



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Iria
Bastón Rey

Tesis doctoral

Modificación de los genotipos
bacteroidales en pacientes con
colitis ulcerosa y su aplicación
en la práctica clínica

Santiago de Compostela, 2024

Programa de doctorado en Investigación Clínica en Medicina

TESIS DOCTORAL

**MODIFICACIÓN DE LOS GENOTIPOS
BACTEROIDALES EN PACIENTES CON
COLITIS ULCEROSA Y SU APLICACIÓN EN LA
PRÁCTICA CLÍNICA**

Autora

Iria Bastón Rey

Directores: Juan Enrique Domínguez Muñoz

Manuel Barreiro de Acosta

Tutor: Juan Enrique Domínguez Muñoz

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA EN MEDICINA

SANTIAGO DE COMPOSTELA / LUGO 2024

Conflicto de interés

Yo, Iria Bastón Rey, con DNI 45872351R, presento esta tesis exponiendo, conforme a lo requerido, el siguiente conflicto de interés:

Declaro que soy titular de la solicitud de una patente, desarrollada en el contexto de esta tesis de doctorado

- Solicitante: Universidade de Santiago de Compostela/Servicio Galego de Saúde
- Número de solicitud: EP22382873.2
- Fecha de solicitud: 22/09/2022

Fdo. Iria Bastón Rey

Financiación

Este estudio ha sido financiado tras la obtención de la I beca GETECCU – MSD otorgada en la XXVII reunión nacional de GETECCU el 8/10/2016 al proyecto “Modificación de los genotipos bacteroidales en pacientes con colitis ulcerosa y su aplicación en la práctica clínica”

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, expresar mi más sincero agradecimiento al equipo de investigación básica que ha contribuido de manera fundamental al desarrollo de este trabajo. Jose, Rosa Ana, sin vuestra dedicación, conocimientos y apoyo este trabajo no se hubiese podido realizar. Vuestra labor ha sido crucial para entender cómo los hallazgos en el laboratorio pueden traducirse en beneficios tangibles para los pacientes. Sin esta conexión entre la investigación básica y la práctica clínica, los médicos clínicos no podríamos hacer nada por mejorar la salud de nuestros pacientes. Vuestra pasión por la ciencia y vuestro compromiso con la investigación han sido una inspiración. Aprecio enormemente el tiempo, la paciencia y los esfuerzos que habéis dedicado para ayudarme a comprender mejor los fundamentos básicos de la EII y para proporcionarme los recursos necesarios para llevar a cabo esta investigación. Paula, Iria sois las mejores compañeras de laboratorio que pude tener, muchas gracias por vuestra sonrisa, disponibilidad y ayuda siempre que la necesité.

A mis directores de tesis:

Enrique, gracias por tu visión y orientación. Tu constante énfasis en la importancia de la investigación hace comprender la relevancia de llevar a cabo estudios que contribuyan al avance y la mejora de los estándares de atención médica.

Manu, tu apoyo incondicional ha sido fundamental para mi crecimiento profesional y personal. Gracias por las oportunidades que me has brindado y tu disposición en todos los momentos de mi vida. Eres un gran amigo.

GRACIAS a todo el servicio de Aparato Digestivo, compañeros médicos que no dudáis en echar una mano en lo que haga falta, enfermería, auxiliares y celadores que nunca habéis puesto una pega ante la realización de estudios y hacéis fácil y divertido el día a día. Sol, Laura especialmente deciros gracias por el ambiente que creáis dentro del equipo de investigación y fuera de él.

A GETECCU, gracias por proporcionar orientación experta y oportunidades de aprendizaje que han enriquecido mi desarrollo académico y personal. Sin la beca otorgada, este trabajo no hubiese sido posible. GETECCU para mi significa “casa llena de amigos”.

A mi familia, Pili, Toño Marilar y Mencía pilar fundamental que nunca cae. Gracias por estar siempre ahí y no perder la esperanza de que leyese esta tesis. Gracias a la familia Bastón, Castiñeiras y Fox por poner todos los medios a su alcance para finalizar este trabajo, en Manchester no se para, pero se escribe bien.

A mi red de amigos, vuestra presencia incondicional y vuestros ánimos para continuar han hecho posible la elaboración de este trabajo. Soy muy afortunada por teneros. Gracias Andrea por ser mi compañera de camino. Anita, mi luz y ejemplo. Nuria mi complemento perfecto.

Pau fuiste, eres y serás siempre mi mitad.

A nuestros pacientes de EII, gracias por vuestra confianza.

RESUMEN

Las alteraciones genéticas asociadas al sistema inmune, la disbiosis de la microbiota intestinal unidos a la influencia del ambiente parecen ser los responsables del desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal. Esta tesis ha profundizado en el estudio de la microbiota intestinal y dentro de esta se ha centrado en el filo Bacteroidetes uno de los dos filos mayoritarios en el ser humano. Varios estudios han encontrado variabilidad en cuanto a la abundancia de bacterias pertenecientes al filo Bacteroidetes en pacientes con EII. Además de las observaciones generales sobre la abundancia, varios investigadores también han encontrado cambios específicos en ciertas especies bacterianas dentro de este filo pudiendo presentar implicaciones funcionales que inducen cambios en la respuesta inmune dando lugar a un aumento de la actividad inflamatoria a este nivel. La tesis se compone de un estudio inicial retrospectivo con inclusión de 52 pacientes con EII (26 con colitis ulcerosa (CU) y 26 con enfermedad de Crohn (EC)). Mediante la realización de una colonoscopia indicada por práctica clínica habitual se obtuvieron biopsias de la mucosa colónica que posteriormente se utilizaron en el desarrollo de la técnica de detección de los diferentes genotipos de Bacteroidetes. Entre los diferentes genotipos encontrados se identificó uno al que llamamos genotipo C4 en el 86,2% de los pacientes activos frente a un 26,1% de los inactivos. También la presencia de este genotipo se asoció de manera significativa a la necesidad de cambio de tratamiento al año ($p=0,0001$), y a la necesidad de esteroides en el primer año tras la colonoscopia ($p=0,007$). La presencia del genotipo C4 no se vio influenciada por la extensión de la enfermedad ni en pacientes con CU ni en pacientes con EC. Sin embargo, sí se observó una buena correlación entre el porcentaje de genotipo C4 y el índice endoscópico Mayo con una mayor concentración a medida que aumenta la gravedad de las lesiones endoscópicas visualizadas en pacientes con CU. No se observó una buena correlación entre el porcentaje de genotipo C4 y el índice endoscópico SES-CD en pacientes con EC. El siguiente paso de la tesis fue realizar un estudio prospectivo comparando los genotipos de Bacteroidetes en pacientes con CU y controles sanos. Se incluyeron 17 pacientes con CU de debut obteniéndose muestras fecales y biopsias de la mucosa colónica y 17 controles sanos de los que se obtuvieron muestras fecales. El genotipo C4 se encontró en un 59% de las muestras fecales de los pacientes frente al 5,9% de los controles sanos ($p=0,002$). En los 17 pacientes, al comparar la presencia de los diferentes genotipos

encontrados en heces y biopsias observamos la aparición del genotipo C4 en el 59% de las heces y en el 64,7% de las biopsias. La asociación de C4 en heces y el grado de actividad endoscópica e histológica no fue significativa. El 80% y el 50% de los pacientes con índice endoscópico Mayo 3 y 2 respectivamente presentaron en sus muestras fecales genotipo C4. Posteriormente a partir de la secuenciación del genotipo C4 se creó una sonda de reconocimiento que permitió la cuantificación de este genotipo C4 en la totalidad de las muestras obtenidas en los pacientes con CU de debut. La mediana de abundancia mediante qPCR de genotipo C4 en heces de los controles fue de 0,37 fg con un RIQ (0,35-4,87) mientras que la mediana en heces de los casos fue significativamente superior 1218,1 fg (RIQ 190,1 - 4278,9) $p = (0,001)$. Mediante la creación de una curva ROC el área bajo la curva que obtuvimos para la discriminación entre pacientes con CU e individuos sanos fue de 0,941. El punto de corte óptimo que maximizó el porcentaje total de clasificaciones correctas fue 68 fg dado que con él se obtuvo una sensibilidad del 100%, una especificidad del 82%, un valor predictivo positivo del 85% y un valor predictivo negativo del 100%.

En la última parte de la tesis realizamos un estudio experimental en ratones empleando 15 ratones hembra Swiss ICR-CD1. Fueron divididos en 3 grupos de 5 ratones cada uno con inoculación por vía rectal mediante sonda anal de PBS 1X en el grupo 1, inoculación de un pool bacteriano de heces de un individuo sano en el grupo 2 y de un pool bacteriano de un paciente con EC activa con presencia del genotipo C4 en el grupo 3. Tras 4 días se realizaron los cortes histológicos del intestino y se realizó el estudio de los Bacteroidetes presentes en las muestras fecales de los ratones. Se observó engrosamiento parietal en el 60% de los ratones que habían sido inoculados con las bacterias del paciente con EC activa mientras que no se observó este engrosamiento en ningún ratón inoculado con bacterias de controles sanos ni en los ratones control. Pudimos observar tanto en la muestra de raspado intestinal como de heces el asentamiento de bacterias humanas en el grupo de ratones inoculados con heces de pacientes con EC. El grupo de ratones inoculados con heces de controles sanos y el grupo de ratones control no presentaron asentamiento de microbiota humana ni en muestra fecal ni en raspado.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	16
1.1 Enfermedad inflamatoria intestinal. Conceptos Generales.....	16
1.2 Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal.....	17
1.3 Clasificación de la enfermedad inflamatoria intestinal.....	18
1.4 Etiopatogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal.....	19
1.4.1 Factores genéticos	20
1.4.2. Factores inmunológicos.....	22
1.4.3. Factores ambientales	25
1.4.4. Factores microbiológicos	30
1.5 Diagnóstico de la enfermedad inflamatoria intestinal.....	30
1.6 Tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal	35
1.7 Microbiota intestinal	38
1.8 Técnicas para el estudio de la microbiota intestinal.....	46
1.8.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	46
1.8.2 Electroforesis en Gel de Campo pulsado	47
1.8.3 MALDI-TOF MS	47
1.8.4 Metagenómica	48
1.8.5 Metatranscriptómica.....	48
1.8.6 Metabolómica.....	48
1.8.7 Metaproteómica.....	49
1.9 Microbiota intestinal y enfermedad inflamatoria intestinal.....	49
1.9.1 Conceptos generales	49
1.9.2 Modelos animales de EII.....	51
1.9.3 Diversidad y estabilidad.....	52
1.9.4 Alteraciones específicas de la microbiota	54
1.10. Microbiota intestinal como diana terapéutica	59
1.10.1 Probióticos.....	59
1.10.2 Trasplante de microbiota fecal	61
2. HIPÓTESIS.....	64
3. OBJETIVOS.....	65
4. MATERIAL Y MÉTODOS	66
4.1 Diseño del estudio	66
4.2 Población	66
4.3 Descripción de la intervención.....	67

4.4 Variables del estudio y definiciones	68
4.5 Procesado de las muestras	69
4.5.1 Obtención y almacenaje de las muestras.....	69
4.5.2 Extracción de ADN	69
4.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	70
4.5.4 Ligamiento, transformación y clonación.....	71
4.5.5 Obtención de genotipos asociados a Bacteroidetes.....	71
4.5.6 Concentración y purificación del producto de PCR y RFLP	74
4.5.7 Creación de primers y sonda TaqMan de reconocimiento de un genotipo específico	74
4.5.8 Experimento en ratones (Estudio 3)	76
4.6 Análisis estadístico.....	77
4.7 Aspectos éticos:	78
5. RESULTADOS	80
5.1 Resultados Estudio 1	80
5.1.1. Características de los pacientes	80
5.1.2. Genotipos Bacteroidetes.....	88
5.2. Resultados Estudio 2	95
5.2.1 Características de los pacientes	95
5.2.2 Genotipos Bacteroidetes.....	98
5.3. Creación de SONDA de detección de genotipo C4.....	104
5.4 Resultados Estudio 3. Experimento en ratones.....	107
6. DISCUSIÓN	111
7. CONCLUSIONES.....	139
8. BIBLIOGRAFÍA.....	140
9. ANEXOS.....	165
9.1 Dictamen del comité autonómico de ética de la investigación de Galicia.....	165
9.2 Clasificación AEMPS	167
9.3 Hoja de información al/la participante adulto/a.....	168
9.4. Permiso uso de imágenes.....	179

ABREVIATURAS

AIEC: *E Coli* adherente-invasiva

ARN: ácido ribonucleico

ARNr: ARN ribosómico

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CAGE: cap analysis of gene expression

CDAI: Crohn's disease activity index

CF: Calprotectina fecal

CU: Colitis ulcerosa

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxinucleótidostrifosfato

DSS: Sulfato sódico de dextrano

EC: Enfermedad de Crohn

ECCO: European Crohn's and Colitis Organisation

EII-I: Enfermedad Inflamatoria Inclasificable

EII: Enfermedad Inflamatoria Intestinal

FC: frecuencia cardíaca

FNkB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

GALT: *Gut associated lymphoid tissue*

GWAS: *Genome-Wide Association Studies*

Hb: hemoglobina

HMP: *The Human Microbiome Project*

IC: intervalo de confianza

IFN: interferon

Ig: inmunoglobulina

IL: interleukina

iTReg: Linfocitos T reguladores inducidos

MAP: *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*

NEE: nutrición enteral exclusiva

NGS: *Next Generation Sequencing*

NK: *Natural Killer*

NOD2: dominio de oligomerización de nucleótidos 2

Nt: Nucleótidos

nTReg: Linfocitos T reguladores naturales

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PPAR- γ : receptor gamma de proliferadores peroxisómicos activados

ROS: especies reactivas de oxígeno

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TGI: Tracto gastro intestinal

Th: linfocitos T helper

TLR: receptores *Toll like*

TMF: Trasplante de microbiota fecal

TNBS: ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico

TNFalfa: factor de necrosis tumoral alfa

TReg: Linfocitos T reguladores

VSG: velocidad de sedimentación globular

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de Montreal: Enfermedad de Crohn	18
Tabla 2. Clasificación de Montreal: Gravedad Colitis ulcerosa.....	19
Tabla 3. Índice Mayo endoscópico.....	33
Tabla 4. Índice SES-CD: íleon + C. derecho + C. transversal + C. izquierdo + recto.....	34
Tabla 5. Datos de secuenciación del fragmento de interés clonado con <i>primers</i> REI.	72
Tabla 6. Características de los pacientes	80
Tabla 7. Parámetros analíticos globales y según el tipo de enfermedad.	84
Tabla 8. Parámetros analíticos globales y según actividad endoscópica.....	85
Tabla 9. Genotipo bacteroidal en función del tipo de EII	89
Tabla 10. Genotipo bacteroidal en función de la presencia de actividad	90
Tabla 11. Regresión logística univariable/multivariable de factores asociados a actividad	91
Tabla 12. Asociación del genotipo C4 y diferentes variables en relación a actividad	92
Tabla 13. Características de los pacientes al diagnóstico.....	95
Tabla 14. Parámetros analíticos al debut, 4 meses y al año del diagnóstico de CU.....	96
Tabla 15. Datos de secuenciación de los diferentes genotipos bacteroidales (<i>primers</i> REI). ..	98
Tabla 16. Genotipo bacteroidal en heces en los casos y los controles	99
Tabla 17. Genotipo bacteroidal en heces y biopsias de los casos.....	100
Tabla 18. Regresión logística: Factores asociados a la presencia de C4 en heces de casos....	101
Tabla 19. Secuencia de los primers y la sonda C4 utilizados.....	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microbioma en las diferentes ubicaciones del cuerpo humano..	43
Figura 2. Abundancia de especies bacterianas en pacientes con EII e individuos sanos.	52
Figura 3. Perfiles de corte de los genotipos encontrados a lo largo de este estudio.....	73
Figura 4. Hábito tabáquico según el tipo de Enfermedad inflamatoria intestinal	81
Figura 5. Extensión de la colitis ulcerosa	82
Figura 6. Extensión y patrón de los pacientes con enfermedad de Crohn.....	82
Figura 7. Índice endoscópico Mayo en los pacientes con colitis ulcerosa	83
Figura 8. Índice endoscópico SESCO en pacientes con Enfermedad de Crohn.....	83
Figura 9. Niveles de leucocitos, VSG, proteína C reactiva y CF y actividad endoscópica.....	86
Figura 10. Tratamientos según el tipo de EII	87
Figura 11. Fármacos biológicos en el momento de la colonoscopia	87
Figura 12. Fármacos biológicos al año de la colonoscopia	88
Figura 13. Genotipos bacteroidales en función de la actividad de la enfermedad	90
Figura 14. Correlación de porcentaje de genotipo C4 e índice Mayo endoscópico	93
Figura 15. Correlación de porcentaje de genotipo C4 y localización colitis ulcerosa.....	94
Figura 16. Síntomas presentes al diagnóstico.....	96
Figura 17. Tratamientos en el primer año tras el diagnóstico	97
Figura 18. Uso de corticoides en el primer año tras el diagnóstico de colitis ulcerosa.....	98
Figura 19. Genotipos bacteroidales en heces y biopsias.	100
Figura 20. Porcentaje de C4 según extensión de la colitis ulcerosa	102
Figura 21. Porcentaje de C4 según Mayo endoscópico y gravedad en estudio AP.....	102

Figura 22. Niveles de CF y proteína C reactiva en función de genotipo C4.....	103
Figura 23. Correlación porcentaje genotipo C4 en biopsias y heces.....	104
Figura 24. Gel de agarosa al 2% con amplicones obtenidos por PCR con los primers FGENC4/RGENC4 en casos, controles y <i>Phocaeicola dorei</i>	105
Figura 25. Secuencia de reconocimiento de C4 (sonda + primers).....	105
Figura 26. Regresión lineal qPCR	106
Figura 27. Concentración de genotipo C4 (fg) en heces de controles y pacientes con CU....	106
Figura 28. Curva ROC de la sonda de detección del genotipo C4.	107
Figura 29. Gel de agarosa que muestra la amplificación mediante PCR con primers HUM de ADN presente en heces de ratones con inoculación previa de bacterias.....	108
Figura 30. Amplificación de bacterias extraídas de ratones tras inoculación de bacterias de controles sanos y de pacientes con EC.	108
Figura 31. Cortes histológicos experimento ratones. Escala 100x.....	109
Figura 32. Concentración (fg) obtenida mediante qPCR en muestras fecales.	110

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad inflamatoria intestinal. Conceptos Generales

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) engloba una serie de trastornos intestinales de tipo inflamatorio siendo la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC) los principales. Existe un pequeño porcentaje de pacientes en los que al presentar características tanto de EC como de CU no se puede clasificar como ninguna de ellas y se denomina enfermedad inflamatoria inclasificable (EII-I) o indeterminada. Estas enfermedades presentan un curso crónico con periodos de mayor y menor intensidad de actividad y periodos de remisión en los que no se observa actividad inflamatoria. La EC se caracteriza por una afectación parcheada transmural que da origen a las diferentes presentaciones y complicaciones como son la presencia de fístulas, abscesos o estenosis que pueden afectar a cualquier área del aparato digestivo. La CU por el contrario se caracteriza por una afectación continua de la mucosa que puede localizarse en el recto y/o en el resto del colon. Los síntomas que nos orientan al diagnóstico son muy variables pero el cuadro clínico más frecuente se caracteriza por la presencia de rectorragia, distensión y dolor abdominal con diarrea y urgencia defecatoria. La etiología de estas enfermedades ha sido ampliamente investigada pero hoy en día aún se desconoce. Se han visto implicados tanto factores genéticos como inmunológicos y ambientales que se interrelacionan entre sí. La contribución de la microbiota intestinal en la patogenia de la EII hoy en día se presenta como indiscutible, encontrándose diferentes mecanismos involucrados tanto en el desarrollo de la inflamación como en el mantenimiento de la misma. La colonización por microorganismos comensales a lo largo del tracto gastrointestinal (TGI) se inicia ya prenatalmente permitiendo el desarrollo y regulación del sistema inmune, desembocando en un estado de homeostasis entre la microbiota comensal y el hospedador. En la EII se ha demostrado un desequilibrio entre la microbiota intestinal y el sistema inmunitario de la mucosa que termina desencadenando una respuesta inflamatoria crónica. Debido a estas limitaciones en el conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad y la heterogeneidad de la misma el tratamiento en la actualidad no permite la curación. El objetivo actual de los diferentes tratamientos es el control de los síntomas y de las lesiones en los tejidos para evitar las complicaciones y disminuir el impacto en la calidad de vida de estos pacientes [1][2]

1.2 Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal

Las primeras descripciones clínicas de pacientes con diarrea con sangre se remontan a civilizaciones griegas hace miles de años, pero la clara distinción entre enteritis y colitis ulcerosa no fue posible hasta el siglo XIX. En este momento se publicaron varias series de casos de “enteritis regional” y no fue hasta el 1888 cuando se acuñó el término “colitis ulcerosa”. La introducción del sigmoidoscopio electrónico permitió realizar el diagnóstico diferencial con otras patologías con similares presentaciones clínicas. En cuanto a la EC, en 1806 dos cirujanos describieron un caso de un paciente con una zona en el íleon engrosada con granulomas no caseificantes al observarlo al microscopio, en un principio se confundía con la tuberculosis intestinal. Casos aislados similares se publicaron en los años posteriores pero no fue hasta 1932 cuando los doctores Crohn, Ginzburg y Oppenheimer que trabajaban en el Hospital Mont Sinaí (NY, EEUU) publicaron un artículo con 14 casos de pacientes con ileítis regional terminal que clasificaban en 4 tipos: inflamación aguda, enteritis ulcerosa, estenosis y fase con fístulas [3][4]. La incidencia de la EC y de la CU ha ido incrementándose en paralelo al desarrollo del nivel socioeconómico e industrial de los diferentes países. Así Estados Unidos, Canadá, Nueva Zelanda, Australia y países del oeste de Europa son los que presentan el mayor número de pacientes afectados. En los últimos años se observa que la incidencia está incrementándose en los países ahora en vías de desarrollo. Esto sugiere que dentro de la hipótesis de etiopatogenia de la enfermedad deben de tenerse en cuenta los diferentes factores ambientales que parecen aumentar la predisposición a padecer la enfermedad [5].

Las tasas de incidencia globales son variables y se sitúan entre 0 y 24,3/100000 habitantes para CU y entre 0 y 20,2/100000 para EC. Si nos centramos en los estudios epidemiológicos a nivel europeo, se observa que tanto las tasas de CU como de EC han ido aumentando en los últimos años y en el estudio del grupo Europeo de Epidemiología (EpiCOM) se ha visto además que las tasas de incidencia anual en todos los centros de Europa occidental fueron aproximadamente el doble de las tasas obtenidas en los centros de Europa del Este. La tasa de incidencia media anual de EC fue de 6.5 (rango 0-10.7) en centros europeos Occidentales y 3.1 (rango 0.4–11.5) en centros de Europa del este, mientras que las tasas de incidencia media anual de CU fueron 10.8 (rango 2.9–31.5) y 4.1 (rango 2.4–10.3), respectivamente [6].

A nivel español los datos más recientes son del año 2017 en el que se diagnosticaron 3.611 nuevos casos de EII lo que sitúa la tasa de incidencia de EII en España en 16 casos por cada 100.000 habitantes/año (7,5 para EC, 8 para CU y 0,5 para colitis indeterminada) [7].

1.3 Clasificación de la enfermedad inflamatoria intestinal

Enfermedad de Crohn:

Hoy en día la clasificación más utilizada es la clasificación de Montreal que tiene en cuenta la edad al diagnóstico, la localización y el patrón de la enfermedad, **tabla 1** [8]

Tabla 1. Clasificación de Montreal: Enfermedad de Crohn

A (Age of diagnostic)	B (Behaviour)	L (Location)
A1 (≤ 16 años)	B1 (inflamatorio)	L1 (ileal $\pm$ ciego)
A2 (17-40 años)	B2 (estenosante)	L2 (cólica)
A3 (≥ 41 años)	B3 (fistulizante)	L3 (ileocólica)
	p (perianal)	L4 (tracto superior)

Elaboración propia

El patrón inflamatorio es el más frecuente al diagnóstico (hasta un 80% de los casos) pero a medida que pasan los años el fenotipo va evolucionando siendo a los 20 años estenosante hasta en un 30% o penetrante/fistulizante en el 56%. Esto no es así en cuanto a la localización dado que se ha visto que suele mantenerse a lo largo de la historia natural de la enfermedad. La afectación más frecuente que aparece en el 40% de los casos es la ileocólica, seguida de la ileal en un 30%, colónica en un 25% y la afectación del tracto superior que aparece en un 5% de los casos [9].

Se han descrito diferentes factores que predicen un curso complicado de esta enfermedad como son la edad joven al diagnóstico, la localización ileocólica, la necesidad de tratamiento esteroideo en el primer brote y el tabaquismo [10].

Colitis ulcerosa:

Para describir la extensión de la enfermedad la clasificación más utilizada es la de Montreal. Divide la enfermedad según la extensión (E) en E1: proctitis (cuando la extensión se limita al recto), E2: colitis izquierda (cuando la inflamación alcanza hasta el ángulo esplénico) y E3:

colitis extensa (la afectación involucra hasta el ángulo hepático o a todo el colon). No obstante, se observan casos en los que, en el diagnóstico inicial la enfermedad se limita al recto y a lo largo de la evolución se extiende a colon izquierdo o a la totalidad del marco colónico siendo este un factor de riesgo para un curso más agresivo de la enfermedad. La pancolitis suele verse en el 25% de los pacientes mientras que la proctitis y colitis izquierda en torno al 40% y 35% respectivamente. En la clasificación de Montreal también se incluye la gravedad (S) dividiendo la enfermedad en S0: inactivo, S1: actividad leve, S2: actividad moderada y S3: actividad grave (Tabla 2) [11].

Tabla 2. Clasificación de Montreal: Gravedad Colitis ulcerosa

S0	Ausencia de síntomas (remisión clínica)
S1 (leve)	≤ 4 deposiciones/día (+/- sangre) No síntomas sistémicos Marcadores Inflamación normales
S2 (moderada)	>4 deposiciones/día (sangre) Síntomas mínimos de inflamación sistémica
S3 (grave)	≥ 6 deposiciones/día (sangre) FC ≥ 90 lpm T ^a ≥ 37,5° C Hb < 10,5 g/dl VSG ≥ 30 mm/h

Elaboración propia

1.4 Etiopatogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal

La etiopatogenia de la EII hoy en día es desconocida. Se han barajado múltiples hipótesis sobre las posibles causas responsables del origen de la misma y cada día tenemos un mayor conocimiento sobre los factores implicados en su aparición. Actualmente, son tres grupos de ideas las que parecen entrelazarse para dar origen a este tipo de enfermedades: las primeras se basan en alteraciones genéticas asociadas al sistema inmune, las segundas a cambios en la homeostasis del tubo digestivo secundarios a la alteración de la microbiota intestinal y, las últimas, hacen referencia a la influencia directa del ambiente. En la actualidad, de manera general, se cree que tanto la CU como la EC son resultado de una respuesta inmune alterada desencadenada por factores ambientales en individuos genéticamente susceptibles [12]

1.4.1 Factores genéticos

El papel de los factores genéticos hoy en día es indiscutible, se han descrito más de 200 loci implicados en el desarrollo de la EII. Sin embargo, estas alteraciones genéticas no son suficientes por sí solas ya que existen individuos con estas modificaciones predisponentes que no desarrollan la enfermedad. Esto podría explicarse mediante los cambios epigenéticos que regularían los patrones de expresión génica y modularían la respuesta de cada célula a los factores ambientales [13].

Se ha visto una superposición de riesgo genético entre la EC y CU, así como entre la EII y otras enfermedades inmunomediadas. Aproximadamente el 30% de los loci iniciales descritos para la EC se replicaron en CU y en un metaanálisis se identificó que 110 de los 163 loci descritos en ese momento están asociados con ambos subtipos de enfermedades pero generalmente muestran intensidad de efectos diferentes en cada subtipo de enfermedad [14] [15]. Uno de los genes más estudiados es el CARD15 alojado en el cromosoma 16 que codifica el receptor dominio de oligomerización de nucleótidos 2 (NOD2) cuyas variantes originan mayor susceptibilidad al desarrollo de la EC. NOD2 se encuentra implicado en el reconocimiento intracelular de patógenos o sus productos. Con la mutación se ve una disminución en la activación de la vía FN-kB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas). Ante la ausencia de eliminación de las bacterias en el epitelio se produce una sobreproducción local de citocinas inflamatorias que secundariamente producirían un aumento de expresión de FN-kB por otras vías dando lugar a la afectación tisular en la EC [16]. Aunque también se puede observar en población sana, entre un 10% y un 20% de los pacientes con EC presentan una variación en este gen pero en ratones con deficiencia de NOD2, se ha demostrado que no desarrollan colitis de manera espontánea pero sí lo hacen cuando sufren exposición a un antígeno microbiano que es capaz de activar a las células T excesivamente [17]. Los GWAS (*Genome-Wide Association Studies*) han permitido conocer más de 200 loci implicados, dos de los descritos en los últimos años son SLAMF8 y RORC. SLAMF8 es un receptor de superficie celular cuya expresión tiene lugar en las células mieloides activadas encargándose de regular la respuesta inflamatoria al inhibir la migración a sitios de inflamación y reprimiendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). RORC codifica ROR γ t que se trata del principal regulador transcripcional de las células Th17 y de las células linfoides innatas. Ambos juegan un papel fundamental en la barrera intestinal y defensa microbiana. Se ha demostrado que la inhibición farmacológica de ROR γ t en modelos de ratones con

inflamación intestinal presenta beneficios terapéuticos y además reduce la cantidad de células Th17 aisladas en muestras de tejido intestinal de pacientes con EII [18][19].

