provocant una inhibició de la progressió d’una cascada inflamatòria desencadenada pel TNF- α al tracte gastrointestinal [101]. Alguns dels tractaments anti-TNF- α pel tractament de la MII són l’Infliximab (IFX), que s’administra de manera intravenosa en l’hospital, i l’Adalimumab (ADA) i el Golimumab que s’administren subcutàniament amb xeringues ja carregades amb la dosi que s’ha d’administrar, fet que permet al mateix pacient subministrar-se la dosi des de casa.

Unes altres citocines produïdes pels leucòcits i que estan implicades en la inflamació i la patogènesi de la MII són la IL-12 i la IL-23 [102]. El tractament biològic anomenat Ustekinumab és el primer biològic que bloqueja ambdues interleucines impedit la seva unió al seu receptor IL-12R β 1 present a les cèl·lules T. Aquesta unió es deriva en una menor migració i activació de cèl·lules Th17 reduint la inflamació a l’intestí [102].

El Vedolizumab és un tractament bloquejador de la integrina α 4 β 7 altament específic. Les integrines són proteïnes transmembrana que permeten que les cèl·lules s’adhereixin al seu entorn i juguin un paper en la senyalització cel·lular. La investigació ha descobert tres subunitats d’integrina diferents associades a la migració dels leucòcits al tracte gastrointestinal: α 2 β 2, α 4 β 1 i α 4 β 7. Els bloquejadors de la integrina han estat dissenyats específicament per evitar que aquestes tres subunitats s’uneixin als receptors de la

molècula 1 d'adhesió de la cèl·lula vascular de la mucosa (MAdCAM-1) als vasos sanguinis del tracte gastrointestinal. D'aquesta manera s'evita la migració de cèl·lules immunes al tracte GI, minimitzant així la inflamació [103].

1.6.4 Cirurgia en la MII

La teràpia mèdica redueix la inflamació intestinal i millora els símptomes, però, malgrat els avenços terapèutics, aproximadament el 20% dels pacients amb CU i fins a un 80% dels pacients amb MC necessitaran sotmetre's a una cirurgia intestinal al llarg de la seva vida [104,105] [105].

La majoria de pacients amb CU que s'han de realitzar una cirurgia es realitzen una proctocolectomia total ja que proporciona una cura permanent. Aquest procediment va associat d'una anastomosi amb bossa ileo-anal i creació d'un reservori. No obstant, la principal complicació que es pot donar a llarg termini amb una freqüència d'entre el 10% i el 55% dels casos és la reservoritis o pouchitis [106]. La colectomia parcial es realitza poques vegades a causa de l'elevada probabilitat de que la malaltia reapareixi en el còlon restant [107].

A diferència de la CU, en la MC la cirurgia no és una cura definitiva. Per això, la resecció intestinal està indicada per a pacients refractaris a la teràpia o intolerants als tractaments mèdics. També es realitza a pacients que presentin complicacions greus de la malaltia com per exemple obstrucció, subobstruccions recurrents, abscessos abdominals, perforació, hemorràgia greu o, fins i tot, càncer. En el cas de la MC, el procediment quirúrgic més comú és la resecció ileo-cecal i la reconstrucció primària, que s'indica en pacients amb afectació ili terminal o ileocolònica [107].

Tot i que el procediment quirúrgic permet millorar els símptomes i la qualitat de vida dels pacients amb MC, la recurrència de l'activitat endoscòpica al cap d'un any després de la resecció ileo-colònica s'observa fins un 80% dels pacients, mentre que la recurrència clínica s'observa en prop d'un 20% dels pacients als 2 anys i en un 80% fins als 20 anys [108,109].

2. LA SÍNDROME DE L'INTESTÍ IRRITABLE

El síndrome de l'intestí irritable (SII) és una desordre intestinal que es presenta habitualment en la vida adulta primerenca afectant al voltant del 11% de la població mundial [110,111]. Tot i la seva alta prevalença, només una minoria dels pacients amb

SII (30 – 50%) acaben buscant assistència sanitària, representant el 25% de les visites que realitza un gastroenteròleg i fins a un 12% de les visites d'un metge d'atenció primària [112]. Segons els símptomes clínics, la SII es pot subdividir en tres subtipus: la SII amb predomini de la diarrea (SII-D), la SII amb predomini del restrenyiment (SII-C) i una barreja d'ambdós (SII-M).

La SII és un trastorn que abans es pensava que era exclusivament psicossomàtic [113], ja que hi ha símptomes clínics de disfunció gastrointestinal. Tot i que s'han proposat diverses hipòtesis, l'etiologia i la fisiopatologia de la SII encara s'han de dilucidar. La influència de possibles alteracions en el sistema nerviós central i entèric, així com la permeabilitat deteriorada desencadenada per un antigen luminal i els nivells alterats de neuropèptids i hormones gastrointestinals s'han indicat com a possibles causes o factors que contribueixen a la malaltia [111,113–117]. A més, la motilitat intestinal anormal, així com factors genètics, ambientals i fisiològics (per exemple, ansietat, sensibilitat interpersonal, depressió, hostilitat, etc.) també poden tenir un paper important en el desenvolupament de la SII [113].

Els pacients amb SII poden presentar dolor i/o molèsties abdominals, inflor, flatulències excessives i alteracions intestinals [118]. Entre les persones diagnosticades de la SII la gravetat dels símptomes varia en un ampli espectre, des de símptomes molt lleus fins a una total incapacitat [119], experimentant una qualitat de vida alterada en comparació amb una població sana [120].

2.1 La Síndrome del Intestí Irritable i el seu diagnòstic

La SII es troba entre les deu malalties més difícils de diagnosticar on actualment s'estima que fins a un 45% dels pacients esperen més d'un any a ser diagnosticats i fins a un 17% triguen més de 5 anys. En la pràctica clínica diària s'han utilitzat diversos criteris diagnòstics (Kruis, Mangin, Roma) per distingir els pacients amb SII dels malalts intestinals orgànics, no obstant, els més recents i actualment utilitzats són els criteris de Roma IV. Segons aquests criteris, desenvolupats per classificar els trastorns gastrointestinals funcionals, un subjecte pot presentar SII si compleix els criteris esmentats en la taula 8. Aquests criteris diagnòstics s'han de complir durant els darrers 3 mesos amb l'inici dels símptomes com a mínim 6 mesos abans del diagnòstic.

El solapament de la SII amb altres trastorns intestinals funcionals o orgànics és molt freqüent. Tot i que els criteris de Roma IV són obligatoris, no són suficients per establir

el diagnòstic de la SII. El procediment a seguir consisteix en la realització d'una sèrie d'exploracions prèvies amb l'objectiu de descartar el diagnòstic d'altres patologies amb simptomatologia semblant per tal de reforçar el diagnòstic de la SII. En primer lloc, trobem les proves bàsiques de laboratori que inclouen l'hemograma, l'anàlisi de la proteïna C-reactiva i la calprotectina fecal com a indicadors d'inflamació, el perfil de la tiroides, les proves serològiques per la celiaquia, l'anàlisi microbiològica de les femtes (bacteris i paràsits), la prova de detecció de sang oculta en femta, entre d'altres. La calprotectina fecal és un dels paràmetres més utilitzats per diferenciar trastorns funcionals, com la SII, de malalties intestinals inflamatòries com és el cas de la MII [121].

Taula 8. Criteris de Roma IV per la Síndrome de l'Intestí Irritable.

Criteris de Roma IV

Dolor abdominal recurrent (≥ 1 dia per setmana de mitjana en els previs 3 mesos).

Dolor abdominal associat amb mínim dos dels següents tres símptomes:

- Dolor que millora amb la defecació.
 - Dolor associat a un canvi en la freqüència de les deposicions.
 - Dolor associat a un canvi en la composició de la femta.
-

Quan les proves de laboratori són normals, la calprotectina fecal és incerta i el pacient continua amb la simptomatologia, es realitzen proves complementaries, com la colonoscòpia, per tal de descartar la MII. Tot i el bon rendiment obtingut per les proves endoscòpiques, aquestes no deixen de ser invasives i per tant comporten cert risc pel pacient. Aquests procediments costosos i invasius no es fan de forma rutinària i, principalment, no donen una resposta concisa per diagnosticar el pacient.

Així doncs, la cerca d'una marcador que sigui capaç de diagnosticar la SII de forma específica permetria alleujar la incertesa i millorar la qualitat de vida del pacient, evitar efectes adversos de medicaments o tractaments innecessaris i estalviar eines diagnòstiques, preservar els limitats recursos sanitaris i iniciar el tractament més adequat pel pacient el més aviat possible.

El camp emergent de la investigació sobre l'estudi de signatures bacterianes basades en l'estudi de la microbiota, obre noves vies per al desenvolupament de nous biomarcadors pel diagnòstic de la SII. Els biomarcadors basats en microbiotes poden arribar a ser útils en el diagnòstic diferencial, així com en el seguiment i pronòstic de la MII. Tot i això, el camp actual necessita un desenvolupament més extens des del punt de vista clínic.

3. LA MICROBIOTA INTESTINAL

3.1 Composició de la microbiota intestinal

El microbioma humà és el conjunt de tota la microbiota que resideix sobre els humans o als seus òrgans i biofluids. Aquests microorganismes inclouen bacteris, arqueus, virus i eucariotes unicel·lulars com fongs i llevats que poden ser comensals, simbiòtics i patògens. Es calcula que la microbiota humana conté uns 3.8×10^{13} microorganismes residents essent 10 vegades més gran que el nombre de cèl·lules humanes presents en el nostre cos [122]. El tracte gastrointestinal és l'òrgan amb més diversitat d'espècies i més colonitzat, amb més del 70% dels microorganismes presents en tot el cos humà [123].

La microbiota digestiva es distribueix al llarg de tot el tracte digestiu, des de la boca fins al recte, no obstant, la densitat i la composició de la microbiota varia segons la localització anatòmica (Figura 8). Encara que l'intestí prim i el còlon són els òrgans amb més densitat de cèl·lules bacterianes, la composició de la microbiota varia significativament entre aquests òrgans degut a les diferents condicions que s'hi troben a nivell de pH, potencial redox, disponibilitat de nutrients i d'aigua, contingut en sal, competència microbiana, entre d'altres. Mentre que en l'estómac i en el tracte superior s'observa una menor quantitat de bacteris, la quantitat augmenta gradualment des del jejú fins al còlon, essent aquest últim l'òrgan on la densitat de cèl·lules bacterianes és més alta, estimada entre 10^{11} i 10^{12} cèl·lules per mil·lilitre, fent del còlon humà un dels hàbitats microbians més densament poblats de la Terra [124].

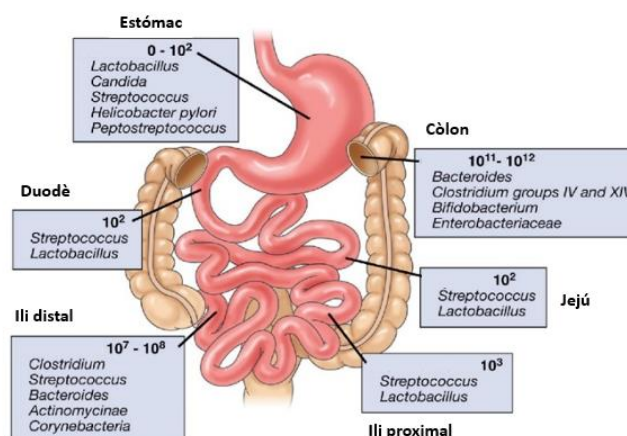


Figura 8. Composició i concentracions luminals d'espècies microbianes dominants en diverses regions del tracte gastrointestinal.

Les noves tecnologies de seqüenciació, juntament amb el desenvolupament de la bioinformàtica han permès descriure àmpliament les comunitats microbianes que habiten

el tracte intestinal humà. La major part de la microbiota intestinal està composta per anaerobis estrictes. S'ha vist que hi ha més de 50 filaments bacterians que colonitzen el tracte gastrointestinal [125]. Tot i això, la majoria d'espècies que es troben en el tracte digestiu pertanyen al fílum Bacteroidetes que són gram negatius (majoritàriament espècies del gènere *Bacteroides* o *Prevotella*), i al fílum Firmicutes que són majoritàriament gram positius (principalment espècies del gènere *Clostridium* i *Lactobacillus*) [126]. Altres fílums com Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Fusobacteria i Cianobacteria estan presents en unes proporcions menors. Els fongs i els arqueus representen menys de l'1% del total de la microbiota intestinal [127] (Figura 9).

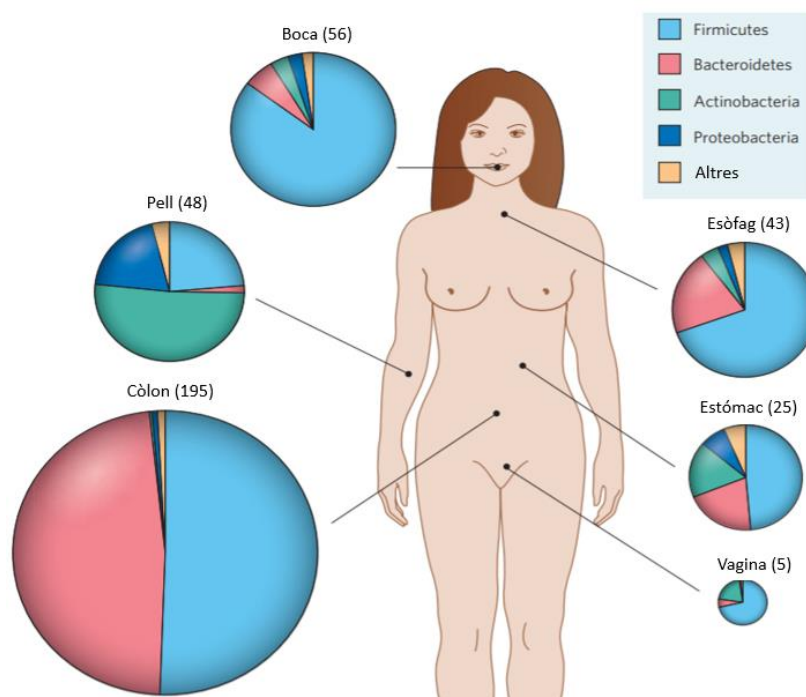


Figura 9. Composició a nivell de fílums segons diferents parts del cos.

A més de trobar diferències al llarg de les regions longitudinals del tracte digestiu, també se'n poden trobar en la composició microbiana entre el lumen i el revestiment intestinal. Això es deu principalment a la distribució del moc associat al teixit epitelial i al gradient d'oxigen que s'hi troba. Mentre que en individus sans la superfície epitelial i la capa de mucina interna presenten una baixa colonització, la capa de mucina externa conté colonitzadors especialitzats com *Akkermansia muciniphila*. En la fase lumen intestinal s'observa la comunitat microbiana més variable i les partícules de substrat del lumen intestinal són riques en colonitzadors especialitzats com *Ruminococcus* spp.

3.2 Evolució de la microbiota intestinal

La composició de la microbiota de l'intestí humà canvia amb l'edat, essent diferent des de la infància fins a la vellesa [128,129]. Mentre que els nadons tenen una microbiota intestinal que exerceix funcions específiques per a la biologia del nadó, com per exemple, l'entrenament del sistema immunitari o efectes en la nutrició de l'hoste, quan envellim la microbiota intestinal guanya diversitat i desenvolupa noves funcions fisiològiques per tal de complir els requisits dels adults, com ara l'extracció d'energia dels aliments [130].

La composició inicial de la microbiota es veu afectada després del part pel tipus de naixement i també per la microbiota intestinal present en la mare [131–135]. La modalitat de part és un dels factors que influeix en la composició inicial de la microbiota en els nadons. Els nadons que neixen per part natural, adquireixen bacteris que s'assemblen a la microbiota vaginal de la mare, mentre que els nadons nascuts per cesària adquireixen comunitats bacterianes similars a les que es troben en la superfície de la pell de les mares [132].

El tracte intestinal dels nadons es colonitza poques hores després del naixement [136], essent els bacteris anaerobis facultatius (és a dir, enterobacteriàcies, estreptococs i estafilococs) els primers colonitzadors. Amb el pas del temps, la concentració d'oxigen disminueix en el còlon, fet que permet que s'instal·lin a l'intestí els bacteris estrictament anaerobis [137]. La microbiota intestinal dels lactants oscil·la fins que s'introdueix un aliment sòlid a la seva dieta. Mentre que els nadons tenen una microbiota enriquida en Bifidobacteris, la introducció d'aliments sòlids provoca un canvi cap a una comunitat bacteriana dominada per Firmicutes i Bacteroidetes, que s'assembla més a la microbiota observada en adults [138]. Aquesta microbiota de tipus adult és capaç de metabolitzar els polisacàrids complexos i proporcionar beneficis a l'hoste [139]. L'alta plasticitat de la microbiota intestinal li permet canviar i adaptar-se en resposta a factors ambientals i endògens. Les persones grans canvien la seva dieta i el seu estil de vida (és a dir, alteracions del gust i l'olfacte, canvis en la motilitat intestinal i la masticació), fet que pot provocar alteracions que resultin en una dieta desequilibrada a nivells de nutrients [140]. Aquestes modificacions juntament amb la immunosenescència, afecten tant a l'estructura filogenètica com a la funcional de la microbiota intestinal, afavorint l'augment de patobionts com Enterobacteriaceae i la reducció de grups immunomoduladors com Clostridis del cluster IV i XIVa, i *Bifidobacterium* [141].

3.3 Funcions de la microbiota intestinal

L'aparició de tècniques com ara la hibridació fluorescent *in situ* (FISH), la reacció en cadena de la polimerasa quantitativa (qPCR) i la pirosequenciació del àcid ribonucleic ribosòmic (ARNr) 16S han ajudat molt a estudiar els mecanismes que intervenen en la relació simbiòtica entre la microbiota intestinal i la mucosa intestinal del hoste. En aquesta simbiosi, els microorganismes obtenen el suport alimentari necessari pel seu creixement, i la microbiota intestinal imparteix diverses funcions sobre l'hoste com per exemple, funcions metabòliques, immunològiques i intestinals [142], així doncs, la microbiota intestinal presenta un paper imprescindible per al correcte funcionament de l'organisme. No obstant, tot i les múltiples funcions que presenta la microbiota intestinal, encara falta coneixement més específic sobre les funcions de la microbiota intestinal i les seves interaccions amb l'hoste [143].

Una de les principals funcions de la microbiota intestinal és la metabòlica. La majoria de l'activitat metabòlica es produeix al còlon proximal on la disponibilitat de substrats és més elevada. En canvi, en el còlon distal, on la disponibilitat de substrats és més baixa i l'absorció de l'aigua redueix la difusió dels substrats, el metabolisme és més baix. Així doncs, el còlon proximal és el lloc principal on es realitza la fermentació bacteriana. Aquí, els polisacàrids derivats dels vegetals, són fermentats per bacteris sacarolítics, principalment fermentadors primaris que acaben produint àcids grassos de cadena curta o SCFA (de l'anglès *Short Chain Fatty Acids*) i gasos [144,145]. Els principals SCFA produïts pels bacteris són l'acetat, el propionat i el butirat. Els dos primers, està produïts majoritàriament per membres del fílum Bacteroidetes. Quan aquests àcids són produïts per la microbiota intestinal s'absorbeixen ràpidament utilitzant-se com a font d'energia. El butirat és la principal font d'energia dels colonòcits humans, i a més, pot induir l'apoptosi de cèl·lules del càncer de còlon i pot activar la gluconeogènesi intestinal que té efectes beneficiosos sobre la glucosa i l'homeòstasi [146]. Les principals espècies productores de butirat pertanyen al fílum Firmicutes.

A més dels SCFA, la microbiota intestinal també produeix vitamines com la vitamina K, la vitamina B12, la tiamina, la riboflavina i l'àcid fòlic [147]. Un altre dels seus papers fonamentals és la conversió d'àcids biliars secundaris a àcids biliars primaris.

Més enllà de conferir activitat metabòlica addicional a l'hoste, la microbiota intestinal també actua com agent protector contra agents patògens. Per conferir aquesta protecció, la microbiota intestinal actua a dos nivells en subjectes sans. Per una banda, la microbiota

intestinal resident evita la colonització i/o sobrecreixement d'espècies patògenes protegint l'hoste degut a la competència per l'espai d'adhesió, pels nutrients i per la producció de condicions ambientals hostils pel creixement d'espècies patògenes com serien canvis en el pH i el potencial redox de l'ambient [148,149].

Existeix una gran evidència sobre la capacitat d'estimulació del sistema immune per part de la microbiota intestinal tant a nivell local com sistèmic. Les interaccions entre la mucosa, la microbiota intestinal i el teixit limfoide associat al intestí (GALT) són fonamentals per a la defensa de l'hoste contra la invasió i la infecció d'espècies patògenes [148]. Els bacteris comensals influeixen en el desenvolupament dels components humerals del sistema immune de la mucosa i també modulen la producció de citocines per part dels limfòcits T, influenciant la funció de les cèl·lules dendrítiques, limfòcits B i cèl·lules epitelials [150,151]. Tot i que els mecanismes exactes d'aquestes interaccions són desconeguts, són fonamentals per la homeòstasi de l'ecosistema del tracte gastrointestinal. L'absència de microbiota en models animals provoca un subdesenvolupament de la immunitat de la mucosa intestinal presentant uns ganglis mesentèrics més petits i un nombre més reduït de cèl·lules immunes com ara cèl·lules plasmàtiques productores de Immunoglobulina A (IgA), cèl·lules T CD4+ i cèl·lules CD8+ receptores de cèl·lules T $\alpha\beta$ intraepitelials, fet que resulta en una disminució de la capacitat per combatre els bacteris patògens [152].

Recentment s'ha descrit que la microbiota intestinal pot tenir un paper important en la promoció de la curació intestinal i en la regeneració de la funció epitelial de la mucosa [153,154] [155]. Les lesions de l'intestí de certes malalties estan relacionades amb canvis en el microambient que poden induir la proliferació i el creixement d'espècies bacterianes, que indueixen la curació i regeneració del teixit. Utilitzant models animals, en ratolins en els que es va induir una lesió en la mucosa del còlon, es va observar un augment significatiu de bacteris anaerobis, en especial del gènere *Akkermansia* durant l'etapa inicial de la regeneració de la mucosa. A més, es va descriure que *Akkermansia* spp. promou la proliferació dels enteròcits adjacents a les lesions colòniques [156].

3.4 Factors que determinen la composició de la microbiota intestinal

La composició de la microbiota intestinal pot ser altament variable entre individus tot i que les espècies bacterianes principals són presents en la majoria dels individus. Aquests

canvis poden ser donats per diversos factors incloent la genètica de l'hoste, la dieta, l'edat [157,158], la modalitat de naixement [159,160], els antibiòtics [161], entre d'altres.

La microbiota intestinal humana té una composició basal o "core" que presenta un elevat grau d'especificitat amb el subjecte [162]. Aquesta composició és estable i resistent a la modificació al llarg del temps [163]. L'estabilitat de la microbiota intestinal s'ha posat a prova repetidament mitjançant intervencions dietètiques i en la majoria dels casos, es manté una tendència a mantenir la composició basal més o menys reconeixible [164,165]. Aquesta resiliència de la microbiota intestinal també ha estat descrita després de tractaments amb antibiòtic de curta duració [166] tot i que en alguns individus, la recuperació pot ser més lenta.

La dieta és un dels factors més determinants a l'hora de modular l'estructura i composició de la microbiota intestinal. Es creu que la dieta explica més del 50% d'aquestes variacions estructurals microbianes en ratolins i un 20% en humans fent evident el gran potencial que poden tenir les estratègies dietètiques en la gestió de malalties mitjançant la modulació de la microbiota intestinal [167,168]. Les intervencions dietètiques dràstiques a curt termini han demostrat tenir la capacitat d'alterar ràpidament la diversitat de la microbiota intestinal en humans [169]. Tanmateix, aquestes alteracions són transitòries i no persisteixen més enllà de pocs dies. Fins i tot, després d'extenses modificacions en la dieta, la microbiota d'un individu manté la seva composició única, fet que suggereix que els factors que mantenen l'homeòstasi ecològica de l'intestí s'estenen més enllà de la dieta [165].

El tipus de dieta també presenta un efecte en la composició de la microbiota intestinal. Les dietes extremes, basades en la ingesta de proteïna animal o només d'aliments vegetals, produeixen alteracions en la microbiota intestinal en humans [170]. Les dietes riques en fibra també presenten un efecte en la composició de la microbiota, ja que s'ha demostrat que les dietes riques en midó resistent o en fibres de polisacàrids sense midó produeixen un augment de l'abundància de diferents espècies bacterianes [171].

A part de la dieta, la microbiota intestinal està modelada per una combinació de factors extrínsecs (estil de vida i medicaments) i intrínsecs (genètica de l'hoste, regulacions immunes i metabòliques). Els factors ambientals com la ubicació geogràfica, la cirurgia intestinal, el tabaquisme, la depressió i l'estil de vida també es troben implicats en la conformació de la microbiota intestinal.

Un dels factors ambientals amb un impacte més gran en la comunitat microbiana és la presa d'antibiòtics. Aquests tenen un efecte profund sobre la microbiota intestinal normal. L'efecte és ràpid i de vegades persistent en el temps. Els antibiòtics d'espectre ampli redueixen la diversitat bacteriana alhora que promouen l'augment de l'abundància d'alguns bacteris patògens oportunistes com l'espècie *Clostridium difficile* [172] i disminueixen l'abundància d'espècies beneficioses [173]. A més, s'ha descrit que l'ús d'antibiòtics d'espectre ampli, com la clindamicina, en nadons i nens petits té els efectes més duradors en la composició de la microbiota intestinal.

3.5 Modulació de la microbiota intestinal

A part de tots els factors que poden afectar la composició de la microbiota intestinal existeixen diferents mètodes per modular-la, amb l'objectiu de produir un canvi favorable en la seva estructura i les seves funcions. La modulació de la microbiota intestinal és clínicament important per tractar malalties relacionades amb els seus desequilibris. Els mètodes actuals existents per modular aquest equilibri inclouen els prebiòtics, els probiòtics i recentment el transplantament de microbiota fecal.

Els prebiòtics es defineixen com a components de fermentació selectiva que provoquen canvis específics en l'activitat o l'estructura de la microbiota intestinal i, per tant, beneficien l'hoste [174,175]. Els prebiòtics solen consistir en carbohidrats no digeribles, oligosacàrids o polisacàrids curts com la inulina, l'oligofructosa, la galactofructosa, els galacto-oligosacàrids i els xilo-oligosacàrids. Els prebiòtics per a ser fermentats pels components de la microbiota intestinal, han de ser capaços de resistir als àcids gàstrics, i a la degradació provocada pels enzims del tracte digestiu superior. Aquesta fermentació promou el creixement bacterià i l'activació d'espècies de la microbiota intestinal [176].

Els prebiòtics presenten un efecte sobre les espècies presents en el còlon [177]. Les principals espècies diana dels prebiòtics són els Lactobacils i els Bifidobacteris. Els prebiòtics estimulen la producció de SCFA i una disminució del pH [178].

El consum d'aliments amb fibra és important per mantenir la mucosa intestinal sana [179]. Recentment, diversos estudis han evidenciat l'efecte de fibres prebiòtiques en la modulació de la microbiota intestinal [180–182]. Altres estudis han demostrat que l'administració del polisacàrid inulina pot evitar els efectes nocius provinents de dietes riques en greixos [183,184], deixant en evidència que la dieta occidental baixa en fibra

produeix un debilitament en la capa de moc, fet que deriva en un augment de la susceptibilitat dels patògens [185] i un augment en la inflamació [186].

Els probiòtics són microorganismes vius que, quan es prenen en dosis adequades, protegeixen la salut humana [187]. Les espècies probiòtiques més utilitzades són *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i llevats, com *Saccharomyces boulardii* [188]. Els mecanismes proposats pels quals els probiòtics milloren la salut inclouen la promoció d'espècies favorables.

Els probiòtics competeixen amb espècies nocives per als llocs d'adherència a la mucosa intestinal. Per exemple, el probiòtic *E. coli* Nissle pot moure i atacar a microbis patògens evitant la seva adhesió [189]. Aquest probiòtic s'utilitza en alguns trastorns gastrointestinals que inclouen diarrea com la diverticulitis i la CU, utilitzant-se com a mètode efectiu alternatiu a la mesalazina en el manteniment de la remissió de la malaltia en aquests pacients [190]. Altres probiòtics com *Lactobacillus reuteri*, poden produir compostos antimicrobians com la reuterina, una substància que mata directament a microbis nocius i indueix respostes immunes en l'hoste [191]. Per altra banda, s'ha descrit que el probiòtic *Bifidobacterium lactis* Bb12 pot millorar la funció de barrera de la mucosa intestinal, augmentant l'IgA sèrica i reduint la inflamació de l'intestí [192]. A més, s'ha observat que aquest probiòtic redueix el nombre de bacteris patògens en mostres de femtes [193].

Durant els darrers anys, un dels mètodes que ha guanyat interès i acceptació per modular la microbiota intestinal és el trasplantament fecal. Aquest procés consisteix en el trasplantament de bacteris fecals de donants sans a pacients amb infeccions gastrointestinals cròniques i pacients amb MII amb l'objectiu de restaurar la comunitat i la funció de la microbiota intestinal [194]. Fins avui dia, la major part de l'experiència clínica en l'ús del trasplantament fecal s'ha centrat en pacients amb infecció per *Clostridium difficile* [195], utilitzant-se actualment en certes regions com a tractament de segona línia amb unes taxes d'èxit que s'aproximen al 92% [196,197]. A part d'utilitzar-se en la infecció per *C. difficile*, el trasplantament fecal podria ser útil per tractar altres malalties entre les quals s'hi troben la MII [198–200], la SII [201,202], el càncer de colorectal [203], entre d'altres.

3.6 La microbiota intestinal en la malaltia intestinal

Un nombre creixent d'estudis relacionen el desequilibri de la microbiota intestinal o disbiosis amb diferents malalties. Aquesta disbiosis ha estat descrita en obesitat [124], diabetis tipus 1 i tipus 2 [204,205], desenvolupament del càncer [206], al·lèrgies [207], malalties del fetge gras no alcohòlica [208], malaltia renal [209], artritis [210] i trastorns neurològics com l'autisme [211,212]. No obstant, la majoria dels estudis s'han centrat en investigar l'associació de la microbiota intestinal amb malalties relacionades amb l'intestí, com ara el càncer colorectal [213,214], la SII [111,215], la celiàquia [216,217] i més àmpliament, amb MII [218–220].

3.6.1 Paper de la microbiota intestinal en la Malaltia Inflamatòria Intestinal

Diverses línies d'investigació suggereixen un paper important de la microbiota intestinal en el desenvolupament i la progressió de la MII [221,222]. Tot i que el mecanisme exacte no es coneix, les dades obtingudes en diferents estudis realitzats en models animals, proporcionen un argument convincent per certificar el paper fonamental de la microbiota intestinal en el desenvolupament de la inflamació intestinal. Per exemple, en un estudi realitzat amb ratolins lliures de gèrmens s'ha observat com s'impedeix el desenvolupament de la CU en ratolins que són susceptibles genèticament a desenvolupar la malaltia [223]. A més, en un altre estudi s'ha evidenciat que la transferència de bacteris proinflamatoris de ratolins malalts a ratolins sans pot induir un estat d'inflamació en els últims [224,225]. Finalment, s'ha observat que el grau de susceptibilitat a desenvolupar colitis en ratolins s'associa a diferències en la composició de la microbiota intestinal [226].

En l'espècie humana també s'han realitzat estudis que reafirmen el paper del microbioma en els pacients diagnosticats de MII. Per exemple, l'activitat de la malaltia és més evident en zones on les poblacions bacterianes són més elevades (el còlon). A més, les teràpies amb antibiòtics han demostrat certa eficàcia per tractar certs fenotips de MII, com per exemple l'ús de Ciprofloxacina en pacients amb MC amb afectació perianal i en la pouchitis [98,227], i el metronidazol per a la prevenció de la recurrència postoperatòria en pacient amb MC [228,229]. A més, per tal de confirmar més l'efecte del microbioma en pacients amb MII, estudis recents han demostrat un paper important de certs microbis específics en la predicció de resposta a tractament i en determinar el risc de reparació de la malaltia després de la cirurgia [230–232].

Moltes de les mutacions genètiques associades a la MII també estan relacionades amb la funció immune i la seva interacció amb el microbioma. Alguns dels gens més importants són el *NOD2* (“nucleotide oligomerization domain 2”), el *CARD9* (“caspase recruitment domain-containing protein 9”), el *ATG16L1* (“autophagy-related 16-like 1”), i el *CLEC7A* (“C-type lectin domain family 7 member A”) entre d’altres [19,233–235] [236].

Els gens més estudiats són el *NOD2* i el *CARD9*. El *NOD2* és un gen que codifica per un receptor intracel·lular que interactua amb el peptidoglicà present en la paret bacteriana tant de bacteris gram negatius i com de gram positius. Aquest gen s’expressa en els enteròcits actuant com a defensa contra bacteris intracel·lulars contribuint alhora a la resposta immunitària contra els microbis comensals [237–239]. La mutació de *NOD2* provoca la disminució de citocines antiinflamatòries com la IL-10 i una alteració en l’abundància de diferents bacteris de la mucosa [240]. En concret, en pacients amb aquest gen mutat, s’ha observat una disminució en l’abundància d’espècies del gènere *Faecalibacterium* i un augment en l’abundància d’espècies del gènere *Escherichia* [241,242]. A més, en models animals, s’ha vist un increment de la susceptibilitat a desenvolupar CU quan aquest gen es troba mutat [243].

Per la seva banda, el *CARD9* codifica per una proteïna que intervé en la defensa contra les infeccions per fongs. *CARD9* estimula la producció de citocines inflamatòries com la IL-6, TNF- α i IL-1b en resposta a estímuls específics a diferents bacteris, fongs o virus [244]. En ratolins amb *CARD9* inhibida s’ha observat un augment de la susceptibilitat a *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* i *Cryptococcus neoformans* entre d’altres [245–247] i a un augment de la sensibilitat a desenvolupar CU [248].

3.6.2 Composició de la microbiota intestinal en la Malaltia Inflamatòria Intestinal

Diversos estudis indiquen que les alteracions en la composició de la microbiota intestinal són freqüents en la MII [249,250,259,260,251–258]. En aquests pacients s’ha descrit una disminució de la diversitat global de la microbiota intestinal observada tant a nivell de mucosa intestinal, com a nivell de mostra fecal, i una reducció de l’abundància relativa de diferents espècies bacterianes en comparació amb l’observada en individus sans [219,255,261–266]. A més, hi ha evidències que confirmen que en pacients amb MII s’incrementen els proteobacteris, espècies del gènere *Fusobacterium* i l’espècie *Ruminococcus gnavus*. Per contra, els grups Clostridis IV i XIV i els gèneres *Bacteroides*, *Suterella*, *Roseburia*, *Bifidobacterium* i *Faecalibacterium* disminueixen en aquests

pacients [267,268]. Tot i això, és difícil determinar si els canvis en la microbiota observats en pacients diagnosticats de MII són els causants de la patologia, o més aviat, són resultat de la inflamació de la mucosa.