Otros nuevos loci identificados (como los que contienen genes integrina) se encargan de codificar proteínas que se han establecido como objetivos terapéuticos en la EII de ahí la relevancia de investigaciones en este campo hoy en marcha [20].

De todas formas, las mutaciones encontradas son muy heterogéneas entre pacientes lo que podría corresponder con las diferentes formas de presentación de la enfermedad. En algunos casos se observan patrones de expresión monogénica que son las que se suelen encontrar en edad pediátrica con historia familiar pero en la mayoría se trata de patrones poligénicos [21].

Estos loci predisponentes sólo serían responsables de una pequeña parte del desarrollo de la EII. Las modificaciones epigenéticas se definen como 1. modificaciones químicas del ADN (metilación), 2. modificaciones de la organización de la cromatina o las histonas que son proteínas componentes de los nucleosomas alrededor de los cuales se sitúa el ADN o 3. microARN que son cadenas de ARN monocatenario no codificante. Estas modificaciones regulan la expresión de genes conduciendo a la activación o a la inhibición de la transcripción y pueden ser heredables permaneciendo durante la división celular y siendo transmitidos a múltiples generaciones [22].

Los cambios epigenéticos presentan una influencia destacable en el desarrollo del epitelio intestinal y las células inmunes de la lámina propia, permitiendo una homeostasis intestinal con un correcto funcionamiento del mismo. Las modificaciones epigenéticas también pueden producir alteraciones en los niveles de citocinas en el epitelio intestinal, modulando de esta manera los niveles de inflamación. De todas formas la existencia de una modificación epigenética no significa, por sí sola, que se va a producir una afectación en la transcripción del gen asociado sino que se sabe que en muchas ocasiones son secundarios a la interacción con el ambiente [23]. En los últimos años se está enfocando el estudio de los cambios epigenéticos en mejorar los tratamientos en los pacientes con EII. Se están buscando fármacos con capacidad de modular las enzimas involucradas en la metilación del ADN, y la acetilación/metilación de las histonas. La principal limitación es que estos fármacos presentan una amplia actividad afectando a varias enzimas de su clase lo que conlleva en el momento actual a efectos secundarios inadmisibles. Se está estudiando aumentar la especificidad de estos medicamentos para reducir la inflamación y conseguir la curación del epitelio intestinal [24]. Otra rama de investigación en marcha de la epigenética es la identificación de biomarcadores para establecer

el diagnóstico precoz de la EII, en un estudio reciente con 94 pacientes con EII y controles sanos mediante la técnica CAGE (*cap analysis of gene expression*) encontraron que con sólo 35 perfiles de inicio de transcripción podían distinguir si se trataba de EC, CU o control sano [25]. En el estudio de Torres J *et al*, también se logró la identificación de un conjunto de anticuerpos y proteínas séricas que permitieron predecir el desarrollo de una EC a 5 años con un área bajo la curva ROC de 0,76. En contraste, no lograron identificar biomarcadores asociados con el diagnóstico futuro de CU [26]. Esto supone un ejemplo de cómo la integración de la información de la expresión génica y la epigenética permitiría obtener un diagnóstico precoz que permitiría minimizar las consecuencias y complicaciones de la demora en la detección y fallo de tratamiento de estos pacientes.

1.4.2. Factores inmunológicos

En los pacientes con EII se ha visto una activación incontrolada del sistema inmune contra la microbiota intestinal comensal. Esta reacción se denomina “pérdida de tolerancia” en el que participan los siguientes factores [27]:

- Defectos en el sistema inmune innato
- Disregulación del sistema inmune adaptativo
- Disbiosis

a) Sistema inmune innato

Está compuesto por barreras anatómicas, receptores que detectan patrones moleculares de microorganismos y múltiples tipos de células, incluidos neutrófilos, células dendríticas, monocitos, macrófagos y los linfocitos *natural killer* (NK), que permiten una respuesta inflamatoria rápida y efectiva. Se trata por tanto de la primera línea de defensa pero por otro lado también se encarga de activar a la respuesta inmune adaptativa mediante la producción de citoquinas y la presentación de antígenos [28]. Se ha observado en los pacientes con EII variaciones del gen MUC2 y disminución de células caliciformes que son responsables de cambios en el grosor de la capa de mucina. Esto produce alteraciones en la permeabilidad del epitelio lo que aumenta la translocación de bacterias entéricas a la lámina propia del intestino que conduce a un aumento de la exposición antigénica y secundariamente a la activación inmunitaria [29]. Por otra parte, también se han encontrado defectos en las células epiteliales intestinales que conforman la barrera intestinal. Estas células se encargan de sintetizar y secretar

diferentes enzimas y péptidos antimicrobianos con actividad bactericida y además, mediante la secreción de citoquinas quimiotácticas controlan las poblaciones del sistema inmune innato y adaptativo [30]. La inmunidad innata juega un papel fundamental en el reconocimiento antigénico. Este reconocimiento se realiza mediante receptores de reconocimiento de patrón (ej. tipo Toll y tipo NOD) expresados en macrófagos, células dendríticas y células epiteliales. En la EII se ha observado una activación mantenida de estos receptores perdiéndose la homeostasis del sistema inmune conduciendo a una inflamación crónica [31].

Tanto en la EC como en la CU existe una amplia variedad de estirpes celulares del sistema inmune innato implicadas. Se ha visto por ejemplo una infiltración de la mucosa por neutrófilos que liberan múltiples moléculas inflamatorias y citotóxicas que originan daño proteolítico y oxidativo a nivel de los tejidos y también, se ha visto en el epitelio intestinal un aumento de macrófagos CD14+ y de células dendríticas productoras de citoquinas proinflamatorias (IL6, IL23 y TNFalfa) [32].

b) Sistema inmune adaptativo

Al contrario que el sistema inmune innato, el sistema adaptativo genera respuestas altamente específicas frente a los antígenos microbianos. Clásicamente se asoció la EC con un patrón de activación de linfocitos Th1 (tipo *helper*) que se caracteriza por síntesis aumentada de IFN gamma, TNF e IL12 y la CU con un patrón de activación de linfocitos Th2 con síntesis aumentada de IL4, IL5 e IL13 [33]. Este punto de vista está cambiando en los últimos años tras conseguir caracterizar subpoblaciones de células T efectoras Th17 claramente expandidas en el tejido inflamado versus normal de los pacientes. Se ha visto que las células T naïve pueden diferenciarse a células Th1, Th2, Th17 y T reguladoras (Treg) inducidas por citocinas, (IL-6, IL-23 y TGF- β) que son producidas como vimos previamente por las células presentadoras de antígeno que forman parte de la inmunidad innata [34].

Hoy en día se cree que la subpoblación de linfocitos Th17 juega un papel central en la inducción y el mantenimiento de la inflamación crónica a nivel intestinal. Los linfocitos Th17 son inducidos por IL23 y sintetizan citoquinas proinflamatorias IL17, IL21, IL22 e IL26. Se han visto implicados en la patogenia de diferentes enfermedades autoinmunes [35]. En la EII se han identificado múltiples genes relacionados con Th17 como son IL23R, IL12R, JAK2 y STAT3 [36]. En la mucosa y lámina propia de los pacientes con EC y CU se ha visto un aumento de activación de linfocitos Th17, así como aumento de niveles de IL23 y IL17A. La adición de

IL23 en modelos de ratón impulsa la producción de citoquinas producidas por Th17 que producen exacerbación de la colitis mientras que la administración de un anticuerpo anti-IL23 es capaz de disminuir la actividad de la misma [37].

Los linfocitos T reguladores (TReg) juegan un papel crucial en el manteniendo de la tolerancia inmune, la homeostasis intestinal y en la contribución a evitar respuestas anormales frente a bacterias comensales. Se clasifican como TReg naturales (nTReg) o TReg inducidos (iTReg). Los linfocitos iTReg se ubican en tejidos periféricos como la lámina propia y tejido linfoide asociado a intestino y se generan a partir de linfocitos T naïve (Th0) en presencia de TGF- β . En condiciones normales, los iTReg se producen impulsados por la exposición a antígenos en las superficies mucosas para así desarrollar tolerancia a antígenos presentes en la dieta y en la microbiota intestinal [38].

En los pacientes con EC y CU se ha visto un fallo en la regulación inmunitaria de los TReg; existe menor número, tienen afectada su función no siendo capaces de ejercer su efecto antiinflamatorio fisiológico y además por su plasticidad pueden transformarse en otros linfocitos. Las mutaciones en los TReg hacen que se produzcan menores concentraciones de TGF-B, una citoquina que inhibe la diferenciación de los linfocitos T efectores y de IL10, citoquina capaz de inhibir la activación y proliferación de las propias células T y por otra banda estimular la propia maduración y proliferación de las TReg (productoras a su vez de IL10) [39]. La células TReg presentan plasticidad lo que indica que en presencia de citoquinas proinflamatorias tipo IL2, IL1B, IL6 e IL23 pueden adquirir un fenotipo Th17 que como vimos está implicado en la cronificación de la inflamación [40]. En resumen, existe un eje de modulación inmune entre linfocitos Th17 y Treg. Ambos tipos celulares se restringen entre sí por lo que la existencia en la EII de la proliferación de linfocitos Th17 impide la respuesta tolerogénica de las células Treg. Esta inhibición de la respuesta está mediada por las diferentes concentraciones de las citoquinas IL-23 y TGF- β . La producción de IL-23 estabiliza el fenotipo Th17, a la vez que limita la transcripción de FoxP3 que se encarga de activar la diferenciación de las células Treg [41].

En pacientes con CU se ha encontrado que la subpoblación de linfocitos Th9 juega un papel en la etiopatogenia de la enfermedad. La IL9 es producida predominantemente por las células Th9, aunque también se ha visto que es secretada por mastocitos, eosinófilos, neutrófilos y células linfoides innatas. Para la producción de IL9 es necesaria la intervención de IL4 y TGFB [42]. En los pacientes con CU la subpoblación de Th9 está aumentada y con ello la producción

de IL9. La IL9 es fundamental en la amplificación de la respuesta de los linfocitos T ante la presencia de antígenos de la microbiota intestinal, así como en la resistencia de los neutrófilos a la apoptosis lo que se traduce en una propagación y mantenimiento de la inflamación. La IL9 podría ser un potencial marcador de actividad de la enfermedad, así como una posible diana terapéutica [43].

Linfocitos B: Las células B intervienen en la producción de anticuerpos, la presentación de antígenos y la formación de citoquinas. Las células B se diferencian a células plasmáticas y secretan IgA. En la diferenciación de las células B a células plasmáticas (que migrarán a la lámina propia) es necesario el estímulo de las IL4, IL6, IL10 y TGFB. IgA interacciona en la superficie del epitelio y es transportada al lumen donde bloquea las bacterias y toxinas mediante el reconocimiento de los epitopos patógenos [44].

Las células B también ejercen su función como células presentadoras de antígenos, pero no pueden inducir respuesta primaria de células T. Indirectamente pueden modular el efecto de la respuesta mediante la producción de IL10 producida por las células B “reguladoras” que es necesaria para la producción de las células TReg. Las células B también son capaces de producir TGFB necesaria para prevenir la disregulación de la respuesta inmune ante los alérgenos alimentarios [45]. En pacientes con EII sobre todo CU se han observado alteraciones en las células B con presencia de cambios en la metilación del ADN que afectan la ruta IL-12/23 [46]. Todos estos cambios descritos en el sistema inmune afectan inequívocamente a la población de microorganismos que habitan en el tubo digestivo. La interacción entre el sistema inmune del hospedador y la microbiota intestinal genera enterotipos. Los enterotipos se definen como *clusters* de bacterias que son comunes en los pacientes que presentan una determinada patología o alteraciones genéticas similares. A lo largo de la historia se han estudiado la asociación de diferentes patologías con los diferentes patrones de microorganismos presentes en el tracto digestivo [47]. Centrándonos en la EII, existe mucha controversia dado que por una parte se ha intentado establecer relación de causalidad directa tomando la microbiota como agente etiológico primario y por otra se podrían tomar los cambios en la microbiota de estos pacientes como colonizadores oportunistas de la actividad de la enfermedad [48].

1.4.3. Factores ambientales

En los últimos años se ha visto un aumento de la incidencia de la EII paralelamente a los cambios sociodemográficos secundarios al desarrollo económico. Esto nos sugiere la

importancia del componente ambiental en la etiopatogenia de las enfermedades inmunomediadas. Diferentes estudios epidemiológicos de cohortes prospectivas, estudios de población emigrante e inmigrante y estudios de investigación traslacional destacan la interacción de los factores ambientales, el microbioma intestinal y la actividad de la enfermedad [49][50].

En un metaanálisis reciente se identificaron 9 factores que demostraron asociarse al desarrollo de EII: tabaquismo, residencia urbana, apendicetomía, amigdalectomía, exposición a antibióticos, uso de anticonceptivos orales, consumo de refrescos, deficiencia de vitamina D y especies de *Helicobacter* no similares a *Helicobacter pylori*. En este metaanálisis además identificaron 7 factores que demostraron ser factores protectores frente al desarrollo de EII: actividad física, lactancia materna, compartir cama, consumo de té, altos niveles de folato, altos niveles de vitamina D e infección por *H. pylori*. [51]

Los factores implicados podrían ser muy numerosos y es probablemente la interacción entre los mismos la que finalmente produce el desarrollo de la enfermedad. El concepto de exposoma incluye la suma de los múltiples factores de exposición que llenan los días, meses y décadas de la vida de una persona incluyendo la exposición a químicos, radiaciones, ruidos, alimentos, actividades físicas y el perfil único de las bacterias comensales [52].

La “teoría de la higiene” se ha sugerido como un factor más de predisposición al desarrollo de la EII. En la actualidad el desarrollo económico, ha generado una disminución en el contacto con agentes microbianos por lo que el tracto digestivo se encuentra expuesto a poblaciones microbianas menos diversas. Asociado a esto se han reducido las enfermedades infecciosas mediante el empleo de vacunas y alcantarillado y cuando se desarrollan se emplean tratamientos antibióticos para su resolución. Todo esto produce cambios en nuestra microbiota intestinal con consecuencias imprevisibles. El periodo neonatal es especialmente relevante en la determinación de la composición de la microbiota intestinal a largo plazo por lo que el consumo de antibióticos peri parto podría desencadenar una disbiosis con consecuencias a largo plazo [53]

Entre los factores de riesgo más importantes asociados a EII se encuentran el tabaco, la dieta y el uso de antibióticos:

a) Tabaco

Múltiples estudios establecen asociación entre hábito tabáquico como factor de riesgo en pacientes con EC y factor protector en los que presentan CU. El mecanismo por el cual ejerce esta acción es parcialmente conocido. En pacientes con CU se ha visto que pacientes fumadores presentan una disminución de producción de TNF α a través de la acción de la nicotina en la subunidad del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$, aumento de producción de IL10 en respuesta al monóxido de carbono del humo y aumento de la síntesis de mucina en el epitelio intestinal. En pacientes fumadores con EC se ha visto que el monóxido de carbono origina una disminución en la capacidad vasodilatadora lo que desemboca en isquemia perpetuando la inflamación y propiciando el desarrollo de fibrosis [54].

En individuos sanos, fumar aumenta el riesgo de desarrollo de EC hasta prácticamente el doble, y este riesgo está asociado al tiempo de evolución del hábito tabáquico. Se ha analizado que el cese del consumo de tabaco se ha asociado a una reducción en desarrollo de EC pero no se iguala al de la población general nunca fumadora [55].

En pacientes fumadores con EC ya diagnosticada, presentan una evolución más tórpida con desarrollo de complicaciones (fistulas y estenosis), mayor número de brotes y de ingresos hospitalarios, así como más riesgo de cirugía y de recurrencia postquirúrgica. El cese de consumo de tabaco se ha asociado a un 32% de reducción en el riesgo de brote en comparación con los que continúan fumando [56].

Por el contrario, en algunos estudios publicados, fumar parece ser protector para el diagnóstico de CU y el cese del hábito tabáquico se ha visto relacionado con un posible aumento de la incidencia de aparición de CU (HR=3,06 95% IC: 2,00-4,67) permaneciendo elevado 20 años después del cese del consumo. En algunas series se ha visto que los pacientes con CU ya diagnosticada los fumadores presentan un curso más benigno de la enfermedad con menores tasas de ingreso,, menor necesidad de corticoides y colectomía [57].

b) Dieta

El desarrollo económico y la occidentalización ha supuesto un incremento en la comida procesada. El paso de las poblaciones predominantemente rurales a urbanas se ha acompañado de aumento y cambio en el tipo de alimentación, menor actividad física y mayor estrés psicológico. En los últimos años el consumo de grasa y azúcar refinado ha aumentado globalmente. Algunos macronutrientes se han visto asociados a la EII, pero los resultados de los estudios no son concluyentes y en muchos casos son contradictorios. Se ha visto que la fibra

reduce el riesgo de la EII mientras que las grasas, la proteína animal y el azúcar lo aumentan [58][59]

Pero no solo se ha visto la influencia del tipo de comida, sino que también se ha postulado la relevancia del procesado. En estudios animales se ha visto que aditivos (aluminio, dióxido de titanio) y emulsionantes (goma zantana, maltodextrinas y carboximetilcelulosa) desencadenaron la cascada de inflamación en la mucosa intestinal actuando mediante la modificación de la microbiota y disfunción de la barrera intestinal con aumento de la translocación bacteriana [60].

Cada vez existen más estudios que demuestran una asociación entre la dieta y el microbioma intestinal. Inicialmente estudios de secuencias de ARNr16S fecales de 60 especies de mamíferos reveló la agrupación de acuerdo con la dieta (herbívoro, carnívoro y omnívoro) y la filogenia del hospedador [61].

De Filippo *et al* estudiaron el microbioma fecal de dos grupos de individuos, por una parte, niños italianos de 1 a 6 años y por otra parte niños de África subsahariana de 1 a 6 años. Observaron que los géneros de bacterias intestinales presentes en los niños de 1 a 2 años eran prácticamente superponibles explicado probablemente por la lactancia materna. Sin embargo, hubo diferencias relevantes en la microbiota intestinal en los niños a partir de los dos años de edad dado que los niños africanos eran alimentados con una dieta tradicional rica en fibra y los niños europeos eran alimentados con una dieta occidental moderna [62].

Wu *et al* demostró que una dieta a largo plazo rica en proteínas y grasas animales y baja en carbohidratos, similar a una dieta "occidentalizada", se asocia con altas cantidades de *Bacteroides* y bajas cantidades de *Prevotella*, lo que respalda el impacto de la dieta en el microbioma intestinal [63].

En la revisión realizada por el grupo de trabajo de la sociedad europea de enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (ECCO) han propuesto que los componentes dietéticos clave asociados con EC en modelos animales son dietas ricas en grasas animales, azúcares, gluten, maltodextrina, emulsionantes nanopartículas de dióxido de titanio y aluminio. Todos estos son componentes habituales de las dietas de los países desarrollados [64]. Los ratones de los modelos de EII con alimentación rica en grasas y azúcares tenían más probabilidades de desarrollar un aumento de la permeabilidad intestinal, disminución de la expresión de mucinas y engrosamiento de la mucosa. Además, estos ratones presentaron histológicamente mayor número de abscesos de cripta en comparación con el grupo de comida estándar [65].

Se cree que los aminoácidos esenciales son inmunomoduladores, como la glutamina y la arginina, y podrían estar involucrados en la mediación de la respuesta al estrés metabólico. Se ha demostrado que la adición de glutamina y arginina a la dieta de ratones mejoran los parámetros clínicos y bioquímicos de la colitis inducida [66].

Otros estudios en modelos animales de EII respaldan la importancia del calcio y las vitaminas. En ratones con colitis inducida tras la administración de la forma activa de la vitamina D se vio que presentaban mayor consistencia de las heces, menor pérdida de sangre y recuperación del peso y además se demostró que promovía la resistencia de las células del epitelio intestinal a las lesiones y disminuía la respuesta inflamatoria ante antígenos lumenales [67].

Ensayos clínicos no controlados han demostrado que varias terapias dietéticas, como la nutrición enteral exclusiva (NEE) y dietas de exclusión, pueden ser herramientas efectivas para la inducción de la remisión al debut de la EII, para el tratamiento de las complicaciones y para reducir la necesidad de intervenciones quirúrgicas por su EII [68]. La NEE sigue siendo el único tratamiento dietético establecido en la EC pediátrica (no así en edad adulta). Esta dieta induce la remisión clínica en aproximadamente el 80% de los pacientes y promueve la curación de la mucosa intestinal [69].

Recientemente se ha publicado un ensayo clínico en el que se evaluaron los efectos de una dieta individualizada llamada CD-TREAT en el microbioma intestinal, la inflamación y la respuesta clínica en un modelo de rata, adultos sanos y niños con EC. La CD-TREAT recrea la NEE mediante la exclusión de ciertos componentes de la dieta como son el gluten, la lactosa y el alcohol y el aumento de otros como vitaminas, minerales y fibra. También en esta dieta se disminuyeron los carbohidratos complejos a favor de las proteínas. En el modelo de rata, CD-TREAT y NEE produjeron cambios similares en la carga bacteriana (disminución de 0.3 ± 0.3 log₁₀ 16S copias de genes de ARNr por gramo), ácidos grasos de cadena corta, microbioma y severidad de la ileitis. En los niños que recibieron CD-TREAT, el 80% tuvieron una respuesta clínica y el 60% entraron en remisión [70].

c) Antibióticos

En la actualidad se ha generalizado el uso de tratamiento con antibioterapia, pero no sólo ante infecciones, sino que también se usan de forma extensiva en la ganadería formando parte de la cadena alimentaria. Se ha descrito que la toma de antibióticos en la edad infantil

incrementaría el riesgo de padecer la EC al promover alteraciones en la composición de la microbiota intestinal. Este riesgo sería más elevado cuanto más tempranamente se utilizan (primer año de vida una OR: 5,3 [1,6-17,4]), si bien se mantendría como factor de riesgo incluso en la adolescencia. En cuanto a la CU, el uso de antibioterapia parece presentar un riesgo menor o incluso inexistente en los estudios publicados [71][72].

1.4.4. Factores microbiológicos

Una parte de la microbiota intestinal existente se hereda; si bien, a lo largo de la vida el intestino se va colonizando por diferentes tipos de microorganismos en su mayoría bacterias comensales no dañinas lo que hace que se produzcan cambios en su composición, diversidad y funciones. En el intestino del adulto coexisten tres grupos principales de bacterias: Firmicutes, Proteobacteria y Bacteroidetes. Estas bacterias se encuentran en simbiosis con el hospedador dado que el individuo ofrece un ambiente óptimo para su crecimiento y a su vez estas sintetizan ácidos grasos de cadena corta y vitaminas que son esenciales para el correcto funcionamiento del ser humano [73].

La relación entre la microbiota intestinal y la EII se hace patente en múltiples estudios traslacionales, pero también en los realizados en pacientes con esta enfermedad. En los pacientes con EII la disbiosis (desajuste de la microbiota normal de un individuo) es muy frecuente observándose una menor biodiversidad fundamentalmente de los grupos Firmicutes y Bacteroidetes. Se ha visto por ejemplo una disminución de la concentración de *Faecalibacterium prausnitizi* (que presenta actividad antiinflamatoria) en pacientes con EC ileal, asociándose también a un mayor riesgo de recurrencia posquirúrgica [74].

Hoy en día se considera que el efecto del ambiente sobre la microbiota intestinal puede ser clave e incluso superior al genético. Por lo tanto, la modulación de la microbiota a través de la dieta, los antibióticos, prebióticos, probióticos y trasplantes fecales (TMF) representan una vía terapéutica prometedora para el tratamiento de la EII. Al final de esta introducción dado que es el tema central de esta tesis se profundizará en este tema.

1.5 Diagnóstico de la enfermedad inflamatoria intestinal

La inflamación en la EC se caracteriza por ser transmural y puede estar presente de manera segmentaria a lo largo de todo el tubo digestivo. Los tramos más frecuentemente implicados

son el íleon terminal y el colon. Es frecuente el desarrollo de fístulas abdominales y perianales, así como de abscesos y en muchos pacientes están presentes manifestaciones extraintestinales que pueden afectar a articulaciones, a la piel a los ojos o al sistema hepatobiliar entre otros. Además de la inflamación también contribuye a aumentar el espesor de la pared intestinal la proliferación de las capas musculares y la fibrosis de la pared intestinal. Estos factores en conjunto favorecen la formación de las estenosis, principal determinante del desarrollo de la clínica en estos pacientes [9].

La inflamación en la CU se caracteriza por presentarse de manera continua a nivel de la mucosa. La afectación comienza habitualmente en el recto y se puede extender proximalmente. La localización limitada al colon suele determinar unos síntomas más constantes que los encontrados en la EC [75].

El diagnóstico de la EII se establece mediante a) criterios clínicos, b) analíticos, c) endoscópicos d) histológicos y e) radiológicos. Se debe de establecer un diagnóstico diferencial con otras entidades conocidas con las que guarda similitudes como son las enterocolitis infecciosas, isquémicas, farmacológicas o post-radioterapia [76].

a) Criterios clínicos

Los tres síntomas más frecuentes en los pacientes con EC son el dolor abdominal, la diarrea y la astenia si bien es cierto que estos varían dependiendo de la localización de la enfermedad, así como de la edad de presentación. En los pacientes con afectación exclusiva del colon, la diarrea fue el síntoma más frecuente y en pacientes con afectación ileal e ileocólica el dolor abdominal estaba presente en hasta el 91% de los pacientes. En población pediátrica los síntomas descritos previamente sólo aparecen en un cuarto de los pacientes siendo en este grupo de población la anorexia, el retraso del crecimiento y el retraso puberal el escenario clínico más frecuente [77][78].

El patrón de la enfermedad condiciona las manifestaciones clínicas; ante la presencia de una absceso abdominal suele aparecer fiebre, y ante la presencia de estenosis el dolor suele presentarse con carácter cólico y acompañado de náuseas y vómitos que alivian con la defecación o la expulsión de gas [79].

En cuanto a la CU el síntoma guía es la diarrea con o sin sangrado que suele ser diurna y nocturna. En muchas ocasiones la diarrea se intercala con la presencia de esputos rectales

(expulsión de moco y sangre sin heces) y se acompaña de sensación de evacuación incompleta y urgencia deposicional. Hasta un 41% de los pacientes no presentan dolor abdominal a diferencia del alto porcentaje de pacientes con EC y dolor abdominal [1].

b) Criterios analíticos

Hoy en día no existe ningún marcador analítico *gold estándar* para el diagnóstico de la EII. En las determinaciones de laboratorio realizadas en la EII destacan los biomarcadores: sustancias cuyos niveles proporcionan una estimación objetiva de procesos biológicos normales o patológicos, así como de respuestas a las intervenciones terapéuticas. El uso en la rutina de la consulta de estos biomarcadores permite evaluar la efectividad de los tratamientos, adelantarse a las complicaciones de la enfermedad y corregir los defectos nutricionales que pueden presentar estos pacientes [80].

En la EII el biomarcador serológico más utilizado es la proteína C reactiva: se trata de una proteína sintetizada prácticamente en su totalidad en el hígado ante el estímulo de la IL1, IL6 y TNFalfa. La concentración basal habitual de proteína C reactiva es 0,8 mg/l, pero ante un estímulo inflamatorio se incrementa rápidamente y en horas puede aumentar entre 500-1.000 veces su valor. Tiene una vida media corta por lo que tras el cese del estímulo inflamatorio desciende rápidamente hasta los niveles basales. Su sensibilidad es menor en CU que en EC sobre todo cuando la afectación es más distal [81].

Los biomarcadores en heces como es el caso de la calprotectina fecal (CF), son más específicos que los marcadores plasmáticos ya que no se elevan en procesos extradigestivos. La CF constituye el 60% de las proteínas del citosol de los neutrófilos. En presencia de inflamación en la mucosa intestinal se observa migración de los neutrófilos hacia la luz intestinal y por lo tanto la presencia de CF es directamente proporcional a la migración de estas células a la luz. Una ventaja de la CF es que se eleva en fases precoces de la inflamación previamente al desarrollo de la clínica por lo que puede ser útil en el diagnóstico y también en la utilización como guía en el manejo terapéutico de estos pacientes [82].

c) Criterios endoscópicos

La colonoscopia es la primera exploración indicada ante la sospecha de EII, debe de ser completa incluyendo ileoscopia y la toma de dos biopsias de los seis segmentos (íleon, colon derecho, transversal, izquierdo, sigma y recto).