En la MC en particular, s'observa una composició microbiana intestinal més alterada i inestable que en la CU [269]. En pacients amb MC, hi ha una clara pèrdua de microorganismes beneficiosos com per exemple espècies dels gèneres *Faecalibacterium*, *Methanobrevibacter* *Peptostreptococcaceae*, *Anaerostipes*, *Christensenellaceae* i *Collinsella* i un augment en l'abundància d'espècies dels gèneres *Fusobacterium* i *Escherichia* [269].

En la disbiosi present en pacients amb CU també s'ha corroborat que hi ha una reducció en l'abundància d'espècies productores de butirat i, en consonància amb aquestes diferències en els grups funcionals, també s'han observat canvis en la composició dels SCFA fecals en comparació amb subjectes sans [270].

Les alteracions en la composició de la microbiota en pacients amb MC s'han relacionat amb la probabilitat de resposta al tractament [232]. Concretament, s'han associat espècies dels gèneres *Bifidobacterium*, *Collinsella*, *Lachnospira*, *Lachnospiraceae*, *Roseburia* i *Eggerthella* amb la resposta al tractament amb teràpia anti-TNF. A més, certes espècies s'han associat al risc de recaiguda en pacients diagnosticats de MC postquirúrgics, observant reduccions d'espècies dels gèneres *Parabacteroides* i *Clostridials* i un augment d'Enterobacteriacies en comparació amb pacients amb MC que no són sotmesos a cirurgies prèvies [232].

Fins fa poc la microbiota intestinal no s'havia utilitzat per determinar l'activitat o la remissió en pacients amb MII. Tot i que hi ha pocs estudis, en els últims anys s'ha analitzat la microbiota intestinal amb l'objectiu de relacionar-la amb l'activitat de la malaltia demostrant, en alguns casos, diferències clares a nivell de microbiota segons el grau d'activitat de la MII.

En pacients actius diagnosticats de MC s'ha descrit un augment d'espècies del gènere *Fusobacterium* [271] en comparació amb pacients en remissió. En canvi, en aquets pacients actius es va observar una disminució d'espècies com *Akkermansia muciniphila* [271] i el gènere *Bacteroides* [272]. En CU s'ha observat una disminució d'espècies com *Faecalibacterium prausnitzii*, *Methanobrevibacter smithii* i *Roseburia hominis* en pacients en activitat endoscòpica en comparació amb pacients en remissió [220,273]. Al

contrari, espècies com *Escherichia coli*, *Veillonella* spp, i *Fusobacterium* spp. s'han trobat reduïdes en els pacients actius.

Tot i que la majoria d'estudis es centren en la microbiota bacteriana, s'ha descrit que la composició de fongs i virus del microbioma intestinal també es troba alterada en pacients amb MII [274–276]. En particular, la microbiota de pacients amb MC amb afectació ileal presenta un augment en la diversitat de fongs, mentre que els pacients amb CU i MC amb afectació ileocolònica o colònica presenten una disminució de la diversitat de fongs. Concretament, s'ha descrit que l'espècie *Saccharomyces cerevisiae* es troba disminuïda mentre que augmenten espècies com *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Clavispora lusitaniae*, *Cyberlindnera jadinii* i *Kluyveromyces marxianus* [274]. *Saccharomyces cerevisiae* és l'espècie fúngica més abundant observada en la microbiota intestinal, a més de la seva disminució en la MII en comparació amb subjectes sans, també s'ha definit una disminució de l'abundància en aquells pacients amb MII amb activitat endoscòpica en comparació amb aquells pacients en remissió [276].

Una altre espècie de fong que es troba habitualment en la pell, *Malassezia restricta*, s'ha trobat en concentracions elevades en la mucosa intestinal de pacients amb MC [275]. Aquesta espècie promou la producció de citocines inflamatòries estimulants l'activitat de cèl·lules del sistema immunitari innat que presenten mutacions en el gen *CARD9* [275]. En mostres de femta de pacients amb MII s'ha demostrat que el seu viroma entèric està associat a una expansió significativa dels bacteriòfags de l'ordre dels Caudovirals [277]. De la mateixa manera, en mostres de mucosa rectal de pacients amb CU s'ha observat un augment en l'abundància dels Caudovirals amb una reducció de la diversitat bacteriana, que es correlaciona amb la inflamació intestinal [278].

3.6.3 La microbiota intestinal en la SII

Descobriments recents han revelat que la microbiota intestinal pot ser rellevant per a la patogènesi de la SII, ja que en pacients diagnosticats de SII s'han observat alteracions en la fermentació colònica [117,279]. Per exemple, mentre que s'ha descrit una major producció d'hidrogen gas en pacients amb SII amb comportament diarreic, el gas metà es produeix en quantitats més elevades en pacients amb SII amb comportament restret [280]. La microbiota intestinal predominant en pacients amb SII és altament inestable al llarg del temps en comparació amb individus sans [281,282]. Els enfocaments basats en cultius han demostrat que hi ha una quantitat més elevada de bacteris aeròbics i *Lactobacillus* en

pacients amb SII respecte a subjectes sans [282]. Els estudis basats en mètodes moleculars han definit majors diferències entre la microbiota de pacients amb SII respecte a la de controls sans. En aquesta línia, s'ha observat en la SII un augment significatiu dels subgrups Bacteroidetes, Synergistetes i Clostridium. Per altra banda, s'ha observat una reducció en l'abundància d'Actinobacteris com el gènere *Collinsella*, la classe Bacilli, Flavobacteriia, Epsilonproteobacteria i alguns membres del fílum Firmicutes en comparació amb els controls [113,117,283]. En aquesta línia, s'han observat canvis en l'abundància relativa de Firmicutes i Bacteroidetes en pacients amb SII [284]. Precisament, els Firmicutes van ser el doble de les Bacteroidetes, degut en part a un augment en l'abundància d'espècies dels gèneres *Ruminococcus*, *Clostridium* i *Dorea* i a una disminució concomitant de les espècies dels gèneres *Bifidobacterium* i *Faecalibacterium* [285].

Tot i que els estudis que descriuen diferències entre els diferents subtipus de la síndrome són escassos, sembla que la SII amb comportament diarreic i la SII amb comportament restret presenten poblacions microbianes diferents. Mentre que en pacients amb SII-D s'ha observat una menor quantitat de *Lactobacillus* spp., en pacients amb SII-C s'ha observat un augment en l'abundància de *Veillonella* spp. [283]. La diversitat observada entre els diferents subtipus de SII, i la varietat de tècniques i mostres emprades en els diferents estudis, pot estar dificultant l'arribada a un consens sobre la descripció de la disbiosi en la SII [111,113,215]. Aquests estudis suggereixen que les diferències en la composició de la microbiota poden ajudar a diagnosticar la SII.

3.6.4 Marcadors d'interès en la MII i la SII

Recentment, ha crescut l'interès en l'ús de marcadors basats en la microbiota intestinal per a l'estudi de la MII. Així doncs, degut a les seves característiques, certes espècies microbianes podrien actuar com a marcadors de diagnòstic o d'activitat tant en pacients amb MII com en pacients amb SII. A continuació, s'esmenten les espècies que s'han utilitzat en aquesta tesi degut al seu potencial en aquestes malalties.

Faecalibacterium prausnitzii

Faecalibacterium prausnitzii és un bacil anaerobi, no mòbil i gram positiu que pertany al fílum dels Firmicutes. Aquesta espècie, és un dels microorganismes més abundant en els humans, representant entre el 2 i el 15% de les comunitats bacterianes intestinals [286,287]. A més, *F. prausnitzii* és un dels principals productors de butirat presents a

l'intestí. El butirat té un paper fonamental en la fisiologia intestinal ja que presenta nombrosos efectes beneficiosos per a la salut [288–290], a més, aquesta espècie presenta propietats antiinflamatòries ja que és capaç d'induir perfils de citocines tolerogèniques com la IL-10 i alhora d'inhibir la secreció de citocines pro-inflamatòries com la IL-12 i l'interferó- γ [291].

En els últims anys ha crescut l'interès en aquest bacteri degut al seu paper potencial en la promoció de la salut intestinal [292–294]. Diversos estudis realitzats utilitzant mostres fecals i/o mostres de biòpsies intestinals, han demostrat que la prevalença i l'abundància d'aquesta espècie es pot trobar reduïda en certs trastorns com per exemple la malaltia celíaca [295,296], l'obesitat [297,298], la diabetis tipus 2 [298,299], la SII [221,300], el càncer colorectal [301,302] i particularment la MII [250,291,297,303–306]. L'increment d'aquests estudis al llarg dels darrers anys ha suscitat un gran interès per considerar aquest bacteri com a probiòtic de nova generació.

Recentment, Lopez-Siles *et al.* amb l'objectiu de conèixer millor l'ecologia microbiana d'aquesta espècie, van evidenciar que dins d'aquesta hi ha diferents filogrupos, dels quals dos estan clarament diferenciats des del punt de vista taxonòmic [294]. Aquests filogrupos (PHG-I i PHG-II) es troben presents en femtes de subjectes sans. A més, s'ha evidenciat una relació clara entre l'abundància d'aquests dos filogrupos i la MII [302]. Aquest descobriment en *F. prausnitzii* ha proporcionat una millor comprensió de la diversitat i l'ecologia microbiana d'aquesta espècie al còlon.

Així doncs, totes aquestes dades evidencien que l'abundància relativa de *F. prausnitzii* i dels seus filogrupos presenten un clar potencial per esdevenir indicadors o biomarcadors de la salut intestinal en adults [291].

Escherichia coli

Escherichia coli és una espècie gram negativa que pertany al fílum Proteobacteria. Es considera una espècie associada a la inflamació intestinal ja que presenta propietats inflamatòries. Aquesta espècie es troba localitzada a la capa de moc que recobreix les cèl·lules epitelials intestinals i també en grans quantitats en les úlceres originades tant en pacients amb MC com en pacients amb CU [303].

En aquesta línia, diversos estudis han descrit com *E. coli* augmenta en pacients amb MC en comparació amb controls sans [221,307–309]. A més, altres estudis han observat una

major quantitat d'aquesta espècie en pacients amb MC activa en comparació en pacients en remissió [221,252,307,310].

En pacients de CU existeix una controvèrsia sobre l'abundància d'*E. coli*. Mentre que alguns treballs no observen un augment en la seva càrrega en pacients amb CU respecte a subjectes sans [221,307–309], altres estudis han demostrat un augment en l'abundància en aquests pacients [252,310–314]. Aquestes diferències es podrien atribuir a canvis en l'estat de la malaltia dels pacients inclosos en els estudis ja que l'abundància d'*E. coli* s'ha associat amb l'estat d'activitat present en pacients amb CU [315]. Concretament, l'abundància d'*E. coli* és major en aquells pacients de CU en estat actiu en comparació amb pacients en remissió [311,312].

Akkermansia muciniphila

Akkermansia muciniphila és un bacteri gram negatiu anaeròbic obligat que pertany al fílum Verrucomicrobia i que habita principalment a la mucosa intestinal representant entre el 1% i el 3% de la microbiota intestinal. Aquesta espècie es troba implicada en la patogènesi de diferents trastorns com l'autisme, l'obesitat, la diabetis tipus I i la MII [316–319].

A més, *Akkermansia muciniphila* és una espècie degradadora de la mucina. La mucina és el component principal del moc que protegeix l'epiteli intestinal humà on hi habiten els bacteris [320,321]. La seva capacitat específica per degradar el moc es tradueix en l'alliberament d'oligosacàrids i en la producció de propionat i acetat, així com d'aminoàcids, cofactors importants i vitamines que estan disponibles per a altres simbionts intestinals [322].

Certs estudis han observat una disminució en l'abundància d'*A. muciniphila* en pacients amb MC i CU en comparació amb subjectes sans. Aquesta reducció en la seva abundància s'ha considerat com una conseqüència de la reducció de la capa de moc en aquests pacients degut a la inflamació i a la creació d'úlceres. Aquesta reducció de la capa fa que hi hagi una disminució de les mucines que constitueixen la font de carboni primària d'aquesta espècie [317] [317,323,324]. Tot i aquestes observacions, existeix la hipòtesi de que *A. muciniphila* podria ser un factor causal de la inflamació intestinal degut a que la seva presència condueix a la degradació de la capa protectora de mucina [325].

Ruminococcus sp.

Les espècies del gènere *Ruminococcus* són estrictament anaeròbiques, grampositives, no mòbils, i necessiten hidrats de carboni fermentables per al seu creixement [326]. Pertanyen al grup mucolític i, per tant, utilitzen els glicans de la barrera de mucosa intestinal com a font d'energia [327]. Les espècies de *Ruminococcus* són importants per mantenir l'homeòstasi intestinal, particularment mitjançant la producció de SCFAs. Els SCFA produïts promouen la salut intestinal, creant condicions favorables a la resistència contra els bacteris patògens creant una protecció contra la CU [328].

Ruminococcus albus, *R. bromii*, *R. flavefaciens* i *R. callidus* han estat aïllats i detectats a partir de mostres fecals humanes [329], tot i que algunes d'aquestes espècies s'han trobat disminuïdes en pacients amb MC en comparació amb subjectes sans [256,330] [330]. L'espècie *Ruminococcus torques* s'ha trobat associada a la MC [219,331], augmentant la seva abundància en l'epiteli de pacients amb CU i MC [317].

Una d'aquestes espècies, *Ruminococcus albus* s'ha demostrat que està inversament correlacionat amb els índexs clínics d'activitat en CU, on a més activitat clínica, menys abundància de *Ruminococcus albus* [332]. Aquestes observacions, es van trobar també per l'espècie *Ruminococcus bromii* on la seva concentració es va trobar reduïda en pacients actius [255].

Methanobrevibacter smithii

Els metanògens són procariotes anaerobis del domini archaea que utilitzen l'hidrogen per reduir el diòxid de carboni, l'acetat i una varietat de compostos metàl·lics en metà (CH₄). Els arqueus són les úniques fonts biològiques de metà confirmades en la natura [333]. En els humans, els metanògens s'han estudiat per tal d'elucidar el seu possible paper en la progressió d'algunes malalties. La seva presència en l'intestí suggereix una correlació indirecta amb certes malalties del còlon [334].

Un dels ordres dominants dels metanògens són els Metanobacterials, específicament el gènere *Methanobrevibacter* [334]. *Methanobrevibacter smithii* és el metanògen predominant en l'intestí humà. Té un paper important en la digestió eficient dels polisacàrids derivats de la fermentació bacteriana [335].

Fins al moment, l'impacte de les espècies metanogèniques ha estat subestimat en condicions patològiques [335]. Es considera que *Methanobrevibacter smithii* contribueix en les respostes del sistema immunitari en el cos, incloent respostes inflamatòries [335].

A més, s'ha descrit que l'abundància d'aquesta espècie es manté estable al llarg del temps, fins i tot quan es produeixen canvis dràstics en la dieta [336].

Mentre que certs estudis han relacionat la SII-C i l'obesitat amb una alta abundància de metanògens, la MII destaca per presentar una baixa abundància d'aquest grup [337,338]. Altres trastorns gastrointestinals com el restrenyiment, la diarrea funcional i la diverticulitis també s'han relacionat amb els metanògens [338–340].

Seguint aquesta línia, s'ha demostrat que la proporció de productors de metà és més alta en pacients amb SII-C (58% productors de metà) en comparació amb pacients amb comportament diarreic (28% productors de metà) [341]. Així doncs, els estudis observacionals mostren una forta associació entre el trànsit intestinal lent i la producció de metà [342].

3.7 Eines per a l'estudi de la microbiota intestinal

Com s'ha esmentat anteriorment, la microbiota intestinal configura un ecosistema complex amb una enorme diversitat microbiana [143,343]. Durant anys, els científics han estat interessats en el seu estudi i, per fer-ho, s'han anat utilitzant diversos mètodes que han experimentat un canvi important al llarg del temps (Figura 10). Els bacteris, és el grup biològic que ha estat més àmpliament estudiat dintre de les espècies presents en el tracte gastrointestinal [344].

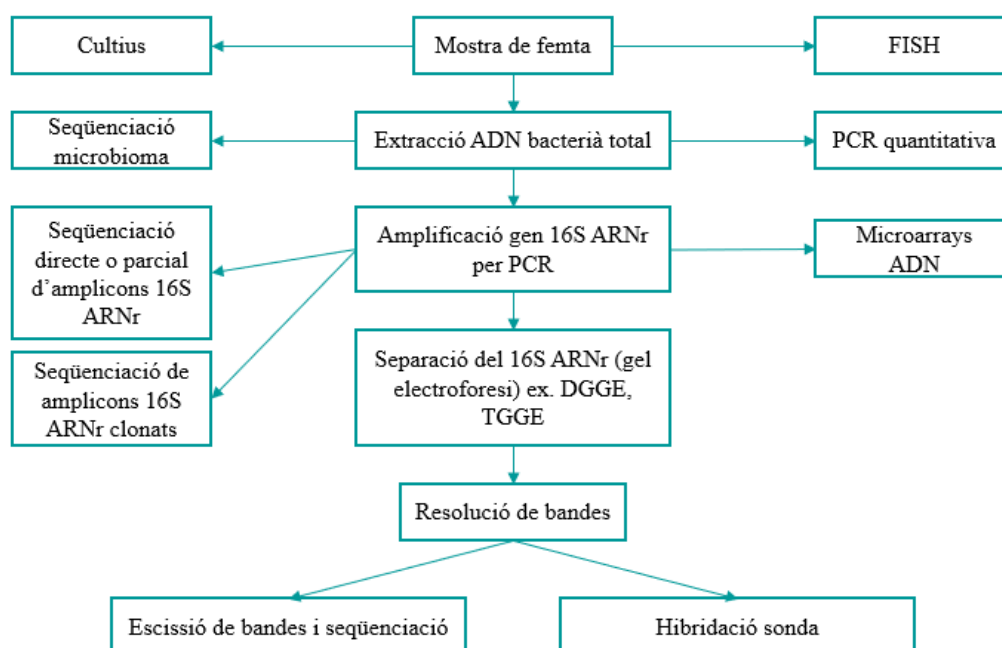


Figura 10. Visió general de les tècniques utilitzades per caracteritzar la microbiota intestinal [345].

Fins als anys 90, el coneixement de la microbiota intestinal es limitava a tècniques tradicionals de cultiu bacterià, un enfoc que s'ha utilitzat des de principis del segle XX [346]. No obstant, aquestes tècniques només identifiquen les espècies que sobreviuen a l'entorn del laboratori representant un percentatge molt baix (<30%) [343]. Una gran proporció de bacteris presents a l'intestí són anaerobis estrictes amb requeriments ambientals difícils d'emular al laboratori per la qual cosa sovint no sobreviuen als procediments utilitzats per a l'aïllament i posterior cultiu. A més, diversos organismes presents a l'intestí humà difereixen en la seva propensió a créixer en placa degut a les condicions inadequades pel que fa al pH, l'estat redox, la temperatura o l'absència de molècules essencials pel creixement dels bacteris, entre d'altres. Així doncs, tot i que les tècniques de cultiu s'han tornat més sofisticades amb el pas dels anys, els seu ús fa que l'abundància relativa de diversos bacteris ubicats en el lumen intestinal estigui fortament esbiaixada a favor d'organismes facultatius i oportunistes i amb pocs requeriments.

Per superar les limitacions dels cultius tradicionals, a finals del segle XX es van desenvolupar tècniques independents del cultiu per a l'estudi dels bacteris presents a un ambient determinat. La majoria d'aquestes tècniques, que permeten identificar diferents espècies bacterianes i la seva abundància, es basen en l'estudi de l'ADN, principalment en l'amplificació del gen d'ARN ribosòmic (ARNr) 16S i la seva seqüenciació. Aquesta ha esdevingut la tècnica d'elecció per estudiar la diversitat i l'abundància del microbioma. El gen 16S ARNr té una allargada d'aproximadament de 1500 nucleòtids amb alguna variació entre espècies [347]. Mentre que diverses regions d'aquest gen estan molt conservades en tots els grups bacterians, s'observen altres regions que mostren una marcada variació anomenades regions hipervariables. En el gen 16S ARNr es troben 9 regions hipervariables (Figura 11).

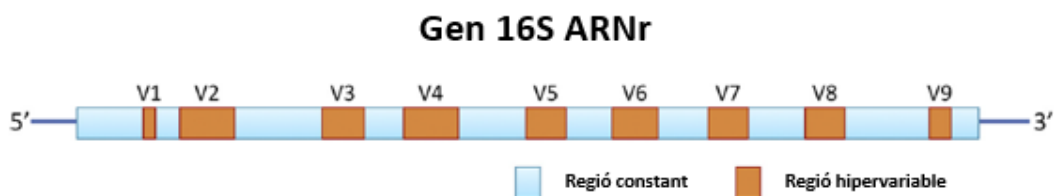


Figura 11. Regions conservades i variables de l'ARN ribosomal 16S [344].

Les variacions de seqüències de nucleòtids en aquestes regions hipervariables (V1 a V9) reflecteixen la divergència evolutiva dels bacteris i, per tant, aquestes seqüències proporcionen un mètode fiable per a la identificació i classificació filogenètica d'espècies

bacterianes. Els mètodes per a la identificació de bacteris basats en seqüències de nucleòtids en aquestes regions tenen l'avantatge de detectar qualsevol tipus de bacteri sigui o no cultivable en placa. Les seqüències del gen 16S ARNr poden ser amplificades utilitzant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) una tècnica que, a més, permet quantificar les dianes genètiques que amplifica, les quals poden tenir diferents graus d'especificitat, des de filogrup a espècie, segons les necessitats experimentals de cada moment [345].

Així doncs, la utilització de tècniques moleculars ha permès identificar i assignar taxonòmicament a la majoria de microorganismes sense necessitat de cultivar-los, essent una veritable revolució en el coneixement de la microbiota i de la seva implicació en estats de salut i malaltia de l'ésser humà.

2

Objectius

L'objectiu general d'aquesta tesi doctoral és la definició de signatures microbianes en la malaltia inflamatòria intestinal i en la síndrome de l'intestí irritable capaces de:

- 1) Diagnosticar diferencialment la MII i la SII a partir de l'estudi de la microbiota en una mostra de femta.
- 2) Monitoritzar l'activitat endoscòpica en pacients diagnosticats amb MC i CU a partir de l'estudi de la microbiota en una mostra de femta.

Per fer-ho, s'ha realitzat l'extracció de l'ADN, la quantificació de diferents marcadors microbians específics per qPCR i s'ha utilitzat la tecnologia Machine Learning. A més d'aquests dos objectius principals, la tesi té com a objectiu secundari:

- 3) Elaborar i optimitzar un procés analític a partir de mostres de femta per a l'estudi de la microbiota fecal per qPCR.

Els resultats s'han organitzat en tres capítols, els quals presentaven els objectius específics següents:

- **Capítol 1:** Realització de diferents proves experimentals amb la finalitat de definir i optimitzar el procés analític a seguir per a l'anàlisi de diferents marcadors microbians per qPCR. Per fer-ho, s'han realitzat proves de conservació de la mostra, proves per avaluar la heterogeneïtat de la mostra i proves per determinar la capacitat del kit d'extracció d'ADN utilitzat.
- **Capítol 2:** Disseny d'un nou mètode no invasiu, anomenat RAID-Dx, per a la discriminació entre la SII i la MII a partir de la definició d'una signatura microbiana específica de la SII.
- **Capítol 3:** Disseny d'un nou mètode no invasiu, anomenat RAID-Monitor, per a la determinació de l'activitat endoscòpica en pacients amb MC i CU. Aquest mètode es basa en la definició d'una signatura microbiana específica de la MII.

3

Material i mètodes

1. RECLUTAMENT DE PACIENTS

Tots els participants es van reclutar en els següents centres hospitalaris: Hospital Universitari Dr. Josep Trueta [Girona, Espanya], Hospital Santa Caterina [Salt, Espanya], Hospital Universitari de Bellvitge [Hospitalet de Llobregat, Espanya], Hospital Universitari Germans Trias i Pujol [Badalona, Espanya], Centro Médico Teknon [Barcelona, Espanya] i Beth Israel Deaconess Medical Center [Boston, EE.UU]. També cal mencionar que 5 de les mostres incloses al estudis eren provinents del Biobanc de l'Hospital Universitari Dr. Josep Trueta (Biobanc IDIBGI, B.0000872), integrat a la Xarxa Nacional de Biobancs.

El participants reclutats es van classificar en tres grups principals: (MII) pacients diagnosticats de MII. Dins d'aquest grup hi trobem pacients amb MC i CU, (SII) pacients diagnosticats de SII amb comportament diarreic o altern i (H) subjectes sans. La procedència dels subjectes de cada grup va ser: el grup H de l'Hospital Dr. Josep Trueta, el grup SII de tots els centres exceptuant Boston i el grup MII de tots els centres (Taula 9).

Taula 9. Reclutament de pacients amb MII i SII i subjectes H per centre participant.

Hospital	MII (n)	SII (n)	H (n)	Total (n)
Hospital Universitari Dr. Josep Trueta	60	10	18	88
Hospital Santa Caterina	13	4	-	17
Hospital Universitari de Bellvitge	31	22	-	53
Hospital Germans Trias i Pujol	23	5	-	28
Centro Médico Teknon	1	11	-	12
Beth Israel Deaconess Medical Center	22	-	-	22
Total pacients reclutats (n)	150	52	18	214

MII; malaltia inflammatòria intestinal, SII; síndrome de l'intestí irritable i H; subjectes sans.

Els pacients amb MII i SII es van diagnosticar seguint els criteris clínics, patològics i endoscòpics establerts. Tots els pacients de MII i SII inclosos en el capítol II i III de la tesi, es van realitzar una colonoscòpia indicada clínicament al Departament de Gastroenterologia del centre participant amb la finalitat de discriminar endoscòpicament els pacients de MII i SII (capítol II) i de monitoritzar l'activitat endoscòpica en els pacients amb MII (capítol III). Els H inclosos en el capítol I de la tesi es van caracteritzar per ser asimptomàtics i estar certificats com a sans per un digestòleg. Els pacients utilitzats en

cada capítol de la tesi es troben a la taula 10. Totes les mostres es van incloure i processar seguint els procediments operatius estàndards amb la corresponent aprovació dels Comitès Científics i d'Ètica (codi d'investigació clínica dels estudis realitzats: RAIDCD2016_1, RAIDCD2016_2, RAIDCD2016_4 i GG-IBS-1001).

Taula 10. Reclutament de pacients amb MII i SII i subjectes H segons el capítol de la tesi.

Hospital	MII (n)*	SII (n)	H (n)	Total (n)
Capítol I	9	-	18	82
Capítol II	52	52	-	17
Capítol III	141	-	-	53

*Tots els MII del capítol II també es van utilitzar al capítol III. MII; malaltia inflamatòria intestinal, SII; síndrome de l'intestí irritable i H; subjectes sans.

2. RECOLLIDA I CONSERVACIÓ DE MOSTRES FECALS

Les mostres de femta es van conservar en diferents condicions en funció de si al pacient se li havia de realitzar o no una colonoscòpia. Tots els pacients reclutats amb colonoscòpia programada en algun dels centres participants, van recollir la mostra de femta a casa en un recipient estèril durant la setmana prèvia a la realització de la colonoscòpia, evitant l'efecte de la preparació prèvia a la colonoscòpia. Immediatament després de la deposició, la mostra de femta es va congelar a -20 °C.

Els pacients que no tenien programada un colonoscòpia, van recollir la mostra de femta en un recipient estèril i immediatament va ser transportada a l'hospital per a ser conservada a -20°C (menys de 12h). Totes les mostres es van mantenir congelades a -20 °C durant el temps que aquestes van romandre emmagatzemades al centre hospitalari. Posteriorment, les mostres van ser enviades als laboratoris de GoodGut SL (Girona, Espanya) on es van mantenir congelades a -80 °C.

El dia de la anàlisi, les mostres van ser descongelades a temperatura ambient i van ser homogeneïtzades sota cabina de bioseguretat II amb una espàtula estèril i posteriorment al·liquotades per triplicat en tubs col·lectors de 8 ml. Una d'aquestes al·liquotades va ser utilitzada per a l'anàlisi de la calprotectina fecal.

En els diferents estudis realitzats en el capítol I, les mostres fecals van ser conservades segons els requeriments establerts en el protocol de l'estudi clínic corresponent. No obstant, la majoria de les mostres es van conservar a temperatura ambient amb un temps inferior a les 4h després de la deposició.

Totes les mostres incloses retrospectivament en aquesta tesi provinents del Biobanc de l'Hospital Universitari Dr. Josep Trueta es van mantenir en les mateixes condicions d'emmagatzematge.

3. ANÀLISIS DE LA CALPROTECTINA FECAL

La CF es va mesurar als laboratoris de LABCO (SynLab - Barcelona) en les mostres de femta, mitjançant un assaig de immunoabsorció lligat a enzims (ELISA, prova de Buhlman).

4. EXTRACCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE L'ADN

L'àcid desoxiribonucleic (ADN) genòmic de totes les mostres fecals homogeneïtzades es va extreure utilitzant el kit NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel GmbH & Co., Duren, Alemanya) seguint les instruccions del fabricant. Per a la lisis cel·lular s'han utilitzat 700 µl de SL1 i 150 µl de Enhancer per a incrementar la recuperació de l'ADN. Finalment l'ADN s'ha eluït amb tampó d'elució SE (Tris/HCl 10 mM, pH 8,5) en un volum final de 100 µl.

En el capítol 1 s'ha comparat aquest mètode amb altres kits d'extracció d'ADN fecal. Per una banda, s'ha utilitzat el mini kit QIAamp ADN Stool de la casa comercial QIAgen que a diferència del kit anterior, no inclou tubs amb "beads" per a la disgregació mecànica de la femta. La lisi de les cèl·lules es complementa amb una incubació a 70°C amb Proteïnasa K. Per a la purificació de l'ADN, aquest kit també compta amb sistema de columnes que eliminen les impureses de la mostra. Finalment, l'ADN és eluït amb el buffer d'elució (Tris/HCl 5 mM, pH 8,5).

Finalment, l'altre kit que s'ha utilitzat és el Maxwell 16 LEV Purification for Stool kit (Promega, Madison USA) que presenta una fase d'incubació a 70°C i una altra a 95°C amb el tampó de lisi. A diferència dels dos kits anteriors, aquest kit inclou una fase automatitzada utilitzant l'instrument MaxWell16.

La concentració d'ADN obtingut s'ha determinat fluorimètricament amb el Qubit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). S'ha calculat el rendiment com la quantitat d'ADN extret per g de femta (ng ADN / g de femta). Finalment, l'ADN eluït s'ha conservat a -20°C.

5. QUANTIFICACIÓ DELS MARCADORS BACTERIANS PER qPCR

S'han utilitzat un total de onze marcadors microbians en els diferents estudis inclosos en aquesta tesi. Els eubacteris (EUB) s'han quantificat com a càrrega total bacteriana. Cadascun dels biomarcadors seleccionats presentava una seqüència genètica específica. Els bacteris emprats van ser *Faecalibacterium prausnitzii* (FPRA), *F. prausnitzii* phylogroup I (PHG-I), *F. prausnitzii* phylogroup II (PHG-II) i *Rumminococcus sp.* (RUM) com a espècies productores de butirat, el grup Enterobacteriàcies (ENT) i l'espècie *Escherichia coli* (ECO) com a membres proinflamatoris, *Akkermansia muciniphila* (AKK) com a espècie indicadora de la homeòstasi de la capa mucosa, *Methanobrevibacter smithii* (MSM) com a espècie metanogènica, els Clostridials (CLO) com a grup proteolític i els grup filogenètic Bacteroidetes (BAC). No tots els marcadors s'han utilitzat en tots els capítols (Taula 11).

Taula 11. Marcadors microbians utilitzats en cada capítol.

Capítol tesi	Marcadors
Capítol 1	EUB, FPRA, ENT, CLO, PHG-I, PHG-II, ECO i AKK
Capítol 2	EUB, FPRA, ECO, PHG-I, PHG-II, AKK, RUM, MSM i BAC
Capítol 3	EUB, FPRA, ECO, PHG-I, PHG-II i AKK

La quantificació dels biomarcadors FPRA, ECO, PHG-I i PHG-II es va realitzar en reaccions de PCR individualitzades a partir de GoTaq qPCR Probe Mastermix (GoTaq® qPCR Master Mix, Promega. Madison, EUA). Les reaccions van consistir en 10 µl que contenien 1x GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), en una concentració d'entre 300 nM i 900 nM dels primers, entre 100 i 250 nM de cada sonda i fins a 10 ng d'ADN genòmic. La quantificació dels marcadors AKK, RUM, MSM, BAC, ENT, CLO i EUB es va realitzar utilitzant GoTaq qPCR Bryt Master Mix (GoTaq® qPCR Master Mix, Promega. Madison, EUA). Les reaccions d'aquests marcadors consistien en 10 µl que contenien 1x GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), amb una concentració de primer d'entre 150 i 250 nM de cada i fins a 10 ng d'ADN genòmic (Taula 12).

La síntesi dels primers utilitzats en aquest estudi es va encarregar a MacroGen (MacroGen, Seül, Corea del Sud). Totes les PCR quantitatives s'han realitzat utilitzant el sistema de PCR a temps real AriaMx (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). Els perfils tèrmics van ser diferents segons el biomarcador analitzat (Taula 13). En els marcadors que anaven sense sonda, es va afegir, al final de cada qPCR, un pas de corba de fusió per verificar la presència de la mida esperada del amplicó, així com per controlar la formació de dímers.

Les dades es van recollir i analitzar amb la versió 1.3 del programa Aria (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). Totes les mostres es van analitzar per duplicat. Les rèpliques s’han considerat vàlides quan la diferència entre el cicle al dintell (Ct) era inferior a 0,6. En cada placa de PCR es van incloure un control negatiu realitzat amb TrisHCl pH 8,1, i estàndards (10^9 - 10^3 còpies genòmiques/ μ L).

Taula 12. Primers (Forward i Revers) i sondes utilitzades en aquest treball dels següents marcadors EUB, FPRA, ECO, PHG-I, PHG-II, AKK, RUM, BAC, MSM, ENT i CLO. Totes les sondes es van marcar a 5’ amb FAM (6-carboxyfluorescein) com a colorant “reporter” i amb TAMRA com a “quencher” o sufocador a l’extrem 3’ per a les sondes FPRA i ECO, mentre que el BHQ1 es va utilitzar per a PHGI i PHGII. Les base R pot ser A o G; W pot ser A o T i Y pot ser C o T.

Marcador	Primers	Sequencia 5’ → 3’	[Sonda]	Ref.
EUB	EUB_F	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT	200 nM	Modified from [348]
	EUB_R	GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C	200 nM	
FPRA	FPRA_F	TGT AAA CTC CTG TTG TTG AGG AAG ATA A	300 nM	[221]
	FPRA_R	GCG CTC CCT TTA CAC CCA	300 nM	
	FPRA_PR	CAA GGA AGT GAC GGC TAA CTA CGT GCC AG	250nM	
PHG-I	PHG_F	CTC AAA GAG GGG GAC AAC AGT T	900 nM	[302]
	PHG_R	GCC ATC TCA AAG CGG ATT G	900 nM	
	PHGI_PR	TAA GCC CAC GAC CCG GCA TCG	300 nM	
PHG-II	PHG_F	CTC AAA GAG GGG GAC AAC AGT T	900 nM	[302]
	PHG_R	GCC ATC TCA AAG CGG ATT G	900 nM	
	PHGII_PR	TAA GCC CAC RGC TCG GCA TC	300 nM	
ECO	ECO_F	CAT GCC GCG TGT ATG AAG AA	300 nM	[349]
	ECO_R	CGG GTA ACG TCA ATG AGC AAA	300 nM	
	ECO_PR	TAT TAA CTT TAC TCC CTT CCT CCC CGC TGA A	100nM	
AKK	AKK_F	CAG CAC GTG AAG GTG GGG AC	250 nM	[350]
	AKK_R	CCT TGC GGT TGG CTT CAG AT	250 nM	
RUM	RUM_F	GGC GGC YTR CTG GGC TTT	250 nM	[351]
	RUM_R	CCA GGT GGA TWA CTT ATT GTG TTA A	250 nM	
MSM	MSM_F	ACG CAG CTT AAA CCA CAG TC	150 nM	
	MSM_R	AAA GAC ATT GAC CCR CGC AT	150 nM	
BAC	BAC_F	CRA ACA GGA TTA GAT ACC CT	300 nM	[352]
	BAC_R	GGT AAG GTT CCT GCG ACC CT	300 nM	
ENB	ENB_F	CAG GTC GTC ACG GTA ACA AG	125 nM	
	ENB_R	GTG GTT CAG TTT CAG CAT GTA C	125 nM	
CLO	CLO_F	CTC AAC TTG GGT GCT GCA TTT	150 nM	
	CLO_R	ATT GTA GTA CGT GTG TAG CCC	150 nM	

Taula 13. Condicions de qPCR dels següents marcadors: EUB, FPRA, ECO, PHG-I, PHG-II, AKK, RUM, BAC, MSM, EN i CLO.

Marcadors	Cicles totals	Desnaturalització		Hibridació i extensió		Corba de fusió	
		T ^a (°C)	Temps (min)	T ^a (°C)	Temps (min)	T ^a (°C)	Temps (min)
EUB	40	95	10:00	95	00:15	95	01:00
				54	01:00	55	00:30
						95	00:30
FPRA i ECO	40	95	10:00	95	00:15	na	na
				60	01:00		
PHGI i PHG-II	40	95	10:00	95	00:15	na	na
				64	01:00		
AKK, RUM, BAC, MSM, ENB i CLO	40	95	10:00	95	00:15	95	01:00
				60	01:00	55	00:30
						95	00:30

6. ANÀLISIS ESTADÍSTICS

Totes les anàlisis estadístiques es van realitzar mitjançant el paquet estadístic SPSS 23.0 (IBM, NYC, EUA). Els nivells de significació es van establir per p-valors $\leq 0,05$.

La normalitat de les dades es va avaluar mitjançant la prova de Kolmogorov-Smirnov. La prova no paramètrica Kruskal-Wallis s'ha utilitzat per comparar variables amb més de dues categories. En canvi, el test de Mann-Whitney (dades no aparellades) i el test de Wilcoxon (dades aparellades) s'han utilitzat per comparacions de dues categories en tots els capítols.

En el capítol 2 i 3, s'ha aplicat l'anàlisi de la corba ROC per determinar la utilitat de cada biomarcador per distingir els diferents diagnòstics o entre l'estat d'activitat. A més, es van calcular valors de sensibilitat, especificitat, valors predictius positius, negatius i els Likelihood ratios dels algoritmes dissenyats mitjançant el programa Epidat 3.1 (SERGAS, Xunta de Galícia, Espanya). A més, per desenvolupar els algoritmes RAID-Dx i RAID-Monitor s'ha utilitzat la tecnologia Machine Learning. Aquesta metodologia específica consisteix en la repetició d'un entrenament inicial realitzant 100 particions aleatòries del conjunt de dades i una validació addicional dels models predictius generats utilitzant 4 algoritmes diferents d'aprenentatge automàtic (xarxa neuronal, regressió logística, arbre d'increment de gradients, bosc aleatori o "random forest").

4

Resultats

CAPÍTOL I

Optimització del procés d'extracció d'ADN per a l'estudi de la microbiota intestinal

1. INTRODUCCIÓ

La microbiota intestinal adherida a la mucosa viu adjacent a l'epiteli intestinal i, per tant, interactua directament amb el sistema immunitari de l'hoste [353]. La microbiota que trobem a la mucosa és homogènia i representativa de l'estat de la mucosa intestinal, no obstant, degut a la necessitat de procediments invasius per a l'obtenció de biòpsies intestinals, sovint per identificar i caracteritzar la microbiota intestinal s'utilitzen mostres fecals ja que la seva obtenció no és invasiva, un aspecte desitjable a l'hora d'aconseguir mostres clíniques.

La microbiota fecal presenta un alt grau de diversitat i una riquesa bacteriana significativament superior a l'observada en mostres de biòpsia intestinal [354]. Espècies que formen part del fílum de les Proteobacteries, es troben en major abundància en la mucosa intestinal, mentre que d'altres espècies dins el fílum Firmicutes i Bacteroidetes són molt més abundants en mostres fecals [355]. A més, tot i que la composició bacteriana varia al llarg del tracte digestiu [356,357], s'ha demostrat que els bacteris fecals tenen més valor diagnòstic que els localitzats en la mucosa intestinal [358].

En hospitals i, sobretot, en centres d'atenció primària, les mostres de femta es fan servir per estudiar paràmetres bioquímics (hemoglobina fecal, enzims, calprotectina fecal, etc.), paràmetres microbiològics (infeccions, toxines, etc.), presència de paràsits, entre d'altres.

En la majoria dels casos, la recollida de la mostra pot realitzar-la el propi pacient al seu domicili. La quantitat de mostra necessària per a l'anàlisi varia en funció del tipus d'estudi que s'ha de realitzar. En estudis complexos com la recerca de greixos o paràsits en femta poden requerir d'una gran quantitat de mostra, i és per això, que sovint s'utilitzen pots de femta estèrils de 150 ml que permeten recol·lectar la mostra sencera o gran part de la mateixa. Per contra, els estudis bioquímics o estudis de sang oculta en femta, requereixen d'una menor quantitat i sovint s'utilitzen tubs col·lectors més petits.

L'estudi de la microbiota fecal és un procés simple i ràpid. Bàsicament, consisteix en l'extracció de l'ADN total de la mostra i la posterior quantificació per qPCR dels diferents marcadors bacterians d'interès. Els mètodes moleculars com l'amplificació d'ADN per PCR i la seqüenciació d'ADN, s'utilitzen en molts estudis experimentals per a detectar i/o quantificar diferents espècies i grups bacterians en mostres fecals [359]. Tot i això, aquest procés senzill contempla diferents fases que es poden considerar crítiques degut a que poden presentar un efecte significatiu en l'anàlisi de la microbiota. Dintre d'aquests

Resultats. Cap1. Optimització del procés per a l'estudi de la microbiota intestinal

hi trobem la conservació de la mostra, la heterogeneïtat de la mostra, el procés utilitzat per l'extracció del ADN, entre d'altres.

Per tant, l'heterogeneïtat de la mostra pot suposar un punt crític ja que pot influir en la abundància de les espècies analitzades.

Un altre punt crític a tenir en compte és la conservació de la mostra de femta per part del pacient, des de la deposició fins a la seva anàlisi a l'hospital o al laboratori. La qualitat de la mostra durant la conservació es pot veure afectada per la temperatura i pel temps. Diversos estudis han conclòs que la composició de la comunitat bacteriana no es veu afectada per l'exposició de la femta a temperatura ambient (TA) durant 24 h, a 4°C durant 48 hores o congelada immediatament després de la seva recol·lecció a -20 o -80°C [258,360–362].

En certs estudis, l'obtenció d'una quantitat suficient d'ADN genòmic és un factor crític per a l'anàlisi posterior de la microbiota. Tant la quantitat com la qualitat de l'ADN eluït després del procés d'extracció són crucials, sobretot per estudis a partir de mostres fecals degut a que aquestes presenten una estructura heterogènia i contenen grans quantitats de sals biliars, proteïnes i polisacàrids complexos que poden inhibir la amplificació per qPCR [363].

L'ADN genòmic extret ha de representar a totes les comunitats microbianes presents a la mostra fecal. Generalment, els procediments d'extracció d'ADN fecal inclouen passos d'homogeneïtzació de la mostra, lisi de les cèl·lules, eliminació d'altres substàncies i purificació de l'ADN. Per alliberar l'ADN bacterià de manera efectiva a partir d'una biomassa fecal complexa, es requereix d'una lisi química i mecànica eficient capaç de trencar la paret cel·lular de les cèl·lules, especialment de bacteris gram-positius i fongs més resistents [364]. Sovint, per realitzar la lisi mecànica, els kits d'extracció d'ADN comercials proporcionen tubs que contenen nombroses boletes (“beads”) de diferents mides formades de diferents materials, com ceràmica, vidre, zirconi o sílice [364,365]. Aquestes “beads” són útils per a la homogeneïtzació de la mostra i per a la lisi mecànica de les cèl·lules mitjançant un vigorós procés de vòrtex durant uns minuts. Així doncs, abans d'escollir un kit d'extracció definitiu per a l'extracció d'ADN, és aconsellable comparar la capacitat de diferents kits per extreure ADN.

Seguint tota la informació anterior, s'han realitzat diferents proves experimentals amb la finalitat de definir i optimitzar el procés analític a seguir per a l'anàlisi de diferents

marcadors microbians per qPCR. Aquestes proves es poden classificar en: **proves de conservació de la mostra** (comparació entre tubs col·lectors i comparació entre diferents temperatures i temps de conservació), proves per avaluar **l'heterogeneïtat de les mostres** i proves per **determinar la capacitat del kit d'extracció d'ADN** (comparació entre diferents kits d'extracció d'ADN).

2. RESULTATS

2.1 Conservació de la mostra

Per a l'estudi de l'efecte de la conservació de la mostra fecal en l'estudi de la microbiota fecal, s'han realitzat dos experiments. El primer tenia com a objectiu avaluar l'efecte del tipus de recipient col·lector utilitzat per a la conservació de la mostra fecal; i el segon el d'estimar l'efecte de la temperatura i el temps de conservació de la mostra de femta sobre el rendiment d'ADN i l'abundància de diferents marcadors bacterians.

Tub col·lector

En aquest estudi es van emprar 5 mostres de femta conservades a temperatura ambient durant un temps inferior a les 4h després de la deposició. Les 5 mostres provenien de 5 persones sanes d'acord amb el criteri d'un digestòleg. Cada mostra de femta es va dipositar en un recipient de 150 ml amb tap de rosca hermètic (Condicció A). De la mateixa mostra, es va separar una porció més petita que es va introduir en un tub col·lector de 8ml (Condicció B). Totes les mostres, un cop recollides i separades segons condició, van ser homogeneïtzades fins a aconseguir una bona uniformitat visual. L'anàlisi de les mostres es va realitzar seguint els procediments descrits en l'apartat de material i mètodes. Les espècies bacterianes analitzades van ser les següents: FPRA, ECO, PHG-I, PHG-II i AKK. La concentració d'ADN observada en les dues condicions de conservació van ser similars significativament entre la condició A i la condició B (p-valor = 0,437)(Figura 12).

Resultats. Cap1. Optimització del procés per a l'estudi de la microbiota intestinal

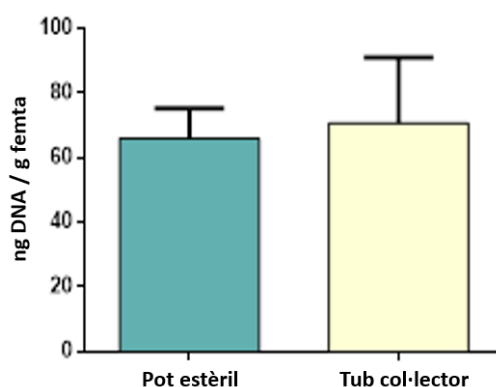


Figura 12. Concentració d'ADN obtinguda en cada condició de conservació (n = 5). Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel test de Wilcoxon entre les dues condicions es troben representades per: *, p-valor < 0,05, **, p-valor < 0,01 i ***, p-valor < 0,001.

A nivell de marcadors microbians, no es van trobar diferències per cap dels 5 marcadors analitzats (FPRA, ECO, PHG-I, PHG-II i AKK) quan les dues condicions van ser comparables (Taula 14).

Taula 14. Mitjana dels valors de Cq dels diferent marcadors analitzats (FPRA, ECO, PHG-I, PHG-II i AKK) normalitzats per l'abundància d'EUB \pm desviació estàndard per a la condició A (pot estèril de 150 ml) i la condició B (tub col·lector 8ml) (n = 5). Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel test de Wilcoxon entre les dues condicions estan representades per: *, p-valor < 0,05, **, p-valor < 0,01 i ***, p-valor < 0,001.

	FPRA	ECO	PHG-I	PHG-II	AKK
Condició A	6,86 \pm 2,11	12,69 \pm 3,10	11,31 \pm 3,45	9,20 \pm 5,24	7,72 \pm 6,90
Condició B	6,81 \pm 2,14	12,49 \pm 4,22	11,25 \pm 3,37	9,35 \pm 5,38	8,02 \pm 7,08
p-valor	0,812	0,812	0,625	0,437	0,125

Condicions de conservació

En aquest estudi es van utilitzar 9 mostres de femta conservades a temperatura ambient amb un temps inferior a les 4h. De les 9 mostres, 5 van provenir de subjectes sans certificats per un digestòleg i 4 van derivar de pacients diagnosticats de MII.

Totes les mostres van ser recollides el mateix dia i es van sotmetre a 6 diferents condicions de conservació (Taula 15). A més, les mostres conservades a TA, es van conservar al llarg de diferents temps (4h, 24h, 48h i 72h).

Taula 15. Condicions de conservació de les mostres segons la temperatura i el temps post-deposició.

	Temperatura	Temps	Condició
Congelada	-80°C	1 hora	1
Nevera	4°C	12-20 hores	3
Temperatura ambient	25°C (TA)	4h, 24h, 48h i 72h	2, 4, 5, 6

Un cop les mostres van arribar al laboratori, aquestes es van separar en 4 alíquotes:

- **Condició 1:** La primera alíquota es va homogeneïtzar i es va congelar directament a -80°C , essent la condició basal.
- **Condició 2:** La segona alíquota es va mantenir durant 4 hores a TA per simular el temps transcorregut entre la defecació de la mostra per part del pacient, i la recollida al hospital. Després de les 4h, la mostra es va homogeneïtzar i es va congelar a -80°C fins el dia de l'anàlisi.
- **Condició 3:** La tercera alíquota es va mantenir durant 12-20h a 4°C (nevera) simulant una deposició per part del pacient el dia abans de la recollida al hospital. Després d'aquest temps, la mostra es va homogeneïtzar i es va congelar a -80°C fins el dia de l'anàlisi.
- **Condició 4, 5 i 6:** La última alíquota es va subdividir en tres parts que es van deixar 24h, 48h i 72h a TA. Després del temps necessari de cada condició, la mostra es va homogeneïtzar i congelar a -80°C . Aquesta condició permet conèixer els canvis de la microbiota fecal segons el temps que es manté la mostra a TA.

L'anàlisi de les mostres es va realitzar seguint els procediments descrits en l'apartat de material i mètodes d'aquesta tesi. Els bacteris analitzats en aquest estudi van ser els següents: EUB, FPRA, ENB i CLO.

Quan es van comparar les diferents concentracions d'ADN extret per a cada condició de conservació (-80°C , 4h TA i 12h 4°C), no es van observar diferències significatives ($p\text{-valor} = 0,954$). No obstant, la condició en la que es va obtenir més concentració d'ADN va ser la condició 1 (Figura 13). Per contra, es van trobar diferències significatives en comparar les 4 condicions de temps a TA ($p\text{-valor} = 0,031$); observant una menor concentració de ADN en les mostres conservades a TA durant 24h. Les elevades desviacions estàndards observades dins de cada condició van ser donades per la gran variabilitat observada entre les diferents mostres utilitzades.

Resultats. Cap1. Optimització del procés per a l'estudi de la microbiota intestinal

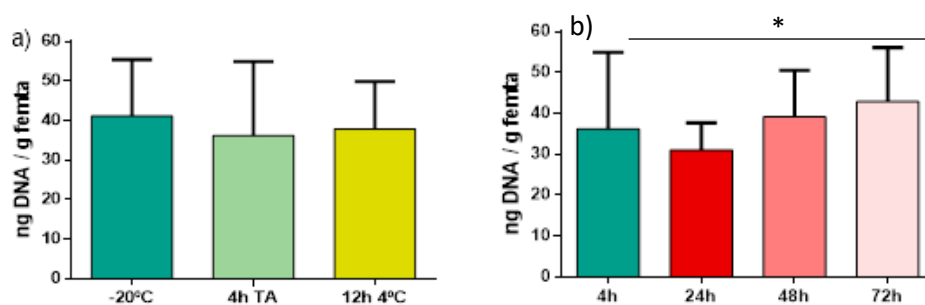


Figura 13. Concentració d'ADN (ng DNA / g de femta) per a cada condició de conservació (n = 9) a) comparació entre congelació, nevera i TA; b) comparació TA a diferents temps a TA (4, 24, 48 i 72h). Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel test de Wilcoxon entre les condicions estan representades per: *, p-valor <0,05, **, p-valor <0,01 i ***, p-valor <0,001.

Passant a analitzar l'abundància dels marcadors bacterians, es va observar que ENB varia significativament segons la temperatura de conservació de la mostra (Taula 16). Concretament, va ser superior en aquelles mostres conservades a TA. No es van observar diferències significatives en l'abundància de FPRA i CLO entre cap de les 3 condicions.

Taula 16. Mitjana dels valors de Cq dels diferent marcadors analitzats (FPRA, CLO i ENB) normalitzats per l'abundància d'EUB \pm desviació estàndard per a cada condició de conservació. Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel test de Kruskal-Wallis entre les tres condicions estan representades per: *, p-valor <0,05, **, p-valor <0,01 i ***, p-valor <0,001.

	FPRA	CLO	ENB
Condicció -20°C	5,35 \pm 0,59	6,26 \pm 1,23	11,45 \pm 4,14
Condicció 4°C	5,59 \pm 0,85	6,95 \pm 2,43	11,61 \pm 4,96
Condicció TA	5,56 \pm 1,20	6,03 \pm 1,28	10,74 \pm 4,45
p-valor	0,505	0,076	0,002**

Pel que fa a la influència del temps de conservació a TA, l'abundància de FPRA va resultar significativament menor en aquelles mostres que van ser conservades durant 72h. En canvi, l'abundància de ENB va ser significativament superior en les mostres conservades durant 48h i 72h. No es van trobar diferències significatives en l'abundància de CLO entre les tres condicions a TA (Taula 17).

Taula 17. Mitjana dels valors de Cq dels diferent marcadors analitzats (FPRA, CLO i ENB) normalitzats per l'abundància d'EUB \pm desviació estàndard per a cada condició de conservació a TA (n = 9). Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel test de Kruskal-Wallis entre les quatre condicions estan representades per: *, p-valor <0,05, **, p-valor <0,01 i ***, p-valor <0,001.

Condicció	FPRA	CLO	ENT
TA 4h	5,99 \pm 1,50	5,98 \pm 2,02	9,95 \pm 4,47
TA 24h	6,20 \pm 1,41	5,68 \pm 1,86	9,64 \pm 4,07
TA 48h	6,58 \pm 1,26	6,11 \pm 1,82	7,50 \pm 2,83
TA 72h	6,79 \pm 1,33	5,97 \pm 2,36	8,15 \pm 4,10
p-valor	0.000***	0.332	0.001***

2.2 Homogeneïtzació de la mostra

Es va avaluar si la distribució de la microbiota fecal era suficientment homogènia per l'anàlisi de les signatures bacterianes o si per contra, calia homogeneïtzar-la degut a que la microbiota es distribuïa de manera heterogènia en una mostra fecal. Per això, es va fer un experiment que consistia en agafar diferents porcions d'una mostra de femta sense homogeneïtzar i posteriorment homogeneïtzar-la. A continuació, es van comparar els resultats obtinguts tant a nivell de rendiment d'ADN com a nivell de marcadors bacterians.

Per fer-ho, es van utilitzar 10 mostres de femta amb estructura definida (escala Bristol 3-4). De les 10 mostres, 5 van provenir d'individus asimptomàtics o sans i 5 provinents de pacients diagnosticats de MII. Cada mostra de femta es va dividir en dues parts:

- **Part superficial:** Regió en contacte amb l'exterior (ambient aeròbic).
- **Part interna:** Regió sense contacte amb l'exterior de la mostra (ambient anaeròbic).

De cada una de les dues parts, es van agafar cinc submostres de diferents zones de la mostra (central, distal i proximal). Després d'agafar totes les submostres de les diferents regions (Figura 14), la mostra sobrant va ser homogeneïtzada per tal de poder comparar l'abundància dels marcadors bacterians entre les diferents submostres provinents de diferents regions i la mostra homogeneïtzada.

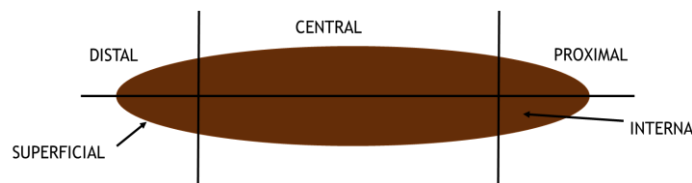


Figura 14. Regions utilitzades de la mostra de femta.

L'anàlisi de les mostres es va realitzar seguint els procediments descrits en l'apartat 2 de material i mètodes. Els bacteris analitzats van ser els següents: EUB, FPRA, ENB i CLO.

El rendiment d'ADN observat en les mostres homogeneïtzades va ser significativament inferior que a les mostres intactes (p-valor = 0,005 i p-valor = 0,015, respectivament). En aquestes mostres, no es van observar diferències significatives entre les regions interna i externa (p-valor = 0,226). (Figura 15).

Resultats. Cap1. Optimització del procés per a l'estudi de la microbiota intestinal

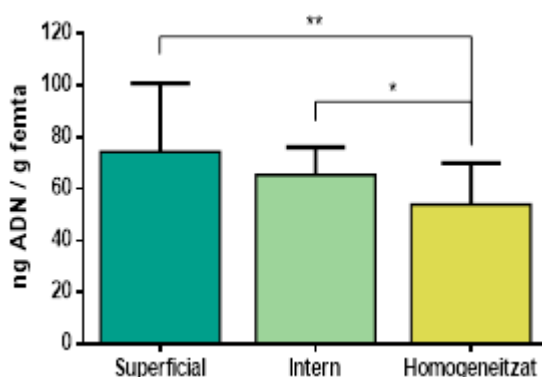


Figura 15. Concentració d'ADN per a cada condició (n = 10). Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel test de Wilcoxon entre les dues condicions estan representades per: *, p-valor <0,05, **, p-valor <0,01 i ***, p-valor <0,001.

Al comparar les espècies bacterianes, l'abundància de ENB va ser significativament inferior en les regions internes en comparació amb la mostra homogeneïtzada (p-valor=0,041*) i amb les regions superficials (p-valor=0,030*). No es van observar diferències significatives pels marcadors FPRA i CLO (Taula 18).

Taula 18. Mitjana dels valors de Cq dels diferent marcadors analitzats (FPRA, CLO i ENB) normalitzats per l'abundància d'EUB \pm desviació estàndard per a cada condició (n = 10): Homogeneïtzat, regió superficial i regió interna. Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel t-test en el cas FPRA i ENB i el test de Wilcoxon per CLO estan representades per: *, p-valor <0,05, **, p-valor <0,01 i ***, p-valor <0,001.

	FPRA	CLO	ENB
Homogeneïtzat	5,88 \pm 1,06	9,73 \pm 4,54	10,82 \pm 2,11
Superficial	5,84 \pm 1,17	9,97 \pm 4,60	10,34 \pm 1,80
Interna	5,84 \pm 1,01	10,16 \pm 5,48	11,10 \pm 2,51
p-valor			
Homog. vs Superficial	0,636	0,621	0,041*
Homog. vs Interna	0,310	0,289	0,563
Superficial vs Interna	0,948	0,882	0,030*

2.3 Kit d'extracció d'ADN

L'objectiu d'aquesta prova va ser comparar el funcionament del kit triat per a l'extracció i purificació d'ADN, Nucleospin Soil kit (Macherey-Nagel, Duren, Alemanial), en front d'altres alternatives com ara: Mini kit QIAamp ADN Stool (QIAGEN) i el Maxwell 16 LEV Purification for Stool kit (Promega). Els paràmetres emprats per a aquesta comparació van ser la concentració final d'ADN i l'abundància obtinguda per al marcador FPRA.

Nucleospin Soil, a diferència dels altres dos kits, inclou "beads" que faciliten la disgregació mecànica de la mostra. S'ha descrit que els kits que no presenten una fase de

lisi mecànica poden causar cert biaix [366,367]. Així doncs, per tal de comparar tots els kits en les seves millors condicions, els kits que no incorporen tubs amb “beads” en el seu protocol, es van utilitzar amb i sense tubs amb “beads”.

En aquest estudi es van utilitzar 3 mostres de femta procedents de controls sans designats segons el criteri d'un digestòleg. L'anàlisi de les mostres es va realitzar seguint els procediments descrits en l'apartat de material i mètodes. L'extracció de l'ADN utilitzant els diferents kits d'extracció es va fer seguint les instruccions de cada fabricant. Els bacteris analitzats van ser els següents: EUB i FPRA.

Quan els diferents kits es van utilitzar seguint les especificacions del kit (sense “beads”), el rendiment en termes de concentració d'ADN va ser significativament més gran amb Nucleospin soil (p-valor = 0,017). Quan es van utilitzar les “beads” en tots els kits d'extracció, només es van observar diferències significatives quan es van comparar el kit Nucleospin soil i el kit de Qiagen (p-valor = 0,031). No es van trobar diferències significatives quan es van comparar el kit de Qiagen i el kit de Promega (Figura 16).

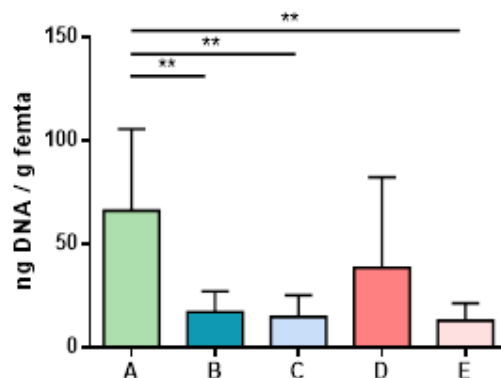


Figura 16. Concentració d'ADN (ng DNA / g de femta) per a cada kit d'extracció (n = 3): A; Nucleospin Soil, B; Qiagen amb “beads”, C; Qiagen sense “beads”, D; Maxwell amb “beads” i E; Maxwell sense “beads”. Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel test de Wilcoxon entre les dues condicions estan representades per: *, p-valor <0,05, **, p-valor <0,01 i ***, p-valor <0,001.

Quan els diferents kits es van utilitzar seguint les instruccions del fabricant, l'abundància de FPRA va ser significativament superior en les mostres extretes amb Nucleospin en comparació amb el kit de Qiagen (p-valor = 0,004). En canvi, no es van observar diferències significatives quan Nucleospin es va comparar amb el kit Maxwell (p-valor = 0,167). No obstant, el kit de nucleospin va obtenir una abundància de FPRA significativament superior a l'obtinguda per els altres dos kits de Qiagen i Promega quan es van utilitzar tubs amb “beads” (p-valor= 0,024 i p-valor = 0,009, respectivament). No es van observar diferències significatives quan el kit de Qiagen i Promega es van comparar (Figura 17).

Resultats. Cap1. Optimització del procés per a l'estudi de la microbiota intestinal

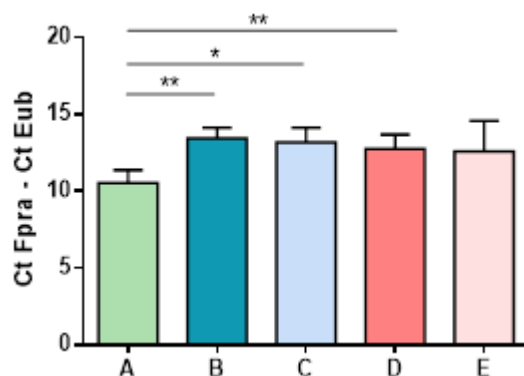


Figura 17. Mitjana i desviació estàndard de l'abundància de FPRA normalitzada per l'abundància d'EUB per a cada kit d'extracció i per a cada condició (n = 3): A; Nucleospin Soil, B; Qiagen amb "beads", C; Qiagen sense "beads", D; Maxwell amb "beads" i E; Maxwell sense "beads". Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel test de Wilcoxon entre les dues condicions estan representades per: *, p-valor <0,05, **, p-valor <0,01 i ***, p-valor <0,001.

3. DISCUSSIÓ

Els mètodes i protocols utilitzats per a l'estudi de la microbiota per al diagnòstic a partir de mostres de femta humanes han de ser robustos, precisos, fiables i dissenyats de manera òptima per assegurar la reducció del biaix introduït per factors que poden esdevenir determinants en el resultat final, com ara les condicions de transport i emmagatzematge, les tècniques d'homogeneïtzació, el mètode d'extracció d'àcids nucleics, entre d'altres [368].

El mètode de conservació de la mostra és crucial a l'hora d'assegurar una reproductibilitat en els resultats. El recipient utilitzat per a la conservació de la mostra pot crear un cert biaix en l'abundància de les espècies microbianes estudiades degut a que no en tots els col·lectors s'acaba recollint la totalitat de la mostra. No obstant, cap dels marcadors estudiats va mostrar diferències significatives entre els dos tubs col·lectors utilitzats.

La congelació directa a -20°C o -80°C es considera normalment el millor mètode de conservació de mostres fecals. No obstant això, no és sempre factible ja que molts estudis requereixen de la recollida de la mostra fecal per part del pacient. En aquest estudi, es va observar un augment significatiu en l'abundància de les Enterobacteriàcies a TA en comparació amb directament la conservació a -80°C . Les Enterobacteriàcies són una família de bacteris gramnegatius, anaerobis facultatius, on *Escherichia coli* és l'espècie més prevalent sovint implicada en infeccions intestinals i molt probablement en episodis inflamatoris [221]. A més, es va detectar un augment en l'abundància d'aquest grup al llarg del temps a TA. El sobre-creixement mostrat pot ésser degut al seu caràcter oportunista i a les condicions favorables necessàries pel seu ràpid creixement en detriment

d'altres espècies més estrictes. A diferència d'allò observat per *E. coli*, l'abundància del bacteri anaerobi estricte *Faecalibacterium prausnitzii* va disminuir quan les mostres van ser conservades a TA durant diferents dies. Aquests resultats estan d'acord amb altres estudis que mostren canvis en la microbiota intestinal segons la condició de conservació [144,369,370]. En un dels estudis, s'observen canvis en l'abundància relativa d'espècies facultatives com ara les que pertanyen al gènere *Bifidobacterium*, i una disminució en l'abundància relativa d'anaerobis estrictes dels gèneres *Anaerostipes*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* i *Lachnospiraceae*, pertanyents al fílum Firmicutes en mostres conservades a TA durant diferents dies [369]. Altres estudis van presentar resultats concordants identificant una disminució similar en bacteris que pertanyen al fílum Firmicutes en mostres emmagatzemades a TA durant 72 hores [144,370] [144]. No obstant, altres estudis no han observat diferències significatives entre mostres fecals congelades, conservades a 4°C i a TA durant 24h [362,371].

Davant els canvis observats atribuïbles a les condicions d'emmagatzematge, s'han proposat diferents solucions tamponades com a estabilitzants de la mostra fecal. Existeixen reactius comercials dissenyats per a la conservació de l'ARN de la mostra com ara el RNAlater, que s'utilitzen comunament com a conservants generals. No obstant, s'ha demostrat que no funcionen correctament en la conservació de la composició de la microbiota [372,373]. Els tampons que contenen EDTA poden inhibir el creixement de certs bacteris a les concentracions utilitzades per la preservació de mostres [374,375].

La microbiota fecal no només no es distribueix uniformement sinó que pot presentar una estructura definida dins la pròpia mostra de femta. Això justifica la necessitat d'una correcta homogeneïtzació de la mostra per qualsevol mètode, la qual redueix significativament la variació intraindividual de bacteris detectats en mostres de femta [368,376,377]. En el present estudi, l'abundància d'Enterobacteriàcies en les regions superficials, més exposades a l'oxigen, va ser superior a l'observada en les mostres homogeneïtzades i també en les regions internes. Aquest resultat confirma que el grau d'homogeneïtat inicial difereix segons la regió de la mostra. És per això que l'homogeneïtzació de les mostres és considerada un pas prioritari per a la reproductibilitat dels resultats. Altres estudis ja descriuen la heterogeneïtat de les mostres de femta. *Santiago i Manichann* el 2014 van voler examinar en 8 subjectes sans si les diferents capes dels excrements eren igualment representatives, comparant-les amb una mostra totalment homogeneïtzada i van concloure que és recomanable la homogeneïtzació dels

excrements, però no indispensable [260]. Tot i això, per tal de minimitzar les diferències intra-mostra, certs estudis han demostrat l'efectivitat de la homogeneïtzació de la mostra fecal [369,376,378].

El rendiment de l'extracció d'ADN bacterià es pot veure afectada per l'eficàcia de la lisi, la qual es pot veure afectada per la composició i el gruix de la paret cel·lular bacteriana. Una lisi insuficientment dràstica pot fer que algunes espècies puguin ser subestimades o caure per sota el llindar de detecció de l'anàlisi. Això pot afectar especialment a bacteris gram-positius amb paret cel·lular gruixuda com per exemple espècies dintre del fílum Firmicutes, com seria el cas de l'espècie *Faecalibacterium prausnitzii*, o altres bacteris que presentin àcid micòlic en la paret cel·lular com per exemple els membres de la família Actinobacteriacies [379]. La disrupció mecànica amb "beads", ultrasons o amb alta pressió, és la manera més eficaç d'aconseguir el trencament de la paret cel·lular. En aquest estudi el kit que amb el què s'obtenia un major rendiment en termes de concentració d'ADN era el Nucleospin Soil. Només el kit Maxwell 16 LEV Purification for Stool, amb tubs amb "beads", va obtenir una concentració d'ADN similar. La disrupció mecànica ja ha estat descrita prèviament com un pas previ a la lisi que produeix un major rendiment en l'extracció i purificació d'ADN [363,379,380]. A més, la concentració de FPRA va ser significativament superior utilitzant el kit Nucleospin Soil cosa que demostra la gran capacitat, en comparació amb els altres kits utilitzats, per extreure DNA d'espècies amb parets cel·lulars més gruixudes.