En la CU lo más frecuente es observar cambios inflamatorios continuos desde el margen anal afectando a la totalidad de la circunferencia del colon. En la mucosa los hallazgos más frecuentes son la pérdida del patrón vascular submucoso, edema, friabilidad, úlceras y sangrado espontáneo. Cuando la afectación es sólo distal se suele observar un cambio abrupto entre mucosa inflamada y mucosa sana normal [83]. En aproximadamente un 20% de los pacientes con pancolitis pueden observarse alteraciones en la mucosa ileal (ileitis por reflujo) lo que se ha relacionado en algunos estudios con un curso más agresivo de la enfermedad [84]. Otras lesiones que podemos encontrar frecuentemente en CU y menos frecuente en la EC son los pseudopólipos; son lesiones polipoides de mucosa regenerativa habitualmente de pequeño tamaño y superficie lisa que se encuentran en áreas con inflamación previa [2].

Se han desarrollado diferentes índices endoscópicos para intentar uniformar la variabilidad existente en relación al observador. Estos índices permiten describir los hallazgos y establecer la gravedad de las lesiones visualizadas. El índice más utilizado en CU en la práctica clínica habitual es el índice de Mayo endoscópico (**Tabla 3**) en el que se tiene en cuenta la presencia de eritema, el patrón vascular existente, la friabilidad y la presencia de erosiones o úlceras. Generalmente se considera curación mucosa una puntuación endoscópica de 0 o 1 si bien es cierto que se ha demostrado que una puntuación de 0 ofrece mayores tasas de remisión a largo plazo. En el estudio de Barreiro-de Acosta *et al* durante los 6 primeros meses de seguimiento un 9.4% de los pacientes con Mayo 0 presentaron recaída de la enfermedad frente a un 36.6% en los que presentaban Mayo 1 ($p < 0.001$) [85].

Tabla 3. Índice Mayo endoscópico

Índice Mayo	Hallazgos endoscópicos
0	Apariencia normal
1	Enfermedad leve: eritema, disminución del patrón vascular, friabilidad leve
2	Enfermedad moderada: eritema marcado, desaparición patrón vascular, friabilidad, erosiones
3	Enfermedad grave: sangrado espontáneo, ulceración

Elaboración propia

En la EC, los hallazgos de la colonoscopia en estos pacientes van desde la presencia de erosiones y aftas aisladas hasta la presencia de úlceras >20mm en sacabocados. Estas úlceras son consecuencia de los folículos linfoides que penetran en la mucosa y presentan mucosa normal entre ellas dando el aspecto típico en empedrado. También es posible identificar estenosis (disminución del calibre de la luz intestinal). En la EC también se dispone de dos

índices endoscópicos validados y reproducibles, el más utilizado es el SES-CD (*Simplified Endoscopic Activity Index for Crohn's disease*) (**Tabla 4**). En este índice se tiene en cuenta el tamaño de la úlcera, el porcentaje de superficie ulcerada, de superficie afecta y la existencia de estenosis. Clasifica la actividad inflamatoria en leve (3-6 puntos), moderada (7-15 puntos) y grave (> 16 puntos) definiéndose cicatrización mucosa como la existencia de un SES-CD de 0-2 puntos [86].

Tabla 4. Índice SES-CD: íleon + C. derecho + C. transversal + C. izquierdo + recto.

Variable	0	1	2	3
Tamaño de la úlcera	No	Afta (0,1-0,5cm)	Úlcera grande (0,5-2cm)	Úlcera muy grande (>2cm)
Superficie ulcerada	No	<10%	10-30%	> 30%
Superficie afecta	No	<50%	50-75%	> 75%
Estenosis	No	Única con paso	Múltiple franqueable	Infranqueable

Elaboración propia

De acuerdo con estos hallazgos endoscópicos en la CU y en la EC, podemos estimar de manera objetiva la gravedad inicial de las lesiones y disponer así de un patrón de referencia para evaluar los resultados de las diferentes intervenciones terapéuticas tanto en ensayos clínicos como en la práctica clínica diaria.

d) Criterios histológicos

Las alteraciones histológicas microscópicas más representativas en cada una de las patologías son:

En la CU se observa una pérdida de la configuración estructural normal de las criptas con pérdida del paralelismo, acortamiento o ramificación con mayor separación entre ellas en la lámina propia. El infiltrado habitual es de predominio linfoplasmocitario difuso observándose en muchos casos un aumento de células plasmáticas distribuidas en banda separando los fondos de las criptas de la muscular de la mucosa. En cuanto a las alteraciones epiteliales, se observa disminución del número de células caliciformes con consecuente disminución de la mucosecreción y metaplasia de células de Paneth que consiste en la aparición de estas células en el colon izquierdo [87].

La lesión característica en la EC es un infiltrado transmural linfoplasmocitario con agregados y folículos linfoides, especialmente en la submucosa. Se puede observar además la existencia

de neutrófilos que pueden verse mezclados con el infiltrado mononuclear o aislados en la lámina propia de la mucosa indicando actividad inflamatoria. La presencia de úlceras aftoides se observa en el microscopio como una pérdida del epitelio sobre folículos linfoides acompañada de neutrófilos y son un hallazgo precoz en la evolución de la enfermedad. La aparición de granulomas no caseificantes es característica de esta enfermedad [88].

e) Criterios radiológicos

En ocasiones la colonoscopia no es suficiente para valorar la extensión de la inflamación debido por ejemplo a la existencia de estenosis que impiden la progresión a tramos proximales o bien por afectación de yeyuno o íleon proximal (tramos no alcanzados mediante colonoscopia convencional). Por otra parte, la afectación transmural en la EC hace necesario el empleo de técnicas de imagen complementarias para evaluar la presencia de fistulas o abscesos. En un estudio de la Clínica Mayo se observó que un 53,7 % de los pacientes con ileoscopia normal tenían EC con segmentos con actividad inflamatoria en el resto del intestino delgado, bien porque no se logró alcanzar la zona con actividad (30 %), o bien porque la inflamación era transmural [89]. Por lo tanto, la resonancia magnética, la tomografía computarizada o la ecografía abdominal son empleadas para complementar los hallazgos de la colonoscopia en cuanto que permiten identificar la existencia de afectación transmural, así como conocer la extensión y el patrón inflamatorio/estenosante o fistulizante de la enfermedad.

1.6 Tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal

El objetivo del tratamiento de la EII es globalmente controlar la inflamación dado que en el momento actual no disponemos de tratamientos con intención curativa.

A menudo el objetivo terapéutico se define como la combinación de remisión clínica, analítica y endoscópica y viene condicionado por la propia evolución de la enfermedad, la respuesta a fármacos y la propia edad y comorbilidades del paciente. En cuanto a los criterios clínicos se busca la resolución del dolor abdominal (EC), del sangrado (CU) y normalizar el hábito intestinal (EC y CU). En cuanto a los objetivos endoscópicos, la ausencia de ulceración en la EC es el objetivo mientras que en la CU se busca la curación mucosa. En la EC cuando la endoscopia no puede evaluar adecuadamente la inflamación, la resolución de la inflamación por técnicas de imagen es el objetivo. La normalización de los biomarcadores no se considera

un objetivo sino una medida complementaria de estimación de presencia de inflamación y en caso de estar elevados obligaría a llevar a cabo una evaluación endoscópica o radiológica [90]. Los tratamientos más frecuentemente empleados en la EII son a) aminosalicilatos, b) corticoides c) inmunosupresores (azatioprina y metotrexato) d) fármacos biológicos.

a) Aminosalicilatos

Su eficacia está ampliamente avalada en diferentes estudios en CU tanto en la formulación oral como rectal y es el fármaco de primera elección en la inducción de la remisión del brote leve-moderado y mantenimiento de la remisión [91]. Con respecto a los pacientes con EC no se ha demostrado que la mesalazina oral sea eficaz en comparación con el placebo para inducir la remisión. Otro aminosalicilato, la sulfasalazina, se mostró eficaz en los primeros estudios publicados en EC cólica leve o moderada pero no en aquellos en los que la afectación era aislada en intestino delgado. En un reciente metaanálisis de la Cochrane no demostró mayor remisión con sulfasalazina que con placebo (RR: 1,38; IC95 %: 1,00-1,89) [92].

b) Corticoides

En la EII se emplean tanto corticoides sistémicos (prednisona o equivalente) para inducir la remisión en un brote moderado-grave de CU o EC, corticoides orales de acción tópica (beclometasona, budesonida) para inducción de la remisión del brote moderado de EC o CU o corticoides tópicos para inducir la remisión del brote leve moderado de CU izquierda o proctitis. Ni los corticoides orales ni los corticoides de acción tópica han demostrado su utilidad en el mantenimiento de la remisión de los pacientes con EII. Los efectos adversos de los corticoides pueden ser agudos (hipertensión arterial, hipercolesterolemia, aumento de peso, intolerancia a la glucosa...) o crónicos (miopatía proximal, neuropatía, glaucoma, cataratas...)[93].

c) Inmunosupresores

c1) Azatioprina y 6 Mercaptopurina

Son análogos de las purinas y se emplean fundamentalmente en pacientes con EII que no responden al tratamiento con corticoides (corticorresistencia) o en los que al reducir la dosis o suspender los corticoides presentan un nuevo brote de la enfermedad (corticodependencia). Estos fármacos tienen un papel limitado en la inducción de la remisión probablemente por su lento comienzo de acción. En los ensayos clínicos recientes así como metaanálisis que

comparan la azatioprina frente a placebo o 5ASA se refleja un beneficio evidente en el mantenimiento de la remisión en CU y quizás menos claro en los pacientes con EC [94][95].

c2) Metotrexato

Se emplea en pacientes con EC con corticodependencia por vía IM dado que ha demostrado ser superior al placebo en inducir la remisión así como en mantenerla a dosis de 15mg/semanales [96]. En CU no ha demostrado superioridad con respecto a placebo [97].

d) Fármacos biológicos

Los fármacos biológicos son sustancias farmacológicas producidas en organismos vivos utilizando biotecnología. Son fármacos de gran tamaño por lo que la administración debe ser por vía parenteral (endovenosa o subcutánea). Son anticuerpos dirigidos contra proteínas implicadas en los procesos inmunológicos relacionados con la patogenia de la EII.

En 1997 se publicaron los primeros estudios con Infliximab, un anticuerpo quimérico que se une al factor de necrosis tumoral alfa (TNFalfa) bloqueando su señal. Demostró eficacia tanto en la inducción de la remisión como en el mantenimiento de los pacientes con EC y CU [98][99].

Adalimumab es una inmunoglobulina recombinante humana IgG1 que se une también al TNFalfa, fue el primero enteramente humano. Fue aprobado en 2007 para la EC y en 2012 para el tratamiento de la CU tanto para la inducción como para el mantenimiento de la remisión [100][101].

Vedolizumab es un fármaco biológico (anticuerpo monoclonal) antiintegrina que bloquea específicamente las subunidades $\alpha 4\beta 7$ y evita la migración selectiva al intestino. Este fármaco se ha aprobado tanto para la CU como para la EC [102][103].

Ustekinumab es un anticuerpo monoclonal tipo IgG1 completamente humano que bloquea la subunidad p40 de las IL-12/IL-23. Actualmente está aprobado para el manejo de la EC y está demostrada su eficacia en CU en los ensayos clínicos pivotaes recientes [104][105].

El desarrollo en investigación está permitiendo un mejor conocimiento acerca de las principales cascadas inflamatorias en la EII lo que desencadena el desarrollo de nuevos tratamientos. Se están investigando nuevas dianas dirigidas a inhibir la señalización celular de citocinas, la entrada de linfocitos y la actividad de los mastocitos. En los últimos años, se han obtenido resultados prometedores con fármacos anti-IL-23 y fármacos inhibidores de las vías JAK en el

tratamiento de pacientes con EII. Los fármacos anti-IL-23 actúan bloqueando específicamente esta citoquina proinflamatoria, reduciendo así la respuesta inmunitaria y, por otro lado, los inhibidores de las vías JAK intervienen en la señalización intracelular que desencadena la inflamación[106].

1.7 Microbiota intestinal

Los microorganismos en el cuerpo humano forman colectivamente hasta 100 billones de células lo que supone 10 veces el número de células humanas codificando 100 veces más genes únicos que nuestro propio genoma. La mayoría de los microbios residen en el tracto gastro intestinal (TGI), correspondiendo en su mayor parte a bacterias pero se distinguen además poblaciones de virus, hongos y arqueobacterias [107]. La microbiota representa el conjunto altamente complejo de microbios, pero también las interacciones entre sí y con el hospedador con el que establecen una relación de simbiosis. Una vez que se conoce la composición saludable y los estados funcionales de la microbiota intestinal, se podrían determinar las características que, cuando se interrumpen, se asocian con la enfermedad. Sin embargo, la complejidad de la microbiota y la variación interindividual complican la definición de cuál puede ser el estado ideal dentro de un individuo.

Los estudios de secuenciación han observado que existe una gran diversidad en la microbiota que varía a lo largo del tiempo y entre poblaciones. Cada individuo alberga más de 1000 filotipos de “nivel especie”: grupos de secuencias que tienen gran diversidad en sus genes de ARN ribosómico. En adultos la mayoría de las bacterias pertenecen a 4 filos: Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria, aunque más del 95% pertenecen a Bacteroidetes o Firmicutes [108].

La microbiota intestinal presenta diferentes funciones llevadas a cabo mediante la interacción con el hospedador: juega un papel crucial en la maduración y homeostasis de la respuesta inmune, impide el crecimiento de patógenos y elimina toxinas exógenas, influye en el desarrollo de la vascularización, regula las funciones endocrinas intestinales, interviene en la señalización neurológica, participa en el desarrollo de la densidad ósea y proporciona una fuente de energía (5 a 10% de los requerimientos diarios de energía del individuo). La microbiota intestinal también interviene en la síntesis de vitaminas y neurotransmisores y en el metabolismo de las sales biliares. Por lo tanto hoy en día se están realizando múltiples estudios que implican a la

microbiota intestinal en la etiopatogenia de numerosas enfermedades crónicas incluyendo el cáncer, enfermedades inmunomediadas y enfermedades con componentes metabólicos, cardiovasculares, autoinmunes, neurológicos y psiquiátricos [109].

Clásicamente existía la teoría de que el feto intraútero era estéril, pero investigaciones recientes han identificado bacterias, ADN bacteriano o productos bacterianos en el meconio, en el líquido amniótico y en la placenta indicando la colonización de la microbiota de la madre en el feto ya intraútero. Se han evidenciado varios factores asociados a cambios en el desarrollo precoz de la microbiota como son el microbioma materno, el modo de nacimiento (cesárea o parto natural), el uso de antibióticos durante el embarazo y la duración de la gestación. En recién nacidos se ha visto que el tipo de alimentación (leche materna o de fórmula) y el entorno al nacer producen modificaciones en la microbiota [110].

Por ejemplo, los bebés que nacen por parto vaginal presentan una colonización del TGI a partir de la microbiota del canal del parto por lo que su microbiota es muy similar a la de su propia madre. Esta superposición no se ha visto entre la microbiota de madres y bebés que han nacido a través de cesárea. Se sugiere que la cesárea es una de las causas de alteración precoz de la microbiota al impedir la colonización microbiana a través del canal del parto [111]. En el estudio LISA (estudio multicéntrico prospectivo alemán que incluyó 2500 recién nacidos) se demostró mayor probabilidad de enfermedades atópicas en los dos primeros años tras el nacimiento en niños nacidos por cesárea versus niños nacidos por parto vaginal [112].

A nivel de *filo*, se identificó en recién nacidos mediante cesárea una baja concentración de Bacteroidetes ($p = 0.002$) al compararlos con bebés nacidos vía vaginal en un estudio realizado en el sureste de Suecia. Esta disminución del nivel de Bacteroidetes persistió durante los dos primeros años tras el nacimiento [113]. En el estudio KOALA (cohorte de 1032 recién nacidos en los Países Bajos) se usaron ensayos cuantitativos de PCR para identificar diferentes especies bacterianas de las muestras de heces recolectadas al mes del nacimiento. Los lactantes nacidos por parto vaginal sin asistencia ($n = 826$) tenían un número relativamente alto de *B. fragilis* y un número reducido de *C. difficile*. Por el contrario, las muestras de heces de bebés nacidos por cesárea ($n = 108$) mostraron un menor número de Bifidobacterias y *Bacteroides* y con mayor frecuencia fueron colonizados por *C. difficile*. En particular, los miembros del género *Bacteroides* son altamente específicos para las heces maternas, por lo que en conjunto los hallazgos resaltan el papel central de la exposición durante el parto para la herencia precoz y el establecimiento de *Bacteroides* en el perfil microbiano del bebé. En el estudio KOALA además

se identificaron otros factores de cambio en la microbiota del recién nacido. Se observó que los lactantes alimentados exclusivamente con fórmula presentaban colonización con mayor frecuencia por *E. coli*, *C. difficile*, *Bacteroides* y Lactobacilos, en comparación con los lactantes amamantados con leche materna. La hospitalización y la prematuridad se asociaron con una mayor prevalencia y recuentos de *C. difficile* y el uso de antibióticos por parte del lactante se asoció con un menor número de Bifidobacterias y *Bacteroides* [114].

Varios estudios indican que, una vez que se introducen alimentos sólidos en la dieta del bebé, las diferencias en la población microbiana entre los lactantes de leche materna y los lactantes alimentados con fórmula se pierden y las comunidades microbianas convergen hacia un microbioma adulto complejo. La composición de los microorganismos del TGI del bebé va aumentando en número y diversidad a medida que aumenta la edad del niño y alrededor de los tres años, la microbiota intestinal presentará una diversidad y complejidad semejante a la microbiota intestinal anaeróbica adulta [115]. Se ha identificado que este microbioma intestinal precoz permite la interacción cruzada entre los microbios del epitelio intestinal y el GALT (*Gut-associated lymphoid tissue* o tejido linfoide asociado con el intestino). El desarrollo del TGI y del sistema inmune requiere la interacción entre las células epiteliales intestinales, el tejido linfoide y la incipiente microbiota comensal [116]. Los estímulos apoptóticos, la síntesis reactiva de oxígeno y la señalización del receptor *Toll-like* son inducidos por bacterias comensales para producir un estado de inflamación controlada que ayuda a desarrollar las defensas inmunes innatas y promueve el reconocimiento de patógenos. La microbiota comensal induce una mayor expresión de genes que promueven el recambio epitelial y la síntesis de moco, así como una peristalsis elevada, que disminuye la colonización del intestino delgado [117]. Estas interacciones permiten que el intestino infantil desarrolle rápidamente tolerancia a los antígenos alimentarios y la microbiota comensal proporcionando una barrera frente a la penetración de microbios patógenos en la mucosa y la submucosa [118].

El paso inicial para entender la relación simbiótica entre la microbiota intestinal y su hospedador sería caracterizar la microbiota sana para así obtener un modelo de referencia. Se han realizado proyectos a gran escala como el Meta-HIT [119] y *The Human Microbiome Project* (HMP) [120].

Clásicamente los estudios de la microbiota intestinal basados en cultivos sugerían que todos los adultos contenían un “core” entendido como un grupo de especies que todos los individuos presentaban. Los estudios siguientes de secuenciación demostraron una gran diversidad en la

población a lo largo del tiempo en un mismo individuo poniendo en duda el concepto del “core”. En comparación con la microbiota de los bebés la microbiota bacteriana en adultos es estable pero las proporciones de especies y subespecies específicas presentan gran variación interindividual. Cada individuo presenta aproximadamente > 1000 filotipos a nivel de especie siendo en su mayoría bacterias pertenecientes a unos pocos filos [121]. En individuos adultos, Bacteroidetes y Firmicutes usualmente suponen más del 95% mientras que las Actinobacterias, Proteobacterias y Verrucomicrobia son componentes generalmente menores. Bacteroidetes incluyen por ejemplo el género *Bacteroides* y *Prevotella*; Firmicutes incluyen los *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*; Actinobacteria incluye el género *Bifidobacterium* y *Proteobacteria* incluyendo especies como la *E. coli*. La microbiota humana también alberga arqueas, eukarya y virus [108]. En los estudios del “core” se han identificado varias especies principales como *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* y *Bacteroides uniformis* pero en otros individuos estas especies estaban presentes en $<0,5\%$ [122]. A partir de que los estudios incluyesen diferentes edades (desde microbiota fetal hasta microbiota en el anciano) y se recogiesen datos de los diferentes países la noción del “core” se ha debilitado aún más.

A pesar de las diferencias interindividuales de los componentes de la microbiota intestinal se ha visto que las funciones de esta microbiota se realizan equivalentemente entre individuos. Esta información funcional de la microbiota proviene de aislamientos mediante cultivos que permitieron caracterizar el contenido genómico y de estudios de secuenciación de ADN. El estudio funcional mediante metagenómica se basa en secuenciar el ADN de la microbiota total (incluso de aquellos microorganismos no cultivables) haciéndolos coincidir con las secuencias de los genes funcionales conocidos en bases de datos. Este procedimiento está mejorando a medida que más genomas son secuenciados y añadidos al mapa-referencia [123]. Por lo tanto, esto significa que, aunque la composición de la microbiota intestinal sea diferente los perfiles de genes funcionales son bastante similares entre individuos. Esto se corroboró inicialmente en un estudio con una población de 18 mujeres que compartían más del 93% de los grupos funcionales a nivel de “enzima” pero pocos filotipos a nivel de género [122] y posteriormente estos hallazgos se corroboraron en los estudios de HMP y MetaHIT [119][120]. La corriente actual en investigación es que compartimos un “core” funcional pero no un “core” microbiano.

En este “core” funcional están implicadas vías involucradas en el metabolismo, la fermentación, la metanogénesis, la fosforilación oxidativa y la biosíntesis de lipopolisacáridos [124].

Los estudios iniciales de la composición de la microbiota se realizaron mediante la amplificación de ADNr 16S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y cebadores bacterianos. En el estudio de Eckburg *et al* [125] se identificaron un total de 11831 secuencias observándose un total de 395 filotipos bacterianos. La mayoría de los organismos eran miembros del filo Firmicutes y Bacteroidetes. Dentro de los Firmicutes la mayoría de las secuencias (un 95%) pertenecían a la clase *Clostridia*. Varias de las bacterias pertenecientes al filo Firmicutes fueron productoras de butirato todos los cuales son miembros de los grupos clostridiales IV, XIVa y XVI. Estos grupos se encargan en individuos sanos del mantenimiento y la protección del epitelio colónico normal [126]. En el estudio de Eckburg también se identificó variabilidad en los 65 filotipos de Bacteroidetes entre sujetos. Se detectó *B. thetaiotaomicron* en cada sujeto cuya función es la absorción de nutrientes y la maduración y mantenimiento de las células epiteliales [127]. Se observaron relativamente pocas secuencias (en comparación con los filos Firmicutes y Bacteroidetes) de Proteobacterias, Actinobacterias, Fusobacterias y Verrucomicrobia.

En el año 2011 se sugirió que los humanos podían ser clasificados en 3 grupos o “enterotipos” en base a su microbiota intestinal (de acuerdo con el género más abundante). Se combinaron en este estudio datos de metagenómica intestinal de 39 muestras de 6 nacionalidades diferentes y la secuencia de ADN se comparó con 1511 genomas de referencia disponibles a través de los consorcios IHMC y MetaHIT. Casi el 53% de las secuencias se podían asignar a un género del conjunto de genomas de referencia y el 80% se podía asignar a un filo. El análisis multidimensional de conglomerados reveló que las muestras se separaban en 3 enterotipos cada uno identificable por las variaciones de uno de los tres géneros principales (Bacteroidetes (enterotipo 1), Prevotella (enterotipo 2) y Ruminococcus (enterotipo 3). Los pertenecientes al enterotipo 1 parecen obtener la energía de la fermentación de carbohidratos, el enterotipo 2 parece degradar las glucoproteínas de mucina de la capa mucosa intestinal mientras que el enterotipo 3 puede unir las mucinas y transportar y degradar los azúcares constituyentes. Los enterotipos no se correlacionaron con las propiedades del hospedador como la nacionalidad, la edad, el sexo el índice de masa corporal como cabría esperar [47]. Sin embargo, ahora se piensa que estas distinciones no son tan claras y la tendencia es a que se establece un gradiente continuo de proporciones entre Firmicutes y Bacteroidetes a lo largo de las muestras fecales de los

diferentes adultos sanos. El HMT realizó un estudio que incluyó un total de 4788 muestras de 242 adultos sanos de microbiota de cavidad oral, piel, nariz, heces y vagina. La cavidad oral y las heces fueron las más diversas en cuanto a miembros de especies. Curiosamente, aunque la composición bacteriana de las heces varía considerablemente, existe una notable consistencia en las vías metabólicas representadas por la microbiota (**Figura 1**) [120]

Figura 1A

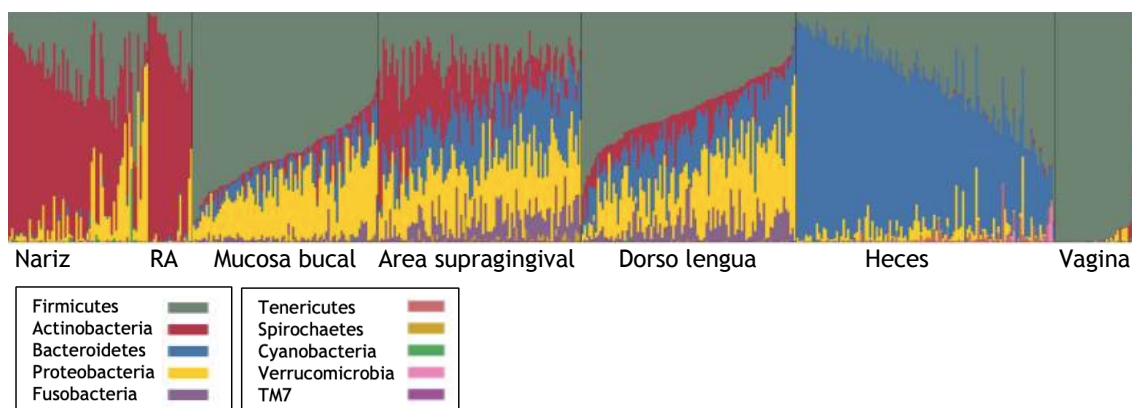


Figura 1B

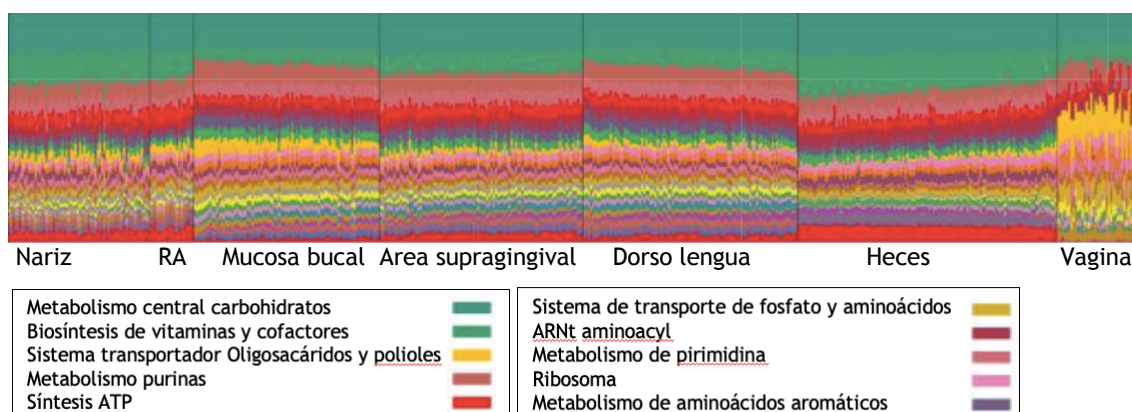


Figura 1. Las barras verticales representan el microbioma en las diferentes ubicaciones del cuerpo humano. En el A se colorean en función del filo al que correspondan, en el B se colorean según los módulos metabólicos en los que participan. RA (área retroauricular).

Imagen adaptada de Huttenhower C y cols [120]. Nature. Copyright © 2012.

La composición de la microbiota en individuos de edad avanzada presenta diferencias al compararlas con grupos de menor edad. Entre otros factores la disminución de la motilidad existente en este grupo de población desencadena mayores tiempos de tránsito intestinal con mayor tiempo de retención de las heces. Además de esto, la inmunosenescencia, los déficits nutricionales, el uso de laxantes y la polimedicación pueden alterar la homeostasis de la microbiota [128]. En el estudio de Biagi *et al* en el que se empleó PCR cuantitativa de ARNr

16S y un microarray específico diseñado para la microbiota del TGI se comparó la composición microbiana entre adultos jóvenes, adultos mayores y centenarios (>100 años). Identificó una práctica superposición entre los adultos jóvenes y mayores pero las diferencias fueron significativas al comparar estos grupos con el de centenarios. La microbiota en el grupo de centenarios mostró una menor diversidad con cambios especialmente en la subpoblación de Firmicutes con aumento de Proteobacteria y disminución de Bifidobacteria. Se observó un aumento de anaerobios facultativos especialmente patobiontes y una marcada disminución de *Faecalibacterium prauznitzii* y otras especies con capacidad anti inflamatoria. Como bacterias características de los centenarios identificaron *Eubacterium limosum* que se identificó en concentraciones más de 10 veces superiores en comparación con los otros grupos [129].