En resum, les condicions òptimes per a la conservació de mostres fecals destinades a estudis de microbiota per diagnòstic de malalties digestives són: utilitzar pots estèrils de 150 ml o tubs col·lectors de 8ml, congelació directament després de la deposició o conservació a TA durant un període inferior a 48h, homogeneïtzació i utilització del kit Nucleospin Soil de Macherey Nagel, amb un pas de disrupció mecànica amb "beads" previ a la lisi.

CAPÍTOL II

RAID-Dx: Nou mètode no invasiu per al diagnòstic diferencial de la Síndrome de l'Intestí Irritable i la Malaltia Inflamatòria Intestinal

1. INTRODUCCIÓ

La síndrome de l'intestí irritable (SII) és un trastorn funcional gastrointestinal que afecta entre el 9% i el 22% de la població als EUA i a Europa [110,111,381]. El seu diagnòstic es basa en la simptomatologia que es troba sistematitzada en els criteris de Roma IV. Així doncs, la SII es diagnostica a partir de l'aparició de dolor abdominal recurrent que ha de ser present almenys un dia a la setmana, amb dues o més de les següents característiques: 1) dolor associat a la defecació, 2) dolor relacionat amb un canvi en la freqüència de deposicions, 3) dolor relacionat amb un canvi en la consistència de la deposició. En el cas de la durada de les molèsties, cal tenir en compte que els criteris han de complir-se durant els últims tres mesos i els símptomes haurien d'haver començat almenys sis mesos abans del diagnòstic [382].

Varis aspectes de la simptomatologia d'aquest desordre intestinal, són compartits amb altres trastorns funcionals de l'intestí com ara el restrenyiment funcional o la diarrea funcional, o les malalties orgàniques com és el cas de la MII, entre d'altres [383,384]. Per tant, tot i que els criteris de Roma IV estan ben establerts i són obligatoris, no són suficients per establir el diagnòstic de la SII.

Davant l'absència d'un test capaç de diagnosticar en positiu la SII, en la pràctica clínica habitual es realitzen tot un seguit d'exploracions per reforçar el seu diagnòstic. En primer lloc, es fan un seguit de proves mínimes de laboratori que inclouen l'hemograma, l'anàlisi de la proteïna C reactiva, el perfil de la tiroide, les proves serològiques de la malaltia celíaca, l'anàlisi microbiològica de les femtes (bacteris, paràsits i ous), la calprotectina fecal (FC) entre altres.

Una de les primeres opcions en el diagnòstic diferencial d'aquesta malaltia tant dels metges d'atenció primària com dels especialistes gastrointestinals a l'hora d'avaluar un pacient amb dolor abdominal i amb alteració del ritme deposicional amb predomini de diarrea és la possibilitat de trobar-se davant d'una MII. Actualment, la CF és un dels paràmetres més utilitzats per diferenciar la MII dels trastorns funcionals, com ara la SII [385–387]. La CF és un bon marcador per al diagnòstic de la MII. No obstant, quan les proves mínimes de laboratori són normals, la CF és incerta i el pacient continua amb la simptomatologia, la realització d'una colonoscòpia es l'opció escollida per descartar definitivament una malaltia orgànica. Malauradament, la colonoscòpia és un mètode invasiu, car i amb poca acceptació per part dels pacients [67,68,71]. La colonoscòpia no

Resultats. Cap2. RAID-Dx

es realitza en aquells pacients amb una CF inferior a 50 µg/g ja que es consideren pacients amb SII. En canvi, tots aquells pacients amb una CF superior 50 µg/g de femta són sospitosos de presentar una MII i per tant, si la CF continua elevada, s'acaba realitzant una colonoscòpia.

A l'intestí humà existeix un complex ecosistema microbià capaç de realitzar una àmplia varietat de funcions implicades en la nutrició i en la regulació de la salut de l'hoste de diferents maneres [388].

S'ha descrit que les comunitats bacterianes presents en la mucosa del còlon de pacients amb colitis ulcerosa (CU), malaltia de Crohn (MC) o amb SII són estructuralment diferents, comparades amb l'observada en subjectes sans [117,222,254,390]. Una de les espècies proinflamatòries implicades és *Escherichia coli*. És ben conegut que la càrrega d'aquest bacteri augmenta en pacients amb MII [221]. *Escherichia coli* té el potencial d'afectar la integritat de la mucosa intestinal, contribuint a una disfunció de la barrera epitelial, així com a la fisiopatologia de la MII [391]. D'altra banda, segons estudis recents, els pacients amb MII presenten una menor abundància de *F. prausnitzii*. Això s'ha pogut demostrar tant en mostres de mucosa intestinal com en mostres de femta [55,221,252,356,392–394]. A més, s'ha evidenciat que la quantificació d'aquesta espècie podria ser un bon biomarcador per tal de discriminar diferents trastorns intestinals [221,250]. Dins d'aquesta espècie hi ha dos filogrups clarament diferenciats des del punt de vista taxonòmic [294]. Ambdós són presents a les femtes de subjectes sans, i les seves respectives abundàncies poden variar depenent del trastorn intestinal [302].

A partir d'aquestes dades, i mitjançant l'anàlisi de la microbiota fecal, s'ha dissenyat un nou mètode no invasiu (RAID-Dx) que permet discriminar a partir de l'estudi de la microbiota fecal, aquells pacients amb SII d'aquells que presenten MII. Aquesta prova es basa en una combinació matemàtica de set marcadors bacterians fecals descrits anteriorment en mostres de biòpsia [221,294,322]. Així doncs, el RAID-Dx permet detectar signatures bacterianes específiques per la SII a través d'una mostra de femta.

2. MATERIAL I MÈTODES DE L'ESTUDI

2.1 Població d'estudi

En aquest estudi es van reclutar un total de 52 pacients amb MII i 52 pacients amb SII de la unitat de MII dels serveis d'Aparell digestiu de sis hospitals: Hospital Universitari Dr. Josep Trueta [Girona, Catalunya], Hospital Santa Caterina [Salt, Catalunya], Hospital

Universitari de Bellvitge [Hospitalet de Llobregat, Catalunya], Hospital Universitari Germans Trias i Pujol [Badalona, Catalunya], Centre Mèdic Teknon [Barcelona, Catalunya] i el Beth Israel Deaconess Medical Center [Boston, USA]. Els pacients amb MII es van diagnosticar seguint els criteris clínics, patològics i endoscòpics. Els pacients amb SII es van caracteritzar per presentar criteris de Roma IV positius i comportament diarreic o altern. Tots els pacients inclosos, es van sotmetre a una colonoscòpia clínicament indicada al Departament de Gastroenterologia de qualsevol dels centres participants. Els malalts de MII van presentar una colonoscòpia amb activitat inflamatòria (SES-CD > 0 punts per MC i IEM > 0 punts per CU), mentre que els pacients amb SII van presentar una colonoscòpia sense lesions macroscòpicament valorables.

Els criteris d'inclusió dels pacients van consistir en: diagnòstic de MC o CU o SII, edat igual o superior a 18 anys i colonoscòpia programada. Per la seva banda, els criteris d'exclusió van ser: pacients que van rebre tractament antibiòtic i/o antidiarreics i/o prebiòtics i/o probiòtics durant l'últim mes, embaràs, morbiditat severa i presència d'alguna cirurgia intestinal prèvia o qualsevol condició intestinal significativa que pugui alterar els resultats segons els criteris dels investigadors.

2.2 Calprotectina fecal

De cada mostra fecal es va determinar la CF. La capacitat diagnòstica de la CF es va determinar a partir dels valors de sensibilitat i especificitat obtinguts utilitzant el punt de tall de la CF més precís observat en aquest estudi. A més, també es va analitzar la CF utilitzant altres punts de tall utilitzats habitualment en la pràctica clínica (50 µg/g, 100 µg/g i 150 µg/g de femta).

2.3 Conservació, transport i extracció de ADN

Les condicions de conservació i el transport de les mostres als hospitals i l'extracció de l'ADN es troben àmpliament detallats en l'apartat 1.2 i 1.4 dins la secció de Material i mètodes.

2.4 Quantificació dels marcadors bacterians per qPCR

Es va dissenyar un sistema de PCR quantitativa a partir de set espècies bacterianes específiques més els Eubacteris (EUB), que van ser utilitzats per a la normalització de les dades. Cadascun dels biomarcadors seleccionats presentava una seqüència genètica específica. Els bacteris diana van ser *Faecalibacterium prausnitzii* (FPRA), *F. prausnitzii* phylogroup I (PHG-I), *F. prausnitzii* phylogroup II (PHG-II), *Escherichia coli* (ECO),

Akkermansia muciniphila (AKK), *Rumminococcus sp.* (RUM), *Methanobrevibacter smithii* (MSM) i el grup filogenètic Bacteroidetes (BAC).

Les condicions de quantificació dels diferents marcadors per qPCR es troben especificades en l'apartat 1.5 dins dels material i mètodes generals.

2.5 Definició del RAID-Dx

RAID-Dx és una prova no invasiva realitzada a partir d'una mostra de femta, que fa servir un algoritme matemàtic que combina tots els marcadors indicats a l'apartat anterior. El RAID-Dx permet diferenciar els pacients de SII d'aquells amb MII. L'algoritme RAID-Dx va estar definit utilitzant de manera aleatòria el 70% de les dades i posteriorment validat amb el 30% restant. Així doncs, el resultat final obtingut per aquest algoritme és categòric, classificant els pacients en MII o SII.

2.6 Eines estadístiques

En termes d'anàlisi qualitativa, es va considerar absència del marcador analitzat quan no es va obtenir un C_q a l'anàlisi de qPCR.

El poder d'aquesta prova de concepte (87%) es va calcular mitjançant el paquet estadístic G * Power 3.1.9.2, en concret el mòdul per a dos grups independents, post-hoc. Això es va aconseguir a partir de la mostra N de cohorts de MII i SII tot definint un nivell de significació del 5% i una mida d'efecte gran ($d = 0,8$).

L'anàlisi de la corba de la característica operativa del receptor (ROC) es va aplicar per determinar la capacitat de la CF i dels diferents marcadors bacterians individuals per diagnosticar diferencialment aquells pacients amb SII en relació als pacients de MII. La precisió de la discriminació es va obtenir mesurant l'àrea sota la corba ROC (AUC).

La prova de McNemar es va utilitzar per comparar la capacitat de les diferents metodologies emprades en aquest estudi (CF i RAID-Dx). L'estadística s'ha realitzat utilitzant el paquet estadístic SPSS 23.0 (IBM, NYC, USA). Els nivells de significança es van establir per als valors $p \leq 0,05$.

3. RESULTATS

3.1 Dades demogràfiques

Un total de 104 pacients van participar en aquest estudi. D'aquests, 52 van ser diagnosticats amb MII i 52 de SII. Les dades rellevants sobre la població d'estudi es recopilen a la taula 19.

Taula 19. Característiques dels pacients de MII i SII reclutats en l'estudi.

	Pacients MII	Pacients SII
Pacients inclosos (N)	52	52
Sexe, Masculí, N (%)	66 (49,6)	25 (46,3)
Edat (Mitjana ± DS)	48,0 ± 12,9	45,1 ± 12,5
Caucàsics, N (%)	50 (94,0)	49 (92,1)

3.2 Marcadors bacterians en el diagnòstic diferencial entre MII i SII

L'abundància de cada marcador bacterià es va comparar entre els pacients amb MII i SII. L'abundància de AKK i MSM va ser significativament superior en els pacients amb SII en comparació amb l'observada en els pacients amb MII (p-valor = 0,008 i 0,001, respectivament). Per contra, l'abundància de Bac va ser significativament inferior en aquests pacients amb comparació amb l'observada en els pacients amb MII (p-valor < 0,001). No es van trobar diferències significatives per a la resta de marcadors analitzats (Figura 18).

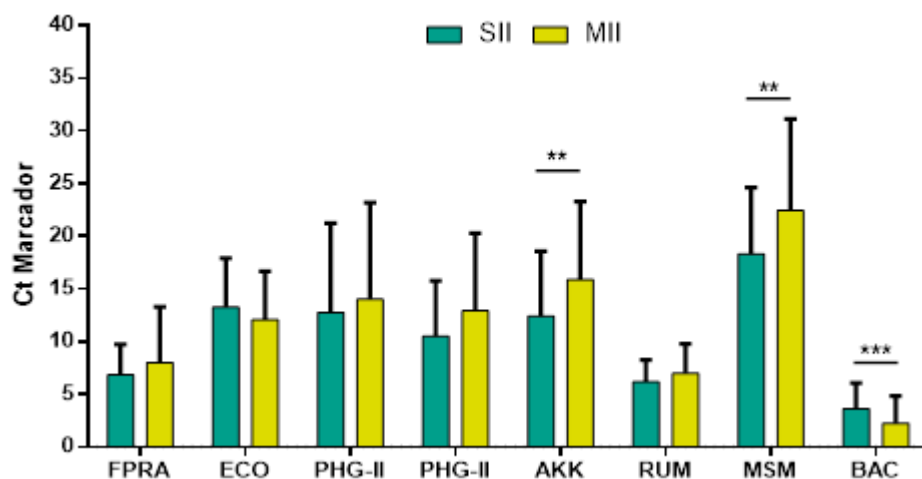


Figura 18. Mitjana de valors de Ct de cada marcador normalitzat per EUB (FPRA, ECO, PHG-I, PHG-II, AKK, RUM, MSM i BAC) per a les malalties SII (n = 52) i MII (n = 52). Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel test de Mann-Whitney entre les dues condicions estan representades per: *, p-valor <0,05, **, p-valor <0,01 i ***, p-valor <0,001.

Resultats. Cap2. RAID-Dx

Es va analitzar la capacitat de cada marcador per discriminar els pacients amb SII d'aquells amb MII. AKK va presentar una AUC de 0,648, mostrant una sensibilitat del 73,1% per diagnosticar els pacients amb SII i una especificitat del 59,6% per al diagnòstic de la MII. MSM va obtenir una AUC de 0,680 amb una sensibilitat i especificitat del 76,9% i el 59,6% respectivament. El millor marcador per discriminar entre ambdós malalties va ser Bac amb una AUC de 0,691, una sensibilitat del 80,8% i una especificitat del 50,0%.

Degut a que cap marcador individual va mostrar una alta precisió per discriminar entre els pacients amb SII i els pacients amb MII, es va desenvolupar un nou mètode, anomenat RAID-Dx, basat en un algoritme que combina els diferents marcadors bacterians analitzats per tal de diferenciar els pacients amb ambdós trastorns.

3.3 La Calprotectina Fecal en el diagnòstic diferencial de la SII

Els nivells de calprotectina fecal van ser significativament superiors en els pacients amb MII ($994,8 \pm 715,8 \mu\text{g/g}$ de femta) en comparació amb l'observada en els pacients amb SII ($145,6 \pm 255,4 \mu\text{g/g}$ de femta) obtenint un p-valor $> 0,001$. La CF va mostrar una gran capacitat per discriminar ambdues malalties (AUC = 0,854), no obstant, els resultats de sensibilitat i especificitat van variar considerablement segons el punt de tall utilitzat (Taula 20).

Taula 20. Sensibilitat (SENS), especificitat (ESPE), valor predictiu positiu (VPP), valor predictiu negatiu (VPN), ràtio de probabilitat positiva (LR+) i la relació de probabilitat negativa (LR-) de la Calprotectina fecal a diferents punts de tall (50 $\mu\text{g/g}$, 100 $\mu\text{g/g}$, 150 $\mu\text{g/g}$ i 165 $\mu\text{g/g}$) per a la discriminació de la Síndrome del Intestí Irritable i la Malaltia Inflamatòria Intestinal.

	Calprotectina Fecal 50 $\mu\text{g/g}$	Calprotectina Fecal 100 $\mu\text{g/g}$	Calprotectina Fecal 150 $\mu\text{g/g}$	Calprotectina Fecal 165 $\mu\text{g/g}$
SENS (%; CI 95%)	51,9 (37,4-66,5)	69,2 (55,7-82,7)	75,0 (62,3-87,7)	80,8 (69,1-92,4)
ESPE (%; CI 95%)	90,0 (77,6-100,0)	86,7 (72,8-100,0)	83,3 (68,3-98,3)	83,3 (68,3-98,3)
VPP (%; CI 95%)	90,0 (77,6-100,0)	90,0 (79,4-100,0)	88,6 (78,1-99,1)	89,4 (79,5-99,2)
VPN (%; CI 95%)	51,9 (37,4-66,5)	61,9 (46,0-77,8)	65,8 (49,4-82,2)	71,4 (55,0-87,8)
LR+ (CI 95%)	5,19 (1,72-15,68)	5,19 (2,05-13,16)	4,50 (1,99-10,17)	4,85 (2,15-10,91)
LR- (CI 95%)	0,53 (0,39-0,73)	0,36 (0,23-0,55)	0,30 (0,18-0,49)	0,23 (0,13-0,41)

Els millors resultats de sensibilitat i especificitat es van obtenir ficant el punt de tall a 165 $\mu\text{g/g}$ de femta (80,85% i 83,3% respectivament). Tot i que el punt de tall més establert en la pràctica clínica habitual (50 $\mu\text{g/g}$ de femta) va presentar molt bons resultats per la MII

arribant a una especificitat del 90,0%, la capacitat per diagnosticar correctament el pacients amb SII va ser molt baixa, obtenint una sensibilitat del 51,9%, la qual cosa produeix un augment considerable del nombre de colonoscòpies innecessàries.

3.4 RAID-Dx en el diagnòstic diferencial de la SII

El RAID-Dx es va definir utilitzant el 70% de les dades totals (35 pacients de SII i 35 pacients amb MII) i es va validar amb el 30% restant de les dades (17 pacients amb SII i 17 pacients amb MII). Els resultats de la definició del algoritme van mostrar uns valors elevats de sensibilitat i especificitat del 94,3% i del 91,4% respectivament (Taula 21). Quan l'algoritme va ser validat amb el 30% de les dades, encara que el valor de sensibilitat va disminuir fins al 88,2%, el valor d'especificitat va augmentar fins al 94,1%. Així doncs, el RAID-Dx va presentar una alta capacitat per diagnosticar diferencialment la SII de la MII.

Taula 21. Sensibilitat (SENS), especificitat (ESPE), valor predictiu positiu (VPP), valor predictiu negatiu (VPN), ràtio de probabilitat positiva (LR+) i la relació de probabilitat negativa (LR-) del RAID-Dx en la seva fase de definició (80% de les dades) i en la seva fase de validació (30% de les dades) per al diagnòstic diferencial de la SII i la MII.

	Definició RAID-Dx	Validació RAID-Dx
SENS (%; CI 95%)	94,3 (85,2-100,0)	88,2 (70,0-100,0)
ESPE (%; CI 95%)	91,4 (80,7-100,0)	94,1 (88,0-100,0)
VPP (%; CI 95%)	91,7 (81,2-100,0)	93,7 (78,8-100,0)
VPN (%; CI 95%)	94,1 (84,7-100,0)	88,9 (71,6-100,0)
LR+ (CI 95%)	11,00 (3,72-32,56)	15,00 (2,22-101,23)
LR- (CI 95%)	0,06 (0,02-0,24)	0,13 (0,03-0,46)

Tot i que els valors de sensibilitat i d'especificitat obtinguts en la validació del RAID-Dx van ser superiors als obtinguts per a la Calprotectina fecal amb el seu punt de tall òptim de 165 µg/g observat en aquest estudi, no es van observar diferències significatives entre les dues metodologies pel que fa a la sensibilitat i l'especificitat (p-valor = 0,146 i p-valor = 1,000). Quan la calprotectina es va analitzar utilitzant el punt de tall preestablert en la pràctica clínica (50 µg/g de femta), la sensibilitat del RAID-Dx va ser significativament superior a l'observada per la CF (p-valor < 0,001. La especificitat va ser igual per als dos mètodes (p-valor = 1,000). Així doncs, la realització del RAID-Dx en pacients amb SII suposaria una reducció del 84% de les colonoscòpies innecessàries degudes a un diagnòstic erroni per part de la calprotectina fecal (50 µg/g de femta).

4. DISCUSSIÓ

La síndrome del Intestí Irritable és tradicionalment diagnosticada a partir dels criteris clínics de Roma IV, els quals presenten una capacitat limitada per diagnosticar la SII, amb una sensibilitat del 75% en atenció primària [395]. Malauradament, el seu diagnòstic continua sent difícil perquè és clínicament heterogeni, no presenta marcadors biològics i moltes altres malalties intestinals comparteixen les seves manifestacions clíniques. Per exemple, més del 70% dels pacients amb MII compleixen els criteris de Roma IV definits per a pacients amb SII [396]. La cerca d'una marcador que sigui capaç de diagnosticar la SII de forma específica permetria alleujar la incertesa i millorar la qualitat de vida del pacient, evitar efectes adversos de medicaments o tractaments innecessaris, estalviar eines diagnòstiques i cirurgies innecessàries, preservar els limitats recursos sanitaris i iniciar el tractament més adequat pel pacient el més aviat possible.

El diagnòstic de la MII s'ha basat històricament en una combinació de la història clínica, l'estudi de paràmetres en sang, la radiologia, l'endoscòpia i anatomia patològica. Així doncs, hi ha una gran necessitat d'un biomarcador fecal capaç de reduir la necessitat de procediments endoscòpics invasius en pacients amb SII. La capacitat de la CF com a marcador pel diagnòstic de la MII ha estat àmpliament demostrada [61,397,398]. Molts estudis realitzats en centres especialitzats de referència han demostrat una alta capacitat de la CF per diferenciar entre la MII i diferents trastorns intestinals com la SII. No obstant, la CF no és específica només de la MII i altres processos poden incrementar-la, tals com el càncer colorectal, certes infeccions gastrointestinals i altres entitats inflamatòries com la colitis microscòpica o la diverticulitis [399].

En aquest estudi la CF s'ha analitzat a diferents punts de tall. En la pràctica clínica, el punt de tall a 50 µg/g de femtes s'utilitza com a nivell específic per detectar malalties orgàniques, ja que s'obté un alt valor predictiu negatiu [400]. En canvi, punts de tall més elevats no són recomanables degut a l'increment dels falsos negatius, la qual cosa fa que es redueixi el nombre de pacients amb MII correctament diagnosticats. En el nostre estudi la CF va presentar una alta capacitat pel diagnòstic de la MII amb una especificitat elevada del 90,0% quan el punt de tall de la CF va ser utilitzat a 50 µg/g de femtes. Per contra, la capacitat per diagnosticar aquells pacients amb SII va ser menor, mostrant una sensibilitat del 52% degut a que un percentatge elevat de pacients amb SII va presentar uns nivells de CF superiors a 50 µg/g de femta. Aquests resultats s'assemblen a d'altres on també es va observar una menor capacitat de la CF per diagnosticar la SII [401]. En altres estudis,

la sensibilitat de la CF va variar del 63% al 100% i l'especificitat del 80% al 100% per distingir pacients amb MII de pacients amb SII [61,81,401–403]. La capacitat de la CF per diagnosticar la SII es va veure incrementada quan el punt de tall utilitzat va ser major, no obstant, conseqüentment la capacitat de diagnòstic per la MII es va veure lleugerament disminuïda. Aquests resultats concorden amb els observats en d'altres estudis [81,401]. La CF tot i ser un mètode amb menor capacitat pel diagnòstic de la SII, es comporta clarament millor si el comparem amb altres biomarcadors com la Proteïna C Reactiva, Anticossos anti-citoplasma dels neutròfils, entre d'altres [67].

La manca de coneixement sobre l'etiologia de la SII pot dificultar el desenvolupament d'una prova diagnòstica per a aquesta patologia. La fisiopatologia de la SII és extremadament complexa, ja que implica diferents factors com la motilitat intestinal anormal, la hipersensibilitat visceral, augment de la permeabilitat intestinal, activació immune, alteració de la microbiota i, a diferència dels pacients amb MII, la pertorbació en la funció de l'eix cervell-intestí [404].

La simptomatologia compartida dels pacients amb SII inclou dolor abdominal, sensació d'inflor, flatulència excessiva i trastorns intestinals. Tots aquests símptomes es centren en el tracte intestinal provocant una modificació de l'hàbit deposicional dels pacients. Al mateix temps, l'intestí també es modifica obligant a la microbiota intestinal a adaptar-se a les noves condicions del medi. S'ha descrit que els bacteris són capaços de superar modificacions de l'hoste, establint un nínxol reeixit mitjançant l'adquisició de fonts de nutrients i eludint la mort d'altres microorganismes i del sistema immune innat i adaptatiu [405]. Aquests desafiaments representen oportunitats d'adaptació i de creixement.

La majoria de l'activitat bacteriana es produeix en el còlon proximal on la disponibilitat del substrat és més alta. Al còlon distal, la disponibilitat de substrat disminueix i l'extracció d'aigua lliure redueix la difusió de substrats i productes microbians. Això fa que la part proximal del còlon sigui el principal lloc de fermentació. En particular, els hidrats de carboni no digeribles són fermentats al còlon proximal per bacteris sacarolítics, principalment fermentadors primaris com els Bacteroidetes [146]. Els Bacteroidetes són la pedra angular de l'homeòstasi en l'intestí i estan relacionats amb el metabolisme dels hidrats de carboni, el resultat del qual pot influir en la salut humana. Això probablement és el que converteix els Bacteroidetes en un bon marcador per formar part del test RAID-Dx. A més, el RAID-Dx inclou tres representants que habiten en l'interior del mucus: *A. muciniphila*, *F. prausnitzii* i *Ruminococcus* sp. La presència d'una important capa de moc

Resultats. Cap2. RAID-Dx

intestinal ajuda als ecosistemes de dues maneres diferents: d'una banda allotjant bacteris protectors i muconutritius i d'altra, mantenint els bacteris nocius transitoris allunyats de la membrana mucosa facilitant el trànsit intestinal [406,407]. Aquests tres marcadors bacterians presenten funcions fisiològiques importants per a l'hoste, a més, s'associen amb el manteniment de la homeòstasi intestinal [300,408]. S'ha descrit repetidament una disminució de la seva abundància que es correlaciona amb certes malalties intestinals [113,285,412,413,293,294,305,317,350,409–411]. *M. Smithii*, un altre marcador utilitzat per al RAID-Dx, va ser seleccionat perquè és una espècie metanogènica que juga un paper important en la digestió eficient dels polisacàrids pel consum dels productes finals de la fermentació bacteriana [335]. A més, els estudis observacionals mostren una forta associació entre el trànsit intestinal retardat i la producció de metà, que informa d'una associació entre les baixes abundàncies de metanògens i la SII diarreica [334,342]. Finalment, *E. coli* pertany al fílum dels Proteobacteria i presenta propietats inflamatòries. *E. coli* s'ha trobat en nombres més elevats a la mucosa propera a les cèl·lules epitelials intestinals i en úlceres de pacients amb MC i CU en comparació amb subjectes sans o amb pacients amb SII [221,307–309]. Aquests estudis indiquen que *E. coli* pot ser un dels principals inductors de la inflamació intestinal, la qual cosa fa que el seu ús com a marcador bacterià per al diagnòstic diferencial entre la SII i la MII sigui indispensable.

Tot i l'elevada capacitat diagnòstica obtinguda per RAID-Dx, es fa evident que els estudis són proves de concepte i que el nombre de mostres utilitzat no és suficientment elevat per poder validar el mètode. Per aquest motiu, actualment estan en marxa la validació clínica del mètode, amb una mida mostral més elevada. A més, també cal remarcar que, al no tenir mostres de biòpsies intestinal en aquests pacients, pot haver-hi un petit biaix donat per inflamacions microscòpiques no detectades en la colonoscòpia convencional de pacients amb SII.

En aquest estudi, el RAID-Dx va obtenir una capacitat diagnòstica, per discriminar entre la SII i la MII, significativament superior en comparació amb la CF amb el punt de tall més emprat a la pràctica clínica habitual (50 µg/g de femta), tot mantenint la capacitat diagnòstica per la MII. En aquest context, l'ús d'aquesta signatura bacteriana com a prova de primera línia per al diagnòstic permetria reduir la utilització d'altres proves de laboratori i proves d'imatge que s'utilitzen actualment. El mal diagnòstic condueix a majors costos mèdics directes de 21 M € anuals i una mala qualitat de vida del pacient. Actualment, es calcula que fins al 45% dels pacients esperen més d'un any per al

diagnòstic d'aquestes malalties, tot i que fins al 17% esperen més de 5 anys. Això sol ja justifica la necessitat del desenvolupament d'un mètode no invasiu que permeti escurçar el temps mitjà del diagnòstic definitiu de la SII (de 5 anys a 7 dies), detectar la patologia el més aviat possible, començar el tractament, evitar futures complicacions i reduir significativament el cost directe dels clients. Per tant, RAID-Dx es postula com a eina específica per al diagnòstic de la SII amb una alta sensibilitat i especificitat.

CAPÍTOL III

**RAID-Monitor: Un nou mètode no
invasiu per monitoritzar l'activitat
endoscòpica en pacients amb
Malaltia Inflamatòria Intestinal**

1. INTRODUCCIÓ

La Malaltia Inflamatòria Intestinal (MII) és un conjunt de patologies cròniques que cursen amb brots, i per tant, és necessari un seguiment constant i exhaustiu per adaptar adequadament la pauta terapèutica. En la pràctica clínica habitual s'utilitzen diferents metodologies per monitoritzar l'activitat o verificar la remissió dels pacients amb MII. Els procediments invasius com la colonoscòpia, tot i que es consideren la millor eina per avaluar la curació de la mucosa, no són la millor eina per al seguiment regular de l'activitat a causa dels seus riscos associats [67,68,71]. És per aquest motiu que són necessàries noves aproximacions metodològiques que permetin obtenir una indicació sobre l'activitat clínica, endoscòpica i, idealment, histològica per tal de minimitzar l'ús innecessari dels mètodes invasius [414].

En la pràctica clínica i en assajos d'intervenció terapèutica és freqüent utilitzar índexs clínics, com ara l'índex de Harvey-Bradshaw (en pacients de MC) i l'índex parcial de Mayo (en pacients de CU). Malauradament, els resultats d'aquestes valoracions es basen en la simptomatologia percebuda i presentada pel pacient i, per tant, degut a la seva subjectivitat, sovint no es correlacionen correctament amb l'estat de la mucosa [415–418]. Existeixen alguns biomarcadors no invasius com a marcadors potencials per a la monitorització de l'activitat en la MII [398,419]. Un dels biomarcadors més utilitzats en l'actual pràctica clínica és la CF. L'elevació de la CF en femtes es correlaciona positivament amb l'activitat inflamatòria de la mucosa intestinal [121,420,421]. Tot i el seu ús generalitzat i els bons resultats que ofereix, la CF requereix d'un punt de tall predeterminat per al seguiment de l'activitat de la MII que no està ben consolidat. Això és degut a la gran variabilitat derivada de la diversitat de dissenys emprats en els diferents estudis, especialment pel que fa a la definició de la remissió i al punt de tall utilitzat [81,82]. Un altre problema que presenta la CF, és l'elevada variabilitat en la seva abundància que es pot obtenir a partir d'un mateix pacient [422–425]. Així doncs, la cerca de nous marcadors no invasius per a controlar l'activitat de la malaltia amb una precisió superior a la CF és necessària.

Tot i que encara no s'ha establert l'etiologia de la MII, s'ha demostrat que la microbiota té un paper molt important en el desenvolupament i la progressió de la malaltia [221,222]. La disbiosi, definida com la desviació en la composició d'una comunitat microbiana normal, ha estat àmpliament descrita en pacients amb MII [222,256,257,259,260]. Les observacions més freqüentment demostrades han estat una reducció en la diversitat de la

microbiota observable tant en biòpsies com en femtes, juntament amb un canvi en l'abundància relativa de diferents espècies bacterianes en mostres de pacients amb MII en comparació amb les de subjectes sans [219,255,261–266]. A més, s'han descrit diferències clares segons el grau d'activitat de la MII a nivell de microbiota, encara que els resultats dels diferents estudis són inconsistents, probablement a causa de les diferències metodològiques.

En pacients amb MC activa, s'han observat increments significatius en l'abundància d'espècies dins el fílum de Proteobacteria i la família Enterococcaceae. Per contra, s'ha observat una reducció d'espècies pertanyents a la família Ruminococcaceae i a l'ordre Clostridiales [426]. En pacients amb CU activa, s'han descrit augments en els nivells de *Streptococcus sp.* i reduccions del nivell Clostridials [426]. Aquests estudis suggereixen que la microbiota pot tenir un paper important en la inducció d'exacerbacions [251,271] i que les diferències en la composició de la microbiota poden ser explotades per determinar l'activitat de la malaltia en la MII.

A partir d'aquestes evidències, s'ha dissenyat el RAID-Monitor, una eina no invasiva per determinar l'activitat endoscòpica en pacients amb MII basada en la combinació matemàtica de cinc marcadors bacterians fecals, prèviament definits en mostres de biòpsia intestinal [221,294,322]. L'objectiu d'aquest estudi va ser avaluar la capacitat de RAID-Monitor per monitoritzar l'activitat endoscòpica, tant en pacients amb MC, com en pacients amb CU, en comparació amb els índexs clínics actuals i els nivells de CF.

2. MATERIAL I MÈTODES DE L'ESTUDI

2.1 Població d'estudi

Es va reclutar una cohort formada per 141 pacients amb MII als serveis de Digestologia de sis hospitals: Hospital Universitari Dr. Josep Trueta (Girona), Hospital Santa Caterina (Salt), Hospital Universitari de Bellvitge (Hospitalet de Llobregat), Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona), Centro Médico Teknon (Barcelona) i el Beth Israel Deaconess Medical Center (Boston, USA). Els pacients amb MII es van diagnosticar seguint els criteris clínics, patològics i endoscòpics. Tots els pacients inclosos es van realitzar una colonoscòpia clínicament indicada al corresponent servei del centre participant amb l'objectiu de determinar l'activitat endoscòpica. Les indicacions per a la colonoscòpia van ser la monitorització de la curació de la mucosa. Cinc de les mostres i les seves dades clíniques associades es van incloure retrospectivament en aquest estudi

provinents del Biobanc de l'Hospital Universitari Dr. Josep Trueta (Biobanc IDIBGI, B.0000872), integrat a la Xarxa Nacional de Biobancs. Aquestes mostres es van processar seguint els procediments operatius estàndard amb l'aprovació adequada dels Comitès Científics i d'Ètica.

Els criteris d'inclusió dels pacients van consistir en: diagnòstic de MC o CU, edat igual o superior a 18 anys i colonoscòpia programada. Els criteris d'exclusió van ser: pacients que van rebre tractament antibiòtic i/o antidiarreics durant l'últim mes, embaràs, morbiditat severa i presència d'alguna cirurgia intestinal prèvia o qualsevol condició intestinal significativa que pugui alterar els resultats segons els criteris dels investigadors. Finalment, es van excloure de l'estudi un total de 8 pacients degut a la presència de lesions adenomatoses observades durant la realització de la colonoscòpia. Un cop aplicats aquest criteris es van incloure a l'estudi un total de 133 pacients.

2.2 Monitorització de l'activitat endoscòpica

En aquest estudi, tots els subjectes es van sotmetre a una colonoscòpia per avaluar l'estat de la mucosa. L'activitat endoscòpica es va utilitzar per classificar l'estat de la malaltia del pacient en estat actiu o en remissió. Tots els pacients abans de la colonoscòpia van ser sotmesos a la neteja del tracte gastrointestinal utilitzant polietilenglicol segons les directrius del fabricant.