A lo largo del TGI se observa una variación de la microbiota existente. Esto se produce como consecuencia de que cada región anatómica posee unas propias condiciones físico-químicas que la caracterizan. La motilidad intestinal, el pH, el potencial redox, la cantidad de nutrientes y las secreciones producidas (como por ejemplo el ácido clorhídrico o enzimas digestivas) son diferentes en cada tramo del tubo digestivo. Así mismo la densidad microbiana también aumenta a lo largo del TGI; por gramo de contenido intestinal la densidad microbiana aumenta de 10^1 - 10^4 en el estómago y duodeno, 10^4 - 10^8 en el yeyuno e íleon y 10^{10} - 10^{12} en el colon y heces [130].

Se ha propuesto también que la composición de la microbiota difiere en función de si está presente a nivel de la luz intestinal o adherida a la capa mucosa. Las bacterias asociadas a la capa de moco están en contacto con las células del sistema inmune ejecutando funciones de homeostasis con las células del hospedador. En varios estudios se ha observado una diferencia significativa en la composición de la microbiota luminal de las heces y las biopsias de colon. De todas formas estos resultados deben interpretarse con cautela dado que las biopsias en estos estudios se obtuvieron de colon en individuos sometidos a una colonoscopia precedida de una preparación laxante necesaria para limpiar el TGI [131]

Los modelos experimentales en animales pueden diferenciar la microbiota luminal de la asociada a la capa mucosa sin necesidad de realizar preparaciones laxantes que la podrían modificar. La organización de la capa de moco varía a lo largo de las diferentes partes del TGI ya que se ha observado que la capa de moco en el estómago y colon es homogénea en comparación con la del intestino delgado donde el moco se distribuye de manera menos definida

[132]. Se ha descrito que estas diferencias en la organización de la capa de moco puedan estar relacionadas con la variación de la microbiota asociada a la misma. El estudio de Wang *et al* en modelos murinos, ha demostrado que la composición de la microbiota asociada a la mucosa del colon proximal y de las heces es muy similar entre sí, pero difiere significativamente de la asociada a la mucosa del colon distal. Además, demostró que la microbiota intestinal es esencial para mantener la expresión regional de los receptores *Toll-like*. TLR2 se expresa más en el colon proximal y disminuye en un gradiente distal mientras que TLR4 se comporta a la inversa identificándose la expresión disminuida en el colon proximal. La exposición del colon distal a la microbiota proximal indujo la expresión de TLR2. De estos estudios se deduce que el mutualismo hospedador-microbiota es fundamental para la homeostasis intestinal e inmune [133].

Se han propuesto diferentes teorías para justificar la implicación de la microbiota en el desarrollo de las diferentes enfermedades. Inicialmente la hipótesis que se barajó fue que diversos factores tanto endógenos como exógenos podrían desencadenar un aumento de la permeabilidad intestinal. Una segunda hipótesis es que en personas genéticamente susceptibles para alguna enfermedad crónica, las alteraciones intestinales subclínicas favorecerían la expansión de microorganismos oportunistas y la tercera y más ampliamente aceptada en la actualidad es la teoría de la disbiosis [109]. Como hemos visto, numerosos factores causan alteraciones en la composición de la microbiota, interrumpiendo así la homeostasis microbiana y causando este estado de disbiosis o desequilibrio. La disbiosis generalmente implica un impacto negativo en la salud del hospedador con consecuencias a largo plazo asociándose al desarrollo de enfermedades tales como como la EII, el síndrome intestino irritable, obesidad, diabetes, síndrome metabólico, asma, aterosclerosis, autismo y cáncer [134].

A menudo, un único factor predisponente no es suficiente para inducir disbiosis ya que la microbiota intestinal posee capacidad de adaptación a los cambios en cuanto a disponibilidad de nutrientes y variaciones ambientales. Sin embargo, el conjunto de varios factores puede producir cambios que finalmente desencadenen estados patológicos. Aunque se desconoce el mecanismo completo, se ha visto involucrado el estrés oxidativo, los bacteriófagos y bacteriocinas. Globalmente, en la disbiosis se reduce la microbiota con actividad simbiótica con el hospedador al mismo tiempo que aumenta el número de especies susceptibles de convertirse en patógenas, conocidas como patobiontes [135].

1.8 Técnicas para el estudio de la microbiota intestinal

Una baja proporción de las bacterias es cultivable por lo que el estudio de la microbiota se ha realizado mediante el estudio del gen bacteriano que codifica para la subunidad 16S ribosómico mediante la identificación por PCR de determinados fragmentos bacterianos. El ARNr 16S se trata de la macromolécula más frecuentemente empleada en investigación de filogenia y taxonomía bacteriana. Su aplicación fue propuesta ya en los años 70 por Carl Woese y hoy en día ha sido adoptada por investigadores de todo el mundo convirtiéndose en el *gold estándar* para la taxonomía molecular, el análisis de la biodiversidad y la identificación de microorganismos [136].

1.8.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El gen 16S ARNr está formado por aproximadamente 1500 nucleótidos (nt). Se pliega en una estructura secundaria compuesta por segmentos de doble cadena y otras regiones con cadena sencilla. Proceden de las subunidades pequeñas de los ribosomas y se encuentran altamente conservados con regiones comunes a todos los organismos, pero además, presentan áreas variables que se sitúan en zonas específicas. Este gen presenta secuencias específicas cortas que aparecen en prácticamente la totalidad de los miembros de un determinado grupo filogenético y prácticamente nunca están presentes en los otros grupos. Se denominan oligonucleótidos firma y se utilizan para ubicar a cada bacteria en su propio grupo [137]. Para la amplificación del 16S ARNr mediante PCR se utiliza un termociclador que mantiene la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo. Para llevar a cabo esta técnica se necesitan cuatro desoxinucleótido trifosfato (dNTP) que actúan como sustratos para polimerizar el ADN, dos cebadores que son nucleótidos complementarios a una de las dos hebras de ADN que permiten que la ADN polimerasa inicie la reacción, Magnesio que actúa como cofactor de la ADN polimerasa, una solución tampón que mantiene el pH adecuado para que la ADN polimerasa pueda actuar y la propia ADN polimerasa [138].

Secuenciación

El inicio de la secuenciación tuvo lugar en 1977 mediante el empleo de didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTP) o método de Sanger y el método químico o de Maxam y Gilbert.

El método de Sanger emplea ddNTP que carecen del grupo hidroxilo del carbono 3', de forma que cuando uno de estos nucleótidos se incorpora a una cadena de ADN en crecimiento esta no puede proseguir elongándose. Para la realización de este método es necesaria una hebra molde de ADN de cadena simple, un cebador, una ADN polimerasa I de *E. coli* con nucleótidos marcados radiactivamente o mediante fluorescencia y los ddNTP. La muestra de ADN se separa en cuatro reacciones de secuenciación separadas (dATP, dGTP, dCTP y dTTP). La incorporación de ddNTP en la nueva cadena de ADN termina la prolongación produciendo varios fragmentos de longitud variable. Los fragmentos de ADN sintetizados y marcados de nuevo son desnaturalizados por calor y separados por tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-urea. Cada una de las 4 reacciones de síntesis se corre en carriles aislados (Carril A, T, G y C) y se observan las bandas de ADN mediante autorradiografía o luz ultravioleta y la secuencia de ADN se puede leer a partir de la placa de rayos X o de la imagen del gel [139].

1.8.2 Electroforesis en Gel de Campo pulsado

Mediante campos eléctricos pulsados se pueden separar las moléculas de ADN. Esta separación por masa molecular es motivada porque las moléculas de ADN extendidas y orientadas en los campos eléctricos originales se relajan, formando ovillos cuando el campo eléctrico es eliminado o se cambia la dirección del mismo. El grado de relajación varía en función del tamaño del ADN. Las enzimas implicadas en este proceso podrían ser lisozimas, proteinasa K, SmaI o XbaI [140].

1.8.3 MALDI-TOF MS

Esta técnica requiere que un microorganismo aislado sea cultivado en un medio sólido o líquido de cultivo. Las células del microorganismo se mezclan con la matriz en una placa y posteriormente es analizada en el MALDI-TOF MS. Se obtienen una serie de picos que forman la huella digital. Estos picos representan moléculas de dentro o de la superficie de los microorganismos (incluidas proteínas). La presencia de estas proteínas viene atribuida a la expresión génica diferente que tienen las bacterias a nivel de género, especie y cepa. Podemos comparar espectros de masas de proteínas con espectros de masas que están recogidos en bases de datos. Una vez que se identifican las proteínas se puede secundariamente deducir el microorganismo [141].

1.8.4 Metagenómica

Fue descrita por primera vez en 1998 por Handelsman y Rodon. Se define como el análisis de los genomas colectivos presentes en un entorno o ecosistema definido. En las últimas décadas en el estudio de la microbiota se han empleado técnicas de alto rendimiento usando la tecnología de la pirosecuenciación con el sistema 454 Life Science y la secuenciación masiva mediante el sistema Illumina.

La técnica de la pirosecuenciación se basa en la incorporación secuencial de nucleótidos sobre una cadena de ADN molde y la secuencia de esta cadena se deduce por el orden en el que los diferentes nucleótidos fueron incorporados en la cadena en crecimiento (complementaria del ADN molde). El sistema GS FLX produce alrededor de 400000 lecturas con una longitud media de 250pb. Estos tamaños son suficientes para analizar la mayor parte de las regiones variables del gen ARNr. Un gran número de muestras pueden ser agrupadas en una placa mediante el uso de cortas secuencias de códigos de barra aumentando la especificidad de los cebadores de la PCR para la región variable que será secuenciada [142].

La bioinformática permite a los investigadores identificar las principales funciones y genes que codifican enzimas de interés clínico o industrial. El genoma completo de microorganismos particularmente abundantes se puede reconstruir proporcionando una visión más integral de su potencial biológico [143].

1.8.5 Metatranscriptómica

La metatranscriptómica a diferencia de la metagenómica permite conocer las actividades particulares de una comunidad en un entorno específico. Permite estudiar cómo varían los fenotipos de las comunidades bacterianas con el tiempo mediante el análisis del ARN en respuesta a diferentes exposiciones ambientales y patógenas. La metatranscriptómica sumada a los datos metagenómicos proporciona información acerca de que genes se expresan en una comunidad microbiana y permite el estudio de qué cambios transcripcionales ocurren en respuesta a los diferentes microbios [144].

1.8.6 Metabolómica

El metaboloma incluye todos los metabolitos de una célula, tejido u organismo producto de los procesos celulares. La metabolómica de los fluidos biológicos como orina, suero o heces se consigue mediante técnicas espectroscópicas que pueden utilizarse para el análisis global de

metabolitos o para un enfoque dirigido de metabolitos seleccionados. Los perfiles metabólicos pueden unirse con la metagenómica y metatranscriptómica utilizando modelos computacionales multivariados para proporcionar información sobre la función microbiana en condiciones ambientales variables. Por ejemplo en un estudio de ratones colonizados con una microbiota intestinal humana, la introducción de un producto lácteo fermentado no produjo cambios marcados en la estructura de la microbiota intestinal si embargo, el análisis metatranscriptómico de muestras fecales y metabolitos urinarios revelaron cambios importantes en la expresión de enzimas microbianas involucradas en el metabolismo de carbohidratos [145].

1.8.7 Metaproteómica

La metaproteómica se encarga del estudio de las proteínas que se expresan en muestras ambientales. Permite obtener información acerca de la diversidad funcional de la microbiota intestinal indicando que procesos metabólicos están en curso y cómo están afectados por cambios en el medio. Comparado con la metatranscriptómica, proporciona información más estable ya que el estudio de la expresión del ARN no tiene en cuenta la regulación postranscripcional. Se está realizando una identificación no selectiva de alto rendimiento de miles de proteínas de hábitats microbianos complejos. Este proceso implica la lisis celular y la posterior digestión enzimática de todas las proteínas de la muestra. Los fragmentos peptídicos resultantes se separan por cromatografía líquida y se someten a espectrometría de masas. Posteriormente el resultado se cuantifica y se compara con las bases de datos de referencia predichas a partir de la secuencia genómica. Este método no requiere separación basada en gel ni secuenciación de proteínas *de novo* y ya se ha aplicado a pacientes con EII [146][147].

1.9 Microbiota intestinal y enfermedad inflamatoria intestinal

1.9.1 Conceptos generales

La participación del microbioma en la etiopatogenia de la EII es compleja. Los hallazgos en modelos animales han identificado variaciones en la microbiota con diferentes roles en la enfermedad que van desde acciones protectoras a pro-inflamatorias. Durante los últimos años numerosos estudios han comparado la composición de la microbiota intestinal de pacientes con EII con la presente en individuos sanos pero estos cambios observados no siempre han sido consistentes.

Globalmente se ha observado una disminución en la diversidad microbiana y en la estabilidad de la microbiota [148]. También se ha identificado una disminución en taxones específicos incluidos en los filos Firmicutes y Bacteroidetes y en algunos casos se observó aumento de anaerobios facultativos como Enterobacterias, Escherichia y Fusobacterium [149]. Se han visto diferencias en la composición de la microbiota también entre pacientes con CU y EC. En el estudio de Joossens *et al* se identificaron cinco especies bacterianas que caracterizaron la disbiosis predominante en pacientes con EC (*Dialister invisus*, una especie no caracterizada de *Clostridium XIVa*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium adolescentis* y *Ruminococcus gnavus*. De estas especies, *F. prausnitzii* se ha visto que presenta actividad anti inflamatoria pudiéndose asociar a una prolongación del estado de remisión de los pacientes con EC. En este estudio también se identificaron cambios en la microbiota intestinal de los familiares de los pacientes con EC al compararlos con la microbiota en individuos sanos lo que ha desencadenado nuevos estudios en este campo [150].

Además de los cambios en los componentes visualizados tanto en modelos animales como en heces y biopsias de pacientes con EII también se ha visto que la disbiosis afecta a la producción de los metabolitos por parte de las bacterias intestinales. En pacientes con EII se ha visto una menor producción de ácidos grasos de cadena corta producidos habitualmente por las bacterias comensales. Estos ácidos grasos son utilizados como fuente de energía por el epitelio intestinal [151].

Otro escenario en el que intervienen las bacterias comensales es la producción de metabolitos que previenen la colonización por especies patógenas como es por el ejemplo el polisacárido A sintetizado por *Bacteroides fragilis*. Esta molécula está implicada en la supresión de producción de IL17 y la mejora de las células T CD4+ previniendo la colitis inducida por *Helicobacter hepaticus* [152].

En un estudio recientemente publicado se correlacionaron los cambios en la microbiota con las exacerbaciones de la EC. Se recogieron muestras fecales de 196 pacientes observándose que durante el brote de la enfermedad 105 vías metabólicas disminuyeron en comparación con las muestras tomadas de los pacientes en remisión. La mayoría de estas vías metabólicas que descendieron, presentan propiedades antiinflamatorias facilitando la biosíntesis y la fermentación de varios aminoácidos como triptófano, metionina o arginina, vitaminas y ácidos grasos de cadena corta [153].

1.9.2 Modelos animales de EII

Los modelos animales de EII inducida experimentalmente son útiles para comprender más sobre la alteración de la microbiota intestinal, identificar nuevos objetivos para la intervención terapéutica y probar nuevas terapias. Los cinco modelos de ratón más utilizados fueron: inducción química de colitis por sulfato sódico de dextrano (DSS), colitis inducida por hapteno a través del ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS), colitis inducida por *Helicobacter* en ratones *mdr1a* (- / -), el modelo de colitis por transferencia SCID CD4 (+) CD45RB (hi) y el modelo de colitis IL-10 (- / -) [154].

En esos modelos murinos experimentales se han observado alteraciones en la microbiota intestinal. La diversidad bacteriana disminuye en los ratones con deficiencia de IL10 (IL10-/-) mientras que las Actinobacterias y Proteobacterias (especialmente *E. coli*) se ven aumentadas en algunos modelos y hay cambios variables en el filo Firmicutes y Bacteroidetes; los Clostridiales aumentan mientras que las Lachnospiraceae particularmente los grupos Clostridium XIVa y IV disminuyen [155]. En la EII humana también se observa un aumento de Actinobacterias (excepto las Bifidobacterias) y Proteobacterias, disminución de Lachnospiraceae y cambios variables en Bacteroidetes. Además, hay un aumento de las bacterias asociadas a la mucosa en la EII humana, aunque las concentraciones lumbinales disminuyen. Estos hallazgos indican que las respuestas inmunes del huésped disreguladas están asociadas con amplios cambios en la composición microbiana intestinal comensal en ambas poblaciones [156][157].

Tanto en la colitis experimental como en la EII se ha visto que la inflamación altera la composición microbiana también en cuanto a especies bacterianas individuales. Específicamente, los grupos filogenéticos B2 y D de *E. coli*, y las cepas invasivas adherentes de *E. coli* que se unen a CEACAM6 en las células epiteliales humanas, se han asociado con la EC [158]. Además, los ratones diseñados para expresar el receptor humano CEACAM6 solo desarrollan inflamación intestinal cuando son colonizados con *E. coli* invasiva adherente [159]. Siguiendo esta línea el estudio de Garret *et al* correlacionó la presencia de dos especies pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae: *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis* con el desarrollo de colitis en modelos experimentales de ratón [160]. Mientras que bacterias específicas demostraron empeorar la inflamación intestinal el aumento en la concentración de otras del orden de los Clostridiales como *F. prausnitzii* parecen ser protectoras. En ratones con colitis TNBS (que no albergan *F. prausnitzii*) la administración de *F. prausnitzii* disminuye los

niveles de inflamación [161]. Estos hallazgos sugieren que cambios en especies bacterianas específicas podrían afectar a toda la composición de la comunidad microbiana aumentando o atenuando la carga de inflamación intestinal.

1.9.3 Diversidad y estabilidad

Una de las primeras enfermedades estudiadas a nivel microbiano mediante metagenómica de alto rendimiento fue la EII. En 2010, Qin *et al* basado en la proporción de 155 especies microbianas presentes en más de un 1% en cada individuo pudo separar pacientes con CU, EC e individuos sanos (**Figura 2**). Estos resultados sugieren que la microbiota de los pacientes con EII presenta menor diversidad en comparación con los individuos sanos [119].

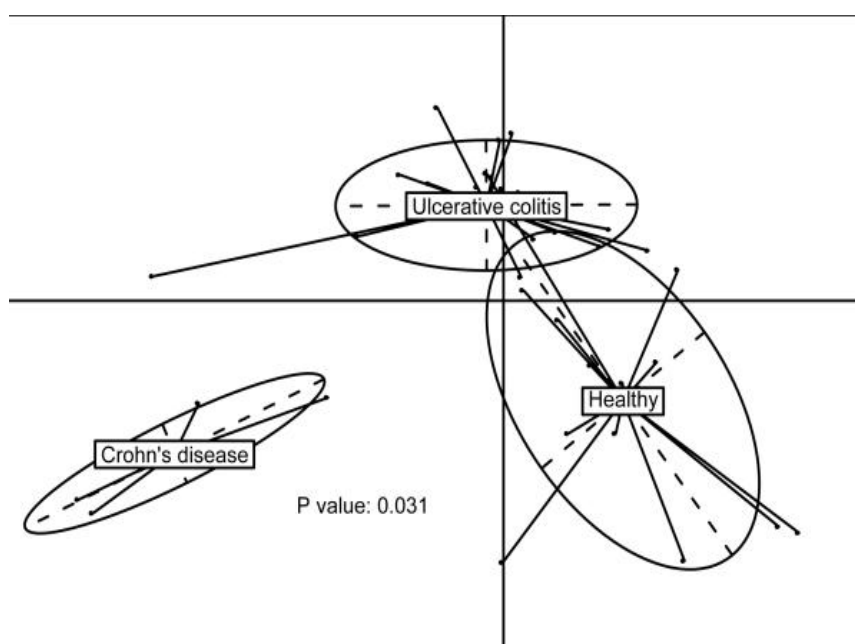


Figura 2. Diferencia de abundancia de especies bacterianas en pacientes con EII e individuos sanos.

Imagen de Qin y cols [119]. Nature. Copyright © 2010.

Existen múltiples estudios llevados a cabo en gemelos que ponen de manifiesto la importancia de la heredabilidad y posteriormente de la microbiota intestinal en la etiopatogenia de la EII. El primer estudio llevado a cabo en gemelos con EII data de 1988 en él se observó una tasa de concordancia entre gemelos monocigóticos de 6,3% para CU y 58,3% para EC [162]. Agrupando los estudios de gemelos recientes las estimaciones de heredabilidad para la EC y la CU son 0,75 y 0,67, respectivamente. Sin embargo, las estimaciones de los Estudios de Asociación Genómica (GWAS) son mucho más bajas. Es probable que esta "falta de

heredabilidad" se deba a deficiencias tanto en los estudios familiares como en GWAS dado que no tienen en cuenta el entorno familiar compartido y consideran la varianza genética y ambiental como entidades separadas cuando probablemente exista una interacción multidireccional compleja [163]. En estudios más recientes se añadió al concepto de heredabilidad las alteraciones de la microbiota intestinal en "gemelos discordantes". En el estudio de Lepage *et al* se realizaron biopsias de colon sigmoideo a pacientes con CU y a sus gemelos sanos (parejas de "gemelos discordantes") y también a parejas de gemelos sin CU. Se determinaron los perfiles de ARN mensajero mediante ARN ribosómico 16S. Se observó que los gemelos con CU tenían menos diversidad en la microbiota bacteriana y más Actinobacteria y Proteobacteria que sus gemelos sanos. A su vez el gemelo sano de los "gemelos discordantes" presentaba menos diversidad y más abundancia de Lachnospira y Ruminococcus que los presentados cuando ambos gemelos eran sanos. En este estudio también se observó que las transcripciones relacionadas con las respuestas oxidativas e inmunitarias se expresaron significativamente diferente entre los gemelos con CU y sus gemelos sanos [164]. En otro estudio en el que se incluyeron 40 parejas de gemelos concordantes o discordantes para EC o CU no se vieron diferencias entre el gemelo con CU y el hermano sano si bien es cierto que la mayor parte de los pacientes se encontraba en remisión que se ha relacionado con la restauración de la microbiota. Sin embargo los gemelos con EC presentaban una composición microbiana diferente a los gemelos sanos sobre todo aquellos con afectación ileal en los que se observó desaparición de bacterias centrales como Faecalibacterium y Roseburia y mayores cantidades de Enterobacterias y *Ruminococcus gnavus* [165].

En el estudio de Gevers *et al* realizado sobre una cohorte de edad pediátrica con 447 pacientes con EC y 221 controles sanos se analizó la microbiota intestinal en heces y en biopsias de los diferentes tramos (íleon terminal y recto). Se incluyeron sólo pacientes con EC recién diagnosticados para impedir la interferencia de tratamientos ya iniciados. Se recogieron un total de 1321 biopsias y 304 muestras fecales que se analizaron mediante secuenciación usando ARNr 16S por Illumina. De nuevo se corroboró en este estudio que en biopsias la inflamación está asociada a una caída en la biodiversidad de las especies incluyendo Enterobacterias, Bacteroidales y Clostridiales con aumento de Pasteurella, Veillonella, Neisseria y Fusobacteria. Por el contrario, en las muestras fecales este desbalance entre individuos sanos y pacientes con EC no se demostró, lo que sugiere un mayor rendimiento en las muestras obtenidas de la mucosa

ileal y rectal que en las muestras fecales. 57 de los 447 pacientes estuvo expuesto a antibióticos justo antes del debut y al comparar este grupo con el resto de pacientes con EC se observó que presentaban una mayor disbiosis [166].

En el estudio de Michail *et al* en pacientes con CU en edad pediátrica se compararon muestras fecales de 27 pacientes con CU grave y 26 controles sanos mediante PCR de ARNr 16S. Se observó una reducción de la diversidad fundamentalmente originada por una pérdida de especies bacterianas (266 ± 69) en CU versus (758 ± 3) en controles ($p < 0,001$).

En los pacientes hubo una disminución en el porcentaje en Firmicutes, Lentisferas y Verrucomicrobia y un aumento en Proteobacteria, Fusobacteria y Espiroquetas. Los mayores cambios se observaron como una disminución del 5% en Firmicutes y un aumento del 3.6% en las Proteobacterias. Un hallazgo interesante en este estudio fue que el grupo de niños que fracasaron al tratamiento con corticoides tuvieron significativamente menos diversidad microbiana que los que respondieron a la toma de esteroides (142 ± 49 vs 338 ± 62 filo especies detectadas respectivamente, $p = 0,013$) [167].

1.9.4 Alteraciones específicas de la microbiota

Además de las alteraciones globales de la diversidad microbiana, se han relacionado diversos géneros y especies individuales bacterianas patogénicas en la EII. Especies individuales pueden desempeñar un papel importante en la inmunomodulación jugando un papel clave en la persistencia de la respuesta inflamatoria.

Las especies candidatas a influir en la patogénesis de la EII fueron *Escherichia coli* y *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP), *Campylobacter jejuni*, *Fusobacterium*, *Bacteroides* y *Faecalibacterium prausnitzii*.

a) *Escherichia coli*

En múltiples estudios se ha observado un aumento en el número de *E. coli* asociado a la mucosa en comparación con controles sanos. Se trata de un bacilo gram-negativo de la familia de las Enterobacterias, juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis y no está implicado en la enfermedad salvo que se deteriore la barrera intestinal. El primer estudio realizado fue en 1978 en el que se observó un aumento de los anticuerpos contra el antígeno O de *E. coli* en pacientes con EII [168]. En cuanto a CU hay estudios que determinan que está aumentada en heces y biopsias, aunque en mucha menor proporción que en la EC. En la EC *E.*

coli se ha relacionado de manera consistente con una mayor abundancia tanto en heces pero aún más predominante en muestras de mucosa [169][170].

Se han descrito incremento de *E. coli* con propiedades invasivas, se conoce a este grupo como *E. coli* adherente-invasiva (AIEC). Se han descrito en este grupo incremento de los factores virulentos que le permiten adherirse e invadir células intestinales, estos factores virulentos son el desarrollo de flagelo, pili tipo 1 y porinas de membrana externa tipo C [171]. Además, AIEC es capaz de resistir la fagocitosis sobreviviendo y replicándose en grandes vacuolas dentro de los macrófagos sin desencadenar la muerte de la célula huésped [172]. In vitro inducen una respuesta inflamatoria con secreción de citoquinas y originando granulomas. Los pili tipo 1 se unen al receptor CEACAM-6 de las células epiteliales ileales de pacientes con EC. Aunque también se han identificado las AIEC en personas sanas, son mucho menos prevalentes y se ha visto que no se adhieren a enterocitos ileales en individuos sanos [173].

Hoy en día existe la controversia de que las AIEC por una parte podrían iniciar la enfermedad desencadenando la inflamación, pero por otra podrían ser simplemente colonizadoras de una situación inflamatoria preexistente actuando como factor agravante.

b) *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP)

Existen dos revisiones sistemáticas con metaanálisis en pacientes con EC y presencia de MAP. En la primera se incluyeron 28 estudios caso-control comparando MAP en pacientes con EC con individuos sanos o con CU mediante PCR en biopsias o anticuerpos en suero. La MAP se detectó con mayor frecuencia en pacientes con EC que en sanos y pacientes con CU [174]. En la segunda revisión sólo se incluyeron estudios de muestras de tejido mediante PCR o hibridación in situ. Se incluyeron 47 estudios en los que MAP se detectó con mayor frecuencia en EC que en los controles [175]. Ambos metaanálisis fueron criticados por excluir estudios en los que MAP no se detectaba ni en pacientes ni en controles [176]. En un estudio en el que analizaron más de 15000 genes mediante ARNr16S no se detectó MAP en pacientes con EC, pero es cierto que las dificultades en la extracción de ADN de MAP puede explicar el fracaso de la detección en muchos estudios [149].

Se ha propuesto el uso de antimicobacterianos en el tratamiento de la EC, el resultado del ensayo clínico randomizado controlado con placebo que incluyó 213 pacientes no mostró beneficio (a dos años el 59% del grupo con antibioterapia frente al 50% en el grupo placebo habían recaído)

[177].

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

c) *Campylobacter jejuni*

Se trata de un bacilo gram-negativo. En varios estudios ha demostrado capacidad de alterar las uniones epiteliales con el consecuente aumento de la permeabilidad permitiendo la translocación de organismos comensales a través de las capas epiteliales [178]. En un estudio Danés que comparó pacientes con infección por *Salmonella* o *Campylobacter* frente a individuos que nunca presentaran esta infección se observó un mayor riesgo de desarrollar EII sobre todo durante el primer año pero permaneció alto hasta 15 años después de desarrollar la infección [179]. En las células infectadas por *C. jejuni* se observó una pérdida del potencial transmembrana mitocondrial y agotamiento de ATP secundario a estrés metabólico. Esta evidencia sugiere que puede desempeñar un papel en la patogénesis de la EII al promover la internalización y translocación de bacterias comensales, al menos en parte, a través de vías relacionadas con el estrés. En varios estudios se han confirmado estas teorías al observar en pacientes con infección por *C. jejuni* la translocación de *E. coli* a través de las uniones epiteliales estrechas y de las balsas lipídicas epiteliales que conducen a la interacción con los receptores NOD-2 y a la liberación del FNkB [180]

d) *Fusobacterium*

Se trata de un bacilo gram negativo que interviene en el metabolismo de ácido butírico. Concretamente la especie que se ha identificado más frecuente en la mucosa de pacientes con CU ha sido *Fusobacterium varium*. Ohkusa *et al* identificaron aumento de la presencia de *F. varium* en la mucosa de pacientes con CU así como anticuerpos específicos frente a este en suero [181]. Este mismo autor publicó un estudio experimental en ratones a los que le infundía enemas con *F. varium* desarrollando la aparición en la mucosa colónica de úlceras con abscesos de criptas y un infiltrado inflamatorio y cambios apoptóticos muy similares al visualizado en pacientes con CU [182] *F. varium* invade las células epiteliales del colon estimulando la producción de citoquinas pro inflamatorias como IL8 y TNFalfa. Por otra parte se ha corroborado mediante técnicas de inmunohistoquímica que la expresión de IL8, TNFalfa y FNkB p65 del núcleo se encuentra aumentada en la mucosa del recto de los individuos con CU activa pero no así cuando se encuentran inactivos [183].

Kato *et al* publicaron un estudio multicéntrico en el que incluyeron 30 pacientes con CU refractaria a corticoides y 64 con corticodependencia. Los pacientes recibieron durante dos

semanas amoxicilina + tetraciclina + metronidazol y al final del tratamiento un 63% del primer grupo y un 73% del segundo grupo habían presentado respuesta clínica [184]. Estos hallazgos van en concordancia con el estudio previo de Nomura *et al* en el que se demostró una reducción del número de *F. varium* en las muestras de la mucosa de los pacientes con CU que respondieron al tratamiento [185].

e) *Bacteroides*

Es un género que incluye gran número de especies gram negativas anaerobias normalmente comensales constituyendo uno de los principales componentes de la microbiota del TGI. Pertenece al orden de los Bacteroidales y al filo Bacteroidetes.

Matsuda *et al* detectaron un aumento de *Bacteroides* sobre todo *B. vulgatus* en la microbiota intestinal de pacientes con CU frente a controles sanos. Así mismo investigaron la respuesta de anticuerpos en suero frente a las bacterias aisladas en la mucosa afecta; se descubrió un determinante antigénico único de *B. vulgatus* y se observó que la IgG contra esta proteína fue mucho mayor en pacientes con CU (53,8%) que en los sueros de controles sanos (9,1%). La formación de anticuerpos contra *B. vulgatus* en estos pacientes podría orientar a que puede tener un papel en la etiopatogenia de la enfermedad [186]. Algunas cepas de *B. fragilis* producen enterotoxinas que se han detectado significativamente en mayor proporción en pacientes con CU y diarrea en comparación con controles sanos [187]. En el estudio de Vrakas *et al* se observaron mayores proporciones de *Bacteroides* en EC activa, así como en EC y CU inactiva que en los controles ($P < 0.05$); las proporciones también fueron mayores en muestras de CU activa que en controles pero sin lograr alcanzar la significación estadística [188]. En varios estudios se ha visto que *B. fragilis* estimula la liberación de IL8, la división de la cadherina E y la proliferación de células epiteliales. En modelos de ratón la inoculación de *B. fragilis* enterotoxigénica indujo el desarrollo de colitis con aparición de engrosamiento de la mucosa colónica con infiltrado celular, abscesos de cripta y ulceración de las células epiteliales [189]. También se ha visto que otras cepas como *B. vulgatus* activan FNkB en las células epiteliales intestinales humanas [190].

En un estudio longitudinal que incluyó 22 pacientes con colectomía con realización de reservorio ileoanal tras CU grave se detectaron aumentos significativos de diferentes cepas de *Bacteroides* coincidiendo con la aparición de inflamación (reservoritis)[191].

Todos estos datos apoyan la hipótesis de que la colonización por ciertas cepas de *Bacteroides* pueden tener un papel en el desarrollo de la CU.

f) *Faecalibacterium prausnitzii*

Se trata de un género que abarca cepas gram positivas anaeróbicas que forman parte de la microbiota comensal del ser humano. Pertenece al orden de los Clostridiales y al filo Firmicutes. *F. prausnitzii* ha demostrado actividad anti inflamatoria en múltiples estudios tanto en pacientes con CU como EC. Se ha demostrado que *F. prausnitzii* se encuentra en menor proporción en pacientes con CU tanto en actividad como en remisión. En un estudio en el que se incluyeron 116 pacientes con CU en remisión, 29 familiares de estos pacientes y 31 controles sanos se observó que la menor proporción de *F. prausnitzii* se relacionaba con menor tiempo en remisión y mayor número de recaídas. Así mismo tras un brote, las cifras de *F. prausnitzii* iban aumentando y eran mayores en aquellos que presentaban remisión mantenida [192]. En un metaanálisis que incluyó 11 estudios con una n de 1180 pacientes se demostró que la densidad de *F. prausnitzii* era menor en pacientes con EII en comparación con controles sanos pero que esta reducción era particularmente acusada en los pacientes con EC con afectación ileal [193]. Recientemente se ha demostrado en modelos murinos que *F. prausnitzii* podría regular la diferenciación de células Th 17 a células Treg. El butirato, en lugar de otras sustancias producidas por *F. prausnitzii* es el que permite mantener este equilibrio Th17/Treg ejerciendo los efectos antiinflamatorios sobre la colitis al inhibir la histona desacetilasa 1 para promover Foxp3 y bloquear así el eje IL6/STAT3/IL17 [194]. En varios estudios en pacientes con EII se han demostrado niveles más bajos de butirato en relación a la disminución de las bacterias productoras del mismo. La depleción de estas bacterias productoras de butirato reduce la señalización epitelial a través del receptor PPAR γ aumentando así la biodisponibilidad luminal de oxígeno resultante en la expansión disbiótica sobre todo de Enterobacterias patógenas [195]. Un estudio piloto demostró que la suplementación con butirato oral puede mejorar la eficacia de la mesalazina oral reduciendo la relación *Bacteroides fragilis*/*F. prausnitzii*. Demostró mejorar los síntomas (frecuencia de deposiciones y sangrado) en el 85% de los pacientes con CU en el grupo del butirato frente al 55% en el grupo con mesalazina sola [196].

1.10. Microbiota intestinal como diana terapéutica

1.10.1 Probióticos

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que administrados en concentraciones adecuadas confieren efectos beneficiosos para la salud del hospedador. Las especies probióticas pueden colonizar la mucosa del TGI evitando la colonización por patógenos potenciales (fenómeno denominado como resistencia a la colonización). Esta estrategia se consigue mediante el agotamiento de recursos nutricionales disponibles o la alteración del medio ambiente mediante la alteración del pH o la producción de moco. Esto deriva en condiciones ambientales hostiles en las que especies dañinas no pueden competir [197]. Otro mecanismo posible por el que podrían actuar sería que las bacterias beneficiosas podrían alterar los perfiles de expresión génica de posibles patógenos resultando en una disminución de la expresión de los factores virulentos [198]. Muchos de los géneros empleados como *Lactobacillus* y *Bifidobacteria* pertenecen a la microbiota comensal sana y son cruciales en el mantenimiento de la homeostasis y del estado de salud. En modelos experimentales en ratón se estudiaron los efectos de dos probióticos: *Lactobacillus paracasey* y *L. rhamnosus*. La presencia de estas bacterias en el ratón alteró los perfiles metabólicos sanguíneos y tisulares aumentando la acumulación de ácidos biliares lo que condujo a una mayor absorción de lípidos a nivel del intestino. Las bacterias cambiaron la composición lipídica de las heces y la absorción de vitaminas y minerales. Estos hallazgos indican que es un producto de la bacteria y no la bacteria en sí misma la que podría producir los efectos beneficiosos [199].

En cuanto al uso de probióticos en EII, no han cumplido las expectativas en humanos que se preveían en los modelos animales y estudios in vitro.

En un metaanálisis publicado en 2017 en el que se incluyeron 22 ensayos clínicos no se observó ningún beneficio de los probióticos en comparación a placebo en la inducción de la remisión en CU activa. Sin embargo, cuando sólo se consideraron los ensayos de la formulación de De Simone pareció haber un beneficio (RR=0,74; IC95% 0,63-0,87). En este metaanálisis los probióticos parecen equivalentes a la mesalazina en la prevención de la recaída de la CU pero no hubo ningún beneficio en los pacientes con EC (ni en la inducción de la remisión ni en la prevención de la recaída o recurrencia postquirúrgica) [200].

Solo un ensayo clínico en pacientes con EC demostró ligera mejoría clínica en pacientes con actividad empleando un simbiótico (*Bifidobacterium longum* e inulina/FOS). El ensayo se

realizó sobre 35 pacientes, se evaluó el estado clínico y se tomaron biopsias al inicio, a los 3 y a los 6 meses. Se realizó PCR de ARNr 16S. Se obtuvieron mejorías en los índices clínicos de actividad en el grupo con toma de simbióticos con reducciones significativas en la expresión de TNF alfa a los 3 meses pero no a los 6 meses [201].

Los probióticos en CU han presentado un escenario más prometedor. Se realizó un ensayo clínico para evaluar la eficacia de *E. coli Nissle* 1917 en el mantenimiento de la remisión en la CU. Se incluyeron 327 pacientes con CU aleatorizados a recibir el probiótico con *E. coli Nissle* versus mesalazina 1,5g al día. Se observó recidiva de la enfermedad al año en un 36,4% del grupo tratado con el probiótico frente a 33,9% en el grupo tratado con mesalazina por lo que el probiótico con *E. coli Nissle* demostró ser equivalente a la mesalazina en el mantenimiento de la remisión [202]. La formulación de De Simone se trata de una mezcla de probióticos que contiene 3 cepas de Bifidobacterias (*B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*), 4 de lactobacilos (*L. casei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subsp Bulgaricus*) y una cepa de *Streptococcus salivarius thermophilus* y ha sido estudiado en pacientes con EII. En un ensayo clínico ha demostrado su eficacia en cuanto a la inducción de la remisión en los pacientes con CU leve moderada [203] y en otros estudios ha tenido resultados favorables en cuanto a la inducción y mantenimiento de la remisión tanto por sí sólo como asociado al tratamiento convencional [204][205].

La reservoritis (inflamación del reservorio ileoanal en pacientes a los que se le realizó una panproctocolectomía total) es el escenario donde los probióticos han demostrado tener una mayor eficacia. La teoría más aceptada para explicar la mayor respuesta en estos pacientes es que en ellos se alcanza una mayor concentración de bacterias al ser el reservorio un compartimento más estanco. En un metaanálisis que incluyó 11 ensayos clínicos la formulación de De Simone demostró ser más efectivo que placebo en cuanto al mantenimiento de la remisión de la reservoritis crónica así como en la prevención de la reservoritis [206].

La ausencia de la respuesta esperada de los probióticos en la EII puede ser debida a que en muchos casos la diana microbiológica es errónea dado que como vimos cada individuo presenta una microbiota sana con diferencias importantes interindividuales. Idealmente la administración de uno u otro probiótico debería de ser individualizada a las carencias/variaciones existentes en cada persona. Por otra parte, es posible que los microorganismos empleados no tengan la suficiente potencia para desplazar la microbiota aberrante por lo que en un futuro es posible que la modificación genética de estos microorganismos derive en una mayor eficacia de los mismos.

1.10.2 Trasplante de microbiota fecal

El trasplante de microbiota fecal (TMF) consiste en la administración de heces procedentes de un donante sano a un paciente a través del tubo digestivo con el objetivo de restaurar la microbiota intestinal de estos receptores enfermos. En los últimos años se ha empezado a ensayar en diferentes enfermedades como es la EII tras el éxito obtenido en el tratamiento de la infección recurrente o refractaria por *Clostridioides difficile*. En una revisión sistemática con metaanálisis en la que se incluyeron 37 estudios (7 ensayos randomizados controlados y 30 series de casos) la resolución clínica de la infección alcanzó el 92% de los pacientes. En aquellos pacientes que había fallado un primer trasplante fecal, la administración de heces consecutiva conseguía aumentar las tasas de respuesta sin aumentar la tasa de eventos adversos graves [207].

Los datos iniciales de trasplante fecal y EII provienen de series de casos. El primer metaanálisis publicado en 2014 incluyó 9 estudios de cohortes, 8 estudios de casos y 1 único ensayo clínico randomizado controlado. Se incluyeron 122 pacientes con EII (79 con CU, 39 con EC y 4 inclasificada). La proporción global de los pacientes que alcanzaron la remisión clínica fue del 36,2% (IC95% 17,4%-60,4%) con una heterogeneidad moderada ($I^2=37\%$). En el análisis por subgrupos la respuesta clínica en los pacientes con CU fue del 22% con datos estadísticamente homogéneos ($I^2=0$) frente al 60,5% en pacientes con EC (con una heterogeneidad moderada $I^2=37\%$) [208]. Posteriormente a este metaanálisis, en 2015 se publicaron dos ensayos clínicos con TMF. En el estudio de Moayyedi *et al* 75, pacientes con CU fueron aleatorizados a recibir TMF o placebo mediante enemas de retención semanales durante 6 semanas. La tasa de remisión definida como Mayo score <3 con Mayo endoscópico de 0 en semana 7 fue significativamente mayor en el grupo del TMF (9/38 (24%) vs 2/37 (5%) $p=0,03$) [209]. En el ensayo clínico de Rossen *et al*, 50 pacientes con CU se aleatorizaron a recibir TMF de donante o autólogo a través de una sonda nasoduodenal en el momento 0 y 3 semanas después. En este estudio no hubo diferencias significativas en la tasa de remisión en los dos grupos [210]. A finales de 2018 se publicó una revisión sistemática Cochrane en la que se incluyeron sólo estudios randomizados o no randomizados pero con brazo control en pacientes con EC o CU sometidos a TMF. Se incluyeron 4 estudios con un total de 277 pacientes todos con CU (no se encontró ningún estudio de estas características realizado en pacientes con EC). 3 de los estudios administraron las heces al receptor mediante vía rectal y uno mediante sonda

nasoduodenal. Los resultados combinados sugieren que el TMF aumenta las tasas de remisión clínica x2 en pacientes con CU en comparación con placebo. A las 8 semanas el 37% (52/140) de los pertenecientes al grupo de TMF lograron la remisión en comparación con el 18% (24/137) del grupo control (RR 2,03, IC 95% 1,07 a 3,86) con heterogeneidad moderada ($I^2 = 50\%$). La remisión endoscópica a las 8 semanas obtuvo unos resultados combinados favorables en el grupo de TMF (30% en el grupo con trasplante frente a 10% en el grupo placebo)[211].

Se ha documentado la importancia de la elección del donante. En el estudio de Moayyedi *et al* se encontró que la mayoría del efecto observado se relacionó con un “super-donante” en particular (7 de los 9 pacientes en remisión habían recibido heces de este único donante). Las diferencias en la microbiota de este donante incluyeron un aumento significativo de la densidad de Lachnospiraceae y Ruminococcus. Así mismo se evaluó si los respondedores tenían mayor similitud en su microbiota a la del donante que los no respondedores; se observó una tendencia no significativa a que los que habían respondido tuvieran una microbiota más similar a la del “super-donante” [209].

El estudio de Kump *et al* se centró en demostrar la importancia del donante en el TMF. Para ello realizó un ensayo abierto controlado que incluyó un grupo de 17 pacientes con CU que recibieron TMF precedido de tratamiento con antibióticos y otro grupo de 10 pacientes con CU que sólo recibió el tratamiento previo con antibióticos. El 59% del grupo que recibió trasplante presentaron respuesta frente al 24% del grupo que recibió sólo antibióticos. Se analizó la composición de la microbiota intestinal en heces de los donantes mediante PCR ARNr 16S. La microbiota intestinal de los pacientes con mayores tasas de respuesta presentaba mayor riqueza bacteriana y aumento de *Akkermansia muciniphila* ($3.3 \pm 3.1\%$ vs $0.1 \pm 0.2\%$), Ruminococcaceae ($13.8 \pm 5.0\%$ vs $7.5 \pm 3.7\%$), y Ruminococcus ($4.9 \pm 3.5\%$ vs $1.0 \pm 0.7\%$) [212].

La seguridad del TMF también fue evaluada en los ensayos clínicos previamente descritos, la mayoría de los eventos adversos fueron leves y a corto plazo. En el metaanálisis de Imdad *et al* el 78% de los que recibieron TMF frente al 75% del grupo control presentaron algún efecto adverso. Entre los eventos adversos más frecuentes se encontraron fiebre, escalofríos, dolor abdominal, náusea, flatulencia y cefalea [211].

La baja eficacia del TMF en CU frente a las altas tasas de respuesta obtenidas para la infección por *Clostridioides difficile* hacen pensar en las interacciones complejas de los diferentes

factores que terminan desembocando en el desarrollo de la enfermedad. Así mismo, la variabilidad de los protocolos del TMF incluyendo los criterios de selección de donantes, la ruta de pretratamiento de la muestra y del receptor y el modo de administración al paciente podrían contribuir a la baja eficacia clínica de TMF. Los factores involucrados en una mejor respuesta al TMF en CU continúan sin estar aclarados. Se ha visto que el diagnóstico reciente podría tener mejores resultados que los que recibieron varios tratamientos y fueron refractarios a los mismos [209].

Paramsothy *et al.* han sugerido que la presencia de actividad endoscópica leve moderada en lugar de grave, el aumento de los clusters de Clostridium IV y XVIII y el aumento de diversidad microbiana pueden ser potenciales predictores de una mejor respuesta al TMF [213].

Se necesitan más estudios de alta calidad para optimizar el protocolo para el TMF y determinar la eficacia en EII a largo plazo. La idoneidad de la composición de la microbiota del donante, así como la vía de administración son cruciales a la hora de aumentar las tasas de respuesta de este tipo de tratamiento.

2. HIPÓTESIS

Consideramos que el microbioma difiere en pacientes con EII e individuos sanos y específicamente que podrían existir genotipos de Bacteroidetes concretos implicados en la EII. En caso de confirmarse nuestra hipótesis podría aplicarse como herramienta de diagnóstico precoz.

3. OBJETIVOS

Objetivo principal: Demostrar que los genotipos de Bacteroidetes dentro de la microbiota intestinal difieren en pacientes con colitis ulcerosa frente a individuos sanos.

Objetivos secundarios:

- Desarrollo de una técnica con capacidad de diferenciar genotipos de Bacteroidetes en muestras de heces y biopsias.
- Estudiar la diferencia de genotipos en pacientes con actividad y en pacientes en remisión de su EII, tanto de CU como de EC.
- Comparar los genotipos de Bacteroidetes encontrados en muestras de heces y biopsias de un mismo paciente al diagnóstico.
- Estudiar la asociación entre genotipos de Bacteroidetes en biopsias colónicas y muestras fecales y el grado de actividad endoscópica.
- Correlacionar los diferentes genotipos encontrados con los reactantes de fase aguda serológicos (proteína C reactiva y calprotectina fecal).
- Creación de una sonda de detección del genotipo más frecuentemente identificado en los pacientes con colitis ulcerosa.
- Observar cambios histológicos en intestino de ratones tras la inoculación de heces de un paciente con EC en actividad.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Diseño del estudio

El estudio se dividió en 3 fases, una primera fase (Estudio 1) en la que se desarrolló la técnica de identificación de genotipos de Bacteroidetes en biopsias en una serie de pacientes con EII, una segunda fase (Estudio 2) en la que se realizó un estudio caso-control en pacientes con CU e individuos voluntarios sanos y una tercera fase (Estudio 3) en la que se realizó la evaluación histológica en intestino de ratones tras inoculación de heces de individuos con EC activa y controles.

4.2 Población

Estudio 1: Se incluyeron consecutivamente pacientes con diagnóstico confirmado de EII (tanto CU como EC) en seguimiento en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela que acudieron a realizar una colonoscopia según práctica clínica habitual.

Criterios de inclusión Estudio 1:

- Edad ≥ 18 años
- Diagnóstico establecido de EII, tanto de CU como de EC, según los criterios diagnósticos de la ECCO [1][2].
- Firma del consentimiento informado

Estudio 2: Se identificaron e incluyeron prospectivamente pacientes con diagnóstico de debut de CU en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela entre Junio 2017 y Enero 2019 que posteriormente realizaron seguimiento en la Unidad de EII de dicho centro.

Criterios de inclusión Estudio 2 para los casos:

- Edad ≥ 18 años
- Diagnóstico debut de CU según los criterios diagnósticos de la ECCO[1].
- Firma del consentimiento informado

Criterios de inclusión Estudio 2 para los controles:

- Edad ≥ 18 años sin patología previa
- Firma consentimiento informado

Criterios de exclusión para Estudio 1 y 2:

- Edad < 18 años
- Embarazo o lactancia
- Incapacidad para comprender el estudio y/o firmar el consentimiento informado
- Cualquier enfermedad maligna no considerada como curada
- Toma de antibióticos o probióticos en los últimos 30 días
- Infección concomitante por *Clostridioides difficile* u otro patógeno entérico
- Enfermedad grave que requiere hospitalización
- Necesidad de cualquier tratamiento farmacológico que pueda alterar la microbiota intestinal en los 3 meses anteriores
- Consumo de cualquier fármaco experimental en las 4 semanas previas a la inclusión en el estudio.
- Cualquier enfermedad hepática o enfermedad malabsortiva que pueda considerarse que altere la microbiota intestinal

Estudio 3: se emplearon ratones hembra Swiss ICR-CD1 con edad comprendida entre 8 y 10 semanas. Los experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones del animalario de la USC en consonancia con la regulación europea de protección de animales (Directiva 86/609), la Declaración de Helsinki, y/o la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio adoptada y promulgada por los Institutos Nacionales de la Salud de los Estados Unidos (Publicación NIH No. 85-23, revisado en 1996). Los ensayos fueron llevados a cabo por personal con la acreditación en vigor de manipulación de animales de experimentación.

4.3 Descripción de la intervención

Estudio 1:

Visita 1: Fueron invitados a participar en el estudio pacientes con EC o CU a los que se le solicitó (siguiendo la práctica clínica habitual) una colonoscopia. Una vez obtenido el consentimiento informado, el día de la colonoscopia se recogieron 2 biopsias para la realización del genotipado de Bacteroidetes. Se recogieron variables demográficas y los valores de las

variables presentes en la analítica más cercana a la colonoscopia siempre que esta no superase ± 30 días de la misma.

Estudio 2 Casos:

Visita 1: Pacientes con sospecha de CU, basándose en clínica y bioquímica, previamente a su inclusión, se les informó por oral y por escrito sobre el estudio. Una vez obtenido el consentimiento informado, en caso de confirmarse el diagnóstico el día de la colonoscopia se recogieron 2 biopsias para la realización del genotipado de Bacteroidetes. Se le indicó al paciente que aportase muestra de heces en visita 2.

Visita 2: Tuvo lugar en los 15 primeros días tras la realización de la colonoscopia de diagnóstico. Se recogieron muestras de heces. Se cumplimentó la historia clínica siguiendo el curso habitual, se registraron las variables demográficas y se le realizó una analítica sanguínea según práctica clínica habitual incluyendo biomarcadores (proteína C reactiva y CF).

Estudio 2 Controles:

Voluntarios sanos que tras consentir su participación en el estudio aportaron una muestra de heces para estudio de microbiota. Se completaron variables sociodemográficas.

4.4 Variables del estudio y definiciones

- Se incluyeron variables sociodemográficas acerca de las características individuales de cada individuo (fecha de nacimiento, sexo, antecedentes familiares de EII).
- La información relativa al hábito tabáquico se definió como [214]:
 - Fumador activo: si ha fumado al menos 1 cigarrillo/día en los últimos 6 meses.
 - Exfumador: hábito tabáquico previo. Si no han transcurrido más de 6 meses desde su retirada se considera fumador activo.
 - Nunca fumador: nunca ha fumado o ha fumado menos de 100 cigarrillos en toda su vida.
- Fecha de diagnóstico de la EII (referencia: fecha de realización de colonoscopia)
- Manifestaciones extraintestinales
- Fenotipo de la enfermedad [8]:
 - Fenotipo de la CU: se empleó la clasificación de Montreal para definir E1 proctitis ulcerosa, E2 colitis ulcerosa izquierda o E3 colitis ulcerosa extensa.

- Fenotipo de la EC: se empleó la clasificación de Montreal. Divide la extensión en L1 ileal, L2 colónica, L3 ileocólica y L4 de tracto digestivo alto y el comportamiento en B1 inflamatorio, B2 estenosante y B3 penetrante.
 - Enfermedad perianal
 - Actividad endoscópica [83]:
 - CU: se clasificó según el índice Mayo
 - EC: se clasificó según el índice SES-CD
 - Tratamiento actualizado en el momento de la recogida de la muestra en el Estudio 1.
 - Variables analíticas
- Se recogieron los datos cuantitativos de las plaquetas, la hemoglobina (g/dl), leucocitos, albúmina, proteína C reactiva, velocidad de sedimentación globular y CF
- Porcentaje de los diferentes genotipos de Bacteroidetes en cada muestra de heces y biopsias de los individuos.

4.5 Procesado de las muestras

4.5.1 Obtención y almacenaje de las muestras

- Muestras fecales: tras la entrega de la muestra de heces por el paciente se procedió a su almacenamiento en un envase estéril y se congeló a -25°C para posteriormente realizar la extracción del ADN bacteriano.
- Biopsias intestinales: las muestras se almacenaron a 4° C en tubos estériles con solución salina tras su recogida en la unidad de endoscopias del Hospital Clínico. Inmediatamente con un intervalo menor de 3 horas, se realizó en el laboratorio lavado del tejido (x3) en solución salina estéril y posteriormente la disrupción tisular con tampón fosfato salino (PBS) y esferas de zirconio (Zirconia/Silica de 0,1mm de diámetro y Minibeadbeater™) durante 3 intervalos (20,20 y 30 segundos) a 4800 oscilaciones/min. Posteriormente el sobrenadante fue recogido en un tubo de 1,5mL centrifugándolo a 10000g durante 5 minutos y el pellet fue almacenado a -25°C para posteriormente realizar la extracción del ADN bacteriano.

4.5.2 Extracción de ADN

- Muestras fecales: se empleó el kit comercial de QIAGEN, QiAamp® DNA Stools Kit-Alemanía. Las condiciones bajo las que se empleó el kit fueron las establecidas por el fabricante exceptuando el último paso del protocolo en el que se empleó agua destilada tratada con

dietilpírocarbonato (DEPC). Se cuantificó mediante Nanodrop la concentración para posteriormente ajustarla a 50ng/μl en agua destilada con DEPC.

- Biopsias: se empleó el protocolo descrito por Ausubel *et al* [215]. Se mezclaron con la muestra 537μl de tampón TE, 30μl de SDS al 10% y 3μl de proteinasa K (20ng/ml) y se dejó durante una hora a 37°C. Posteriormente se le añadieron 100μl de NaCl 5M, 80μl de CTAB/NaCl y se incubó a 65° durante 10 minutos. Posteriormente se añadieron 750μl de cloroformo/alcohol isoamílico y se centrifugó a 10000g durante 5 minutos. El sobrenadante se trató con 750μL de fenol-tamponado/cloroformo/alcohol isoamílico y se centrifugó posteriormente durante 5 minutos. Sobre el sobrenadante extraído en este último paso, se añadió 450 μL de isopropanol y se centrifugó de nuevo. Se retiró el isopropanol y se añadió 1 mL de etanol al 70% con posterior nueva centrifugación. Se retiró el etanol y se dejó secar el precipitado en el *miVac DNA concentrator*. Al producto final se le incorporaron 30μL de agua destilada con DEPC. Se cuantificó mediante Nanodrop la concentración para posteriormente ajustarla a 25 ng/μL en agua destilada con DEPC.

4.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se emplearon los *primers* REI-F y REI-R descritos en el estudio de Reischer *et al* [216] que amplifican una región que incluye 93 pares de bases del ADN que codifica el ARNr16S bacteriano. La secuencia de dichos *primers* es la siguiente:

- REI-F: CTTGGCCAGCCTTCTGAAAG
- REI-R: CCCCATCGTCTACCGAAAATAC

La PCR con estos *primers* REI incluyó las siguientes condiciones y tiempos:

- 2 minutos desnaturalización a 95°C
- 35 ciclos: 30 segundos a 95°C seguidos de 30 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C
- Extensión durante 5 minutos a 72°C
- El producto de PCR se almacenó a 4°C

La preparación de la mezcla para llevar a cabo esta PCR en un volumen final de 25μL fue la siguiente: 2,5 U/μL de la enzima Taq de alta fidelidad *NZY Proof DNA polymerase* de NZYTECH, 0.2 mM de dNTPs (NZYSet de NZYTECH), 0.2 μM de cada primer y 2,5μL del tampón propio de la Taq.

La confirmación de la PCR se realizó mediante geles de agarosa al 4% (SeaKem®Le Agarose –Lonza) empleando 3μL de RealSafe™ (iNtRON) y tampón TBE 1X. El marcador utilizado

fue el GeneRuler™100bp Plus DNA Ladder y el tiempo de electroforesis fue de 40 minutos a 70V.