L'activitat endoscòpica dels pacients amb MC es va definir mitjançant l'índex endoscòpic SES-CD (Simple Endoscopic Score for Crohn's disease). Es va considerar activitat endoscòpica un SES-CD > 2 punts (remissió SES-CD ≤ 2 punts). Aquest punt tall es fa servir en la majoria dels estudis que utilitzen la puntuació del SES-CD per definir la gravetat de la malaltia [427]. L'activitat endoscòpica en pacients amb CU va ser definida utilitzant l'índex endoscòpic de Mayo (IEM), ja que, a més de ser fàcil d'utilitzar, es emprat de manera rutinària en assajos clínics i en la pràctica clínica habitual [68]. Així doncs, l'activitat endoscòpica es va definir mitjançant un IEM > 1 punt i la remissió amb un IEM ≤ 1 punt. Aquest punt de tall es recomanat per un grup d'especialistes internacionals ja que està associat amb una menor taxa de colectomia durant el seguiment [428]. Tot i que no disposem del valor del índex SES-CD dels pacients de MC provinents del centre Beth Israel Deaconess Medical Center, l'activitat endoscòpica d'aquests pacients va ser certificada i confirmada pel digestòleg del centre.

2.3 Índex clínics

Al mateix dia de la realització de la colonoscòpia per part del pacient es van recollir les dades clíniques rellevants. En els pacients amb MC, l'activitat clínica es va avaluar mitjançant l'índex de Harvey-Bradshaw (IHB) que defineix l'activitat clínica en aquells pacients amb un IHB > 4 punts. En CU l'activitat clínica va ser avaluada utilitzant l'índex de Mayo Parcial (IMP) que defineix activitat clínica en aquells pacients amb un IMP > 1 punt.

2.4 Calprotectina fecal

Es va determinar la capacitat de la CF a partir dels valors de sensibilitat i especificitat obtinguts utilitzant el punt de tall de la CF més precís observat en aquest estudi. A més, també es va analitzar la CF utilitzant altres punts de tall utilitzats habitualment en la pràctica clínica (50 µg/g, 100 µg/g i 250 µg/g de femta).

2.5 Conservació, transport i extracció de DNA

Les condicions de conservació i el transport de les mostres als hospitals i l'extracció de l'ADN es troben àmpliament detallats en l'apartat 1.2 i 1.4 dins la secció de Material i mètodes.

2.6 Quantificació dels marcadors bacterians per qPCR

Es va dissenyar un sistema de PCR quantitatiu específic per a l'anàlisi del RAID-Monitor utilitzant cinc espècies bacterianes específiques i els Eubacteris (EUB). Els EUB van ser utilitzats per a la normalització de les dades. Cadascun dels biomarcadors seleccionats va presentar una seqüència bacteriana específica per a una espècie bacteriana. Els bacteris diana van ser *Faecalibacterium prausnitzii* (FPRA), *F. prausnitzii* filogrup I (PHG-I), *F. prausnitzii* filogrup II (PHG-II), *Escherichia coli* (ECO) i *Akkermansia muciniphila* (AKK).

Les condicions de quantificació dels diferents marcadors per qPCR es troben especificades en l'apartat 1.5 dins dels material i mètodes generals.

2.7 Definició del RAID-Monitor

RAID-Monitor és una prova qualitativa, realitzada a partir d'una mostra de femta, basada en un algoritme que combina tots els marcadors estudiats. A causa de les diferents abundàncies bacterianes trobades, es va dissenyar un algoritme diferent per a cada malaltia (MC i CU). La combinació dels diferents marcadors bacterians va ser capaç de

diferenciar els subjectes amb activitat endoscòpica d'aquells que presentaven remissió endoscòpica. Aquests algorismes van estar definits utilitzant de manera aleatòria el 70% de les dades i posteriorment validats amb el 30% restant. Així doncs, el resultat final obtingut per l'algoritme RAID-Monitor és categòric, classificant els pacients amb MC i CU en pacients amb activitat endoscòpica o remissió endoscòpica.

2.8 Eines estadístiques

En termes d'anàlisi qualitativa, un biomarcador es va considerar absent quan no es va obtenir un valor de Ct a l'anàlisi de qPCR.

El poder d'aquesta prova de concepte (73% per a MC i 82% per CU) es va calcular mitjançant el mòdul G*Power 3.1.9.2, mòdul: dos grups independents, post-hoc. Això es va aconseguir utilitzant la mostra N de cohorts de MC i CU definint un nivell de significació del 5% i una mida d'efecte gran ($d = 0,8$),

L'anàlisi de la corba de la característica operativa del receptor (ROC) es va aplicar per determinar la capacitat dels marcadors i de la CF per distingir els subjectes amb activitat endoscòpica, d'aquells pacients amb remissió. La precisió de la discriminació es va mesurar per l'àrea sota la corba ROC (AUC).

La prova de McNemar es va utilitzar per comparar les diferents metodologies (resultats clínics, CF i RAID-Monitor) per determinar l'activitat endoscòpica. L'anàlisi estadística es va realitzar utilitzant el paquet SPSS 23.0 (IBM, NYC, USA). Els nivells de significació es van establir per p-valors $\leq 0,05$.

3. RESULTATS

3.1 Dades demogràfiques

L'avaluació de l'activitat es va portar a terme amb 133 pacients amb MII; 54 amb MC i 79 amb CU. Les principals dades sobre la població d'estudi es recopilen a la taula 22.

Taula 22. Característiques dels pacients de MII reclutats en l'estudi, tant agrupats en MII com separats en MC i CU.

	Pacients MII	Pacients MC	Pacients CU
Pacients inclosos (n)	133	54	79
Sexe, Masculí, n (%)	66 (49,6)	25 (46,3)	41 (51,9)
Edat (Mitjana ± DS)	48,0 ± 12,9	45,1 ± 12,5	49.9 ± 13,0
Caucàsics, n (%)	125 (94,0)	53 (98,1)	72 (91,1)
Tractament, n (%)			
No tractament	20 (15,0)	8 (14,8)	12 (15,2)
Mesalazina	51 (38,3)	7 (13,0)	44 (55,7)
Azatioprina	51 (38,3)	26 (48,1)	25 (31,6)
Anti-TNF-α	36 (27,1)	22 (40,7)	14 (17,7)
Desconegut	9 (6,8)	3 (5,6)	6 (7,6)
Activitat endoscòpica*			
Remissió‡	52 (44,8%)	20 (54,1%)	32 (40,5%)
Activitat lleu§	22 (19,0%)	5 (13,5%)	17 (21,5%)
Activitat moderada¶	21 (18,1%)	7 (18,9%)	14 (17,7%)
Activitat severa⋈	19 (16,4%)	3 (8,1%)	16 (20,3%)

*Les mostres de MC provinents de Boston no van presentar el valor del SES-CD (SES-CD > 2 punts). ‡Remissió (SES-CD ≤ 2 punts en MC; MES = 0 punts en CU), §Activitat endoscòpica lleu (SES-CD=3-6 en MC, MES=1 en CU), ¶Activitat endoscòpica moderada (SES-CD=7-15 en MC ; MES= 2 punts en CU), ⋈Activitat endoscòpica severa (SES-CD > 15 punts en MC; MES = 3 punts en CU).

3.2 Marcadors bacterians entre poblacions

Es van comparar les abundàncies relatives de FPRA, ECO, PHG-I, PHG-II i AKK entre poblacions (Espanya vs EUA) (Figura 19). Com que al centre Beth Israel Deaconess Medical Center no es van reclutar pacients en remissió, només es van comparar mostres de pacients amb MC i CU amb activitat endoscòpica. Malgrat les diferències en l'estil de vida i la dieta, no es van trobar diferències significatives per a cap marcador bacterià analitzat entre ambdues poblacions. Per tant, les mostres dels pacients americans de MII amb activitat endoscòpica es van analitzar conjuntament amb els pacients amb MII procedents d'Espanya.

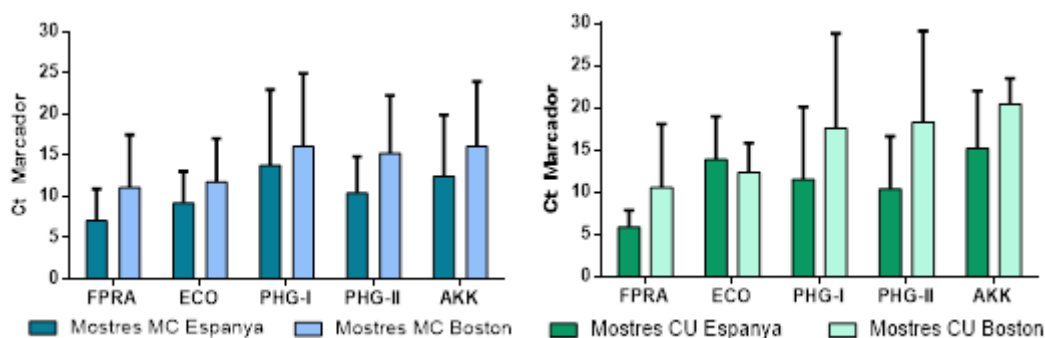


Figura 19. Mitjana de valors de Ct de cada marcador normalitzat per EUB (FPRA, ECO, PHG-I, PHG-II i AKK) per a les poblacions de MC i CU de Espanya (n = 17 per MC i n = 25 per CU) i Boston (n = 17 per MC i n = 5 per CU) . Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel test de Mann-Whitney entre les dues condicions estan representades per: *, p-valor <0,05, **, p-valor <0,01 i ***, p-valor <0,001.

3.3 Marcadors bacterians per monitoritzar l'activitat en la MII

Es va comparar l'abundància de cada marcador bacterià de pacients amb MC actius (SES-CD > 2 punts) i pacients amb MC en remissió endoscòpica (SES-CD ≤ 2 punts) sense obtenir cap diferència significativa entre ells (Figura 20). No obstant, en pacients amb CU, l'abundància de PHG-II va ser significativament més abundant en aquells que presentaven remissió endoscòpica (p-valor = 0,035) obtenint una AUC de 0,641 per distingir els subjectes amb activitat endoscòpica d'aquells amb colonoscòpia normal. Això proporciona uns valors de sensibilitat i especificitat del 74,4% i del 50,0%, respectivament.

Degut a que cap marcador individual no va presentar una diferència suficient per determinar l'activitat endoscòpica en pacients amb MII, es van desenvolupar dos algorismes que combinen diferents marcadors bacterians i els integra en un sistema que sí es pot fer servir conjuntament per al propòsit inicial i que hem anomenat RAID-Monitor.

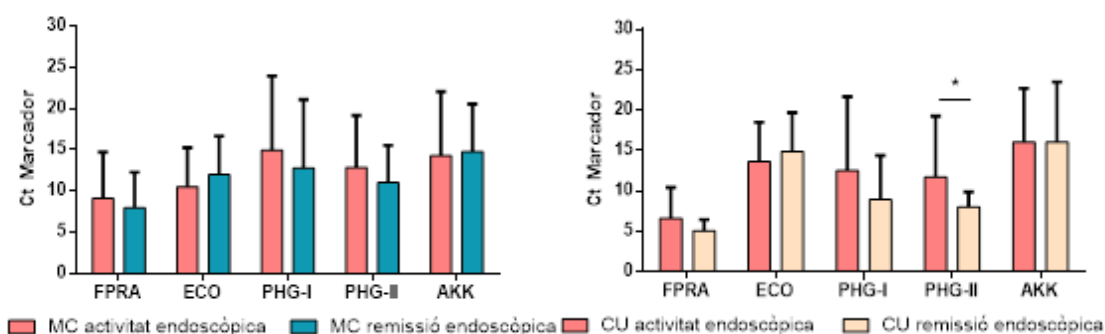


Figura 20. Mitjana de Ct de cada marcador normalitzat per EUB (FPRA, ECO, PHG-I, PHG-II i AKK) per les poblacions de MC i CU en activitat (n = 34 per MC i n = 47 per CU) i en remissió endoscòpica (n = 20 per MC i n = 32 per CU). Les diferències estadísticament significatives obtingudes pel test de Mann-Whitney entre les dues condicions estan representades per: *, p-valor <0,05, **, p-valor <0,01 i ***, p-valor <0,001.

3.4 Comparativa de RAID-Monitor, Índex clínic i Calprotectina Fecal en pacients amb MC

Els resultats de la definició del algorisme RAID-Monitor en MC van mostrar uns valors elevats de sensibilitat i especificitat del 83,3% i del 87,5% respectivament (Taula 23). La seva validació va mostrar un lleuger augment del valor de sensibilitat (90,0%) i una lleugera reducció de la especificitat (81,2%) en comparació amb els resultats obtinguts en la fase de definició del RAID-Monitor en pacients amb MC.

Taula 23. Sensibilitat (SENS), especificitat (ESPE), valor predictiu positiu (VPP), valor predictiu negatiu (VPN), ràtio de probabilitat positiva (LR+) i la relació de probabilitat negativa (LR-) de l'índex Harvey-Bradshaw (IHB), calprotectina fecal (millor tall de 200 µg/g de femta) i RAID-Monitor (definició; 70% i validació; 30 %, de l'algoritme) per a la detecció de l'activitat endoscòpica en pacients de MC.

Malaltia de Crohn	Definició RAID-Monitor	Validació RAID-Monitor	Índex Clínic (HBI)	Calprotectina Fecal 200 µg/g§
SENS (%; CI 95%)	83,3 (66,3-100,0)	90,0 (66,4-100,0)	72,7 (56,0-89,4)	88,2 (70,0-100,0)
ESPE (%; CI 95%)	87,5 (65,0-100,0)	81,2 (48,5-100,0)	75,0 (53,5-96,5)	80,0 (60,0-100,0)
VPP (%; CI 95%)	93,1 (80,2-100,0)	85,9 (60,4-100,0)	82,8 (67,3-98,2)	78,9 (58,0-99,9)
VPN (%; CI 95%)	73,4 (45,9-98,9)	86,6 (55,5-100,0)	62,5 (41,0-83,9)	88,9 (71,6-100,0)
LR+ (CI 95%)	7,50 (1,46-41,91)	5,40 (1,11-28,87)	2,91 (1,32-6,39)	4,41 (1,81-10,78)
LR- (CI 95%)	0,19 (0,08-0,48)	0,12 (0,02-0,82)	0,36 (0,20-0,67)	0,15 (0,04-0,55)

L'índex clínic utilitzat per a la MC, l'IHB, va presentar uns valors de sensibilitat i una especificitat menors (72,7% i 75,0%, respectivament) que el RAID-Monitor. En conseqüència, es va obtenir una reducció del valor predictiu positiu (VPP), del Valor Predictiu Negatiu (VPN), de la relació de versemblança positiva (LR+) i negativa (LR-). Quan els dos tests es van comparar utilitzant el test de McNemmar, es van observar diferències significatives en la sensibilitat (p-valor = 0,016), on la capacitat del RAID-Monitor per detectar aquells pacients amb MC activa va ser major. En canvi, tot i observar-ne una reducció, no es van observar diferències significatives entre els dos mètodes a nivell d'especificitat (p-valor = 0,453).

La capacitat de la CF per determinar l'activitat endoscòpica es va avaluar utilitzant diferents punts de tall. Utilitzant el punt de tall més acceptat (250 µg/g de femta), es va obtenir una sensibilitat del 82,3% i una especificitat del 80,0%. La CF va mostrar un valor de AUC de 0,846. Els majors valors de sensibilitat i especificitat es van obtenir utilitzant un punt de tall a 200 µg/g de femta, mostrant uns valors del 88,2% i del 80,0%, respectivament (Taula 24).

Resultats. Cap3. RAID-Monitor

Taula 24. Sensibilitat (SENS), especificitat (SPEC), valor predictiu positiu (VPP), valor predictiu negatiu (VPN), ràtio de probabilitat positiva (LR +) i la relació de probabilitat negativa (LR-) de l'índex Harvey-Bradshaw (HBI), calprotectina fecal (millor tall de 200 µg / g, altres talls: 50 µg / g, 100 µg / g, i 250 µg / g de femta) i monitor de RAID (definició; 70% i validació; 30 %, de l'algorisme) per a la detecció d'activitat que defineix la malaltia d'inflamació activa amb estàndards endoscòpics (SES-CD > 2).

Malaltia de Crohn	Calprotectina Fecal 50 µg/g	Calprotectina Fecal 100 µg/g	Calprotectina Fecal 200 µg/g	Calprotectina Fecal 250 µg/g
SENS (%; CI 95%)	94,1 (80,0-100,0)	94,1 (80,0-100,0)	88,2 (70,0-100,0)	82,3 (61,3-100,0)
ESPE (%; CI 95%)	50,0 (25,6-74,4)	55,0 (30,7-79,3)	80,0 (60,0-100,0)	80,0 (60,0-100,0)
VPP (%; CI 95%)	61,5 (40,9-82,2)	64,0 (43,2-84,8)	78,9 (58,0-99,9)	77,8 (55,8-99,8)
VPN (%; CI 95%)	90,9 (69,4-100,0)	91,7 (71,9-100,0)	88,9 (71,6-100,0)	84,2 (65,2-100,0)
LR+ (CI 95%)	4,41 (1,81-10,78)	2,09 (1,27-3,44)	4,41 (1,81-10,78)	4,12 (1,67-10,17)
LR- (CI 95%)	0,15 (0,04-0,55)	0,11 (0,02-0,75)	0,15 (0,04-0,55)	0,22 (0,08-0,63)

La sensibilitat van ser significativament superior en la CF en comparació amb l'observada a partir de l'IHB (p-valor = 0,021) mentre que la especificitat no va mostrar diferències (p-valor = 1,000). RAID-Monitor va presentar uns valors de sensibilitat i especificitat més elevats que la CF, tot i que els resultats no van ser estadísticament significatius (p-valor = 1,000 i p = 0,687, respectivament).

3.5 Comparativa de RAID-Monitor, Índex clínic i Calprotectina Fecal en pacients amb CU

En pacients amb CU, el RAID-Monitor va mostrar en la seva definició uns valors elevats de sensibilitat i especificitat del 90,0% i del 94,1% respectivament (Taula 25). El VPP, VPN, LR + i LR- de la cohort utilitzada en aquest estudi també van ser superiors. En la seva validació, el RAID-Monitor va mostrar resultats semblants a la definició del algorisme amb uns valors de sensibilitat i especificitat del 90,0% i el 93,3%, respectivament.

L'índex clínic utilitzat per a la CU, l'IMP, va presentar un valor de sensibilitat del 70,0% essent menor que el RAID-Monitor, tot i que el valor d'especificitat va ser similar (94,4%). No obstant, no es van obtenir diferències significatives ni en termes de sensibilitat ni d'especificitat (p-valor = 0,065 i 1,000 respectivament).

Taula 25. Sensibilitat (SENS), especificitat (ESPE), valor predictiu positiu (VPP), valor predictiu negatiu (VPN), ràtio de probabilitat positiva (LR+) i la relació de probabilitat negativa (LR-) de l'índex Harvey-Bradshaw (IHB), calprotectina fecal (millor tall de 200 µg/g de femta) i RAID-Monitor (definició; 70% i validació; 30 %, de l'algoritme) per a la detecció de l'activitat endoscòpica en pacients de CU.

Colitis Ulcerosa	Definició RAID-Monitor	Validació RAID-Monitor	Índex Clínic (IMP)	Calprotectina Fecal 350 µg/g
SENS (%; CI 95%)	90,0 (74,3-100,0)	90,0 (66,4-100,0)	70,0 (51,9-88,1)	76,0 (57,3-94,7)
ESPE (%; CI 95%)	94,1 (84,7-100,0)	93,3 (77,4-100,0)	91,8 (83,1-100,0)	75,5 (62,4-88,6)
VPP (%; CI 95%)	90,0 (74,3-100,0)	90,0 (66,4-100,0)	84,0 (67,6-100,0)	61,3 (42,5-80,0)
VPN (%; CI 95%)	94,2 (84,7-100,0)	93,3 (77,4-100,0)	83,3 (72,5-94,2)	86,1 (74,5-97,6)
LR+ (CI 95%)	15,30 (3,96-59,2)	13,50 (2,01-90,7)	8,58 (3,26-22,6)	3,10 (1,81-5,3)
LR- (CI 95%)	0,11 (0,03-0,40)	0,11 (0,02-0,69)	0,33 (0,19-0,57)	0,32 (0,16-0,65)

De nou, la CF es va analitzar a diferents punts de tall (Taula 26). Utilitzant el punt de tall predeterminat de 250 µg/g de femta en la CU, es van assolir uns valors de sensibilitat i especificitat del 76,0% i del 67,3%, respectivament, que eren inferiors als obtinguts pel RAID-Monitor.

La CF va presentar un valor de AUC de 0,774, amb el millor punt de tall per a la cohort UC estudiada de 350 µg/g. Amb aquest punt de tall els valors d'especificitat van augmentar fins al 75,5%, i el valor de sensibilitat es van mantenir al 76,0%.

Taula 26. Sensibilitat (SENS), especificitat (ESPE), valor predictiu positiu (PPV), valor predictiu negatiu (NPV), ràtio de probabilitat positiva (LR+) i la relació de probabilitat negativa (LR-) de l'índex Harvey-Bradshaw (IHB), calprotectina fecal (millor tall de 200 µg/g de femta) i RAID-Monitor (definició; 70% i validació; 30 %, de l'algoritme) per a la detecció de l'activitat endoscòpica en pacients de MC.

Colitis Ulcerosa	Calprotectina Fecal 50 µg/g	Calprotectina Fecal 100 µg/g	Calprotectina Fecal 250 µg/g	Calprotectina Fecal 350 µg/g
SENS (%; CI 95%)	92,0 (79,4-100,0)	84,0 (67,6-100,0)	76,0 (57,3-94,7)	76,0 (57,3-94,7)
ESPE (%; CI 95%)	34,7 (20,3-49,0)	42,9 (28,0-57,7)	67,3 (53,2-81,5)	75,5 (62,4-88,6)
VPP (%; CI 95%)	41,8 (27,9-55,8)	42,9 (28,0-57,7)	54,3 (36,3-72,2)	61,3 (42,5-80,0)
VPN (%; CI 95%)	89,5 (73,0-100,0)	84,0 (67,6-100,0)	84,6 (72,0-97,2)	86,1 (74,5-97,6)
LR+ (CI 95%)	1,41 (1,11-1,78)	1,47 (1,09-1,98)	2,33 (1,47-3,68)	3,10 (1,81-5,32)
LR- (CI 95%)	0,23 (0,06-0,92)	0,37 (0,14-0,97)	0,36 (0,17-0,74)	0,32 (0,16-0,65)

La capacitat de la CF va ser menor a la observada per l'IMP a nivell d'especificitat (p-valor = 0,039). En canvi, la sensibilitat d'ambdós mètodes va ser similar. Quan es va comparar la calprotectina fecal amb el RAID-Monitor, el nostre mètode va mostrar una major capacitat per determinar la remissió endoscòpica en pacients amb CU (p-valor = 0,022). Per contra, no es van observar diferències significatives per als valors de sensibilitat (p-valor = 0,219).

4. DISCUSSIÓ

En aquest estudi, s'ha comparat la capacitat per determinar l'activitat endoscòpica del RAID-Monitor amb els índexs clínics utilitzats en la pràctica clínica habitual i la calprotectina fecal per oferir una indicació de la activitat inflamatòria de la mucosa intestinal. Els índexs clínics IHB i IMP, van presentar una capacitat limitada per determinar l'activitat endoscòpica. Aquesta baixa correlació dels índexs clínics, s'ajusta a l'observada en d'altres estudis [66,67].

Tot i que molts biomarcadors han estat avaluats en la MII amb una correlació significativa amb les lesions endoscòpiques [419], encara no hi ha biomarcadors de fàcil ús, no invasius, de baix cost, ràpids d'analitzar i reproduïbles [72]. La calprotectina fecal, és el biomarcador més utilitzat en la pràctica clínica per a la detecció d'inflamacions, i s'utilitza principalment en el diagnòstic de la MII, en l'avaluació de l'activitat de la malaltia, en la predicció de la recaiguda de la malaltia i en la predicció de resposta terapèutica [386,429–431]. Tot i mostrar precisió per a la inflamació intestinal, la CF presenta una alta variabilitat deguda a la manca d'un punt de tall universal capaç d'informar correctament sobre la remissió endoscòpica.

En aquest estudi, els millors resultats de la CF en pacients amb MC es van obtenir situant el punt de tall a 200 µg/g de femta. Alguns autors proposen punts de tall que oscil·len entre els 70 i els 270 µg/g de femta adquirint sensibilitats al voltant del 70-80% i especificitats del 80-97% [386,432–435].

En termes generals, els valors de sensibilitat i especificitat obtinguts per la CF a la literatura són del 80-90% i del 70-80% respectivament, depenent del punt de tall utilitzat [51,420,433–436]. Considerant altres treballs publicats, el millor punt de tall trobat per discriminar l'activitat endoscòpica és 250 µg/g, indicant la remissió endoscòpica amb un 80% de sensibilitat i un 82% de especificitat [433]. En els pacients amb CU, els millors resultats es van obtenir utilitzant el punt de tall a 350 µg/g, el qual és superior al que

s'utilitza habitualment [434]. És important destacar que la sensibilitat i especificitat de la CF en CU poden dependre de l'índex endoscòpic utilitzat per definir l'activitat endoscòpica. En aquest sentit, l'índex endoscòpic de colitis ulcerosa (UCEIS) mostra una millor correlació amb els nivells de calprotectina fecal en comparació amb l'índex endoscòpic de Mayo [414].

Durant la darrera dècada, la microbiota intestinal i els seus efectes sobre el cos humà han guanyat interès en medicina. En aquest estudi, s'ha explorat la possibilitat d'utilitzar components específics de la microbiota intestinal com a biomarcadors no invasius per a la detecció d'inflamació intestinal. Són escassos els estudis previs que hagin analitzat la microbiota intestinal amb l'objectiu de relacionar-la amb l'activitat. Recentment s'han publicat estudis que mostren una correlació inversament significativa entre l'activitat de la malaltia i el recompte d'espècies com *F. prausnitzii* i *Roseburia hominis*, dues de les espècies productores de butirat més importants en pacients actius amb MII [220]. A més, la majoria dels estudis coincideixen en que els recomptes de representants del phylum Firmicutes són més baixos en pacients amb MII, concretament en aquells bacteris que produeixen butirat [220,250,251,294,300,437]. Dintre d'aquest grup, s'ha descrit una reducció d'alguns bacteris productors de butirat, com *F. prausnitzii* i *F. prausnitzii PHG-I* en pacients amb MC i CU en comparació amb subjectes sans, mentre que *F. prausnitzii PHG-II* s'ha trobat reduït específicament en MC [302]. El butirat és una font d'energia important per als colonòcits que participa en la regulació de la proliferació i la diferenciació cel·lular. A més, el butirat té efectes immunomoduladors i presenta propietats antiinflamatòries [145,438].

Pel que fa a les espècies considerades proinflamatòries, dins del phylum Proteobacteria, aquestes són més abundants en pacients amb MII la qual cosa coincideix amb els nostres resultats [221,253,308]. També es produeix un enriquiment d'espècies del phylum Proteobacteria en pacients amb MC amb activitat lleugera o severa i CU greu [426].

En termes resumits, la inflamació intestinal causa una disminució dels bacteris productors de butirat i un augment dels Proteobacteria. El RAID-Monitor s'ha desenvolupat utilitzant aquesta informació bàsica i analitza quantitativament de forma combinada cinc espècies bacterianes rellevants, incloent tres bacteris productors de butirat (FPRA, PHG-I i PHG-II), una espècie pro-inflamatoria (ECO) i una espècie degradadora de la mucina (AKK).

Resultats. Cap3. RAID-Monitor

El RAID-Monitor presenta un ús fàcil degut a que no requereix de la congelació de la mostra de femta després de la deposició.

Tot i els bons resultats obtinguts en aquest estudi, cal tenir en compte que la cohort de l'estudi és petita, i que per aquest motiu, és necessari un estudi de validació més ampli. També cal considerar que les lectures endoscòpiques no van ser centralitzades, és a dir, les imatges endoscòpiques obtingudes de tots els pacients no van ser revisades pel mateix expert, la qual cosa podria afectar lleugerament el resultat dels índexs endoscòpics. Finalment cal remarcar la disparitat existent entre l'activitat histològica i l'activitat macroscòpica observada durant la colonoscòpia, ja que pot persistir la inflamació microscòpica en els teixits que apareixen en remissió quan s'observen endoscòpicament [439,440]. L'aparició d'inflamació microscòpica podria ser responsable de les recaigudes eventuais o dels increments de CF [441]. Així doncs, també caldria conèixer el comportament dels marcadors bacterians utilitzats segons l'activitat histològica.

El present estudi és el primer que proposa l'ús de bacteris com a indicadors inflamatoris i en desenvolupa una eina específica que permet obtenir valors de sensibilitat i especificitat superiors als obtinguts per la calprotectina fecal. Això té una rellevància especial quan es consideren els costos directes i indirectes de la MII. A Europa, es calcula que els costos anuals directes de l'assistència sanitària –en major part hospitalitzacions, cures ambulatòries, medicaments i cirurgia– i els costos indirectes superen els 5,6 milions de milions d'euros [442,443]. L'ús del RAID-Monitor suposaria una reducció del 75% de la taxa de falsos positius en pacients amb MC i el 77,5% en pacients amb CU quan es compara amb la CF. Aquesta reducció donaria lloc a una disminució de les colonoscòpies innecessàries, que considerant que el RAID-Monitor té un preu de 95€, la CF de 15 € i la colonoscòpia un preu aproximat de 500 €, es podrien traduir en estalvis de fins a 17 milions d'euros només a Espanya o de 100 milions de lliures esterlines al Regne Unit. Això, juntament amb un impacte positiu en la qualitat de vida, la morbiditat i la mortalitat en pacients amb MII, posa de manifest la importància de les investigacions diagnòstiques, el seguiment de la malaltia i la teràpia en la MII [444]. En aquest context, RAID-Monitor es pot considerar un bon mètode alternatiu a la CF per avaluar l'activitat endoscòpica en pacients amb MII.

5

Discussió general

Durant els últims anys el microbioma humà ha rebut una atenció creixent esdevenint un punt de trobada científic entre la Medicina i les Ciències Biològiques. La possible relació dels microorganismes que resideixen en l'intestí humà en un bon nombre de malalties han cridat molt l'atenció de clínics més enllà de les malalties infeccioses clàssiques. Les comunitats microbianes allotjades a l'intestí humà comprenen una nova i prometedora eina per comprendre el desenvolupament de les funcions intestinals i alhora entendre alguns trastorns i malalties, tant digestives [445] com extradigestives. Així doncs, comprendre els vincles entre el microbioma i la malaltia humana pot proporcionar eines potencials per a la millora de la salut humana.

Moltes malalties humanes són causades per espècies o soques de bacteris específics, com la tuberculosi (*Mycobacterium tuberculosis*), el tètanus (*Clostridium tetani*), la diftèria (*Corynebacterium diphtheriae*), entre d'altres, que presenten una associació directe amb la malaltia i per tant, s'utilitzen com a biomarcadors de la malaltia [446]. Aquests biomarcadors permeten el diagnòstic d'aquest tipus de malalties de manera senzilla. Les comunitats bacterianes associades a l'hoste estan compostes per centenars o milers d'espècies úniques, i per tant, pot haver-hi altres casos en què no hi hagi un biomarcador únic i específic per a un fenotip o malaltia, sinó que s'hi poden associar un conjunt de biomarcadors [446] o signatures microbiològiques.

La identificació de signatures microbiològiques permet construir models útils per diagnosticar, monitoritzar, o fins i tot, predir resultats terapèutics. En la MII, molts estudis han identificat alteracions en determinats tàxons bacterians, en especial un increment de la família *Enterobacteriaceae*, i d'espècies com *Ruminococcus gnavus* i *Desulfovibrio* i una disminució de *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lachnospiraceae* i *Akkermansia* sp. entre d'altres [447]. Així doncs, la definició i la utilització d'aquestes i d'altres espècies estudiades en la composició microbiana fecal com a signatures microbiològiques, poden ser doncs valuoses com a biomarcadors pel maneig de la MII, especialment en el diagnòstic i en el seguiment longitudinal de l'activitat de la malaltia i la resposta a tractaments.

La composició microbiana fecal difereix de l'observada en mostres de mucosa intestinal, a causa principalment de factors com la dieta, el sistema immunitari de l'hoste entre d'altres. És per això que els marcadors bacterians analitzats en aquesta tesi es van estudiar originalment en mostres de mucosa intestinal de pacients diagnosticats de MII i SII i posteriorment es va optimitzar la detecció dels marcadors en mostres de femta. Per tant,

Discussió general

la presència i la quantificació dels marcadors analitzats en la femta no està tant fortament sotmesa a la dieta i a altres variacions externes, reflectint en certa mesura, l'abundància real de la mucosa colònica.

Seguint aquesta línia, hem desenvolupat dues signatures bacterianes fecals amb diferents finalitats. La primera signatura estava dirigida a pacients amb SII que complien criteris de Roma IV positius (RAID-Dx); i la segona signatura es va dirigir al monitoratge de l'activitat endoscòpica en pacients amb MC i CU (RAID-Monitor).

El primer mètode, RAID-Dx, ha estat capaç, a partir de la definició de marcadors microbians específics de la SII, de discriminar la SII de la MII amb elevats valors de sensibilitat i especificitat. A l'actualitat la principal eina per discriminar entre ambdós malalties és la CF. En aquest treball, la CF ha mantingut uns valors alts d'especificitat pel diagnòstic de la MII, però la sensibilitat obtinguda pel diagnòstic de la SII ha estat baixa. En aquest estudi, un 48.1% de pacients amb SII s'han classificat erròniament com a MII quan la CF s'ha utilitzat amb el punt de tall preestablert de 50 µg/g de femta, cosa que comportaria un increment de colonoscòpies realitzades.

Per tant, l'ús del RAID-Dx permetria reduir el número de colonoscòpies realitzades a pacients amb SII mantenint el valor diagnòstic per la MII. Tot i així, per confirmar el valor del RAID-Dx en el diagnòstic en positiu de SII seria necessari un estudi clínic contemplat tots els perfil diana del diagnòstic d'aquesta malaltia. Seguint aquesta línia, en un estudi recent realitzat per GoodGut SL amb 52 pacients de SII i 61 subjectes sans, RAID-Dx va demostrar una elevada capacitat per discriminar entre pacients de SII i subjectes sans amb una alta sensibilitat i especificitat [464]. Així doncs, l'ús de RAID-Dx en la pràctica clínica habitual podria millorar significativament la gestió de la SII donant suport al seu diagnòstic, cosa que podria produir una disminució dels temps de diagnòstic i alhora una reducció d'aquelles proves complementaries que esperen un resultat negatiu per a lesions orgàniques.