4.5.4 Ligamiento, transformación y clonación

A partir de la PCR se realizó el ligamiento en plásmidos siguiendo los pasos indicados del kit CloneJet PCR cloning Kit (Thermo Scientific Fermentas), la relación inserto-vector fue 3:1 y los tubos empleados de 0,5 ml fueron tipo *low binding*. Para la transformación se emplearon células de *E. coli* competentes comerciales NZY5α (NZYTECH). Estas células se mezclaron con el ligamiento a una relación 10:1 en un tubo de 1,5ml y se dejaron 30 minutos en hielo seguido de un shock térmico a 42°C durante 40 segundos en un bloque térmico. Posteriormente se dejaron en hielo durante 2 minutos y se añadió 0.9 mL de medio de cultivo SOC (NZYTECH) dejándolos a 37°C en agitación a 200 r.p.m. 1 hora. Por último, se centrifugó a 2.400g un minuto eliminando posteriormente 700μL del sobrenadante y se sembró 200μL del pellet resuspendido (células transformadas) en placas con medio LB Broth (Conda-Pronadisa) con 1% de agar más ampicilina (100μg/mL).

Se seleccionaron 10 colonias al azar y se realizó PCR de confirmación de las mismas según las condiciones expuestas previamente. Se realizaron cultivos en 5ml de LB líquido con ampicilina (concentración 100μg/mL) dejándolos incubar a 37° durante 14 -16 horas. Para la extracción de los plásmidos se ha usado el kit comercial QIAGEN (QiAprep® Spin Miniprep) sustituyendo en el último paso el tampón recomendado por agua destilada+DEPC. Tras la extracción, en el *Nanodrop* se observó la concentración del plásmido ajustándola en rango 30-50 ng/μL.

4.5.5 Obtención de genotipos asociados a Bacteroidetes

En un trabajo previo de nuestro grupo (de Felipe *et al*) secuenciaron 55 muestras de pacientes con EII y controles sanos siguiendo el método de Sanger. Estos datos permitieron seleccionar los enzimas de restricción utilizados en la RFLP [217].

Tabla 5. Datos de secuenciación del fragmento de interés clonado con *primers* REI.

Genotipo	Secuencia
N (Normal)	CTTGGCCAGCCTTCTGAAAGGAAGATTAATCCAGGATGGGATCATGAGTTCACAT GTCCGCATGATTAAAGGTATTTTCGGTAGACGATGGGG
C1	TGGCCAGCCTTCTGAAAGGAAGATTAATACGATGGCATCATGAGTCCGCATGTT CACATGTAAAGGTATTTTCGGTAGACGATGGGG
C2	CTTGGCCAGCCTTCTGAAAGGAAGATTAATACAAGATGGCATCATGAGTCCACAT GTTACATGATTAAAGGTATTTTCGGTAGACGATGG
C3	CTTGGCCAGCCTTCTGAAAGGAAGATTAATACAAGATGGCATCATGAGTTCACAT GTTACATGATTAAAGGTATTTTCGGTAGACGATGGGG
C4	CTTGGCCAGCCTTCTGAAAGGAAGATTAATCCAGGATGGCATCATGAGTTCACAT GTCCGCATGATTAAAGGTATTTTCGGTAGACGATGGGG
C5	CTTGGCCAGCCTTCTGAAAGGAAGATTAATCCAGGATGGGATCATGAGTCCACAT GTCCGCATGATTAAAGGTATTTTCGGTAGACGATGGG

Elaboración propia

Los pequeños cambios en las secuencias permiten mediante el uso de los enzimas de restricción seleccionados Hinf I, Dpn II, Pci I y Aci I establecer los genotipos de todas las muestras analizadas. Se obtuvieron así los diferentes perfiles en los geles, **Figura 3**.

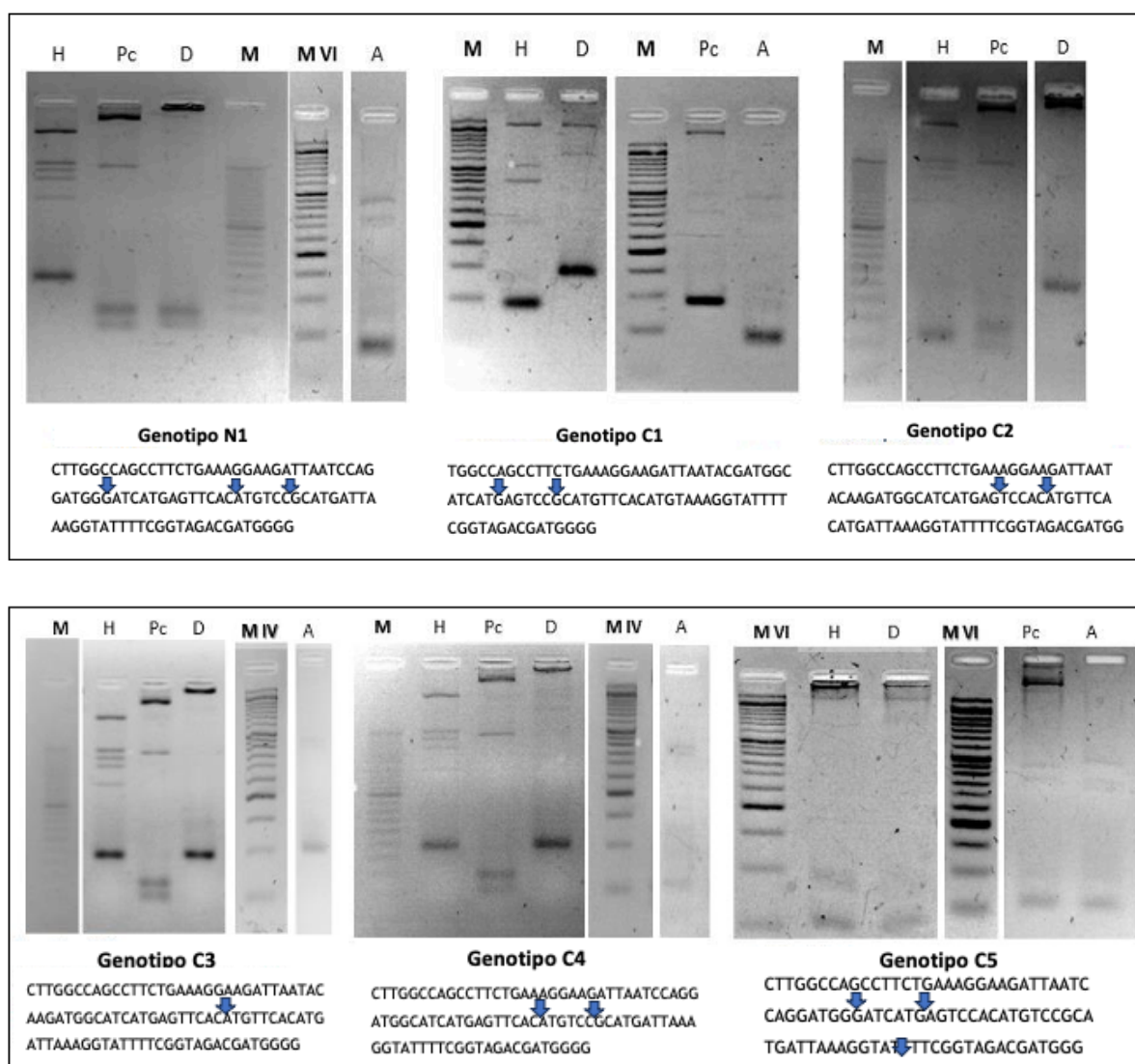


Figura 3. Patrón de perfiles de corte de los genotipos bacteroidales. (N1 genotipo normal; C1-C5 genotipos propios de pacientes). Elaboración propia.

Tras realizar una búsqueda en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; National, Center for Biotechnology Information, USA) se obtuvo una alta homología con dos especies de *Bacteroides*: *B. vulgatus* y *P. dorei*. Se vió que el genotipo N1 correspondía probablemente con *P. dorei* mientras que *B. vulgatus* correspondía probablemente con el genotipo C1. En el estudio de Felipe *et al* observaron en muestras fecales que los voluntarios sanos presentaban un 100% de genotipo N1 mientras que los pacientes con EC presentaban una mayor variabilidad aumentando la presencia de genotipos como C1, C3 y C4 en mayor proporción.

4.5.6 Concentración y purificación del producto de PCR y RFLP

Se realizó una PCR por quintuplicado de cada plásmido obtenido según los componentes y condiciones previamente descritos (*primer* REI). Al volumen total de producto de la PCR se añadió un volumen igual de fenol-tamponado/cloroformo/alcohol isoamílico en tubos de 1,5ml. Se realizó la centrifugación de los mismos a 10.000g y se recogió la fase acuosa en un nuevo tubo. Se añadió 1/10 de ese volumen de acetato de sodio 3M con pH5,2 y 2,5 volúmenes de etanol 100% congelado agitándolo posteriormente mediante vortex. Posteriormente se incubaron los tubos a -25°C durante 30 minutos y se centrifugaron a 10000g durante 30 minutos a 4°C. Se eliminó sobrenadante, se añadió 1 mL de etanol 70%, se centrifugó para retirar el sobrenadante de nuevo y finalmente el precipitado se secó en el *miVac DNA concentrator*. El pellet se resuspendió en 23µL de agua destilada más DEPC.

Se cuantificó en el Nanodrop y se ajustó a una concentración de 400ng/µL para ser digerido con los enzimas HinF I, Dpn II, Pci I y Aci I. Se emplean 5µL del ADN, 2,5U de enzima y su tampón correspondiente a una concentración 1X en un volumen final de 10µL. Se requirió para la digestión enzimática 90 minutos a 37°C.

La visualización de los cortes enzimáticos se realizó mediante geles de agarosa al 4%. La electroforesis empleada fue de 40 minutos a 70V empleando como marcador NZYDNALadder VI.

Tras caracterizar los cortes se calcularon los porcentajes de genotipos asociados a cada una de las muestras.

4.5.7 Creación de primers y sonda TaqMan de reconocimiento de un genotipo específico

A partir de la secuencia del genotipo que más asociación demostró con la actividad de la CU se creó una sonda y unos primers que permitieron la cuantificación de la concentración de este genotipo en la totalidad de las muestras obtenidas en el estudio 2 mediante el uso de la técnica de qPCR.

Se enviaron a secuenciar productos de PCR/plásmidos cuyo inserto correspondía con el genotipo C4 para conocer con exactitud la distribución de nucleótidos que componen dicha secuencia y mediante el programa BLAST se alinearon y compararon con las diferentes secuencias obtenidas en el estudio, incluyendo la secuencia del genotipo N1 presente en los

controles sanos. Una vez identificada la secuencia del genotipo C4, y analizadas las diferencias que muestra respecto a otros genotipos, se procedió al diseño de la sonda y de los primers, empleando el programa Primer3Plus, para su uso en la técnica de qPCR, que permitió conocer la abundancia existente del genotipo C4 en las muestras de los individuos con CU y controles sanos.

El empleo de los nuevos primers diseñados para qPCR permitió amplificar una secuencia de 114 pares de bases. Dado que el tamaño del fragmento amplificado mediante qPCR fue algo mayor que el obtenido previamente al utilizar la técnica de PCR, antes de realizar la cuantificación de las muestras mediante qPCR se verificó la especificidad de los primers seleccionados mediante PCR empleando DNA de muestras procedentes de individuos sanos, pacientes con CU y como control de la PCR DNA extraído de la especie *Phocaeicola dorei* (antiguamente denominada *Bacteroides dorei*, DSM-1785), cuya secuencia de nucleótidos amplificada mediante PCR con los nuevos primers seleccionados coincide con la secuencia del genotipo N1. Esta especie bacteriana se obtuvo de la Colección Alemana de Cultivos Tipo (DSMZ-Alemania).

Para la cuantificación de las muestras mediante qPCR fue necesaria la realización simultánea de una recta estándar de calibración o curva patrón. En este estudio, la recta estándar se construyó a partir de 7 diluciones decimales del plásmido clonado con el genotipo C4, en las que se incluye un rango desde 1 ng/ μ l hasta 1 fg/ μ l, y que se corresponde con un rango de 10^7 a 10^1 copias de la secuencia. La metodología seguida para obtener el plásmido clonado con el genotipo C4 (ligamiento, transformación y clonación) se ha descrito previamente en el apartado 4.5.4.

La cuantificación y ajuste del ADN de cada una de las muestras y de las diferentes diluciones de la curva patrón previa a la realización de la qPCR se realizó mediante fluorimetría empleando el kit *Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay* (ThermoFisher Scientific, USA) dado que se trata de una técnica muy sensible basada en la unión selectiva del colorante fluorescente al ADN de doble cadena, lo que permite detectar y cuantificar la cantidad de ADN presente en las muestras y controles de manera exacta.

La serie de diluciones que conforma la curva patrón se incluyó en cada ejecución de amplificación. La amplificación de las diluciones seriadas del plásmido clonado con ADN del genotipo C4 de Bacteroidetes, generó una recta que correlaciona el valor de Ct (ciclo umbral o *threshold value*) y la cantidad/ número de copias del plásmido. Según la curva estándar, las

muestras que no mostraron la señal fluorescente antes de que la Ct alcanzase un valor de 37 ciclos se consideraron negativas.

En los ensayos de qPCR se utilizó el equipo StepOne Plus Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, USA). Para la realización de los ensayos se preparó una mezcla de reacción que contenía la *Master Mix* de Nzytech (*NZYSpeedy qPCR Probe Master Mix 2x*, Portugal) a concentración final 1x, los primers a una concentración 0,2 μ M (cada uno), la sonda TaqMan a una concentración 0,6 μ M, agua ultrapura y 1 μ l de ADN en un volumen final de 10 μ l. El programa seleccionado contenía dos fases; una primera fase de activación de la polimerasa en la que se alcanzaban 95 °C durante 5 minutos, y una segunda fase (*Cycling stage*) que presentaba 40 ciclos incluyendo cada ciclo una desnaturalización a 95 °C durante 10 segundos y un alineamiento/extensión a 60 °C durante 1 min. El control negativo consistió en una mezcla de reacción de la qPCR en la que el ADN se sustituyó por agua ultrapura (1 μ l en un volumen final de 10 μ l de mezcla de reacción).

4.5.8 Experimento en ratones (Estudio 3)

Se emplearon para realizar el ensayo 15 ratones hembra Swiss ICR-CD1 con edad comprendida entre 8 y 10 semanas obtenidos y criados en el animalario de la Universidad de Santiago de Compostela. Tras ayuno de 12 horas se dividieron en 3 grupos de 5 ratones sobre los que se llevó a cabo la inoculación de diferentes preparados vía rectal mediante sonda anal (150 μ L). El primer grupo de 5 fue el grupo control al que se le inoculó PBS 1X, el grupo 2 recibió heces de un individuo sano y al grupo 3 se le inoculó un pool bacteriano de un paciente con EC activa con presencia del genotipo que más ampliamente se encontró relacionado con la actividad de la enfermedad. Se obtuvo cada día muestras fecales de cada una de las jaulas que posteriormente se guardaron a -25°C en tubos *ependorf*. Tras 4 días de la inoculación se sacrificaron los animales, se extrajeron muestras fecales de los ratones de cada grupo. Se realizaron los cortes histológicos del intestino de los ratones y se realizó el estudio de los Bacteroidetes presentes en las muestras fecales de los ratones y de la microbiota asociada al epitelio para lo cual se realizó un raspado intestinal. Para el raspado intestinal se seccionó el intestino longitudinalmente y tras lavado con *Dulbecco* tamponada con fosfato se raspó en una rejilla de metal.

a) Cortes histológicos

Inicialmente se realizó la fijación de las muestras en fijador de Bouin compuesto en un 75% por solución de ácido pícrico, 25% formol y 5% ac acético glacial. Posteriormente se deshidrataron en etanol durante dos horas individualmente al 70-80-96 y 100%. Se realizaron 4 pases en butanol 30min y durante 12 horas se embebieron en parafina. Se realizaron dos pases más en parafina y se realizaron los bloques que fueron cortados en micrótopo (grosor: 7µm). Para la tinción de los cortes se desparafinaron la muestras mediante xilol 8 minutos (x3), se hidrataron en alcohol al 100-96%-70% y se lavaron con agua destilada. La tinción que emplearemos fue hematoxilina durante 15 minutos y tras lavado en agua destilada se dejaron los cortes 5 minutos en eosina. Las muestras se deshidrataron mediante pases en etanol de 96% y 100% seguidos de xilol.

b) Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico bacteriano se empleó en las muestras de heces y biopsias el mismo kit comercial y protocolo que el expuesto en el punto 4.5.2

c) PCR

Para el estudio del raspado intestinal y heces de ratón se emplearon los primers HUM- F y HUM-R del estudio de Shanks *et al*[218]. HUM-F: CGTCAGGTTTGTTCGGTATTG y HUM-R: TCATCACGTAACCTTATTTATATGCATTAGC. Las condiciones de la PCR fueron desnaturalización 3' a 95°C, 40 ciclos de 15'' a 95°C, 55°C 15'' y 72°C 45'' con una etapa final de extensión de 3' a 72°C. Para la mix se utilizaron 0.15 µL de la Taq DNA pol Roche USA (5 U/µL), 0.5 µL dNTPs [0.2mM], 0.2 µM de cada primer, 2.5 µL de tampón 10X y 2 µL de muestra. La confirmación de la PCR se realizó mediante geles de agarosa 2% con las mismas condiciones que en el punto 4.5.3.

4.6 Análisis estadístico

Inicialmente se realizó un análisis descriptivo de la muestra: los datos cuantitativos se presentan como medias ($\pm$ desviación estándar) y medianas ($\pm$ rangos intercuartílicos) y las variables categóricas mediante porcentajes.

La asunción de normalidad se valoró mediante la prueba de Shapiro-Wilk y métodos gráficos. Las variables cualitativas se compararon mediante test chi-cuadrado o test exacto de Fisher según procediese.

Las variables continuas se compararon mediante un test de T de Student o test de U de Mann Whitney en función de la distribución de los datos.

Se creó un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox para analizar factores asociados al peor curso de la EII incluyendo el tipo de genotipo bacteroidal.

Dado que se trata de un estudio piloto no se realizó el cálculo del tamaño muestral.

Se consideró significación estadística un p-valor inferior a 0.05. Todos los valores de p son bilaterales y la significación estadística se evalúa a un nivel alfa de 0.05. Se calcularon los IC del 95% para evaluar la precisión de las estimaciones obtenidas. Todos los análisis se realizaron mediante el software Stata 14 (Statacorp LLC, Texas).

4.7 Aspectos éticos:

Antes del comienzo del estudio, el protocolo del proyecto fue evaluado y clasificado por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios como EPA-SP y fue aprobado por parte del Comité Autónomico de Ética de la investigación de Galicia a fecha 12/7/2017 con el código de registro 2017/033 y el código del Promotor IBR-MES-2017-01.

Los procedimientos tanto analíticos como endoscópicos a los que el paciente fue sometido forman parte de la práctica clínica habitual.

El desarrollo del proyecto se realizó respetando la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial 1964 y ratificaciones de las asambleas siguientes (Tokio, Venecia, Hong Kong y Sudáfrica) sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, la Orden SCO/256/2007, de 5 de Febrero, por la que se establecen los principios y las directrices detalladas de Buena Práctica Clínica y el Convenio relativo a los derechos y la biomedicina, hecho en Oviedo el 4 de Abril de 1997 y sucesivas actualizaciones.

Todo dato clínico recogido de los sujetos a estudio fue separado de los datos de identificación personal de modo que se aseguró el anonimato del paciente; respetando la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre), el RD 1720/2007 de 21 de diciembre, por lo que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, a Ley 41/2002, de 14 de Noviembre (básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica), así como la

Ley 3/2001, de 28 de mayo, (reguladora del consentimiento informado y de la historia clínica de los pacientes), la Ley 3/2005, de 7 de marzo, de modificación da Ley 3/2001 y el Decreto 29/2009 de 5 de febrero , por el que se regula el acceso a la historia clínica electrónica. Los datos clínicos de los pacientes fueron recogidos por el investigador en el Cuaderno de Recogida de Datos (CRD) específico del estudio. Cada CRD está codificado, protegiendo la identidad del paciente. Solamente el equipo investigador y las autoridades sanitarias, que tienen el deber de guardar la confidencialidad, tendrán acceso a todos los datos recogidos para el estudio. Solamente se podrá transmitir a terceros información que no pueda ser identificada. Una vez acabado el estudio, los datos recogidos con fines de investigación serán destruidos (o anonimizados para a su utilización futura ya que se ha pedido permiso expreso para ello en el consentimiento informado a los participantes).

Las analíticas sanguíneas y de heces realizadas en este estudio se encuadran dentro de las habituales en el seguimiento de pacientes con EII. La inclusión en dicha analítica de parámetros de actividad es un método estándar aplicado en nuestra práctica clínica habitual para monitorizar la respuesta al tratamiento. Tal y como se indica previamente su interés es puramente analítico, para valorar niveles de reactantes de fase aguda que permitan evaluar el estado de actividad del paciente.

5. RESULTADOS

5.1 Resultados Estudio 1

5.1.1. Características de los pacientes

Se incluyeron un total de 52 pacientes, 26 con CU y 26 con EC. Las características de los mismos se recogen en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Características de los pacientes

		Todos los pacientes n=52	Colitis Ulcerosa n=26	Enfermedad de Crohn n=26	Valor p
Edad, años		45 (33-55)	52 (40-60)	39 (29-47)	0,0022
Mediana (RIQ)					
Sexo, hombre		29 (56)	17 (65)	12 (46)	0,16
n (%)					
Hábito tabáquico					0,014
n (%)					
	Nunca fumador	28 (54)	19 (73)	9 (35)	
	Exfumador	13 (25)	5 (19)	8 (30)	
	Fumador activo	11 (21)	2 (8)	9 (35)	
Tiempo desde el diagnóstico, años		9,6 (5,2-15,7)	7,7 (4,9-15,6)	10,6 (5,3-19,2)	0,51
Mediana (RIQ)					
Extensión de la CU	Proctitis	N/A	6 (23)	N/A	N/A
n (%)	Colitis izquierda	N/A	8 (31)	N/A	
	Pancolitis	N/A	12 (46)	N/A	
Extensión de la EC	Ileal	N/A	N/A	12 (46)	N/A
n (%)	Colónica	N/A	N/A	2 (8)	
	Ileocolónica	N/A	N/A	12 (46)	
	Tracto digestivo alto	N/A	N/A	0 (0)	
Enfermedad perianal		8 (15)	1 (4)	7 (27)	0,05
n (%)					
Patrón EC	Inflamatorio	N/A		2 (8)	N/A
n (%)	Estenosante			16 (62)	
	Fistulizante			8 (30)	
Cirugía previa		20 (38)	2(8)	18 (69)	0,001
n (%)					

En conjunto, este grupo de pacientes tenían una media de edad de 45 años (RIQ 33-55). Se observaron diferencias significativas en cuanto a la edad dado que la mediana en los pacientes con CU fue de 52 años (RIQ 40-60) frente a 39 años (RIQ 29-47) en los pacientes con EC. El 55,7% eran hombres sin diferencias según el tipo de EII.

En cuanto al tiempo de evolución desde el diagnóstico de la enfermedad la mediana fue de 9,6 años (RIQ 5,2-15,7) sin diferencias significativas entre ambas enfermedades.

El 54% de los pacientes nunca habían fumado frente al 21% que seguían fumando y el 25% que eran exfumadores. Observamos diferencias estadísticamente significativas en el hábito tabáquico según el tipo de EII habiendo más fumadores activos en los pacientes con EC que con CU (35% vs 8%). La distribución del hábito tabáquico según el tipo de EII se muestra en la **Figura 4**

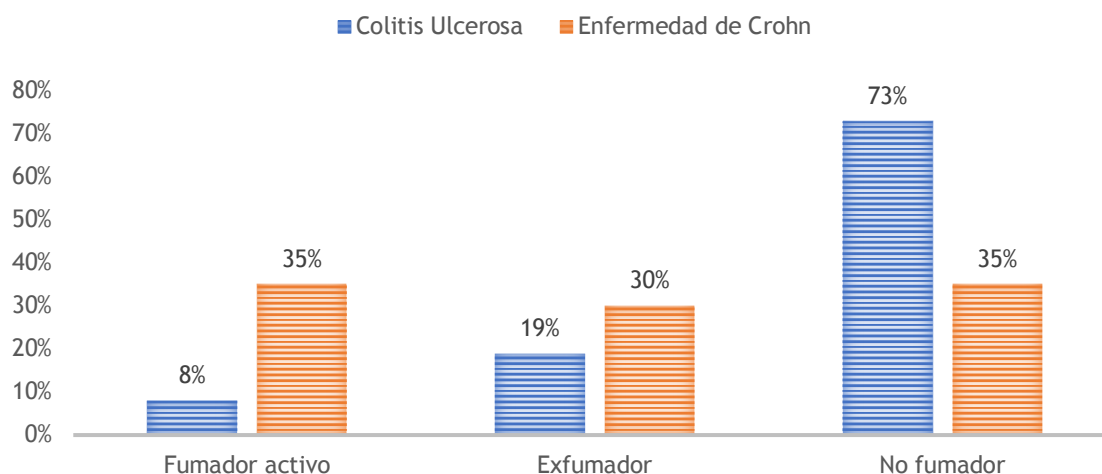


Figura 4. Hábito tabáquico según el tipo de Enfermedad inflamatoria intestinal

Colitis ulcerosa:

Se incluyeron 26 pacientes con CU con una edad media de 52 años (RIQ, 40-60). El 73% nunca habían fumado, un 19% eran exfumadores y sólo un 8% continuaban fumando.

En cuanto a la extensión de la CU, un 46% presentaban una pancolitis, un 31% una colitis izquierda y un 23% una proctitis. Esta clasificación se representa en la **figura 5**.

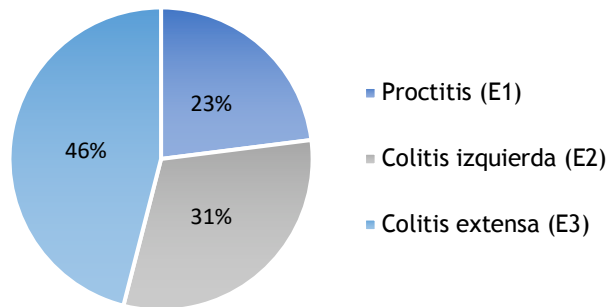


Figura 5. Extensión de la colitis ulcerosa

Enfermedad de Crohn:

Se incluyeron 26 pacientes con EC con una mediana de edad de 39 años (RIQ 29-47). El 35% nunca habían fumado, el 30% eran exfumadores y el 35% fumadores activos.

Con respecto a la extensión, el 46% eran ileales y el 46% ileocólicas. Sólo un 8% tenían afectación exclusivamente a nivel del colon y ninguno tenía afectación del tracto digestivo alto.

En cuanto al patrón, la mayor parte presentaban comportamiento estenosante (62%) seguido de patrón penetrante en un 30%. Sólo 2 pacientes (8%) presentaron patrón inflamatorio (**Figura 6**). De los 26 pacientes presentaban enfermedad perianal un 15%.

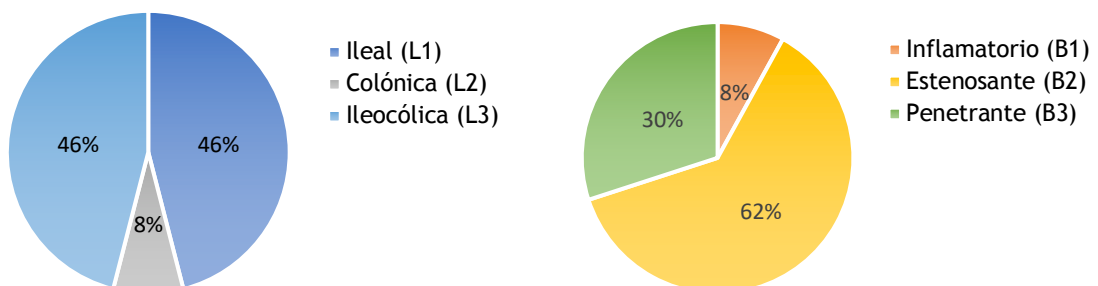


Figura 6. Extensión y patrón de los pacientes con enfermedad de Crohn

Con respecto a la realización de cirugías previas, un 38% de los pacientes con EC se habían intervenido al menos una vez frente al 8% de los pacientes con CU.

Actividad endoscópica

Teniendo en cuenta la valoración del médico tras realizar la colonoscopia, el 55,7% de los pacientes presentaban actividad frente a un 44,2% que estaban inactivos. Si observamos la presencia de actividad en función del tipo de EII no se observaron diferencias. El 65,3% y el 46,1% de los pacientes con EC y CU respectivamente estaban activos. Al clasificar los pacientes con CU según el índice Mayo un 42% presentaron un Mayo 0, un 12% un Mayo 1, un 15% un Mayo 2 y un 31% un Mayo 3 (**Figura 7**).

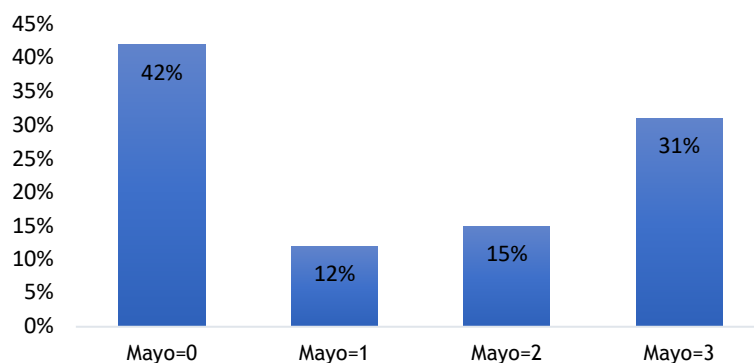


Figura 7. Índice endoscópico Mayo en los pacientes con colitis ulcerosa

En los pacientes con EC la clasificación utilizada fue el SES-CD. Se clasificaron según la puntuación obtenida en actividad leve 35% de los pacientes, moderada 46% y grave 19%. La gráfica de la clasificación se observa en la **Figura 8**.

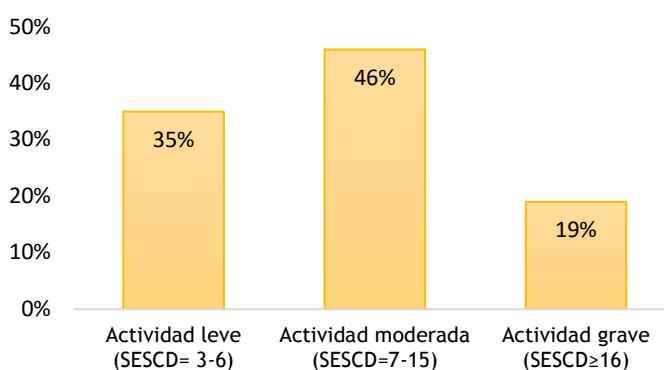


Figura 8. Índice endoscópico SESCD en pacientes con Enfermedad de Crohn

Actividad histológica:

En los pacientes con CU, la actividad histológica se describió como quiescente en el 24% de los pacientes, leve en el 28%, moderada en el 16% y grave en el 32%. En cuanto a los pacientes con EC, la actividad histológica estuvo quiescente en un 26% de los pacientes y se describió como leve en un 39%, moderada en un 13% y grave en un 22%.

Parámetros analíticos:

Se recogieron los valores de la hemoglobina, hierro, ferritina, plaquetas, albúmina, VSG, proteína C reactiva y CF. La mediana de los resultados por tipo de enfermedad se muestra en la **tabla 7**. No hubo diferencias significativas en los parámetros entre las dos enfermedades.

Tabla 7. Parámetros analíticos globales y según el tipo de enfermedad.

	Todos los pacientes n=52	Colitis Ulcerosa n=26	Enfermedad de Crohn n=26	Valor p
Hemoglobina, g/dl	13,9 (12,7-15)	13,9 (12,6-15,1)	14,1 (12,7-15)	0,97
Mediana (RIQ)				
Hierro, µg/dl	71 (47-104)	81 (50-104)	70,5 (47-102)	0,69
Mediana (RIQ)				
Ferritina, ng/ml	45 (21-113)	84 (20-120)	38 (22-91,5)	0,61
Mediana (RIQ)				
Leucocitos, x103/µl	7090 (5725-9650)	6950 (5680-10500)	7090 (5770-8900)	0,87
Mediana (RIQ)				
Plaquetas, x103/µl	252 (198-288)	245 (200-283)	254 (183-342)	0,96
Mediana (RIQ)				
Albúmina, g/dl	4,2 (4,1-4,4)	4,2 (4-4,3)	4,2 (4,1-4,5)	0,93
Mediana (RIQ)				
VSG, mm	13 (7-26)	15,5 (7-28,5)	12 (6-20)	0,36
Mediana, (RIQ)				
Prot. C reactiva, mg/dl	0,68 (0,27-1,8)	0,67 (0,2-2,8)	0,9 (0,27-1,8)	0,97
Mediana (RIQ)				
Calprotectina fecal, mg/kg	117 (30-430)	133 (30-460)	101 (30-286)	0,90
Mediana (RIQ)				

El valor de los parámetros analíticos en función de si la enfermedad inflamatoria estaba activa o inactiva se describe en la **tabla 8**. Se observaron diferencias significativas en función de la

actividad o inactividad endoscópica en los niveles de leucocitos, VSG, proteína C reactiva y CF.

Tabla 8. Parámetros analíticos globales y según presencia o ausencia de actividad endoscópica

	Todos los pacientes n=52	Inactivo n=23	Activo n=29	Valor p
Hemoglobina, g/dl	13,9 (12,7-15)	14,3 (12,7-15)	13,8 (12,5-15,4)	0,77
Mediana (RIQ)				
Hierro, µg/dl	71 (47-104)	86,5 (58-109)	56 (26-102)	0,14
Mediana (RIQ)				
Ferritina, ng/ml	45 (21-113)	84 (26-120)	41,5 (20-94)	0,52
Mediana (RIQ)				
Leucocitos, x10 ³ /µl	7090 (5725-9650)	6200 (5600-7320)	7890 (6350-10800)	0,01
Mediana (RIQ)				
Plaquetas, x10 ³ /µl	252 (198-288)	231 (183-274)	266 (215-370)	0,07
Mediana (RIQ)				
Albúmina, g/dl	4,2 (4,1-4,4)	4,25 (4,2-4,5)	4,2 (4-4,4)	0,10
Mediana (RIQ)				
VSG, mm	13 (7-26)	10 (7-17)	18,5 (10-33,5)	0,05
Mediana, (RIQ)				
Prot C reactiva, mg/dl	0,68 (0,27-1,8)	0,31 (0,15-0,67)	1,72 (0,67-2,8)	0,002
Mediana (RIQ)				
Calprotectina fecal, mg/kg	117 (30-430)	30 (30-101)	286 (30-490)	0,04
Mediana (RIQ)				

Los pacientes con actividad presentaron significativamente niveles más elevados de leucocitos $7890 \times 10^3/\mu\text{l}$ (6350-10800) en relación a los pacientes inactivos $6200 \times 10^3/\mu\text{l}$ (5600-7320). Lo mismo sucedió con los niveles de VSG en activos que fue de 18,5 mm (RIQ 10-33,5) frente a 10 mm (RIQ 7-17) en los pacientes inactivos. Con respecto a la proteína C reactiva, los pacientes con actividad endoscópica presentaron una mediana de 1,72 mg/dl (RIQ 0,67-2,8) frente a 0,31 mg/dl (RIQ 0,15-0,67) en los que estaban inactivos. Con la CF ocurrió lo mismo, los pacientes con EII activa presentaban niveles más altos que los inactivos con una mediana de 286 mg/kg (RIQ 30-490) frente a 30 mg/kg (RIQ 30-101) respectivamente. Los datos se visualizan en la **figura 9**.

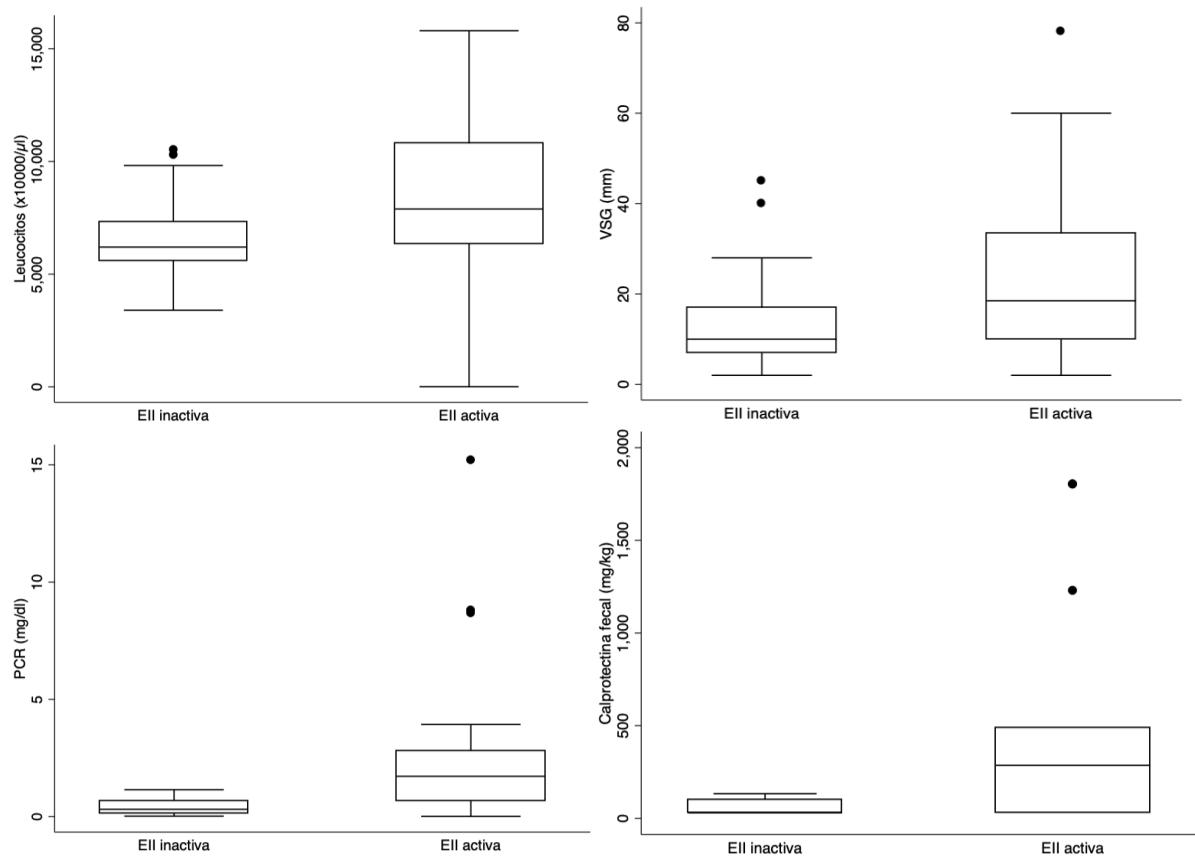


Figura 9. Niveles de leucocitos, VSG, proteína C reactiva y CF en función de actividad o inactividad endoscópica

La mediana de CF en pacientes con CU con Mayo endoscópico = 0 fue de 30 mg/kg (RIQ 30-41), mientras que en aquellos que presentaban un Mayo 2 o 3 endoscópico la mediana fue 460 mg/kg (RIQ 280 – 490) y 814 (RIQ 400-1228) ($p=0,18$). En los pacientes con EC, la mediana de CF fue de 30 mg/kg (RIQ 5-30) en pacientes con enfermedad quiescente o leve definida como un SESCD ≤ 6 y de 178 mg/kg (RIQ 30-1043) en aquellos que presentaban un SESCD > 6 ($p=0,043$)

Tratamientos:

El 13,4% de los pacientes no tenían ningún tratamiento de mantenimiento pautado. El 36,5% estaban a tratamiento con mesalazina, el 13,4% tenían pautado azatioprina y el 36,5% recibían tratamiento biológico. Todos los pacientes que estaban a tratamiento con mesalazina eran pacientes con CU excepto un paciente con EC colónica. Dentro del tratamiento con fármacos biológicos, 15 eran pacientes con EC frente a 4 pacientes con CU.

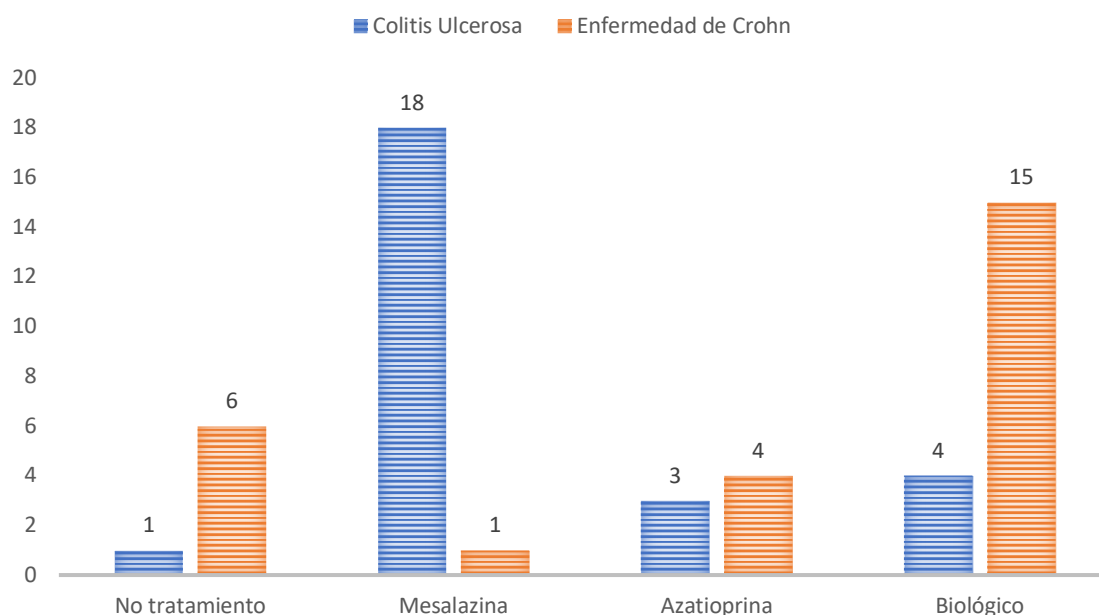


Figura 10. Tratamientos según el tipo de EII

Todos los biológicos usados en estos pacientes fueron de la familia de los anti-TNF. El 32% estaba a tratamiento con infliximab a dosis standard de 5mg/kg cada 8 semanas y el 5% con infliximab a dosis intensificada de 10mg/kg cada 8 semanas. El 5% estaban a tratamiento con adalimumab a dosis de mantenimiento de 40mg cada 2 semanas sin embargo más de la mitad de los pacientes, un 53%, se encontraban a tratamiento con adalimumab intensificado a una dosis de 40mg semanalmente. Un paciente estaba a tratamiento con golimumab a dosis de 50 mg cada 4 semanas. Los porcentajes se muestran en la **figura 11**.

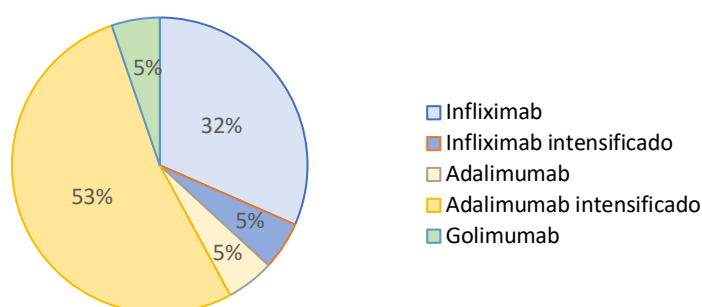


Figura 11. Porcentaje de los diferentes fármacos biológicos en el momento de la colonoscopia

Al año de la realización de la colonoscopia hubo modificaciones en cuanto a los tratamientos de mantenimiento con respecto al momento de la colonoscopia:

El 7,6% continuaban sin tratamiento de mantenimiento y el 30,7% con tratamiento con mesalazina oral. 7 pacientes estaban a tratamiento con azatioprina (13,4%). Los restantes (55,7%) estaban con tratamiento biológico de mantenimiento. 10 pacientes con infliximab (4 de los cuales intensificado), 13 con adalimumab (7 de los cuales intensificado), 1 paciente con ustekinumab y un paciente con golimumab (**figura 12**).

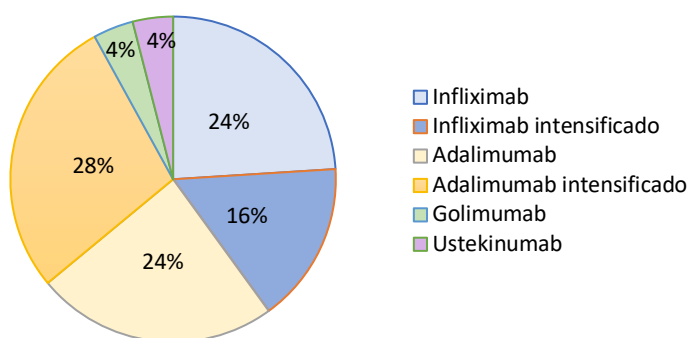


Figura 12. Porcentaje de los diferentes fármacos biológicos al año de la colonoscopia

Al año de la colonoscopia un 57,6% de los pacientes continuaban con el mismo tratamiento, 9 pacientes (17,3%) habían intensificado la dosis del biológico que previamente tenían pautado y 13 (25%) habían cambiado de tratamiento.

5.1.2. Genotipos Bacteroidetes

El porcentaje de aparición de los diferentes genotipos se resume en las **tablas 9 y 10 y figura 13**.

El genotipo N1 (*P. dorei*) apareció en el 100% de los pacientes independientemente de si se trataba de pacientes activos o inactivos o del tipo de enfermedad.

El genotipo C1 (*B. vulgatus*) apareció en el 82,6% de los pacientes sin diferencias significativas en función de la actividad de la misma. Si lo estratificamos por tipo de enfermedad se detectó en la práctica totalidad de los pacientes con EC (96,1%) y en un 69,2% de los pacientes con CU ($p=0,024$).

El genotipo C2 tan solo se detectó en un 5,8% de los pacientes sin diferencias en cuanto al tipo de enfermedad o la presencia de actividad.

El genotipo C3 se encontró en un 30,8% de los pacientes con EII sin diferencias en cuanto al tipo de enfermedad. En cuanto a la actividad parece existir una tendencia a que aumente su presencia en pacientes con actividad, pero sin diferencias estadísticamente significativas.

El genotipo C4 se encontró en un 59,6% de la totalidad de los pacientes con diferencias significativas en cuanto a la presencia de actividad o no pero no en cuanto al tipo de enfermedad. Se observó en un 86,2% de los pacientes activos frente a un 26,1% de los inactivos.

El genotipo C5 se observó en un 13,4% de los pacientes sin diferencias en cuanto al tipo de enfermedad o la actividad de la misma.

Tabla 9. Genotipo bacteroidal en función del tipo de EII

	Todos los pacientes n=52	Colitis ulcerosa n=26	Enfermedad de Crohn n=26	Valor p
Genotipo N1 (<i>B. dorei</i>) n (%)	52 (100)	26 (100)	26 (100)	
Genotipo C1 (<i>B. Vulgatus</i>) n (%)	43 (82,7)	18 (69,2)	25 (96,2)	0,024
Genotipo C2 n (%)	3 (5,8)	2 (7,69)	1 (3,85)	1
Genotipo C3 n (%)	16 (30,8)	8 (30,8)	8 (30,8)	1
Genotipo C4 n (%)	31 (59,6)	15 (57,7)	16 (61,5)	0,77
Genotipo C5 n (%)	7 (13,4)	2 (7,69)	5 (19,2)	0,42

Tabla 10. Genotipo bacteroidal en función de la presencia de actividad

	Todos los pacientes n=52	Inactivo n=23	Activo n=29	Valor p
Genotipo N1 (<i>B. dorei</i>) n (%)	52 (100)	26 (100)	26 (100)	
Genotipo C1 (<i>B. Vulgatus</i>) n (%)	43 (82,7)	20 (87)	23 (79,3)	0,71
Genotipo C2 n (%)	3 (5,8)	2 (8,7)	1 (3,5)	0,58
Genotipo C3 n (%)	16 (30,8)	6 (26,09)	10 (34,5)	0,52
Genotipo C4 n (%)	31 (59,6)	6 (26,09)	25 (86,21)	0,0001
Genotipo C5 n (%)	7 (13,4)	4 (17,4)	3 (10,34)	0,69

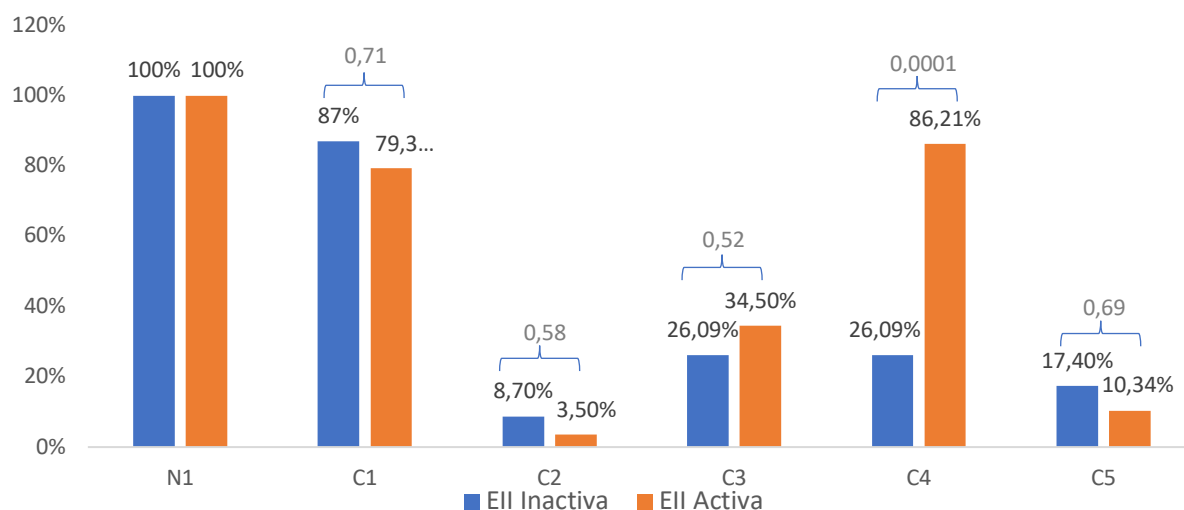


Figura 13. Porcentaje de los diferentes genotipos bacteroidales en función de la actividad de la enfermedad

Al realizar la regresión logística de los diferentes factores asociados a la actividad endoscópica encontramos relación entre los resultados de AP, los niveles de proteína C reactiva y el genotipo C4 (**Tabla 11**). De todos los genotipos encontrados sólo C4 se asoció con mayor riesgo de actividad con una OR 9,56 (IC95: 1,27-71,73).

Tabla 11. Regresión logística univariable y multivariable de los factores asociados a actividad

	Univariable	p	Multivariable	p
Sexo	0,95 (0,31-2,85)	0,92		
Edad	1,01 (0,97-1,04)	0,87		
Tabaco	1,04 (0,54-1,99)	0,90		
AP	7,38 (2,49-21,89)	0,0001	8,26 (1,85-36,90)	0,006
Prot C reactiva	4,18 (1,24-14,1)	0,021	16,2 (1,12-235,66)	0,041
Hemoglobina	0,91 (0,65-1,29)	0,60		
Plaquetas	1,42 (0,86-2,35)	0,17		
Leucocitos	1,63 (0,97-2,74)	0,07		
Hierro	0,99 (0,97-1,01)	0,19		
VSG	1,04 (0,99-1,09)	0,06		
Albúmina	0,24 (0,04-1,47)	0,12		
Calprotectina	1,01 (0,99-1,02)	0,09		
Genotipo C1	0,58 (0,13-2,60)	0,47		
Genotipo C2	0,37 (0,03-4,42)	0,44		
Genotipo C3	1,49 (0,45-4,98)	0,52		
Genotipo C4	17,7 (4,34-72,33)	0,0001	9,56 (1,27-71,73)	0,028
Genotipo C5	0,55 (0,11-2,74)	0,46		

Teniendo en cuenta la presencia de actividad o inactividad observamos que la distribución del genotipo C4 no mostraba variación en función del tipo de EII, el sexo, la edad, el consumo de tabaco y los diferentes parámetros analíticos (**Tabla 12**).

Tabla 12. Asociación del genotipo C4 y diferentes variables en relación a la presencia o ausencia de actividad

	EII inactiva		p	EII activa		p
	C4 presente	C4 ausente		C4 presente	C4 ausente	
Tipo de EII n (%)						
- E. Crohn	2 (22,22)	7 (77,78)	1	14 (82,35)	3 (17,65)	0,62
- C. Ulcerosa	4 (28,57)	10 (71,43)		11 (91,67)	1 (8,33)	
Sexo n (%)						
- Hombre	4 (30,77)	9 (69,23)	0,66	13 (81,25)	3 (18,75)	0,61
- Mujer	2 (20)	8 (80)		12 (92,31)	1 (7,69)	
Edad, años mediana (RIQ)	45 (40-54)	45 (32-55)	0,97	42 (33-57)	40 (29-50)	0,41
Tabaco n (%)						
- No fumador	2 (15,38)	11 (84,62)	0,31	14 (93,33)	1 (6,67)	0,52
- Exfumador	3 (50)	3 (50)		6 (85,71)	1 (14,29)	
- Fumador	1 (25)	3 (75)		5 (71,43)	2 (28,57)	
Prot C reactiva, mg/dl (RIQ)	0,41 (0,15-0,70)	0,30 (0,15-0,67)	0,49	1,72 (0,67-2,80)	1,32 (0,44-5,30)	0,78
Hemoglobina, g/dl mediana (RIQ)	15 (13,20-15,90)	13,7 (12,70-15)	0,19	13,80 (12,10-14,80)	15,50(14,35-15,90)	0,14
VSG mm mediana (RIQ)	7 (5-16)	12 (8-18)	0,36	19,50 (10,00-33,50)	8,5 (4,00-44,5)	0,39

En pacientes con CU y actividad endoscópica no se asoció de manera significativa la cantidad de C4 existente con una mayor extensión de la enfermedad ($p=0,66$).

Teniendo en cuenta los cambios de tratamiento requeridos, la presencia del genotipo C4 se asoció de manera significativa a la necesidad de cambio de tratamiento al año ($p=0,0001$), estando presente C4 en el 90,9% de los pacientes que cambiaron tratamiento. En cuanto a la necesidad de esteroides en el primer año tras la colonoscopia, la presencia de C4 también se asoció significativamente a mayor necesidad de los mismos ($p=0,007$). C4 estaba presente en el 87,5% de los pacientes que necesitó corticoides en el primer año tras la colonoscopia. No hubo diferencias significativas en cuanto a la presencia de C4 y los diferentes tratamientos en el momento de realizar la colonoscopia una vez ajustado por presencia/ausencia de actividad endoscópica ($p=0,86$).

Mediante una correlación de Spearman identificamos una buena correlación ($r=0,70$) entre el porcentaje de C4 existente y los diferentes valores del índice endoscópico Mayo (**figura 14**), obteniendo mayor porcentaje de genotipo C4 a medida que se observaba mayor actividad endoscópica de la enfermedad.

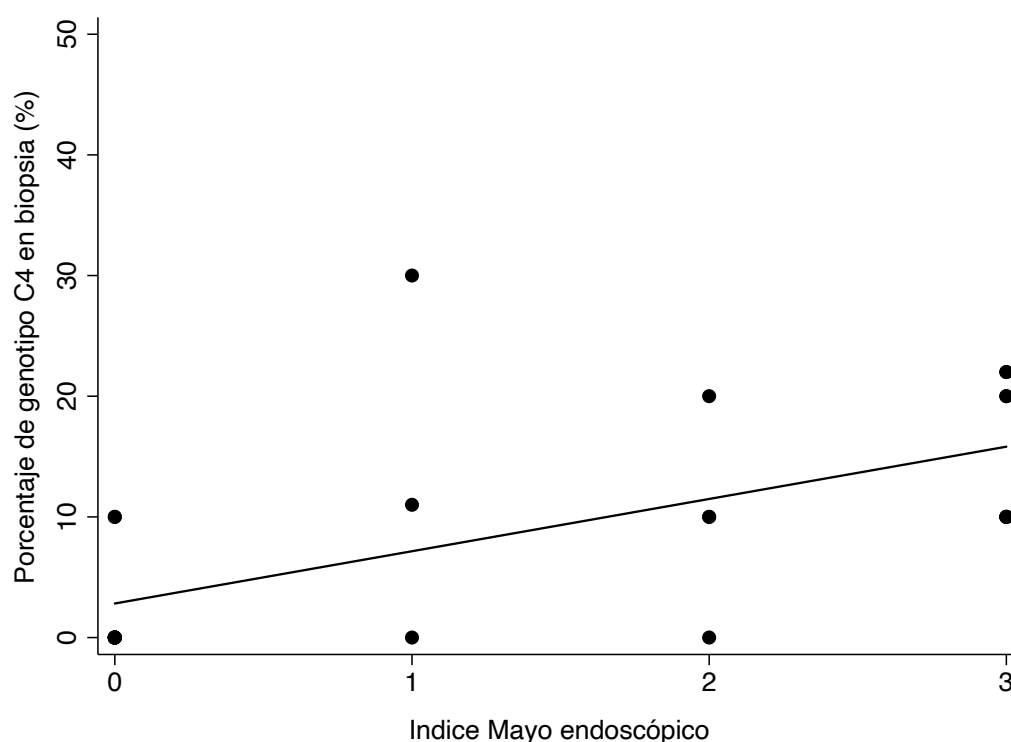


Figura 14. Correlación de porcentaje de genotipo C4 e índice Mayo endoscópico

En EC no identificamos buena correlación entre el porcentaje de genotipo C4 encontrado con el índice de actividad endoscópica SES-CD estratificado en leve moderado y grave ($r=0,31$).

En cuanto a la extensión y el porcentaje de genotipo C4 observamos una correlación moderada en CU ($r=0,5$) y una ausencia de correlación con la localización ($r=-0,07$) así como con el patrón ($r=0,10$) en la EC. La correlación entre el porcentaje de genotipo C4 y la extensión de la CU se muestra en la **figura 15**.