Tot i que són escassos els estudis de signatures microbiològiques en la MII i la SII, certs estudis han definit signatures microbiològiques en la MC i la CU. Pascal *et al* van poder descriure diferències a nivell de microbioma entre la MC i la CU i va validar un algoritme basat en biomarcadors microbians associats a la MC amb una especificitat de fins a un 92%, demostrant així les característiques diagnòstiques de les signatures microbianes en

la MC [269]. Per la seva banda, Papa *et al* van obtenir resultats similars descrivint una signatura microbiològica fecal per diagnosticar la MII en pediatria [448].

Fins el moment cap estudi ha evidenciat una signatura microbiològica pròpia de la SII. Hugerth *et al* en una cohort de 3556 adults diagnosticats de SII no va observar una signatura microbiana diferenciada en els pacients de SII. Tot i observar diferències entre els individus sans i la SII a nivell de microbiota, aquestes diferències estaven en el mateix ordre de magnitud que les observades entre els individus sans [449].

Per la seva banda, el mètode no invasiu, RAID-Monitor, ha demostrat una alta capacitat per monitoritzar l'activitat endoscòpica tant en pacients amb MC com en pacients amb CU d'una manera senzilla i ràpida a partir de la seva determinació en mostres de femta i utilitzant només 6 marcadors microbians.

Aquest estudi ha obert una varietat de possibilitats per a l'ús d'eines diagnòstiques no invasives en la MII. La signatura microbiològica emprada per al desenvolupament del producte RAID-Monitor podria tenir altres aplicacions en la MII, a més del monitoratge de l'activitat endoscòpica en pacients amb MC i la CU, com ara la predicció de la resposta a diferents teràpies o de la recidiva post-quirúrgica. Alguns estudis han intentat relacionar la microbiota intestinal amb la resposta al tractament biològic en aquests pacients. Actualment, els tractaments biològics basat en tractaments anti-TNF són un dels tractaments d'elecció per induir i mantenir la remissió clínica i endoscòpica, així com per reduir les taxes d'hospitalització i millorar la qualitat de vida dels pacients [450]. No obstant, aproximadament un 30% dels pacients tractats amb agents anti-TNF no responen i entre un 10 i un 50% dels pacients que responen acaben perdent la resposta al tractament [451–454]. Hi ha diferents variables associades a aquesta pèrdua de resposta, com pot ser la pròpia activitat inflamatòria o la capacitat del subjecte per a desenvolupar anticossos contra el fàrmac. L'estat de la microbiota podria predir la resposta al tractament i d'aquesta manera, estalviar temps al pacient i recursos als hospitals. En un estudi recent s'utilitza la tecnologia *Machine learning* per predir la resposta a la teràpia en una cohort de pacients diagnosticats amb MII tractats amb anti-integrina, i es demostra que els pacients que aconseguen la remissió presenten una riquesa més gran en la comunitat microbiana [230].

En aquesta línia, en un estudi recent realitzat amb 72 pacients de MC, 51 pacients de CU i 73 subjectes sans, descriu com l'ús de la microbiota intestinal, sola o juntament amb la

Discussió general

CF i l'índex clínic CDAI, permet una predicció més eficaç de la resposta al tractament amb Infliximab. Curiosament, encara que les abundàncies de representants de l'ordre Clostridials en pacients actius amb MII acostumen a ser inferiors, els pacients amb MC que presenten una abundància relativament més elevada de Clostridials responen millor al tractament amb Infliximab que els que presenten una menor abundància [426]. En pacients pediàtrics amb MII es va observar que l'abundància de sis grups de bacteris, inclosos *Eubacterium rectale* i *Bifidobacterium* spp., era capaç de predir la resposta al tractament anti-TNF [455]. En un altre estudi, es va observar que l'abundància del filum Firmicutes estava correlacionada amb un temps més curt de recaiguda després de la retirada d'Infliximab [456]. Tot i que es necessiten més estudis amb més mostres per confirmar el potencial de la microbiota intestinal com a predictor de resposta, aquests descobriments permeten pensar en establir un conjunt de biomarcadors basats en signatures microbianes per controlar i predir l'eficàcia del tractament en pacients amb MII.

Finalment, els marcadors emprats pel RAID-Monitor, també podrien tenir un paper fonamental en la predicció de la recidiva post-quirúrgica en la MC. En aquesta malaltia, un 80% dels pacients operats presenten una recaiguda o recidiva. Predir amb antelació aquesta recidiva a partir de l'estudi de la microbiota podria servir per ajudar i millorar el maneig del pacient. Sokol i col.laboradors van descriure que la reducció de l'abundància de *F. praustnitzii* en pacients amb MC es troba associada a una taxa més elevada de patir recidiva [293]. Així doncs, tots aquests estudis poden obrir el camí cap a l'ús de la microbiota intestinal per estratificar els pacients amb MII i aplicar una teràpia personalitzada per obtenir resultats òptims.

La part més desafiant de detectar signatures microbianes és superar l'elevada variabilitat en la composició de les comunitats microbianes tant entre hostes com dins el mateix. És conegut que la composició microbiana fecal difereix de l'observada en mostres de mucosa intestinal a causa de factors ambientals com la dieta, els àcids biliars i el sistema immunitari de l'hoste. Els marcadors bacterians desenvolupats en aquesta tesi es van estudiar originalment en mostres de mucosa intestinal en pacients amb MC, CU i SII i posteriorment es va optimitzar la seva detecció en mostres de femta. Així, la seva presència a la femta no està tan fortament sotmesa a la dieta i a altres factors externs, reflectint, en certa mesura, l'abundància real de la mucosa colònica. Aquest fonament

racional de l'estudi permet evitar l'enorme soroll de fons present en mostres fecals, alhora que dona significat fisiològic i clínic als marcadors bacterians.

L'ús de mostres de femta per a la determinació del RAID-Dx i el RAID-Monitor facilita la participació dels pacients, ja que permet una recollida fàcil la qual es pot realitzar diàriament a casa utilitzant un tub col·lector estèril. La conservació de les femtes durant màxim 48h a TA, mantenint l'estabilitat dels marcadors, permet certa flexibilitat en l'enviament de les mostres per part del pacient. Els enfocaments basats en qPCR combinen l'elevada selectivitat de la PCR amb la quantificació mitjançant l'enregistrament de l'amplificació d'un producte de PCR. La utilització de la qPCR per a l'anàlisi dels marcadors que formen part d'ambdós productes representa un mètode ràpid, sensible, selectiu, robust, reproducible i fiable que permet la quantificació de marcadors bacterians en mostres complexes com les femtes.

Tot i l'elevada capacitat diagnòstica obtinguda tant pel RAID-Dx com pel RAID-Monitor en els estudis presentats, es fa evident que els estudis són proves de concepte i que el nombre de mostres utilitzat no és suficientment elevat per poder validar el mètode. Per aquest motiu, i com a conseqüència d'aquest estudi, actualment estan en marxa dues proves de validació clínica, amb una mida mostral més elevada per a cada mètode. També cal remarcar que per a cap dels dos mètodes s'han recollit mostres de biòpsies intestinal i per tant, pot haver-hi un petit biaix donat per inflamacions microscòpiques no detectades en la colonoscòpia convencional, tant en pacients amb SII, com en pacients de MII en remissió endoscòpica.

En els estudis de validació clínica del mètode basat en RAID-Monitor, caldria aplicar lectures endoscòpiques centralitzades amb l'objectiu d'evitar un possible biaix en el resultat dels índexs endoscòpics. Tot i presentar millors resultats que la CF, RAID-Monitor és un mètode qualitatiu que permet discernir entre pacients en remissió endoscòpica i pacients amb activitat, tot i això, l'objectiu principal seria convertir-lo en un mètode quantitatiu, com és el cas de la CF que dona un resultat quantitatiu que és correlaciona amb l'activitat de la malaltia.

Tot i que no està clar si les alteracions quantitatives i qualitatives de la microbiota intestinal en la SII precedeixen al trastorn intestinal o són simplement una conseqüència de la malaltia, una estratègia basada en intervencions específiques per modular la microbiota intestinal podria posar les bases per a una eina terapèutica eficaç [457]. Certs

Discussió general

pacients amb SII o MII ja han presentat una millora clínica a tractaments antibiòtics [458] i a l'administració de prebiòtics i probiòtics [459,460]. L'ús de probiòtics, prebiòtics, simbiòtics i la modulació basada en la dieta de la microbiota intestinal cada cop és més freqüent per tractar la SII o MII, tot i que actualment no es disposa de coneixements suficients sobre els tipus, formulacions, indicacions i dosis [461]. Actualment s'estan explorant i analitzant diverses opcions terapèutiques, inclòs el trasplantament fecal, però calen evidències addicionals procedents d'estudis més grans i ben controlats.

Finalment, fora desitjable que la identificació de les signatures bacterianes de la MII i la SII reportades en aquesta tesi doctoral i la seva utilitat provada, serveixi per obrir un temps de descoberta de signatures pròpies d'altres malalties que ja han mostrat relació amb canvis en l'estructura i la composició de la microbiota. Trastorns com obesitat [124], diabetis tipus 1 i tipus 2 [204,205], al·lèrgies [207], malalties del fetge gras [208], malaltia renal [209], artritis [210] i trastorns neurològics com l'autisme [211,212], espondilitis anquilosant [462], càncer colorectal [463] entre d'altres haurien de ser els principals beneficiaris d'aquesta estratègia.

6

Conclusions

Conclusions

1. RAID-Dx és un marcador precís basat en la detecció d'una signatura bacteriana específica de la síndrome de l'intestí irritable que permet diagnosticar i diferenciar la síndrome de l'intestí irritable de la malaltia inflamatòria intestinal amb alts valors de sensibilitat i especificitat, essent un candidat per esdevenir el mètode diagnòstic de la síndrome de l'intestí irritable.
2. Un diagnòstic en positiu de la síndrome de l'intestí irritable, utilitzant el RAID-Dx, permetria incrementar la qualitat de vida dels pacients reduint el temps de diagnòstic.
3. RAID-Monitor és un nou mètode basat en l'estudi de la microbiota intestinal que permet avaluar l'activitat endoscòpica dels pacients amb malaltia de Crohn i Colitis ulcerosa amb elevades sensibilitats i especificitats, oferint millors resultats que l'índex clínic i la Calprotectina Fecal.
4. Aquests resultats converteixen el RAID-Monitor en candidat per esdevenir un mètode de monitoratge de l'activitat en la malaltia inflamatòria intestinal.
5. La validació clínica d'ambdós mètodes es troba en desenvolupament.

7

Bibliografia

Bibliografia

- 1 Ordás I, Eckmann L, Talamini M, *et al.* Ulcerative colitis. *Lancet* 2012;**380**:1606–19. doi:10.1016/S0140-6736(12)60150-0
- 2 Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet* 2012;**380**:1590–605. doi:10.1016/S0140-6736(12)60026-9
- 3 Kaplan GG. The global burden of IBD: From 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;**12**:720–7. doi:10.1038/nrgastro.2015.150
- 4 Kaplan GG, Ng SC. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2017;**152**:313–321.e2. doi:10.1053/j.gastro.2016.10.020
- 5 Ng SC, Shi HY, Hamidi N, *et al.* Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet* 2017;**390**:2769–78. doi:10.1016/S0140-6736(17)32448-0
- 6 Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, *et al.* Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology* 2012;**142**:46–54.e42. doi:10.1053/j.gastro.2011.10.001
- 7 Lennard-Jones JE. Classification of Inflammatory Bowel Disease. *Scand J Gastroenterol* 1989;**24**:2–6.
- 8 Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, *et al.* A simple classification of Crohn's disease: Report of the working party for the world congresses of gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 2000;**6**:8–15. doi:10.1097/00054725-200002000-00002
- 9 Spekhorst LM. Performance of the Montreal classification for inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2014;**20**:15374. doi:10.3748/wjg.v20.i41.15374
- 10 Park JJ, Yang SK, Ye BD, *et al.* Second Korean Guidelines for the Management of Crohn's Disease. *Korean J Gastroenterol* 2017;**69**:29–54. doi:10.4166/kjg.2017.69.1.29
- 11 Freeman HJ. Application of the Montreal classification for Crohn's disease to a single clinician database of 1015 patients. *Can J Gastroenterol* 2007;**21**:363–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17571169>
- 12 Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;**55**:749–53. doi:10.1136/gut.2005.082909
- 13 Peyrin-Biroulet L, Loftus E V., Colombel JF, *et al.* The natural history of adult crohn's disease in population-based cohorts. *Am. J. Gastroenterol.* 2010;**105**:289–97. doi:10.1038/ajg.2009.579
- 14 Bernstein CN, Fried M, Krabshuis JH, *et al.* World gastroenterology organization practice guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010. *Inflamm Bowel Dis* 2010;**16**:112–24. doi:10.1002/ibd.21048
- 15 Shin DS, Cheon JH, Park YE, *et al.* Extensive Disease Subtypes in Adult Patients with Ulcerative Colitis: Non-pancolitis Versus Pancolitis. *Dig Dis Sci* 2018;**63**:3097–104. doi:10.1007/s10620-018-5218-x
- 16 Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, *et al.* Course of ulcerative colitis: analysis of changes in disease activity over years. *Gastroenterology* 1994;**107**:3–11. doi:10.1016/0016-5085(94)90054-x
- 17 Cijeovski Prelicean C, Mihai C, Gogalniceanu P, *et al.* What is the impact of age on adult patients With inflammatoRy boWel disease?
- 18 Basu D, Lopez I, Kulkarni A, *et al.* Impact of race and ethnicity on inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2005;**100**:2254–61. doi:10.1111/j.1572-0241.2005.00233.x
- 19 Jostins L, Ripke S, Weersma RK, *et al.* Host-microbe interactions have shaped the genetic

- architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012;**491**:119–24. doi:10.1038/nature11582
- 20 Ng SC. Epidemiology of inflammatory bowel disease: Focus on Asia. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2014;**28**:363–72. doi:10.1016/j.bpg.2014.04.003
- 21 Dolan KT, Chang EB. Diet, gut microbes, and the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res* 2017;**61**:1600129. doi:10.1002/mnfr.201600129
- 22 Ponder A, Long MD. Clinical Epidemiology A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. Published Online First: 2013. doi:10.2147/CLEP.S33961
- 23 Lakatos PL, Szamosi T, Lakatos L. Smoking in inflammatory bowel diseases: Good, bad or ugly? *World J Gastroenterol* 2007;**13**:6134. doi:10.3748/wjg.v13.i46.6134
- 24 Cosnes J. What is the link between the use of tobacco and IBD? *Inflamm Bowel Dis* 2008;**14**:S14–5. doi:10.1002/ibd.20555
- 25 Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;**18**:481–96. doi:10.1016/j.bpg.2003.12.003
- 26 Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;**12**:205–17. doi:10.1038/nrgastro.2015.34
- 27 Chapman-Kiddell CA, Davies PSW, Gillen L, *et al.* Role of diet in the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2010;**16**:137–51. doi:10.1002/ibd.20968
- 28 Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, *et al.* A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn’s disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2013;**145**:970–7. doi:10.1053/j.gastro.2013.07.050
- 29 Cornish JA, Tan E, Simillis C, *et al.* The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2008;**103**:2394–400. doi:10.1111/j.1572-0241.2008.02064.x
- 30 Kumar Dutta A, Chacko A. Influence of environmental factors on the onset and course of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2016;**22**:1088–100. doi:10.3748/wjg.v22.i3.1088
- 31 Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2014;**20**:91–9. doi:10.3748/wjg.v20.i1.91
- 32 Seung Hoon Lee, Jeong eun Kwon M-LC. Immunological pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Int J Inflamm Bowel Dis* 2018;**2**:14–6. doi:10.19122/2359-30832016020314-16
- 33 Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2009;**361**:2066–78. doi:10.1056/NEJMra0804647
- 34 Zenewicz LA, Antov A, Flavell RA. CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease. *Trends Mol. Med.* 2009;**15**:199–207. doi:10.1016/j.molmed.2009.03.002
- 35 Lee SY, Lee SH, Yang EJ, *et al.* Metformin ameliorates inflammatory bowel disease by suppression of the stat3 signaling pathway and regulation of the between Th17/Treg Balance. *PLoS One* 2015;**10**:e0135858. doi:10.1371/journal.pone.0135858
- 36 Leppkes M, Becker C, Ivanov II, *et al.* ROR γ -Expressing Th17 Cells Induce Murine Chronic Intestinal Inflammation via Redundant Effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* 2009;**136**:257–67. doi:10.1053/j.gastro.2008.10.018
- 37 Fujino S, Andoh A, Bamba S, *et al.* Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;**52**:65–70. doi:10.1136/gut.52.1.65

Bibliografia

- 38 Wang T, Zheng CQ. Roles of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World Chinese J. Dig.* 2005;**13**:72–5. doi:10.1146/annurev.med.51.1.289
- 39 Sanchez-Muñoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 2008;**14**:4280–8. doi:10.3748/wjg.14.4280
- 40 Choi CH, Song I Do, Kim YH, *et al.* Efficacy and safety of infliximab therapy and predictors of response in korean patients with crohn’s disease: A nationwide, multicenter study. *Yonsei Med J* 2016;**57**:1376–85. doi:10.3349/ymj.2016.57.6.1376
- 41 Groux H, Powrie F. Regulatory T cells and inflammatory bowel disease. *Immunol. Today.* 1999;**20**:442–5. doi:10.1016/S0167-5699(99)01510-8
- 42 Chaudhry A, Samstein RM, Treuting P, *et al.* Interleukin-10 Signaling in Regulatory T Cells Is Required for Suppression of Th17 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* 2011;**34**:566–78. doi:10.1016/j.immuni.2011.03.018
- 43 Li MC, He SH. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 2004;**10**:620–5. doi:10.3748/wjg.v10.i5.620
- 44 Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM, *et al.* Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* 2011;**478**:250–4. doi:10.1038/nature10434
- 45 Ivanov II, Atarashi K, Manel N, *et al.* Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell* 2009;**139**:485–98. doi:10.1016/j.cell.2009.09.033
- 46 Ivanov II, Frutos R de L, Manel N, *et al.* Specific Microbiota Direct the Differentiation of IL-17-Producing T-Helper Cells in the Mucosa of the Small Intestine. *Cell Host Microbe* 2008;**4**:337–49. doi:10.1016/j.chom.2008.09.009
- 47 Atarashi K, Nishimura J, Shima T, *et al.* ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation. *Nature* 2008;**455**:808–12. doi:10.1038/nature07240
- 48 Spiceland CM, Lodhia N. Endoscopy in inflammatory bowel disease: Role in diagnosis, management, and treatment. *World J Gastroenterol* 2018;**24**:4014–20. doi:10.3748/wjg.v24.i35.4014
- 49 Horsthuis K, Stokkers PCF, Stoker J. Detection of inflammatory bowel disease: Diagnostic performance of cross-sectional imaging modalities. *Abdom Imaging* 2008;**33**:407–16. doi:10.1007/s00261-007-9276-3
- 50 Kopylov U, Seidman EG. Role of capsule endoscopy in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014;**20**:1155–64. doi:10.3748/wjg.v20.i5.1155
- 51 Mosli MH, Zou G, Garg SK, *et al.* C-Reactive Protein, Fecal Calprotectin and Stool Lactoferrin for Detection of Endoscopic Activity in Symptomatic Inflammatory Bowel Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol* 2015;**110**:802–19. doi:10.1038/ajg.2015.120
- 52 Menees SB, Powell C, Kurlander J, *et al.* A meta-analysis of the utility of C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, fecal calprotectin, and fecal lactoferrin to exclude inflammatory bowel disease in adults with IBS. *Am J Gastroenterol* 2015;**110**:444–54. doi:10.1038/ajg.2015.6
- 53 Tall AR. C-Reactive Protein Reassessed. *N. Engl. J. Med.* 2004;**350**:1450–2. doi:10.1056/NEJMe048020
- 54 Gewurz H. Biology of C-reactive protein and the acute phase response. *Hosp Pract* 1982;**17**:67–81. doi:10.1080/21548331.1982.11702332
- 55 Hold GL, Schwiertz A, Aminov RI, *et al.* Oligonucleotide probes that detect quantitatively

- significant groups of butyrate-producing bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 2003;**69**:4320–4. doi:10.1128/AEM.69.7.4320
- 56 Saverymattu SH, Hodgson HJF, Chadwick VS, *et al.* Differing acute phase responses in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 1986;**27**:809–13. doi:10.1136/gut.27.7.809
- 57 FAGAN EA, DYCK RF, MATON PN, *et al.* Serum levels of C-reactive protein in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur J Clin Invest* 1982;**12**:351–9. doi:10.1111/j.1365-2362.1982.tb02244.x
- 58 Fagerhol MK, Dale I, Andersson T. A radioimmunoassay for a granulocyte protein as a marker in studies on the turnover of such cells. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1980;**16 Suppl**:273–82. doi:10.1016/b978-0-08-027379-2.50028-4
- 59 Røseth AG, Aadland E, Jahnsen J, *et al.* Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestion* 1997;**58**:176–80. doi:10.1159/000201441
- 60 Røseth AG, Fagerhol MK, Aadland E, *et al.* Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces: A methodologic study. *Scand J Gastroenterol* 1992;**27**:793–8. doi:10.3109/00365529209011186
- 61 Walsham NE, Sherwood RA. Faecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Gastroenterol* 2016;**9**:21–9. doi:10.2147/CEG.S51902
- 62 Dubinsky M, Braun J. Diagnostic and Prognostic Microbial Biomarkers in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 2015;**149**:1265–1274.e3. doi:10.1053/j.gastro.2015.08.006
- 63 Shanahan F. Inflammatory bowel disease: Immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. *Gastroenterology* 2001;**120**:622–35. doi:10.1053/gast.2001.22122
- 64 Gisbert JP, Gomollón F, Maté J, *et al.* Papel de los anticuerpos anticitoplasma de los neutrófilos (ANCA) y anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterol Hepatol* 2003;**26**:312–24. doi:10.1016/s0210-5705(03)70365-3
- 65 Best WR, Bectel JM, Singleton JW, *et al.* Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976;**70**:439–44. doi:10.1016/S0016-5085(76)80163-1
- 66 Poullis A, Foster R, Northfield TC, *et al.* Faecal markers in the assessment of activity in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;**16**:675–81. doi:10.1046/j.1365-2036.2002.01196.x
- 67 Benítez JM. Faecal calprotectin: Management in inflammatory bowel disease. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2015;**6**:203. doi:10.4291/wjgp.v6.i4.203
- 68 Walsh AJ, Bryant R V., Travis SPL. Current best practice for disease activity assessment in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016;**13**:567–79. doi:10.1038/nrgastro.2016.128
- 69 Travis SPL, Schnell D, Krzeski P, *et al.* Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: The Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). *Gut* 2012;**61**:535–42. doi:10.1136/gutjnl-2011-300486
- 70 D'Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG, *et al.* A Review of Activity Indices and Efficacy End Points for Clinical Trials of Medical Therapy in Adults With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 2007;**132**:763–86. doi:10.1053/j.gastro.2006.12.038
- 71 Falvey JD, Hoskin T, Meijer B, *et al.* Disease activity assessment in IBD: Clinical indices and biomarkers fail to predict endoscopic remission. *Inflamm Bowel Dis* 2015;**21**:824–31. doi:10.1097/MIB.0000000000000341

Bibliografia

- 72 Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut* 2006;**55**:426–31. doi:10.1136/gut.2005.069476
- 73 Jones J, Loftus E V., Panaccione R, *et al.* Relationships Between Disease Activity and Serum and Fecal Biomarkers in Patients With Crohn's Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;**6**:1218–24. doi:10.1016/j.cgh.2008.06.010
- 74 Florin THJ, Paterson EWJ, Fowler E V., *et al.* Clinically active Crohn's disease in the presence of a low C-reactive protein. *Scand J Gastroenterol* 2006;**41**:306–11. doi:10.1080/00365520500217118
- 75 Yang DH, Yang SK, Park SH, *et al.* Usefulness of C-reactive protein as a disease activity marker in Crohn's disease according to the location of disease. *Gut Liver* 2015;**9**:80–6. doi:10.5009/gnl13424
- 76 Yoon JY, Park SJ, Hong SP, *et al.* Correlations of C-reactive Protein Levels and Erythrocyte Sedimentation Rates with Endoscopic Activity Indices in Patients with Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci* 2014;**59**:829–37. doi:10.1007/s10620-013-2907-3
- 77 Desai D, Faubion WA, Sandborn WJ. Review article: Biological activity markers in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2007;**25**:247–55. doi:10.1111/j.1365-2036.2006.03184.x
- 78 Kane S V., Sandborn WJ, Rufo PA, *et al.* Fecal lactoferrin is a sensitive and specific marker in identifying intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol* 2003;**98**:1309–14. doi:10.1111/j.1572-0241.2003.07458.x
- 79 Vieira A, Fang C Bin, Rolim EG, *et al.* Inflammatory bowel disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: Correlation with laboratory parameters, clinical, endoscopic and histological indexes. *BMC Res Notes* 2009;**2**:1–7. doi:10.1186/1756-0500-2-221
- 80 Lee YW, Lee KM, Lee JM, *et al.* The usefulness of fecal calprotectin in assessing inflammatory bowel disease activity. *Korean J Intern Med* 2019;**34**:72–80. doi:10.3904/kjim.2016.324
- 81 Dhaliwal A, Zeino Z, Tomkins C, *et al.* Utility of faecal calprotectin in inflammatory bowel disease (IBD): what cut-offs should we apply? *Frontline Gastroenterol* 2015;**6**:14–9. doi:10.1136/flgastro-2013-100420
- 82 Boon GJAM, Day AS, Mulder CJ, *et al.* Are faecal markers good indicators of mucosal healing in inflammatory bowel disease? *World J Gastroenterol* 2015;**21**:11469–80. doi:10.3748/wjg.v21.i40.11469
- 83 Pithadia AB, Jain S. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacol Reports* 2011;**63**:629–42. doi:10.1016/S1734-1140(11)70575-8
- 84 Pineton de Chambrun G, Peyrin-Biroulet L, Lémann M, *et al.* Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;**7**:15–29. doi:10.1038/nrgastro.2009.203
- 85 Lichtenstein GR, Rutgeerts P. Importance of mucosal healing in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2010;**16**:338–46. doi:10.1002/ibd.20997
- 86 Hanauer SB. Aminosalicylates in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;**20**:60–5. doi:10.1111/j.1365-2036.2004.02048.x
- 87 Nielsen OH, Munck LK. Drug Insight: aminosalicylates for the treatment of IBD. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007;**4**:160–70. doi:10.1038/ncpgasthep0696
- 88 Lim WC, Wang Y, Macdonald JK, *et al.* Aminosalicylates for induction of remission or response in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2016;**2016**:CD008870.

doi:10.1002/14651858.CD008870.pub2

- 89 Irving PM, Geary RB, Sparrow MP, *et al.* Review article: Appropriate use of corticosteroids in Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2007;**26**:313–29. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03379.x
- 90 Steinhart AH, Ewe K, Griffiths AM, *et al.* Corticosteroids for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane database Syst Rev* 2003;:CD000301. doi:10.1002/14651858.CD000301
- 91 Waljee AK, Wiitala WL, Govani S, *et al.* Corticosteroid use and complications in a US inflammatory bowel disease cohort. *PLoS One* 2016;**11**. doi:10.1371/journal.pone.0158017
- 92 Dassopoulos T, Sultan S, Falck-Ytter YT, *et al.* American gastroenterological association institute technical review on the use of thiopurines, methotrexate, and anti-TNF- α biologic drugs for the induction and maintenance of remission in inflammatory Crohn's disease. *Gastroenterology* 2013;**145**. doi:10.1053/j.gastro.2013.10.046
- 93 Feagan BG, Fedorak RN, Irvine EJ, *et al.* A Comparison of Methotrexate with Placebo for the Maintenance of Remission in Crohn's Disease. *N Engl J Med* 2000;**342**:1627–32. doi:10.1056/NEJM200006013422202
- 94 Campbell S, Travis S, Jewell D. Ciclosporin use in acute ulcerative colitis: A long-term experience. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;**17**:79–84. doi:10.1097/00042737-200501000-00016
- 95 Matsuoka K, Saito E, Fujii T, *et al.* Tacrolimus for the Treatment of Ulcerative Colitis. *Intest Res* 2015;**13**:219. doi:10.5217/ir.2015.13.3.219
- 96 Herfarth HH, Kappelman MD, Long MD, *et al.* Use of Methotrexate in the Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 2016;**22**:224–33. doi:10.1097/MIB.0000000000000589
- 97 Ledder O. Antibiotics in inflammatory bowel diseases: Do we know what we're doing? *Transl. Pediatr.* 2019;**8**:42–55. doi:10.21037/tp.2018.11.02
- 98 Thia KT, Mahadevan U, Feagan BG, *et al.* Ciprofloxacin or metronidazole for the treatment of perianal fistulas in patients with Crohn's disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Inflamm Bowel Dis* 2009;**15**:17–24. doi:10.1002/ibd.20608
- 99 Sokol H. Probiotics and antibiotics in IBD. *Dig Dis* 2014;**32**:10–7. doi:10.1159/000367820
- 100 Neurath MF. Current and emerging therapeutic targets for IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2017;**14**:269–78. doi:10.1038/nrgastro.2016.208
- 101 Sartor RB. Cytokines in intestinal inflammation: Pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* 1994;**106**:533–9. doi:10.1016/0016-5085(94)90614-9
- 102 Simon EG, Ghosh S, Iacucci M, *et al.* Ustekinumab for the treatment of Crohn's disease: Can it find its niche? *Therap. Adv. Gastroenterol.* 2016;**9**:26–36. doi:10.1177/1756283X15618130
- 103 Cherry LN, Vaughan D, Yunker NS, *et al.* Vedolizumab: An $\alpha 4\beta 7$ integrin antagonist for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Ther. Adv. Chronic Dis.* 2015;**6**:224–33. doi:10.1177/2040622315586970
- 104 Negrón ME, Frolkis AD, Dykeman J, *et al.* Risk of Surgery Following Diagnosis in Adult and Pediatric Ulcerative Colitis Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* 2012;**142**:S-797. doi:10.1016/S0016-5085(12)63096-0
- 105 Peyrin-Biroulet L, Harmsen WS, Tremaine WJ, *et al.* Surgery in a population-based cohort of Crohn's disease from Olmsted County, Minnesota (1970-2004). *Am J Gastroenterol* 2012;**107**:1693–701. doi:10.1038/ajg.2012.298

Bibliografia

- 106 Cabriada JL, Vera I, Domènech E, *et al.* Recomendaciones del Grupo Español de Trabajo en Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa sobre el uso de fármacos antifactor de necrosis tumoral α en la enfermedad inflamatoria intestinal (2013). *Gastroenterol Hepatol* 2013;**36**:127–46. doi:10.1016/j.gastrohep.2013.01.002
- 107 Sica GS, Biancone L. Surgery for inflammatory bowel disease in the era of laparoscopy. *World J Gastroenterol* 2013;**19**:2445–8. doi:10.3748/wjg.v19.i16.2445
- 108 Andrews HA, Lewis P, Allan RN. Prognosis after surgery for colonic Crohn's disease. *Br J Surg* 1989;**76**:1184–90. doi:10.1002/bjs.1800761123
- 109 Fornaro R, Caratto E, Caratto M, *et al.* Post-operative recurrence in Crohn's disease: Critical analysis of potential risk factors. An update. *Surgeon*. 2015;**13**:330–47. doi:10.1016/j.surge.2015.04.002
- 110 Makharia GK, Verma AK, Amarchand R, *et al.* Prevalence of irritable bowel syndrome: a community based study from northern India. *J Neurogastroenterol Motil* 2011;**17**:82–7. doi:10.5056/jnm.2011.17.1.82
- 111 Parkes GC, Brostoff J, Whelan K, *et al.* Gastrointestinal Microbiota in Irritable Bowel Syndrome: Their Role in Its Pathogenesis and Treatment. *Am J Gastroenterol* 2008;**103**:1557–67. doi:10.1111/j.1572-0241.2008.01869.x
- 112 Cancarevic I, Rehman M, Iskander B, *et al.* Is There a Correlation Between Irritable Bowel Syndrome and Lactose Intolerance? *Cureus* 2020;**12**. doi:10.7759/cureus.6710
- 113 Ghoshal UC, Shukla R, Ghoshal U, *et al.* The Gut Microbiota and Irritable Bowel Syndrome: Friend or Foe? *Int J Inflam* 2012;**2012**:1–13. doi:10.1155/2012/151085
- 114 Malinen E, Krogius-Kurikka L, Lyra A, *et al.* Association of symptoms with gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2010;**16**:4532–40. doi:10.3748/wjg.v16.i36.4532
- 115 Posserud I, Ersryd A, Simrén M. Functional findings in irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2006;**12**:2830–8. doi:10.3748/wjg.v12.i18.2830
- 116 Drossman DA. What Does the Future Hold for Irritable Bowel Syndrome and the Functional Gastrointestinal Disorders. *J Clin Gastroenterol* 2005;**39**:S251–6.
- 117 Kassinen A, Krogius-Kurikka L, Mäkituokko H, *et al.* The Fecal Microbiota of Irritable Bowel Syndrome Patients Differs Significantly From That of Healthy Subjects. *Gastroenterology* 2007;**133**:24–33. doi:10.1053/j.gastro.2007.04.005
- 118 Lacy BE, Lee R De. Irritable Bowel Syndrome: A Syndrome in Evolution : Journal of Clinical Gastroenterology. *J Clin Gastroenterol* 2005;**39**:S230–42.
- 119 Drossman DA, Chang L, Bellamy N, *et al.* Severity in Irritable Bowel Syndrome: A Rome Foundation Working Team Report. *Am J Gastroenterol* 2011;**106**:1749–59. doi:10.1038/ajg.2011.201
- 120 Kayar Y, Agin M, Unver N, *et al.* The relation between life quality and subtype of the disease in patients with irritablebowel syndrome. *Ann Med Res* 2019;:1. doi:10.5455/annalsmedres.2019.01.035
- 121 Schoepfer AM, Trummler M, Seeholzer P, *et al.* Discriminating IBD from IBS: Comparison of the test performance of fecal markers, blood leukocytes, CRP, and IBD antibodies. *Inflamm Bowel Dis* 2008;**14**:32–9. doi:10.1002/ibd.20275
- 122 Sekirov I, Russell S, Antunes L. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 2010;**90**:859–904. doi:10.1152/physrev.00045.2009.

- 123 Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006;**124**:837–48. doi:10.1016/j.cell.2006.02.017
- 124 Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, *et al.* Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006;**444**:1022–3. doi:10.1038/4441022a
- 125 Schloss PD, Handelsman J. Status of the Microbial Census. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;**68**:686–91. doi:10.1128/mmr.68.4.686-691.2004
- 126 Huttenhower C, Gevers D, Knight R, *et al.* Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012;**486**:207–14. doi:10.1038/nature11234
- 127 Cardinelli CS, Sala PC, Alves CC, *et al.* Influence of Intestinal Microbiota on Body Weight Gain: a Narrative Review of the Literature. *Obes. Surg.* 2015;**25**:346–53. doi:10.1007/s11695-014-1525-2
- 128 Mitsuoka T, Hayakawa K, Kimura N. [The faecal flora of man. II. The composition of bifidobacterium flora of different age groups (author’s transl)]. *Zentralbl Bakteriolog Orig A* 1974;**226**:469–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4152733> (accessed 17 Feb 2020).
- 129 Conlon MA, Bird AR. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients*. 2015;**7**:17–44. doi:10.3390/nu7010017
- 130 Candela M, Biagi E, Turroni S, *et al.* Dynamic efficiency of the human intestinal microbiota. *Crit. Rev. Microbiol.* 2015;**41**:165–71. doi:10.3109/1040841X.2013.813900
- 131 Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, *et al.* Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biol* 2007;**5**:e177. doi:10.1371/journal.pbio.0050177
- 132 Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, *et al.* Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;**107**:11971–5. doi:10.1073/pnas.1002601107
- 133 Tsuji H, Oozeer R, Matsuda K, *et al.* Molecular monitoring of the development of intestinal microbiota in Japanese infants. *Benef Microbes* 2012;**3**:113–25. doi:10.3920/BM2011.0038
- 134 Vaishampayan PA, Kuehl J V., Froula JL, *et al.* Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant. *Genome Biol Evol* 2010;**2**:53–66. doi:10.1093/gbe/evp057
- 135 Grönlund MM, Grzeskowiak Ł, Isolauri E, *et al.* Influence of mother’s intestinal microbiota on gut colonization in the infant. *Gut Microbes* 2011;**2**. doi:10.4161/gmic.2.4.16799
- 136 Jost T, Lacroix C, Braegger CP, *et al.* New Insights in Gut Microbiota Establishment in Healthy Breast Fed Neonates. *PLoS One* 2012;**7**:e44595. doi:10.1371/journal.pone.0044595
- 137 Vael C, Desager K. The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Curr. Opin. Pediatr.* 2009;**21**:794–800. doi:10.1097/MOP.0b013e328332351b
- 138 Koenig JE, Spor A, Scalfone N, *et al.* Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;**108**:4578–85. doi:10.1073/pnas.1000081107
- 139 Vanhoutte T, Huys G, De Brandt E, *et al.* Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers. *FEMS Microbiol Ecol* 2004;**48**:437–46. doi:10.1016/j.femsec.2004.03.001
- 140 Biagi E, Nylund L, Candela M, *et al.* Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. [Erratum appears in *PLoS One*. 2010;**5**(6). doi: 10.1371/annotation/df45912f-d15c-44ab-8312-e7ec0607604d]. *PLoS ONE [Electronic Resour]* 2010;**5**:e10667. doi:<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010667>

Bibliografia

- 141 Quercia S, Candela M, Giuliani C, *et al.* From lifetime to evolution: Timescales of human gut microbiota adaptation. *Front. Microbiol.* 2014;**5**. doi:10.3389/fmicb.2014.00587
- 142 Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, *et al.* role of the normal gut microbiota. 2015;**21**:8787–803. doi:10.3748/wjg.v21.i29.8787
- 143 Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, *et al.* Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science (80-)* 2005;**307**.
- 144 Carding S, Verbeke K, Vipond DT, *et al.* Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health Dis* 2015;**26**:26191. doi:10.3402/mehd.v26.26191
- 145 Wong JMW, de Souza R, Kendall CWC, *et al.* Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 2006;**40**:235–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16633129> (accessed 28 Feb 2018).
- 146 den Besten G, van Eunen K, Groen AK, *et al.* The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res* Published Online First: 2013. doi:10.1194/jlr.R036012
- 147 Tsai F, Coyle WJ. The microbiome and obesity: Is obesity linked to our gut flora? *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2009;**11**:307–13. doi:10.1007/s11894-009-0045-z
- 148 Cebra JJ, Jiang H-Q, Boiko N, *et al.* The Role of Mucosal Microbiota in the Development, Maintenance, and Pathologies of the Mucosal Immune System. In: *Mucosal Immunology*. Elsevier 2005. 335–68. doi:10.1016/B978-012491543-5/50022-X
- 149 Mulder IE, Schmidt B, Stokes CR, *et al.* Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC Biol* 2009;**7**:79. doi:10.1186/1741-7007-7-79
- 150 Thompson-Chagoyán OC, Maldonado J, Gil A. Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): Role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clin Nutr* 2005;**24**:339–52. doi:10.1016/j.clnu.2005.02.009
- 151 O’Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 2006;**7**:688–93. doi:10.1038/sj.embor.7400731
- 152 Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 2013;**11**:227–38. doi:10.1038/nrmicro2974
- 153 Hou Q, Ye L, Huang L, *et al.* The research progress on intestinal stem cells and its relationship with intestinal microbiota. *Front. Immunol.* 2017;**8**. doi:10.3389/fimmu.2017.00599
- 154 Thomas H. Gut microbiota: Microbiota promote gut healing. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2016;**13**:189. doi:10.1038/nrgastro.2016.31
- 155 Wu GD, Chen J, Hoffmann C, *et al.* Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science (80-)* 2011;**334**:105–8. doi:10.1126/science.1208344
- 156 Alam A, Leoni G, Quiros M, *et al.* The microenvironment of injured murine gut elicits a local pro-restitutive microbiota. *Nat Microbiol* 2016;**1**. doi:10.1038/nmicrobiol.2015.21
- 157 Odamaki T, Kato K, Sugahara H, *et al.* Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: A cross-sectional study. *BMC Microbiol* 2016;**16**:1–12. doi:10.1186/s12866-016-0708-5
- 158 Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, *et al.* Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* 2015;**21**:8836–47. doi:10.3748/wjg.v21.i29.8787
- 159 Nagpal R, Tsuji H, Takahashi T, *et al.* Ontogenesis of the gut microbiota composition in healthy,

- full-term, vaginally born and breast-fed infants over the first 3 years of life: A quantitative bird's-eye view. *Front Microbiol* 2017;**8**:1388. doi:10.3389/fmicb.2017.01388
- 160 Wen L, Duffy A. Factors Influencing the Gut Microbiota, Inflammation, and Type 2 Diabetes. *J Nutr* 2017;**147**:1468S-1475S. doi:10.3945/jn.116.240754
- 161 Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, *et al.* Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 2014;**159**:789–99. doi:10.1016/j.cell.2014.09.053
- 162 Wang B, Yao M, Lv L, *et al.* The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering*. 2017;**3**:71–82. doi:10.1016/J.ENG.2017.01.008
- 163 Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, *et al.* Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012;**489**:220–30. doi:10.1038/nature11550
- 164 Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, *et al.* The long-term stability of the human gut microbiota. *Science (80-)* 2013;**341**:1237439. doi:10.1126/science.1237439
- 165 Wu GD, Chen J, Hoffmann C, *et al.* Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science (80-)* 2011;**334**:105–8. doi:10.1126/science.1208344
- 166 De La Cochetière MF, Durand T, Lepage P, *et al.* Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. *J Clin Microbiol* 2005;**43**:5588–92. doi:10.1128/JCM.43.11.5588-5592.2005
- 167 Zhang C, Zhang M, Wang S, *et al.* Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J* 2010;**4**:232–41. doi:10.1038/ismej.2009.112
- 168 Rothschild D, Weissbrod O, Barkan E, *et al.* Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* 2018;**555**:210–5. doi:10.1038/nature25973
- 169 David LA, Materna AC, Friedman J, *et al.* Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biol* 2014;**15**:R89. doi:10.1186/gb-2014-15-7-r89
- 170 David LA, Maurice CF, Carmody RN, *et al.* Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014;**505**:559–63. doi:10.1038/nature12820
- 171 Walker AW, Ince J, Duncan SH, *et al.* Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J* 2011;**5**:220–30. doi:10.1038/ismej.2010.118
- 172 Ruffin M, Sutherland JB, Cerniglia CE. Effects of treatment with antimicrobial agents on the human colonic microflora. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2008;**4**:1343–57. doi:10.2147/tcrm.s4328
- 173 Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* 2017;**474**:1823–36. doi:10.1042/BCJ20160510
- 174 Rossen NG, Fuentes S, Van Der Spek MJ, *et al.* Findings From a Randomized Controlled Trial of Fecal Transplantation for Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 2015;**149**:110-118.e4. doi:10.1053/j.gastro.2015.03.045
- 175 Hasan N, Yang H. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ* 2019;**2019**:1–31. doi:10.7717/peerj.7502
- 176 Quraishi MN, Sergeant M, Kay G, *et al.* The gut-adherent microbiota of PSC-IBD is distinct to that of IBD. *Gut*. 2017;**66**:386–8. doi:10.1136/gutjnl-2016-311915
- 177 Slavin J. Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients*. 2013;**5**:1417–35. doi:10.3390/nu5041417
- 178 de Vrese M, Offick B. Probiotics and Prebiotics: Effects on Diarrhea. In: *Bioactive Foods in*

Bibliografia

- Promoting Health*. Elsevier Inc. 2010. 205–27. doi:10.1016/B978-0-12-374938-3.00014-1
- 179 Ray K. Gut microbiota: Filling up on fibre for a healthy gut. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2018;**15**:67. doi:10.1038/nrgastro.2018.2
- 180 Dahiya DK, Renuka, Puniya M, *et al.* Gut microbiota modulation and its relationship with obesity using prebiotic fibers and probiotics: A review. *Front. Microbiol.* 2017;**8**:563. doi:10.3389/fmicb.2017.00563
- 181 Holscher HD. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes.* 2017;**8**:172–84. doi:10.1080/19490976.2017.1290756
- 182 Umu ÖCO, Rudi K, Diep DB. Modulation of the gut microbiota by prebiotic fibres and bacteriocins. *Microb Ecol Health Dis* 2017;**28**:1348886. doi:10.1080/16512235.2017.1348886
- 183 Zhou K. Strategies to promote abundance of *Akkermansia muciniphila*, an emerging probiotics in the gut, evidence from dietary intervention studies. *J. Funct. Foods.* 2017;**33**:194–201. doi:10.1016/j.jff.2017.03.045
- 184 Schroeder BO, Birchenough GMH, Ståhlman M, *et al.* Bifidobacteria or Fiber Protects against Diet-Induced Microbiota-Mediated Colonic Mucus Deterioration. *Cell Host Microbe* 2018;**23**:27-40.e7. doi:10.1016/j.chom.2017.11.004
- 185 Mearin F. *Diagnóstico del síndrome del intestino irritable: criterios clínicos y biomarcadores*. Elsevier Espa8#241;a, S.L.U. 2016. doi:10.1016/B978-84-9022-966-8/00008-2
- 186 Earle KA, Billings G, Sigal M, *et al.* Quantitative Imaging of Gut Microbiota Spatial Organization. *Cell Host Microbe* 2015;**18**:478–88. doi:10.1016/j.chom.2015.09.002
- 187 Kristensen NB, Bryrup T, Allin KH, *et al.* Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: A systematic review of randomized controlled trials. *Genome Med* 2016;**8**:52. doi:10.1186/s13073-016-0300-5
- 188 Rokka S, Rantamäki P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: Challenges for industrial applications. *Eur. Food Res. Technol.* 2010;**231**:1–12. doi:10.1007/s00217-010-1246-2
- 189 Servin AL. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 2004;**28**:405–40. doi:10.1016/j.femsre.2004.01.003
- 190 Scaldaferri F, Gerardi V, Mangiola F, *et al.* Role and mechanisms of action of *Escherichia coli* nissle 1917 in the maintenance of remission in ulcerative colitis patients: an update. *World J. Gastroenterol.* 2016;**22**:5505–11. doi:10.3748/wjg.v22.i24.5505
- 191 Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S, *et al.* Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiol* 2007;**7**:101. doi:10.1186/1471-2180-7-101
- 192 Mohan R, Koebnick C, Schildt J, *et al.* Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on body weight, fecal pH, acetate, lactate, calprotectin, and IgA in preterm infants. *Pediatr Res* 2008;**64**:418–22. doi:10.1203/PDR.0b013e318181b7fa
- 193 Mohan R, Koebnick C, Schildt J, *et al.* Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: A double-blind, placebo-controlled, randomized study. *J Clin Microbiol* 2006;**44**:4025–31. doi:10.1128/JCM.00767-06
- 194 Khoruts A, Sadowsky MJ. Understanding the mechanisms of faecal microbiota transplantation. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2016;**13**:508–16. doi:10.1038/nrgastro.2016.98
- 195 Ok Kim K, Gluck M. Fecal Microbiota Transplantation: An Update on Clinical Practice. *Clin Endosc* 2019;**52**:137–43. doi:10.5946/ce.2019.009

- 196 Kelly CR, Khoruts A, Staley C, *et al.* Effect of fecal microbiota transplantation on recurrence in multiply recurrent *Clostridium difficile* infection a randomized trial. *Ann Intern Med* 2016;**165**:609–16. doi:10.7326/M16-0271
- 197 van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, *et al.* Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2013;**368**:407–15. doi:10.1056/NEJMoa1205037
- 198 Schwabe RF, Wiley JW, Smits LP, *et al.* BRIEF REVIEW Therapeutic Potential of Fecal Microbiota Transplantation. *Gastroenterology* 2013;**145**:946–53. doi:10.1053/j.gastro.2013.08.058
- 199 Kump P, Wurm P, Gröchenig HP, *et al.* The taxonomic composition of the donor intestinal microbiota is a major factor influencing the efficacy of faecal microbiota transplantation in therapy refractory ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2018;**47**:67–77. doi:10.1111/apt.14387
- 200 Goyal A, Yeh A, Bush BR, *et al.* Safety, Clinical Response, and Microbiome Findings Following Fecal Microbiota Transplant in Children With Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2018;**24**:410–21. doi:10.1093/ibd/izx035
- 201 Pinn DM, Aroniadis OC, Brandt LJ. Is fecal microbiota transplantation the answer for irritable bowel syndrome? A single-center experience. *Am. J. Gastroenterol.* 2014;**109**:1831–2. doi:10.1038/ajg.2014.295
- 202 Aroniadis OC, Brandt LJ, Oneto C, *et al.* 742 - A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial of Fecal Microbiota Transplantation Capsules (FMTC) for the Treatment of Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome (IBS-D). *Gastroenterology* 2018;**154**:S-154-S-155. doi:10.1016/s0016-5085(18)30932-6
- 203 Wong SH, Zhao L, Zhang X, *et al.* Gavage of Fecal Samples From Patients With Colorectal Cancer Promotes Intestinal Carcinogenesis in Germ-Free and Conventional Mice. *Gastroenterology* 2017;**153**:1621–1633.e6. doi:10.1053/j.gastro.2017.08.022
- 204 Wen L, Ley RE, Volchkov PY, *et al.* Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* 2008;**455**:1109–13. doi:10.1038/nature07336
- 205 Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FWJ, *et al.* Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. *PLoS One* 2010;**5**:e9085. doi:10.1371/journal.pone.0009085
- 206 Sekirov I, Russell SL, Caetano M Antunes L, *et al.* Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 2010;**90**:859–904. doi:10.1152/physrev.00045.2009
- 207 Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2009;**9**:313–23. doi:10.1038/nri2515
- 208 Dumas M-E, Barton RH, Toye A, *et al.* Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:12511–6. doi:10.1073/pnas.0601056103
- 209 SIDHU H, ALLISON MJ, CHOW JOM, *et al.* RAPID REVERSAL OF HYPEROXALURIA IN A RAT MODEL AFTER PROBIOTIC ADMINISTRATION OF OXALOBACTER FORMIGENES. *J Urol* 2001;**166**:1487–91. doi:10.1016/S0022-5347(05)65817-X
- 210 Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LAB, Koenders MI, *et al.* Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J Clin Invest* 2008;**118**:205–16. doi:10.1172/JCI32639
- 211 Kang D-W, Park JG, Ilhan ZE, *et al.* Reduced Incidence of Prevotella and Other Fermenters in Intestinal Microflora of Autistic Children. *PLoS One* 2013;**8**:e68322.

Bibliografia

- doi:10.1371/journal.pone.0068322
- 212 Song Y, Liu C, Finegold SM. Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Appl Environ Microbiol* 2004;**70**:6459–65. doi:10.1128/AEM.70.11.6459-6465.2004
- 213 Arthur JC, Jobin C. The struggle within: Microbial influences on colorectal cancer. *Inflamm Bowel Dis* 2011;**17**:396–409. doi:10.1002/ibd.21354
- 214 Uronis JM, Mühlbauer M, Herfarth HH, *et al.* Modulation of the Intestinal Microbiota Alters Colitis-Associated Colorectal Cancer Susceptibility. *PLoS One* 2009;**4**:e6026. doi:10.1371/journal.pone.0006026
- 215 Salonen A, de Vos WM, Palva A. Gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome: present state and perspectives. *Microbiology* 2010;**156**:3205–15. doi:10.1099/mic.0.043257-0
- 216 Nadal I, Donant E, Ribes-Koninckx C, *et al.* Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J Med Microbiol* 2007;**56**:1669–74. doi:10.1099/jmm.0.47410-0
- 217 De Palma G, Nadal I, Medina M, *et al.* Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children. *BMC Microbiol* 2010;**10**:1–7.
- 218 Sokol H, Seksik P. The intestinal microbiota in inflammatory bowel diseases: time to connect with the host. *Curr Opin Gastroenterol* 2010;**26**:327–31. doi:10.1097/MOG.0b013e328339536b
- 219 Martinez-Medina M, Aldeguer X, Gonzalez-Huix F, *et al.* Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Inflamm Bowel Dis* 2006;**12**:1136–45. doi:10.1097/01.mib.0000235828.09305.0c
- 220 Machiels K, Joossens M, Sabino J, *et al.* A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 2014;**63**:1275–83. doi:10.1136/gutjnl-2013-304833
- 221 Lopez-Siles M, Martinez-Medina M, Busquets D, *et al.* Mucosa-associated *Faecalibacterium prausnitzii* and *Escherichia coli* co-abundance can distinguish Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease phenotypes. *Int J Med Microbiol* 2014;**304**:464–75. doi:10.1016/j.ijmm.2014.02.009
- 222 Manichanh C, Borrueal N, Casellas F, *et al.* The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;**9**:599–608. doi:10.1038/nrgastro.2012.152
- 223 Veltkamp C, Tonkonogy SL, De Jong YP, *et al.* Continuous stimulation by normal luminal bacteria is essential for the development and perpetuation of colitis in Tgε26 mice. *Gastroenterology* 2001;**120**:900–13. doi:10.1053/gast.2001.22547
- 224 Ohkusa T, Okayasu I, Ogihara T, *et al.* Induction of experimental ulcerative colitis by *Fusobacterium varium* isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut* 2003;**52**:79–83. doi:10.1136/gut.52.1.79
- 225 Schaubeck M, Clavel T, Calasan J, *et al.* Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence. *Gut* Published Online First: 2015. doi:10.1136/gutjnl-2015-309333
- 226 Reinoso Webb C, den Bakker H, Kobozev I, *et al.* Differential Susceptibility to T Cell-Induced Colitis in Mice: Role of the Intestinal Microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2018;**24**:361–79. doi:10.1093/ibd/izx014
- 227 Shen B, Achkar JP, Lashner BA, *et al.* A randomized clinical trial of ciprofloxacin and metronidazole to treat acute pouchitis. *Inflamm Bowel Dis* 2001;**7**:301–5. doi:10.1097/00054725-

200111000-00004

- 228 Glick LR, Sossenheimer PH, Ollech JE, *et al.* Low-Dose Metronidazole is Associated With a Decreased Rate of Endoscopic Recurrence of Crohn's Disease After Ileal Resection: A Retrospective Cohort Study. *J Crohns Colitis* 2019;**13**:1158–62. doi:10.1093/ecco-jcc/jjz047
- 229 Rutgeerts P, Hiele M, Geboes K, *et al.* Controlled trial of metronidazole treatment for prevention of crohn's recurrence after ileal resection. *Gastroenterology* 1995;**108**:1617–21. doi:10.1016/0016-5085(95)90121-3
- 230 Ananthakrishnan AN, Luo C, Yajnik V, *et al.* Gut Microbiome Function Predicts Response to Anti-integrin Biologic Therapy in Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Host Microbe* 2017;**21**:603–610.e3. doi:10.1016/j.chom.2017.04.010
- 231 Sokol H, Brot L, Stefanescu C, *et al.* Prominence of ileal mucosa-associated microbiota to predict postoperative endoscopic recurrence in Crohn's disease. *Gut* 2019;**69**:462–72. doi:10.1136/gutjnl-2019-318719
- 232 Yilmaz B, Juillerat P, Øyås O, *et al.* Microbial network disturbances in relapsing refractory Crohn's disease. *Nat Med* 2019;**25**:323–36. doi:10.1038/s41591-018-0308-z
- 233 Cohen LJ, Cho JH, Gevers D, *et al.* Genetic Factors and the Intestinal Microbiome Guide Development of Microbe-Based Therapies for Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2019;**156**:2174–89. doi:10.1053/j.gastro.2019.03.017
- 234 Lavoie S, Conway KL, Lassen KG, *et al.* The Crohn's disease polymorphism, ATG16L1 T300A, alters the gut microbiota and enhances the local Th1/Th17 response. *Elife* 2019;**8**. doi:10.7554/eLife.39982
- 235 Liu JZ, Van Sommeren S, Huang H, *et al.* Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet* 2015;**47**:979–86. doi:10.1038/ng.3359
- 236 Strate LL, Modi R, Cohen E, *et al.* Diverticular Disease as a Chronic Illness: Evolving Epidemiologic and Clinical Insights. *Am J Gastroenterol* 2012;**107**:1486–93. doi:10.1038/ajg.2012.194
- 237 Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, *et al.* CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003;**124**:993–1000. doi:10.1053/gast.2003.50153
- 238 Petnicki-Ocwieja T, Hrncir T, Liu YJ, *et al.* Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106**:15813–8. doi:10.1073/pnas.0907722106
- 239 Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, *et al.* Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science (80-)* 2005;**307**:731–4. doi:10.1126/science.1104911
- 240 Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, *et al.* Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;**122**:44–54. doi:10.1053/gast.2002.30294
- 241 Rehman A, Sina C, Gavrilova O, *et al.* Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut* 2011;**60**:1354–62. doi:10.1136/gut.2010.216259
- 242 Li E, Hamm CM, Gulati AS, *et al.* Inflammatory bowel diseases phenotype, *C. difficile* and NOD2 genotype are associated with shifts in human ileum associated microbial composition. *PLoS One* 2012;**7**:e26284. doi:10.1371/journal.pone.0026284
- 243 Couturier-Maillard A, Secher T, Rehman A, *et al.* NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J Clin Invest* 2013;**123**:700–11. doi:10.1172/JCI62236

Bibliografia

- 244 Drummond RA, Franco LM, Lionakis MS. Human CARD9: A critical molecule of fungal immune surveillance. *Front. Immunol.* 2018;**9**:1836. doi:10.3389/fimmu.2018.01836
- 245 Gross O, Gewies A, Finger K, *et al.* Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* 2006;**442**:651–6. doi:10.1038/nature04926
- 246 Yamamoto H, Nakamura Y, Sato K, *et al.* Defect of CARD9 leads to impaired accumulation of gamma interferon-producing memory phenotype T cells in lungs and increased susceptibility to pulmonary infection with cryptococcus neoformans. *Infect Immun* 2014;**82**:1606–15. doi:10.1128/IAI.01089-13
- 247 Jhingran A, Kasahara S, Shepardson KM, *et al.* Compartment-Specific and Sequential Role of MyD88 and CARD9 in Chemokine Induction and Innate Defense during Respiratory Fungal Infection. *PLoS Pathog* 2015;**11**:1–22. doi:10.1371/journal.ppat.1004589
- 248 Lamas B, Richard ML, Leducq V, *et al.* CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat Med* 2016;**22**:598–605. doi:10.1038/nm.4102
- 249 Sartor RB. Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 2008;**134**:577–94. doi:10.1053/j.gastro.2007.11.059
- 250 Swidsinski A, Loening-Baucke V, Vaneechoutte M, *et al.* Active Crohn's disease and ulcerative colitis can be specifically diagnosed and monitored based on the biostructure of the fecal flora. *Inflamm Bowel Dis* 2008;**14**:147–61. doi:10.1002/ibd.20330
- 251 Prosberg M, Bendtsen F, Vind I, *et al.* The association between the gut microbiota and the inflammatory bowel disease activity: a systematic review and meta-analysis. *Scand J Gastroenterol* 2016;**51**:1407–15. doi:10.1080/00365521.2016.1216587
- 252 Matsuoka K, Kanai T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Semin Immunopathol* 2015;**37**:47–55. doi:10.1007/s00281-014-0454-4
- 253 Sokol H, Seksik P, Furet JP, *et al.* Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2009;**15**:1183–9. doi:10.1002/ibd.20903
- 254 Schwartz A, Jacobi M, Frick J, *et al.* Microbiota in pediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr* 2010;**157**:240–4.
- 255 Mondot S, Kang S, Furet JP, *et al.* Highlighting new phylogenetic specificities of Crohn's disease microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2011;**17**:185–92. doi:10.1002/ibd.21436
- 256 Joossens M, Huys G, Cnockaert M, *et al.* Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* 2011;**60**:631–7. doi:10.1136/gut.2010.223263
- 257 Manichanh C. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006;**55**:205–11. doi:10.1136/gut.2005.073817
- 258 Rapozo DCM, Bernardazzi C, de Souza HSP. Diet and microbiota in inflammatory bowel disease: The gut in disharmony. *World J Gastroenterol* 2017;**23**:2124–40. doi:10.3748/wjg.v23.i12.2124
- 259 Passos M do CF, Moraes-filho JP. Intestinal microbiota in digestive diseases. *Arq Gastroenterol* 2017;**54**:255–62.
- 260 Cardona S, Eck A, Cassellas M, *et al.* Storage conditions of intestinal microbiota matter in metagenomic analysis. *BMC Microbiol* 2012;**12**:158. doi:10.1186/1471-2180-12-158
- 261 Lopez-Siles M, Martinez-Medina M, Abellà C, *et al.* Mucosa-Associated Faecalibacterium prausnitzii Phylotype Richness Is Reduced in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Appl Environ Microbiol* 2015;**81**:7582–92. doi:10.1128/AEM.02006-15

- 262 Kabeerdoss J, Sankaran V, Pugazhendhi S, *et al.* Clostridium leptum group bacteria abundance and diversity in the fecal microbiota of patients with inflammatory bowel disease: a case-control study in India. *BMC Gastroenterol* 2013;**13**:20. doi:10.1186/1471-230X-13-20
- 263 Frank DN, St Amand AL, Feldman R a, *et al.* Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:13780–5. doi:10.1073/pnas.0706625104
- 264 Lopez-Siles M, Khan TM, Duncan SH, *et al.* Cultured Representatives of Two Major Phylogroups of Human Colonic Faecalibacterium prausnitzii Can Utilize Pectin, Uronic Acids, and Host-Derived Substrates for Growth. *Appl Environ Microbiol* 2012;**78**:420–8. doi:10.1128/AEM.06858-11
- 265 Ohkusa T, Koido S. Intestinal microbiota and ulcerative colitis. *J Infect Chemother* 2015;**21**:761–8. doi:10.1016/j.jiac.2015.07.010
- 266 Busquets D, Mas-de-Xaxars T, López-Siles M, *et al.* Anti-tumour Necrosis Factor Treatment with Adalimumab Induces Changes in the Microbiota of Crohn’s Disease. *J Crohns Colitis* 2015;**9**:899–906. doi:10.1093/ecco-jcc/jjv119
- 267 Sartor RB, Wu GD. Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches. *Gastroenterology* 2017;**152**:327-339.e4. doi:10.1053/j.gastro.2016.10.012
- 268 Knox NC, Forbes JD, Peterson CL, *et al.* The Gut Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Lessons Learned From Other Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Am J Gastroenterol* 2019;**114**:1051–70. doi:10.14309/ajg.0000000000000305
- 269 Pascal V, Pozuelo M, Borrueal N, *et al.* A microbial signature for Crohn’s disease. *Gut* 2017;**66**:813–22. doi:10.1136/gutjnl-2016-313235
- 270 Nemoto H, Kataoka K, Ishikawa H, *et al.* Reduced Diversity and Imbalance of Fecal Microbiota in Patients with Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci* 2012;**57**:2955–64. doi:10.1007/s10620-012-2236-y
- 271 Tedjo DI, Smolinska A, Savelkoul PH, *et al.* The fecal microbiota as a biomarker for disease activity in Crohn’s disease. *Nat Publ Gr* 2016;**6**:35216. doi:10.1038/srep35216
- 272 Zhou Y, Zhi F. Lower Level of *Bacteroides* in the Gut Microbiota Is Associated with Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int* 2016;**2016**:1–9. doi:10.1155/2016/5828959
- 273 Chen L, Reynolds C, David R, *et al.* Development of an Index Score for Intestinal Inflammation-Associated Dysbiosis Using Real-World Stool Test Results. *Dig Dis Sci* Published Online First: 2019. doi:10.1007/s10620-019-05828-8
- 274 Knox NC, Forbes JD, Peterson CL, *et al.* The Gut Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Lessons Learned From Other Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Am J Gastroenterol* 2019;**114**:1051–70. doi:10.14309/ajg.0000000000000305
- 275 Limon JJ, Tang J, Li D, *et al.* Malassezia Is Associated with Crohn’s Disease and Exacerbates Colitis in Mouse Models. *Cell Host Microbe* 2019;**25**:377-388.e6. doi:10.1016/j.chom.2019.01.007
- 276 Sokol H, Leducq V, Aschard H, *et al.* Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* 2017;**66**:1039–48. doi:10.1136/gutjnl-2015-310746
- 277 Norman JM, Handley SA, Baldrige MT, *et al.* Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell* 2015;**160**:447–60. doi:10.1016/j.cell.2015.01.002
- 278 Zuo T, Lu XJ, Zhang Y, *et al.* Gut mucosal virome alterations in ulcerative colitis. *Gut* 2019;**68**:1169–79. doi:10.1136/gutjnl-2018-318131

Bibliografia

- 279 Kerckhoffs APM, Ben-Amor K, Samsom M, *et al.* Molecular analysis of faecal and duodenal samples reveals significantly higher prevalence and numbers of *Pseudomonas aeruginosa* in irritable bowel syndrome. *J Med Microbiol* 2011;**60**:236–45. doi:10.1099/jmm.0.022848-0
- 280 Simren M. Use and abuse of hydrogen breath tests. *Gut* 2006;**55**:297–303. doi:10.1136/gut.2005.075127
- 281 Maukonen J, Satokari R, Mättö J, *et al.* Prevalence and temporal stability of selected clostridial groups in irritable bowel syndrome in relation to predominant faecal bacteria. *J Med Microbiol* 2006;**55**:625–33. doi:10.1099/jmm.0.46134-0
- 282 Mättö J, Maunuksele L, Kajander K, *et al.* Composition and temporal stability of gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome - a longitudinal study in IBS and control subjects. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;**43**:213–22. doi:10.1016/j.femsim.2004.08.009
- 283 Malinen E, Rinttilä T, Kajander K, *et al.* Analysis of the Fecal Microbiota of Irritable Bowel Syndrome Patients and Healthy Controls with Real-Time PCR. *Am J Gastroenterol* doi:10.1111/j.1572-0241.2005.40312.x
- 284 Ponnusamy K, Choi JN, Kim J, *et al.* Microbial community and metabolomic comparison of irritable bowel syndrome faeces. *J Med Microbiol* 2011;**60**:817–27. doi:10.1099/jmm.0.028126-0
- 285 Rajilić-Stojanović M, Biagi E, Heilig HGJ, *et al.* Global and Deep Molecular Analysis of Microbiota Signatures in Fecal Samples From Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 2011;**141**:1792–801. doi:10.1053/j.gastro.2011.07.043
- 286 Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, *et al.* Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol* 2000;**66**:1654–61. doi:10.1128/AEM.66.4.1654-1661.2000
- 287 Stewart CS, Hold GL, Duncan SH, *et al.* Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;**52**:2141–6. doi:10.1099/00207713-52-6-2141
- 288 Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc* 2003;**62**:67–72. doi:10.1079/PNS2002207
- 289 Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol* 2015;**11**:577–91. doi:10.1038/nrendo.2015.128
- 290 Roy CC, Kien CL, Bouthillier L, *et al.* Short-Chain Fatty Acids: Ready for Prime Time? *Nutr Clin Pract* 2006;**21**:351–66. doi:10.1177/0115426506021004351
- 291 Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, *et al.* *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci* 2008;**105**:16731–6. doi:10.1073/pnas.0804812105
- 292 Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett* 2009;**294**:1–8. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x
- 293 Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, *et al.* *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:16731–6. doi:10.1073/pnas.0804812105
- 294 Lopez-Siles M, Khan TM, Duncan SH, *et al.* Cultured representatives of two major phylogroups of human colonic *Faecalibacterium prausnitzii* can utilize pectin, uronic acids, and host-derived substrates for growth. *Appl Environ Microbiol* 2012;**78**:420–8. doi:10.1128/AEM.06858-11
- 295 De Palma G, Nadal I, Medina M, *et al.* Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated

- bacteria associated with coeliac disease in children. 2010. doi:10.1186/1471-2180-10-63
- 296 Nylund L, Kaukinen K, Lindfors K. The microbiota as a component of the celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *Clin Nutr Exp* 2016;**6**:17–24. doi:10.1016/j.yclnex.2016.01.002
- 297 Miquel S, Martín R, Rossi O, *et al.* Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol.* 2013;**16**:255–61. doi:10.1016/j.mib.2013.06.003
- 298 Remely M, Hippe B, Zanner J, *et al.* Gut Microbiota of Obese, Type 2 Diabetic Individuals is Enriched in Faecalibacterium prausnitzii, Akkermansia muciniphila and Peptostreptococcus anaerobius after Weight Loss. *Endocrine, Metab Immune Disord - Drug Targets* 2016;**16**:99–106. doi:10.2174/1871530316666160831093813
- 299 Muñoz-Garach A, Diaz-Perdigones C, Tinahones FJ. Gut microbiota and type 2 diabetes mellitus. *Endocrinol. y Nutr.* 2016;**63**:560–8. doi:10.1016/j.endonu.2016.07.008
- 300 Miquel S, Martín R, Rossi O, *et al.* Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol* 2013;**16**:255–61. doi:10.1016/j.mib.2013.06.003
- 301 Ferreira-Halder CV, Faria AV de S, Andrade SS. Action and function of Faecalibacterium prausnitzii in health and disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2017;**31**:643–8. doi:10.1016/j.bpg.2017.09.011
- 302 Lopez-Siles M, Martinez-Medina M, Surís-Valls R, *et al.* Changes in the Abundance of Faecalibacterium prausnitzii Phylogroups I and II in the Intestinal Mucosa of Inflammatory Bowel Disease and Patients with Colorectal Cancer. *Inflamm Bowel Dis* 2016;**22**:28–41. doi:10.1097/MIB.0000000000000590
- 303 Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H, *et al.* Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J Gastroenterol* 2005;**11**:1131–40. doi:10.3748/wjg.v11.i8.1131
- 304 Lopez-siles M, Duncan SH, Garcia-gil LJ, *et al.* Faecalibacterium prausnitzii : from microbiology to diagnostics and prognostics. 2017;;1–12. doi:10.1038/ismej.2016.176
- 305 Balamurugan R, Rajendiran E, George S, *et al.* Real-time polymerase chain reaction quantification of specific butyrate-producing bacteria, *Desulfovibrio* and *Enterococcus faecalis* in the feces of patients with colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;**23**:1298–303. doi:10.1111/j.1440-1746.2008.05490.x
- 306 Machiels K, Joossens M, Sabino J, *et al.* A decrease of the butyrate-producing species roseburia hominis and faecalibacterium prausnitzii defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 2014;**63**:1275–83. doi:10.1136/gutjnl-2013-304833
- 307 Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007;**369**:1627–40. doi:10.1016/S0140-6736(07)60750-8
- 308 Martinez-Medina M, Aldeguer X, Lopez-Siles M, *et al.* Molecular diversity of Escherichia coli in the human gut: New ecological evidence supporting the role of adherent-invasive E. coli (AIEC) in Crohn’s disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;**15**:872–82. doi:10.1002/ibd.20860
- 309 Willing B, Halfvarson J, Dicksved J, *et al.* Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn’s disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;**15**:653–60. doi:10.1002/ibd.20783
- 310 Mylonaki M, Rayment NB, Rampton DS, *et al.* Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;**11**:481–7. doi:10.1097/01.mib.0000159663.62651.4f
- 311 Pilarczyk-Zurek M, Chmielarczyk A, Gosiewski T, *et al.* Possible role of Escherichia coli in

Bibliografia

- propagation and perpetuation of chronic inflammation in ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol* 2013;**13**:61. doi:10.1186/1471-230X-13-61
- 312 Sha S, Xu B, Wang X, *et al.* The biodiversity and composition of the dominant fecal microbiota in patients with inflammatory bowel disease. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;**75**:245–51. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.022
- 313 Kotlowski R, Bernstein CN, Sepehri S. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* 2007;**56**:669–75. doi:10.1136/gut.2006.099796
- 314 Rehman A, Lepage P, Nolte A, *et al.* Transcriptional activity of the dominant gut mucosal microbiota in chronic inflammatory bowel disease patients. doi:10.1099/jmm.0.021170-0
- 315 Martinez-Medina M, Garcia-Gil LJ. *Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent invasive *Escherichia coli* pathogenicity. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2014;**5**:213. doi:10.4291/wjgp.v5.i3.213
- 316 Collado MC, Derrien M, Isolauri E, *et al.* Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly. *Appl Environ Microbiol* 2007;**73**:7767–70. doi:10.1128/AEM.01477-07
- 317 Png CW, Lindén SK, Gilshenan KS, *et al.* Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol* 2010;**105**:2420–8. doi:10.1038/ajg.2010.281
- 318 Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, *et al.* Low relative abundances of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism. *Appl Environ Microbiol* 2011;**77**:6718–21. doi:10.1128/AEM.05212-11
- 319 Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, *et al.* Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013;**500**:541–6. doi:10.1038/nature12506
- 320 Liévin-Le Moal V, Servin AL. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev* 2006;**19**:315–37. doi:10.1128/CMR.19.2.315-337.2006
- 321 Derrien M, van Passel MWJ, van de Bovenkamp JHB, *et al.* Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes* 2010;**1**:254–68. doi:10.4161/gmic.1.4.12778
- 322 Lopez-Siles M, Enrich-Capó N, Aldeguer X, *et al.* Alterations in the Abundance and Co-occurrence of *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* in the Colonic Mucosa of Inflammatory Bowel Disease Subjects. *Front Cell Infect Microbiol* 2018;**8**:281. doi:10.3389/fcimb.2018.00281
- 323 van Passel MWJ, Kant R, Zoetendal EG, *et al.* The Genome of *Akkermansia muciniphila*, a Dedicated Intestinal Mucin Degrader, and Its Use in Exploring Intestinal Metagenomes. *PLoS One* 2011;**6**:e16876. doi:10.1371/journal.pone.0016876
- 324 Vignæs LK, Brynskov J, Steenholdt C, *et al.* Gram-negative bacteria account for main differences between faecal microbiota from patients with ulcerative colitis and healthy controls. *Benef Microbes* 2012;**3**:287–97. doi:10.3920/BM2012.0018
- 325 Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, *et al.* *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;**54**:1469–76. doi:10.1099/ijs.0.02873-0
- 326 Rainley FA. *Order I. Clostridiales*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (vol 3)*. 2 nd. New York: : Springer 2009.

- 327 Hoskins LC, Agustines M, McKee WB, *et al.* Mucin degradation in human colon ecosystems. Isolation and properties of fecal strains that degrade ABH blood group antigens and oligosaccharides from mucin glycoproteins. *J Clin Invest* 1985;**75**:944–53. doi:10.1172/JCI111795
- 328 Smith PM, Howitt MR, Panikov N, *et al.* The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 2013;**341**:569–73. doi:10.1126/science.1241165
- 329 Wang RF, Kim S-J, Robertson LH, *et al.* Development of a membrane-array method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. *Mol Cell Probes* 2002;**16**:341–50.
- 330 Kang S, Denman SE, Morrison M, *et al.* Dysbiosis of fecal microbiota in Crohn’s disease patients as revealed by a custom phylogenetic microarray. *Inflamm Bowel Dis* 2010;**16**:2034–42. doi:10.1002/ibd.21319
- 331 Prindiville T, Cantrell M, Wilson KH. Ribosomal DNA sequence analysis of mucosa-associated bacteria in Crohn’s disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004;**10**:824–33.
- 332 Fite A, Macfarlane S, Furrie E, *et al.* Longitudinal Analyses of Gut Mucosal Microbiotas in Ulcerative Colitis in Relation to Patient Age and Disease Severity and Duration. *J Clin Microbiol* 2013;**51**:849–56. doi:10.1128/JCM.02574-12
- 333 Dridi B, Raoult D, Drancourt M. Archaea as emerging organisms in complex human microbiomes. *Anaerobe* 2011;**17**:56–63. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.03.001
- 334 Chaudhary PP, Conway PL, Schlundt J. Methanogens in humans: potentially beneficial or harmful for health. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018;**102**:3095–104. doi:10.1007/s00253-018-8871-2
- 335 Bang C, Weidenbach K, Gutschmann T, *et al.* The Intestinal Archaea Methanosphaera stadtmanae and Methanobrevibacter smithii Activate Human Dendritic Cells. *PLoS One* 2014;**9**:e99411. doi:10.1371/journal.pone.0099411
- 336 Miller TL, Wolin MJ. Stability of Methanobrevibacter smithii populations in the microbial flora excreted from the human large bowel. *Appl Environ Microbiol* 1983;**45**:317–8.
- 337 Peled Y, Weinberg D, Hallak A, *et al.* Factors affecting methane production in humans. Gastrointestinal diseases and alterations of colonic flora. *Dig Dis Sci* 1987;**32**:267–71.
- 338 Pimentel M, Chatterjee S, Chow EJ, *et al.* Neomycin Improves Constipation-Predominant Irritable Bowel Syndrome in a Fashion That Is Dependent on the Presence of Methane Gas: Subanalysis of a Double-Blind Randomized Controlled Study. *Dig Dis Sci* 2006;**51**:1297–301. doi:10.1007/s10620-006-9104-6
- 339 Lee K-M, Paik C-N, Chung WC, *et al.* Breath methane positivity is more common and higher in patients with objectively proven delayed transit constipation. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013;**25**:726–32. doi:10.1097/MEG.0b013e32835eb916
- 340 Weaver GA, Krause JA, Miller TL, *et al.* Incidence of methanogenic bacteria in a sigmoidoscopy population: an association of methanogenic bacteria and diverticulosis. *Gut* 1986;**27**:698–704.
- 341 Triantafyllou K, Chang C, Pimentel M. Methanogens, Methane and Gastrointestinal Motility. *J Neurogastroenterol Motil* 2014;**20**:31–40. doi:10.5056/jnm.2014.20.1.31
- 342 Gottlieb K, Wachter V, Sliman J, *et al.* Review article: inhibition of methanogenic archaea by statins as a targeted management strategy for constipation and related disorders. *Aliment Pharmacol Ther* 2016;**43**:197–212. doi:10.1111/apt.13469
- 343 Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, *et al.* Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;**308**:1635–8. doi:10.1126/science.1110591
- 344 Sarangi AN, Goel A, Aggarwal R. Methods for Studying Gut Microbiota: A Primer for Physicians.

Bibliografia

- J Clin Exp Hepatol* 2019;**9**:62–73. doi:10.1016/j.jceh.2018.04.016
- 345 Fraher MH, O'Toole PW, Quigley EMM. Techniques used to characterize the gut microbiota: A guide for the clinician. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;**9**:312–22. doi:10.1038/nrgastro.2012.44
- 346 Hiergeist A, Gläsner J, Reischl U, *et al.* Analyses of Intestinal Microbiota: Culture versus Sequencing. *ILAR J* 2015;**56**:228–40. doi:10.1093/ilar/ilv017
- 347 Bouchet V, Huot H, Goldstein R. Molecular genetic basis of ribotyping. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008;**21**:262–73. doi:10.1128/CMR.00026-07
- 348 Matsuda K, Iwaki KK, Garcia-Gomez J, *et al.* Bacterial Identification by 16S rRNA Gene PCR-Hybridization as a Supplement to Negative Culture Results. *J Clin Microbiol* 2011;**49**:2031–4. doi:10.1128/JCM.00615-10
- 349 Huijsdens XW, Linskens RK, Mak M, *et al.* Quantification of Bacteria Adherent to Gastrointestinal Mucosa by Real-Time PCR Downloaded from. *J Clin Microbiol* 2002;**40**:4423–7. doi:10.1128/JCM.40.12.4423-4427.2002
- 350 Collado MC, Derrien M, Isolauri E, *et al.* Intestinal Integrity and Akkermansia muciniphila, a Mucin-Degrading Member of the Intestinal Microbiota Present in Infants, Adults, and the Elderly. *Appl Environ Microbiol* 2007;**73**:7767–70. doi:10.1128/AEM.01477-07
- 351 Ramirez-Farias C, Slezak K, Fuller Z, *et al.* Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of Bifidobacterium adolescentis and Faecalibacterium prausnitzii. *Br J Nutr* 2009;**101**:533. doi:10.1017/S0007114508019880
- 352 Bacchetti De Gregoris T, Aldred N, Clare AS, *et al.* Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *J Microbiol Methods* 2011;**86**:351–6. doi:10.1016/j.mimet.2011.06.010
- 353 Sittipo P, Lobionda S, Lee YK, *et al.* Intestinal microbiota and the immune system in metabolic diseases. *J Microbiol* 2018;**56**:154–62. doi:10.1007/s12275-018-7548-y
- 354 San Tang M, Poles J, Leung JM, *et al.* Inferred metagenomic comparison of mucosal and fecal microbiota from individuals undergoing routine screening colonoscopy reveals similar differences observed during active inflammation. Published Online First: 2015. doi:10.1080/19490976.2014.1000080
- 355 San Tang M, Poles J, Leung JM, *et al.* Inferred metagenomic comparison of mucosal and fecal microbiota from individuals undergoing routine screening colonoscopy reveals similar differences observed during active inflammation. Published Online First: 2015. doi:10.1080/19490976.2014.1000080
- 356 Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, *et al.* Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 2006;**308**:1635–8.
- 357 Stearns JC, Lynch MDJ, Senadheera DB, *et al.* Bacterial biogeography of the human digestive tract. *Sci Rep* 2011;**1**:170. doi:10.1038/srep00170
- 358 Rangel I, Sundin J, Fuentes S, *et al.* The relationship between faecal-associated and mucosal-associated microbiota in irritable bowel syndrome patients and healthy subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 2015;**42**:1211–21. doi:10.1111/apt.13399
- 359 Inglis GD, Thomas MC, Thomas DK, *et al.* Molecular methods to measure intestinal bacteria: a review. *J AOAC Int*; **95**:5–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22468337> (accessed 25 Jul 2019).
- 360 Wu GD, Lewis JD, Hoffmann C, *et al.* Sampling and pyrosequencing methods for characterizing

- bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. *BMC Microbiol* 2010;**10**:206. doi:10.1186/1471-2180-10-206
- 361 Fouhy F, Deane J, Rea MC, *et al.* The Effects of Freezing on Faecal Microbiota as Determined Using MiSeq Sequencing and Culture-Based Investigations. *PLoS One* 2015;**10**:e0119355. doi:10.1371/journal.pone.0119355
- 362 Tedjo DI, Jonkers DMAE, Savelkoul PH, *et al.* The Effect of Sampling and Storage on the Fecal Microbiota Composition in Healthy and Diseased Subjects. *PLoS One* 2015;**10**:e0126685. doi:10.1371/journal.pone.0126685
- 363 Ferrand J, Patron K, Legrand-Frossi C, *et al.* Comparison of seven methods for extraction of bacterial DNA from fecal and cecal samples of mice. *J Microbiol Methods* 2014;**105**:180–5. doi:10.1016/j.mimet.2014.07.029
- 364 Thomas V, Clark J, Doré J. Fecal microbiota analysis: an overview of sample collection methods and sequencing strategies. *Future Microbiol* 2015;**10**:1485–504. doi:10.2217/fmb.15.87
- 365 Ariefdjohan MW, Savaiano DA, Nakatsu CH. Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens. *Nutr J* 2010;**9**:23. doi:10.1186/1475-2891-9-23
- 366 Kim D, Hofstaedter CE, Zhao C, *et al.* Optimizing methods and dodging pitfalls in microbiome research. *Microbiome* 2017;**5**:52. doi:10.1186/s40168-017-0267-5
- 367 Costea PI, Zeller G, Sunagawa S, *et al.* Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. *Nat Biotechnol* 2017;**35**:1069–76. doi:10.1038/nbt.3960
- 368 Hsieh YH, Peterson CM, Raggio A, *et al.* Impact of different fecal processing methods on assessments of bacterial diversity in the human intestine. *Front Microbiol* 2016;**7**:1–11. doi:10.3389/fmicb.2016.01643
- 369 Choo JM, Leong LE, Rogers GB. Sample storage conditions significantly influence faecal microbiome profiles. *Sci Rep* 2015;**5**:16350. doi:10.1038/srep16350
- 370 Roesch LFW, Casella G, Simell O, *et al.* Influence of Fecal Sample Storage on Bacterial Community Diversity. *Open Microbiol J* 2009;**3**:40–6. doi:10.2174/1874285800903010040
- 371 Carroll IM, Ringel-Kulka T, Siddle JP, *et al.* Characterization of the Fecal Microbiota Using High-Throughput Sequencing Reveals a Stable Microbial Community during Storage. *PLoS One* 2012;**7**:e46953. doi:10.1371/journal.pone.0046953
- 372 Hale VL, Tan CL, Knight R, *et al.* Effect of preservation method on spider monkey (*Ateles geoffroyi*) fecal microbiota over 8 weeks. *J Microbiol Methods* 2015;**113**:16–26. doi:10.1016/j.mimet.2015.03.021
- 373 Dominianni C, Wu J, Hayes RB, *et al.* Comparison of methods for fecal microbiome biospecimen collection. *BMC Microbiol* 2014;**14**:103. doi:10.1186/1471-2180-14-103
- 374 Reidmiller JS, Smith WL, Sawyer MM, *et al.* Antimicrobial properties of the chelating agent EDTA on Streptococcal bovine mastitis isolates. *J Food Prot* 2006;**69**:1460–2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16786875> (accessed 6 Jun 2019).
- 375 Carozzi FM, Sani C. Fecal Collection and Stabilization Methods for Improved Fecal DNA Test for Colorectal Cancer in a Screening Setting. *J Cancer Res* 2013;**2013**:1–8. doi:10.1155/2013/818675
- 376 Wu WK, Chen CC, Panyod S, *et al.* Optimization of fecal sample processing for microbiome study — The journey from bathroom to bench. *J Formos Med Assoc* 2019;**118**:545–55. doi:10.1016/j.jfma.2018.02.005

Bibliografia

- 377 Gorzelak MA, Gill SK, Tasnim N, *et al.* Methods for Improving Human Gut Microbiome Data by Reducing Variability through Sample Processing and Storage of Stool. 2015;:1–14. doi:10.1371/journal.pone.0134802
- 378 Song SJ, Amir A, Metcalf JL, *et al.* Preservation Methods Differ in Fecal Microbiome Stability, Affecting Suitability for Field Studies. *mSystems* 2016;**1**. doi:10.1128/mSystems.00021-16
- 379 Maukonen J, Simões C, Saarela M. The currently used commercial DNA-extraction methods give different results of clostridial and actinobacterial populations derived from human fecal samples. *FEMS Microbiol Ecol* 2012;**79**:697–708. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01257.x
- 380 Gerasimidis K, Bertz M, Quince C, *et al.* The effect of DNA extraction methodology on gut microbiota research applications. *BMC Res Notes* 2016;**9**:365. doi:10.1186/s13104-016-2171-7
- 381 Martin R, Barron JJ, Zacker C. Irritable bowel syndrome: toward a cost-effective management approach. *Am J Manag Care* 2001;**7**:S268-75.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11474912> (accessed 22 Jan 2019).
- 382 Lacy BE, Mearin F, Chang L, *et al.* Bowel Disorders. *Gastroenterology* 2016;**150**:1393-1407.e5. doi:10.1053/J.GASTRO.2016.02.031
- 383 Vandvik PO, Wilhelmsen I, Ihlebaek C, *et al.* Comorbidity of irritable bowel syndrome in general practice: a striking feature with clinical implications. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;**20**:1195–203. doi:10.1111/j.1365-2036.2004.02250.x
- 384 Whitehead WE, Palsson OS, Levy RR, *et al.* Comorbidity in Irritable Bowel Syndrome. *Am J Gastroenterol* 2007;**102**:2767–76. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01540.x
- 385 van Rhee PF, Van de Vijver E, Fidler V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *Bmj* 2010;**341**:c3369–c3369. doi:10.1136/bmj.c3369
- 386 Sipponen T, Kolho K-L. Fecal calprotectin in diagnosis and clinical assessment of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2015;**50**:74–80. doi:10.3109/00365521.2014.987809
- 387 Grad C, David L, Portincasa P, *et al.* Diagnostic value of calprotectin in irritable bowel syndrome and in inflammatory bowel disease. *Rom J Intern Med* 2012;**50**:3–6.<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L365416126%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=12204749&id=doi:&atitle=Diagnostic+value+of+calprotectin+in+irritable+bowel+syndrome+and+in+inflammatory+bowel+disease>.
- 388 Flint HJ, AM S, AR B, *et al.* The impact of nutrition on the human microbiome. *Nutr Rev* 2012;**70**:S10–3. doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00499.x
- 389 Sears CL. A dynamic partnership: Celebrating our gut flora. *Anaerobe* 2005;**11**:247–51. doi:10.1016/j.anaerobe.2005.05.001
- 390 Casén C, Vebø HC, Sekelja M, *et al.* Deviations in human gut microbiota: A novel diagnostic test for determining dysbiosis in patients with IBS or IBD. *Aliment Pharmacol Ther* 2015;**42**:71–83. doi:10.1111/apt.13236
- 391 Mirsepasi-Lauridsen HC, Du Z, Struve C, *et al.* Secretion of Alpha-Hemolysin by *Escherichia coli* Disrupts Tight Junctions in Ulcerative Colitis Patients. *Clin Transl Gastroenterol* 2016;**7**:e149. doi:10.1038/ctg.2016.3
- 392 Arumugam M, Raes J, Pelletier E, *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011;**473**:174–80. doi:10.1038/nature09944
- 393 Suau A, Rochet V, Sghir A, *et al.* *Fusobacterium prausnitzii* and Related Species Represent a Dominant Group Within the Human Fecal Flora. *Syst Appl Microbiol* 2001;**24**:139–45.

doi:10.1078/0723-2020-00015

- 394 Walker AW, Ince J, Duncan SH, *et al.* Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J* 2011;**5**:220–30. doi:10.1038/ismej.2010.118
- 395 Engsbro AL, Begtrup LM, Kjeldsen J, *et al.* Patients suspected of irritable bowel syndrome--cross-sectional study exploring the sensitivity of Rome III criteria in primary care. *Am J Gastroenterol* 2013;**108**:972–80. doi:10.1038/ajg.2013.15
- 396 Stanisic V, Quigley EM. The overlap between IBS and IBD – what is it and what does it mean? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;**8**:139–45. doi:10.1586/17474124.2014.876361
- 397 Smith LA, Gaya DR. Utility of faecal calprotectin analysis in adult inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2012;**18**:6782–9. doi:10.3748/wjg.v18.i46.6782
- 398 Fengming Y, Jianbing W. Biomarkers of inflammatory bowel disease. *Dis Markers* 2014;**2014**. doi:10.1155/2014/710915
- 399 Kopylov U, Rosenfeld G, Bressler B, *et al.* Clinical Utility of Fecal Biomarkers for the Diagnosis and Management of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2014;**20**:742–56. doi:10.1097/01.MIB.0000442681.85545.31
- 400 Yang Z, Clark N, Park KT. Effectiveness and Cost-effectiveness of Measuring Fecal Calprotectin in Diagnosis of Inflammatory Bowel Disease in Adults and Children. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014;**12**:253-262.e2. doi:10.1016/j.cgh.2013.06.028
- 401 Lozoya Angulo ME, de las Heras Gómez I, Martínez Villanueva M, *et al.* Calprotectina fecal, marcador eficaz en la diferenciación de enfermedades inflamatorias intestinales y trastornos funcionales gastrointestinales. *Gastroenterol Hepatol* 2017;**40**:125–31. doi:10.1016/j.gastrohep.2016.04.009
- 402 D'angelo F, Felley C, Frossard JL. Calprotectin in Daily Practice: Where Do We Stand in 2017? *Digestion* 2017;**95**:293–301. doi:10.1159/000476062
- 403 Ministro P, Martins D. Fecal biomarkers in inflammatory bowel disease: how, when and why? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;**11**:317–28. doi:10.1080/17474124.2017.1292128
- 404 Lacy BE, Mearin F, Chang L, *et al.* The Rome IV criteria for bowel disorders. *Gastroenterology* 2016;**150**:1393-1407.e5. doi:10.1053/J.GASTRO.2016.02.031
- 405 Didelot X, Walker AS, Peto TE, *et al.* Within-host evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2016;**14**:150–62. doi:10.1038/nrmicro.2015.13
- 406 Jakobsson HE, Rodríguez-Piñero AM, Schütte A, *et al.* The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep* 2015;**16**:164–77. doi:10.15252/embr.201439263
- 407 Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, *et al.* Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut* 2016;**65**:426–36. doi:10.1136/gutjnl-2014-308778
- 408 Derrien M, Belzer C, Vos WM De. Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions. *Microb Pathog* Published Online First: 2016. doi:10.1016/j.micpath.2016.02.005
- 409 Spiller RC. Inflammation as a basis for functional GI disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;**18**:641–61. doi:10.1016/J.BPG.2004.04.002
- 410 Cremon C, Guglielmetti S, Gargari G, *et al.* Effect of *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572 on symptoms, gut microbiota, short chain fatty acids, and immune activation in patients with irritable bowel syndrome: A pilot randomized clinical trial. *United Eur Gastroenterol J* 2018;**6**:604–13. doi:10.1177/2050640617736478

Bibliografia

- 411 Plöger S, Stumpff F, Penner GB, *et al.* Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. *Ann N Y Acad Sci* 2012;**1258**:52–9. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06553.x
- 412 Duboc H, Rajca S, Rainteau D, *et al.* Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut* 2013;**62**:531–9. doi:10.1136/gutjnl-2012-302578
- 413 Rigsbee L, Agans R, Shankar V, *et al.* Quantitative Profiling of Gut Microbiota of Children With Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome. *Am J Gastroenterol* 2012;**107**:1740–51. doi:10.1038/ajg.2012.287
- 414 Lee S-H, Kim M-J, Chang K, *et al.* Fecal calprotectin predicts complete mucosal healing and better correlates with the ulcerative colitis endoscopic index of severity than with the Mayo endoscopic subscore in patients with ulcerative colitis. doi:10.1186/s12876-017-0669-7
- 415 Stjernman H, Tysk C, Almer S, *et al.* Factors predicting the outcome of disease activity assessment in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;**15**:1859–66. doi:10.1002/ibd.20975
- 416 af Björkesten C-G, Nieminen U, Turunen U, *et al.* Surrogate markers and clinical indices, alone or combined, as indicators for endoscopic remission in anti-TNF-treated luminal Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 2012;**47**:528–37. doi:10.3109/00365521.2012.660542
- 417 Rigueiro M, Rodemann J, Kip KE, *et al.* Physician assessment of ulcerative colitis activity correlates poorly with endoscopic disease activity. *Inflamm Bowel Dis* 2011;**17**:1008–14. doi:10.1002/ibd.21445
- 418 Cellier C, Sahmoud T, Froguel E, *et al.* Correlations between clinical activity, endoscopic severity, and biological parameters in colonic or ileocolonic Crohn's disease. A prospective multicentre study of 121 cases. The Groupe d'Etudes Thérapeutiques des Affections Inflammatoires Digestives. *Gut* 1994;**35**:231–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7508411> (accessed 12 Jun 2018).
- 419 Vrabie R, Kane S. Noninvasive Markers of Disease Activity in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2014;**10**:576–84. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4991533/pdf/GH-10-576.pdf> (accessed 18 Jan 2018).
- 420 Lobatón T, Rodríguez-Moranta F, Lopez A, *et al.* A new rapid quantitative test for fecal calprotectin predicts endoscopic activity in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2013;**19**:1034–42. doi:10.1097/MIB.0b013e3182802b6e
- 421 Garcia-Planella E, Mañosa M, Cabré E, *et al.* Fecal Calprotectin Levels Are Closely Correlated with the Absence of Relevant Mucosal Lesions in Postoperative Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2016;**22**:2879–85. doi:10.1097/MIB.0000000000000960
- 422 Husebye E, Ton H, Johne B. Biological variability of fecal calprotectin in patients referred for colonoscopy without colonic inflammation or neoplasm1. *Am J Gastroenterol* 2001;**96**:2683–7. doi:10.1111/j.1572-0241.2001.04126.x
- 423 Du L, Foshaug R, Huang VW, *et al.* Within-stool and Within-day Sample Variability of Fecal Calprotectin in Patients With Inflammatory Bowel Disease: A Prospective Observational Study. *J Clin Gastroenterol* 2018;**52**:235–40. doi:10.1097/mcg.0000000000000776
- 424 Lasson A, Stotzer P-O, Öhman L, *et al.* The intra-individual variability of faecal calprotectin: A prospective study in patients with active ulcerative colitis. *J Crohn's Colitis* 2014;**9**:26–32. doi:10.1016/j.crohns.2014.06.002
- 425 Calafat M, Cabré E, Mañosa M, *et al.* High Within-day Variability of Fecal Calprotectin Levels in Patients with Active Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2015;**21**:1072–6.

doi:10.1097/MIB.0000000000000349

- 426 Zhou Y, Zech Xu Z, He Y, *et al.* Gut Microbiota Offers Universal Biomarkers across Ethnicity in Inflammatory Bowel Disease Diagnosis and Infliximab Response Prediction. *mSystems* 2018;**3**:e00188-17. doi:10.1128/mSystems.00188-17
- 427 Koutroumpakis E, Katsanos KH. Implementation of the simple endoscopic activity score in crohn's disease. *Saudi J Gastroenterol* 2016;**22**:183–91. doi:10.4103/1319-3767.182455
- 428 Peyrin-Biroulet L, Sandborn W, Sands BE, *et al.* Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target. *Am J Gastroenterol* 2015;**110**:1324–38. doi:10.1038/ajg.2015.233
- 429 Liverani E, Scaiola E, Digby RJ, *et al.* How to predict clinical relapse in inflammatory bowel disease patients. *World J Gastroenterol January* 2016;**21**:1017–33. doi:10.3748/wjg.v22.i3.1017
- 430 Tibble JA, Sigthorsson G, Bridger S, *et al.* Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000;**119**:15–22.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10889150> (accessed 21 Feb 2018).
- 431 Konikoff MR, Denson LA. Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;**12**:524–34. doi:10.1097/00054725-200606000-00013
- 432 Lobatón T, López-García A, Rodríguez-Moranta F, *et al.* A new rapid test for fecal calprotectin predicts endoscopic remission and postoperative recurrence in Crohn's disease. *J Crohn's Colitis* 2013;**7**:e641–51. doi:10.1016/J.CROHNS.2013.05.005
- 433 Lin J-F, Chen J-M, Zuo J-H, *et al.* Meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2014;**20**:1407–15. doi:10.1097/MIB.0000000000000057
- 434 D'Haens G, Ferrante M, Vermeire S, *et al.* Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012;**18**:2218–24. doi:10.1002/ibd.22917
- 435 Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A, *et al.* Fecal Calprotectin More Accurately Reflects Endoscopic Activity of Ulcerative Colitis than the Lichtiger Index, C-reactive Protein, Platelets, Hemoglobin, and Blood Leukocytes. *Inflamm Bowel Dis* 2013;**19**:332–41. doi:10.1097/MIB.0b013e3182810066
- 436 Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A, *et al.* Ulcerative Colitis: Correlation of the Rachmilewitz Endoscopic Activity Index with Fecal Calprotectin, Clinical Activity, C-reactive Protein, and Blood Leukocytes Background: The accuracy of noninvasive markers for the. doi:10.1002/ibd.20986
- 437 Takahashi K, Nishida A, Fujimoto T, *et al.* Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease. *Digestion* 2016;**93**:59–65. doi:10.1159/000441768
- 438 Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Bourreille A, *et al.* Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000;**47**:397–403. doi:10.1136/GUT.47.3.397
- 439 Bryant RV, Winer S, SPL T, *et al.* Systematic review: Histological remission in inflammatory bowel disease. Is 'complete' remission the new treatment paradigm? An IOIBD initiative. *J Crohn's Colitis* 2014;**8**:1582–97. doi:10.1016/j.crohns.2014.08.011
- 440 Baars JE, Nuij VJAA, Oldenburg B, *et al.* Majority of patients with inflammatory bowel disease in clinical remission have mucosal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2012;**18**:1634–40.

Bibliografia

- doi:10.1002/ibd.21925
- 441 Riley SA, Mani V, Goodman MJ, *et al.* Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut* 1991;**32**:174–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1864537> (accessed 23 Feb 2018).
- 442 Burisch J, Jess T, Martinato M, *et al.* The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J Crohns Colitis* 2013;**7**:322–37. doi:10.1016/j.crohns.2013.01.010
- 443 Nurmi E, Haapamäki J, Paavilainen E, *et al.* The burden of inflammatory bowel disease on health care utilization and quality of life. *Scand J Gastroenterol* 2013;**48**:51–7. doi:10.3109/00365521.2012.685750
- 444 Magalhães J, Castro FD de, Carvalho PB, *et al.* Quality of life in patients with inflammatory bowel disease: importance of clinical, demographic and psychosocial factors. *Arq Gastroenterol* 2014;**51**:192–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25296078> (accessed 23 Feb 2018).
- 445 Guinane CM, Cotter PD. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therap Adv Gastroenterol* 2013;**6**:295–308. doi:10.1177/1756283X13482996
- 446 Knights D, Parfrey LW, Zaneveld J, *et al.* Human-associated microbial signatures: Examining their predictive value. *Cell Host Microbe*. 2011;**10**:292–6. doi:10.1016/j.chom.2011.09.003
- 447 Waldschmitt N, Metwaly A, Fischer S, *et al.* Microbial Signatures as a Predictive Tool in IBD - Pearls and Pitfalls. *Inflamm Bowel Dis* 2018;**24**:1123–32. doi:10.1093/ibd/izy059
- 448 Papa E, Docktor M, Smillie C, *et al.* Non-invasive mapping of the gastrointestinal microbiota identifies children with inflammatory bowel disease. *PLoS One* 2012;**7**:e39242. doi:10.1371/journal.pone.0039242
- 449 Hugerth LW, Andreasson A, Talley NJ, *et al.* No distinct microbiome signature of irritable bowel syndrome found in a Swedish random population. *Gut* 2019;:1–9. doi:10.1136/gutjnl-2019-318717
- 450 Kopylov U, Ben-Horin S, Seidman E. Therapeutic drug monitoring in inflammatory bowel disease. *Ann. Gastroenterol.* 2014;**27**:304–12. doi:10.1097/mog.0000000000000536
- 451 Papamichael K, Cheifetz AS, Melmed GY, *et al.* Appropriate Therapeutic Drug Monitoring of Biologic Agents for Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2019;**17**:1655-1668.e3. doi:10.1016/j.cgh.2019.03.037
- 452 Wang SL, Hauenstein S, Ohrmund L, *et al.* Monitoring of adalimumab and antibodies-to-adalimumab levels in patient serum by the homogeneous mobility shift assay. *J Pharm Biomed Anal* 2013;**78–79**:39–44. doi:10.1016/j.jpba.2013.01.031
- 453 Steenholdt C. Use of infliximab and anti-infliximab antibody measurements to evaluate and optimize efficacy and safety of infliximab maintenance therapy in Crohn's disease. *Dan Med J* 2013;**60**.
- 454 Vande Casteele N, Feagan BG, Gils A, *et al.* Therapeutic drug monitoring in inflammatory bowel disease: Current state and future perspectives. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2014;**16**:378. doi:10.1007/s11894-014-0378-0
- 455 Kolho KL, Korpela K, Jaakkola T, *et al.* Fecal microbiota in pediatric inflammatory bowel disease and its relation to inflammation. *Am J Gastroenterol* 2015;**110**:921–30. doi:10.1038/ajg.2015.149
- 456 Rajca S, Grondin V, Louis E, *et al.* Alterations in the intestinal microbiome (Dysbiosis) as a predictor of relapse after infliximab withdrawal in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2014;**20**:978–86. doi:10.1097/MIB.0000000000000036

- 457 Chong PP, Chin VK, Looi CY, *et al.* The microbiome and irritable bowel syndrome - A review on the pathophysiology, current research and future therapy. *Front Microbiol* 2019;**10**:1–23. doi:10.3389/fmicb.2019.01136
- 458 Pimentel M, Lembo A, Chey WD, *et al.* Rifaximin Therapy for Patients with Irritable Bowel Syndrome without Constipation. *N Engl J Med* 2011;**364**:22–32. doi:10.1056/NEJMoa1004409
- 459 Moraes-Filho JP, Quigley EMM. Microbiota intestinal e função dos probióticos na síndrome do intestino irritável: Uma revisão. *Arq. Gastroenterol.* 2015;**52**:331–8. doi:10.1590/S0004-28032015000400015
- 460 Ford AC, Quigley EMM, Lacy BE, *et al.* Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2014;**109**:1547–62. doi:10.1038/ajg.2014.202
- 461 Rodiño-Janeiro BK, María V, Carmen A-C, *et al.* A Review of Microbiota and Irritable Bowel Syndrome: Future in Therapies. Published Online First: 2018. doi:10.1007/s12325-018-0673-5
- 462 Costello ME, Ciccía F, Willner D, *et al.* Brief Report: Intestinal dysbiosis in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheumatol* 2015;**67**:686–91. doi:10.1002/art.38967
- 463 Malagón M, Ramió-Pujol S, Serrano M, *et al.* Reduction of faecal immunochemical test false-positive results using a signature based on faecal bacterial markers. *Aliment Pharmacol Ther* 2019;**49**:1410–20. doi:10.1111/apt.15251
- 464 Ramió-Pujol S, Amoedo J, Serra-Pagès M, *et al.* A novel distinctive form of identification for differential diagnosis of irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease, and healthy controls. *GastroHep* 2020;:193–204.