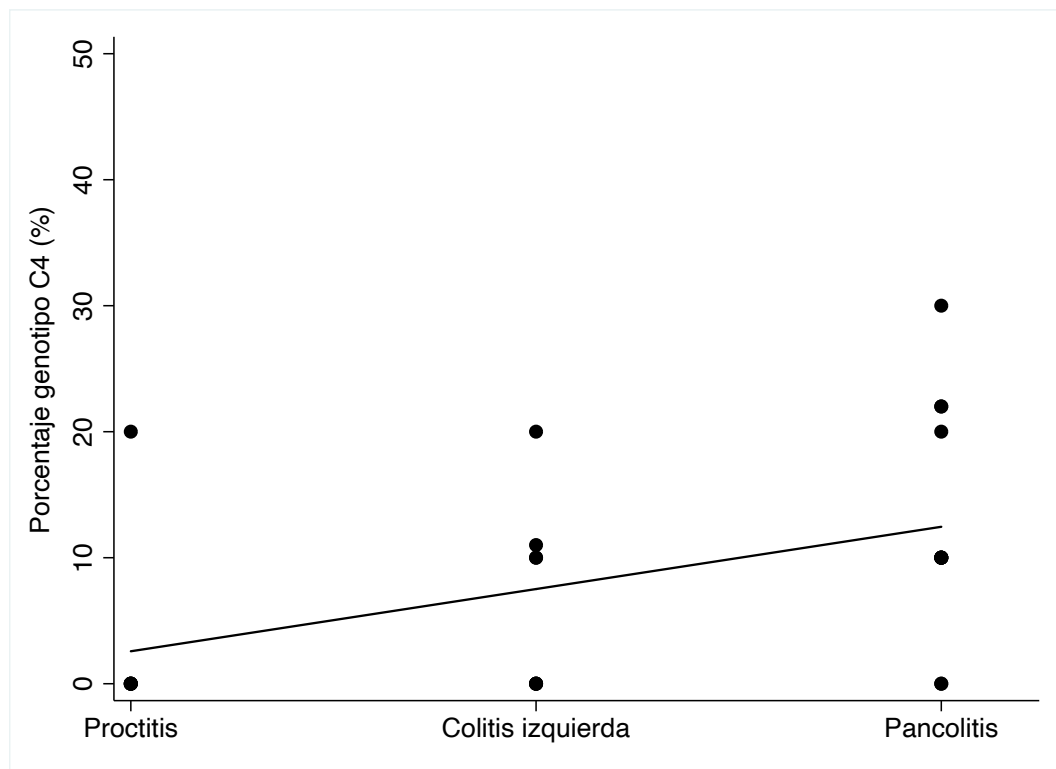


Figura 15. Correlación de porcentaje de genotipo C4 y localización colitis ulcerosa

5.2. Resultados Estudio 2

5.2.1 Características de los pacientes

Se incluyeron en esta segunda parte del estudio 17 controles sanos y 17 pacientes con debut de CU. Las características basales de los individuos se muestran en la **tabla 13**.

La mediana de edad del debut de la CU fue en esta cohorte de pacientes de 47 años (RIQ 35,3-46,9). El 53% fueron hombres. En cuanto al hábito tabáquico el 71% nunca habían fumado y el 24% eran exfumadores siendo sólo un paciente (6%) fumador activo en el momento del debut. En la **tabla 13** también se recogen los hallazgos endoscópicos de la CU. En cuanto a la extensión de la enfermedad, un 41% presentaban afectación de todo el marco colónico, un 24% colitis izquierda y un 35% afectación exclusivamente a nivel de recto. Un 82% presentaron actividad histológica moderada y 18% actividad histológica grave.

Tabla 13. Características de los pacientes al diagnóstico

		Controles n=17	Colitis ulcerosa n=17	Valor p
Edad, años		42,9 (35-43)	47 (35,3-54,4)	0,77
Mediana (RIQ)				
Sexo, hombre		9 (52,9)	9 (52,9)	1
n (%)				
Hábito tabáquico				
n (%)				
	Nunca fumador	11 (64,7)	12 (70,6)	0,83
	Exfumador	4 (23,5)	4 (23,5)	
	Fumador activo	2 (11,8)	1 (5,8)	
Extensión de la CU	Proctitis	N/A	6 (35,3)	N/A
n (%)	Colitis izquierda	N/A	4 (23,5)	
	Pancolitis	N/A	7 (41,2)	
Score endoscópico	Mayo 1	N/A	0 (0)	N/A
(índice Mayo)	Mayo 2	N/A	12 (70,6)	
	Mayo 3	N/A	5 (29,4)	
Grado histológico de	Moderado	N/A	14 (82,3)	N/A
actividad	Grave	N/A	3 (17,6)	

En cuanto al índice endoscópico Mayo, presentaron un Mayo 2 el 71% de los pacientes seguido de un Mayo 3 el 29% de los pacientes.

En la **figura 16** se muestran los síntomas que presentaron los pacientes al diagnóstico. Un 88% presentaban rectorragia, un 59% diarrea y un 24% dolor abdominal.

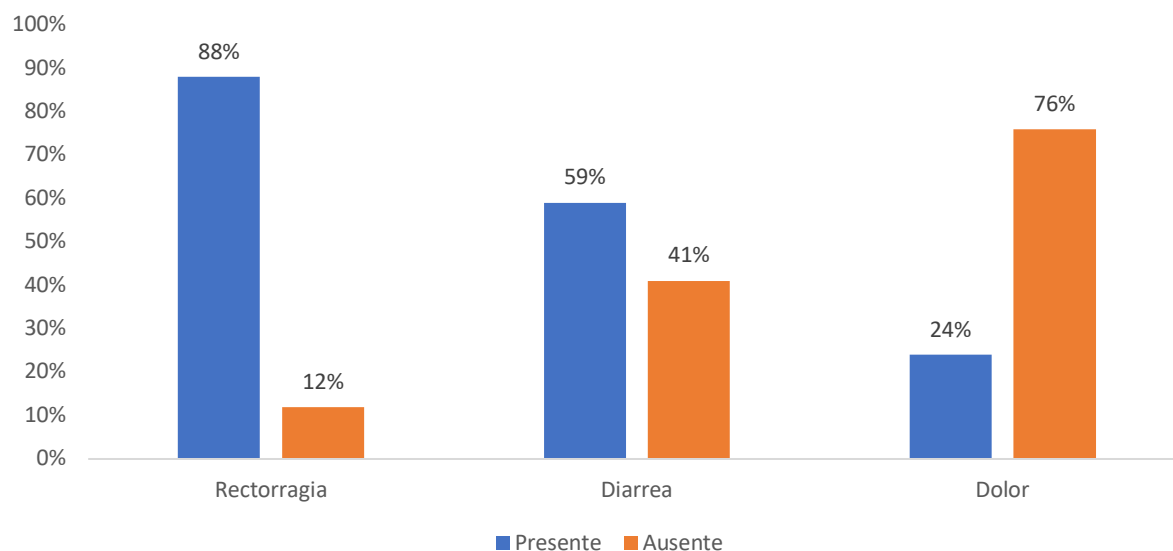


Figura 16. Porcentaje de los diferentes síntomas presentes al diagnóstico

En la **tabla 14** se recogen los valores de la hemoglobina, albúmina, proteína C reactiva y CF al diagnóstico y durante el seguimiento del primer año.

Tabla 14. Parámetros analíticos al debut, a los 4meses y al año del diagnóstico de colitis ulcerosa

	Diagnóstico	4 meses	1 año
Hemoglobina, g/dl Mediana (RIQ)	13,9 (12,6-14,6)	14,3 (12,7-15)	13,7 (13-14,9)
Albúmina, g/dl Mediana (RIQ)	4,4 (4,2-4,6)	4,25 (4,2-4,5)	4,4 (4,3-4,6)
Prot C reactiva, mg/dl Mediana (RIQ)	0,22 (0,12-0,72)	0,10 (0,04-0,25)	0,21 (0,06-0,73)
Calprotectina fecal, mg/kg Mediana (RIQ)	708 (380-1547)	126 (67-374)	104 (61-554)

Al diagnóstico el 100% de los pacientes presentó elevación de CF por encima de 150mg/kg y sólo el 23,5% elevó proteína C reactiva por encima de 0,5 mg/dl. A los 4 meses del diagnóstico el 47% de los pacientes habían normalizado la CF (niveles <150mg/kg) y al año el 58,8% habían conseguido este objetivo.

No se observó relación entre la gravedad endoscópica medida por el índice Mayo y los niveles de CF. La mediana de CF en los pacientes con Mayo endoscópico = 2 fue de 578 (rango 407,5-1560) mientras que la mediana de CF en los pacientes con Mayo endoscópico =3 fue de 411 (rango 151-1078) $p=0,85$.

Tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto a los niveles de CF y necesidad de escalada de tratamiento a inmunosupresor o biológico durante el primer año. La mediana de CF al diagnóstico en los pacientes que continuaron con mesalazina a lo largo del primer año fue de 578 (rango 271-1560) mientras que la mediana de CF en los que necesitaron escalada de tratamiento fue de 542 (411-847) ($p=0,84$)

Tras el diagnóstico el 100% de los pacientes inició tratamiento con mesalazina. Por corticodependencia 5 pacientes durante el primer año iniciaron azatioprina con una mediana de tiempo de 4,4 meses (RIQ 3,73 – 7,7). Dentro del primer año desde el diagnóstico un paciente necesitó escalada de tratamiento a adalimumab tras fracaso a azatioprina por persistencia de actividad inflamatoria. En la **figura 17** se muestra el porcentaje de pacientes con cada tratamiento al año del diagnóstico.

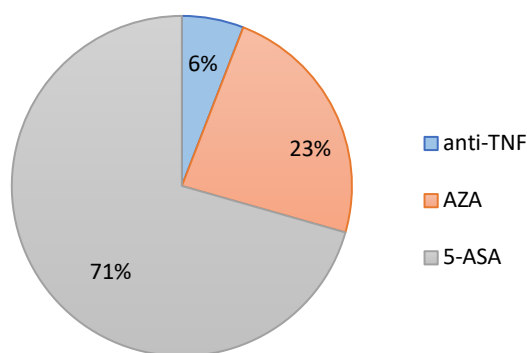


Figura 17. Porcentaje de los diferentes tratamientos en el primer año tras el diagnóstico

El uso de corticoides en el primer año tras el diagnóstico tuvo lugar en el 59% de los pacientes como se muestra en la **figura 18**.

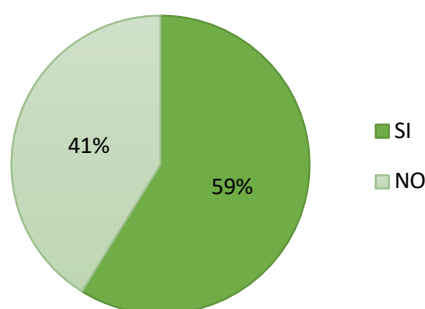


Figura 18. Uso de corticoides en el primer año tras el diagnóstico de colitis ulcerosa.

5.2.2 Genotipos Bacteroidetes

La secuencia de los genotipos encontrados en este segundo estudio se muestra en la **tabla 15**.

Tabla 15. Datos de secuenciación de los diferentes genotipos bacteroidales (*primers REI*).

Genotipo	Secuencia
N1	CTTGGCCAGCCTTCTGAAAGGAAGATTAATCCAGGATGGGATCATGAGTTCACATGTCCGCATGATTAAA GGTATTTTCGGTAGACGATGGGG
C1	CTTGGCCAGCCTTCTGAAAGGAAGATTAATACAAGATGGCATCATGAGTCCGCATGTTTACATGATTAAA GGTATTTTCGGTAGACGATGGGG
C2	CTTGGCCAGCCTTCTGAAAGGAAGATTAATACAAGATGGCATCATGAGTCCACATGTTTACATGATTAAA GGTATTTTCGGTAGACGATGG
C4	CTTGGCCAGCCTTCTGAAAGGAAGATTAATCCAGGATGGCATCATGAGTTCACATGTCCGCATGATTAAA GGTATTTTCGGTAGACGATGGGG
CB4	CTTGGCCAGCCTTCTGAAAGGAAGATTAATCCAGGATGGCATCATGAGTTCACATGTCCGCATGATTAAA GGTTTTTCGGTAGACGATGGG
CB5	CTTGGCCAGCCTTCTGATAGGAAGATTAATCCAGGATGGGATCATGAGTTCACATGTCCGCATGATTAAA GGTATTTTCGGTAGACGATGGGG
CB6	CTTGGCCAGCCTTCTGAAATGAAGATTAATCCAGGATGGGATCATGAGTTCACATGTCCGCATGATTAAA GGTATTTTCGGTAGACGATGGGG
CB7	CTTGGCCAGCCTTCTGAAAGGAAGATTAATGCAGGATGGGATCATGAGTTCACATGTCCCATGAGTAAA GGTATTTTCGGTAGACGATGGGG
CB11	CTTGGCCAGCCTTCTGAAAGGAAGATTAATCCAGGATGGGATCATGGGTTTACATGTCCGCATGATTAAA GGTATTTTCGGTAGACGATGGGG

El porcentaje de aparición de los diferentes genotipos se resume en las **tablas 16 y 17 y figura 19**.

El genotipo N1 (*B. dorei*) apareció en el 100% de los casos y de los controles tanto en muestras fecales como en biopsias.

El genotipo C1 (*B. vulgatus*) apareció en el 17,7% de las heces de los controles frente al 11,8% en las heces de los casos, sin observarse diferencias significativas ($p=1$).

El genotipo C2 no lo hemos detectado en las heces de ningún caso mientras que ha aparecido en la muestra de heces de 3 controles (17,7%).

El genotipo C4 se encontró en un 59% de las muestras fecales de los pacientes con diferencias significativas ($p=0,002$) al compararlo con el porcentaje de aparición en controles que fue, en este caso, de un 5,9%.

Tabla 16. Genotipo bacteroidal en heces en los casos y los controles

	Heces controles n=17	Heces casos n=17	Valor p
Genotipo N1 (<i>B. dorei</i>) n (%)	17 (100)	17 (100)	
Genotipo C1 (<i>B. Vulgatus</i>) n (%)	3 (17,7)	2 (11,8)	1
Genotipo C2 n (%)	3 (17,7)	0 (0)	0,23
Genotipo C4 n (%)	1 (5,9)	10 (58,8)	0,002

En los 17 pacientes, al comparar la presencia de los diferentes genotipos encontrados en heces y biopsias observamos que no existen diferencias significativas con aparición del genotipo C4 en el 58,8% de las heces de los casos y en el 64,7% de las biopsias ($p=0,16$).

Tabla 17. Genotipo bacteroidal en heces y biopsias de los casos

	Heces casos	Biopsias casos	p
Genotipo N1 (<i>B. dorei</i>) n (%)	17 (100)	17 (100)	1
Genotipo C1 (<i>B. Vulgatus</i>) n (%)	2 (11,8)	11 (64,7)	0,52
Genotipo C2 n (%)	0 (0)	1 (5)	N/A
Genotipo C4 n (%)	10 (58,8)	11 (64,7)	0,16

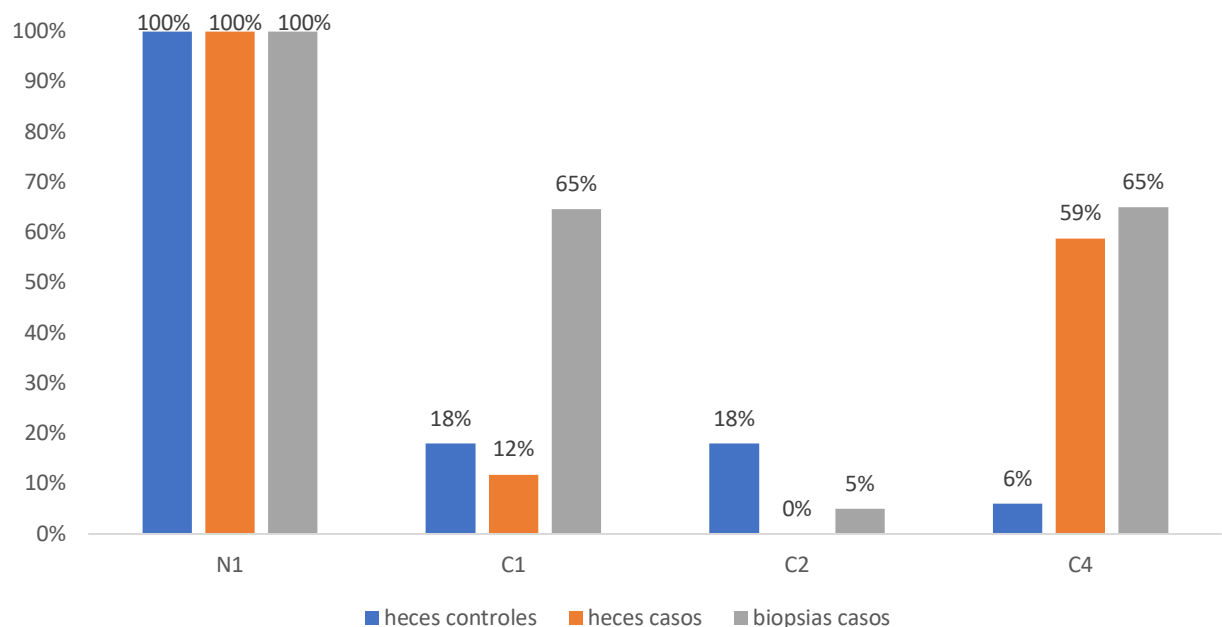


Figura 19. Porcentaje de los diferentes genotipos bacteroidales en heces y biopsias.

En la **figura 19** se representa el porcentaje de aparición de los diferentes genotipos predominantes en las muestras analizadas observándose diferencias significativas en cuanto a la presencia de C4 tanto en heces como biopsias frente a los casos $p=0,002$.

Mediante una regresión logística univariable (**Tabla 18**) estudiamos la asociación entre la presencia de C4 y las diferentes variables. La asociación entre la presencia de C4 y el sexo fue significativa con una OR 7 (IC95: 1,22 - 40,1). El genotipo C4 en heces está presente en el

83,3% de los hombres mientras que en mujeres aparece en un 33%. No se demostró asociación significativa entre la presencia de C4 y el hábito tabáquico, los diferentes parámetros analíticos evaluados ni con la necesidad de glucocorticoides en el primer año.

Tabla 18. Regresión logística univariable y multivariable de los factores asociados a la presencia de C4 en heces de los casos

	Univariable	p
Sexo	24 (1,74-330,8)	0,018
Edad	1,01 (0,92-1,08)	0,99
Tabaco	1,90 (0,51-7,00)	0,34
Extensión	2,24 (0,68-7,40)	0,19
Prot C reactiva	1,71 (0,40-7,2)	0,47
Hemoglobina	0,81 (0,32-2,05)	0,66
Albúmina	0,046 (0,0003-7,01)	0,23
Calprotectina fecal	1 (0,99-1)	0,60
AP	1,5 (0,11-20,68)	0,76
Mayo endoscópico	4 (0,34-47,11)	0,27
GC 1 año	3,11 (0,41-23,39)	0,27
Genotipo C1	0,66 (0,035-12,84)	0,79

La asociación de C4 en heces y la extensión de la CU no fue significativa, $p=0,15$ si bien es cierto que parece existir una tendencia de mayor concentración de Bacteroidetes con genotipo C4 en aquellos pacientes con afectación más extensa (pancolitis). **Figura 20**

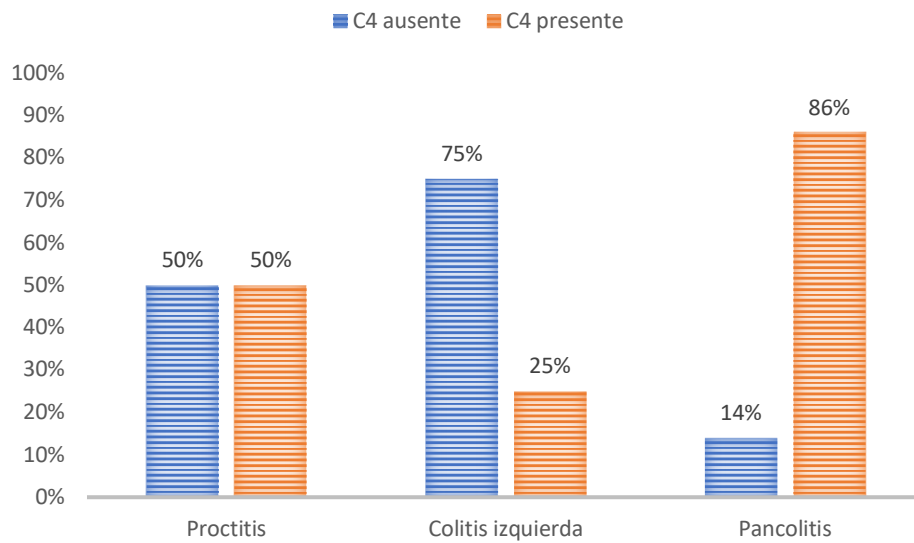


Figura 20. Porcentaje de C4 según extensión de la colitis ulcerosa

La asociación de C4 en heces y el grado de actividad endoscópica e histológica tampoco fue significativa, si bien es cierto que como se muestra en la **figura 21** existe un mayor porcentaje de pacientes con C4 entre los que tienen un mayor índice endoscópico (Mayo 3). El 80% de los pacientes con índice endoscópico Mayo 3 presentan en sus muestras fecales genotipo C4.

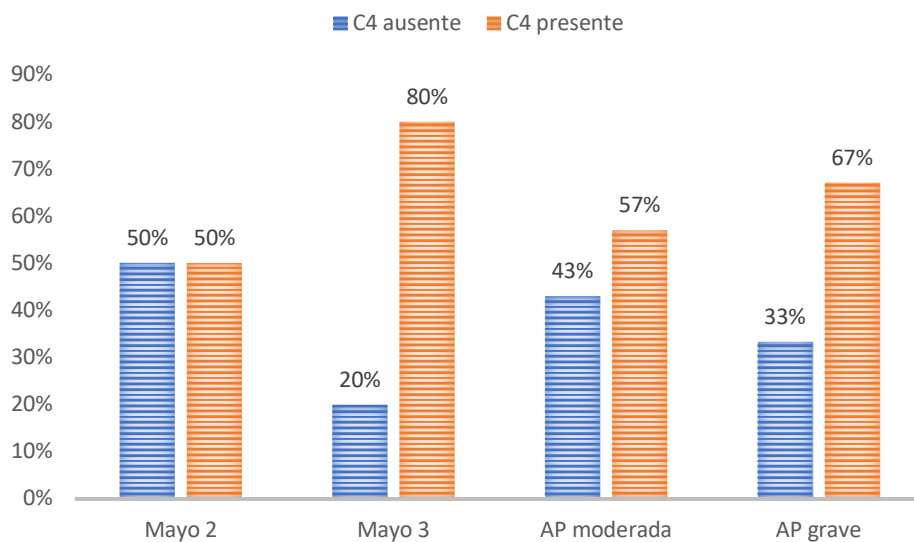


Figura 21. Porcentaje de C4 según Mayo endoscópico y gravedad en estudio anátomo-patológico (AP)

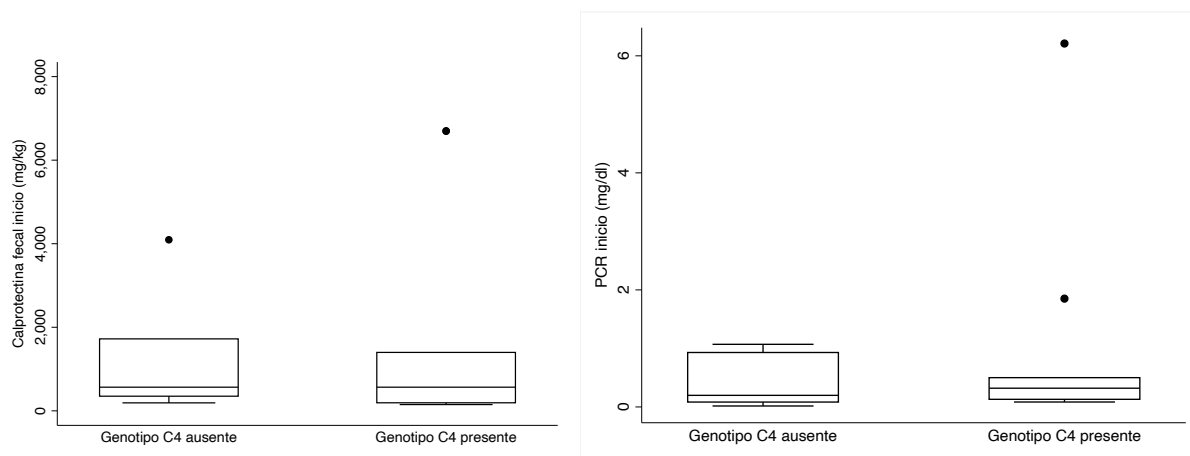


Figura 22. Niveles de CF y proteína C reactiva en función de presencia o ausencia de genotipo C4

La mediana de CF en los pacientes que no presentaron C4 fue de 566 (rango 350-1722) mientras que en los pacientes con presencia de C4 fue de 566 (rango 192-1398). Al estudiar la asociación entre ellas mediante el test de Wilcoxon, observamos que la presencia de C4 no se asoció a niveles mayores de CF ($p=0,85$). **Figura 22.**

La mediana de proteína C reactiva en los pacientes que no presentaron C4 fue de 0,20 (rango 0,083-0,93) mientras que en aquellos con presencia de C4 fue de 0,32 (rango 0,13-0,5). Al evaluar la posible asociación existente mediante test de Wilcoxon, observamos que la presencia de C4 no se asoció a niveles mayores de proteína C reactiva ($p=0,28$). **Figura 22.**

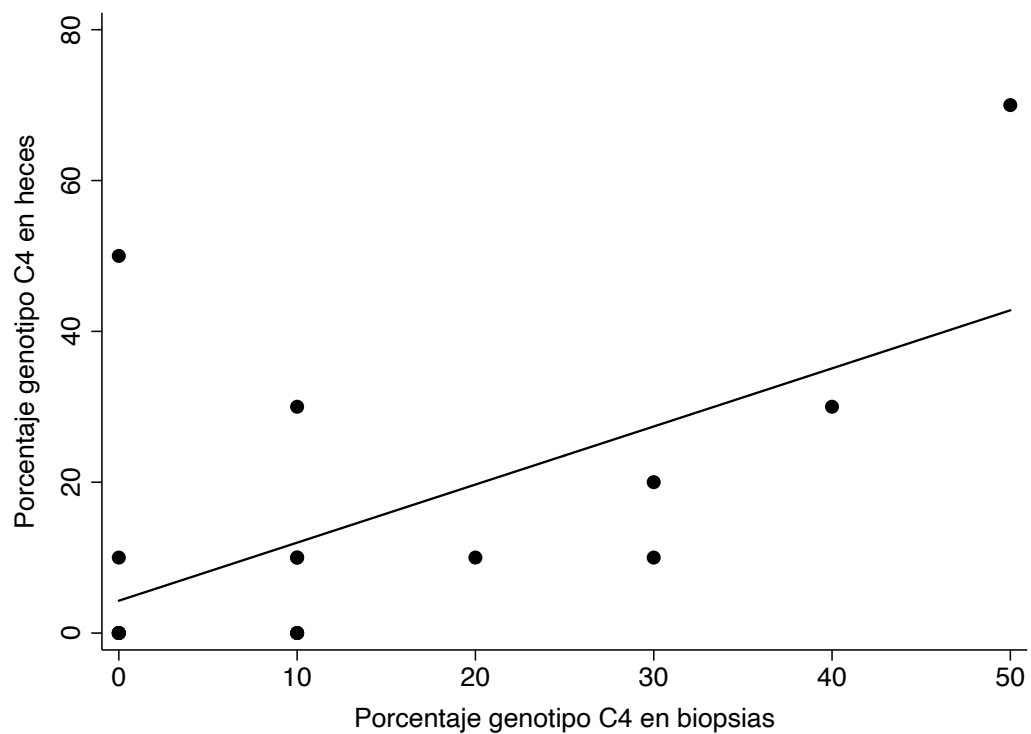


Figura 23. Correlación porcentaje genotipo C4 en biopsias y heces

La correlación entre % C4 en heces y biopsias fue de 0,52. **Figura 23**

5.3. Creación de SONTA de detección de genotipo C4

A partir de la secuenciación del genotipo C4 se creó una sonda que permitió la cuantificación de C4 en la totalidad de las muestras obtenidas en el estudio 2 (**Tabla 19**)

Tabla 19. Secuencia de los primers y la sonda C4 utilizados

Nombre	Secuencia (5'-3')
Bach_f	CTT GGC CAG CCT TCT GAA AG
Bach_r	CCC CAT CGT CTA CCG AAA ATAC
FGENC4	GCC AGC CTT CTG AAA GGA AG
RGENC4	CCG CCT ACT ATC TAA TGG AAC G
SGENC4	[FAM] TGG CAT CAT GAG TTC ACA TGT CCG CA [TAM]

Mediante un gel de Agarosa al 2% visualizamos los amplicones obtenidos mediante PCR con los primers FGENC4/RGENC4 en el DNA extraído de las heces de un control sano, un paciente con CU y DNA de *Phocaeicola dorei*. En la **figura 24** podemos observar los resultados de este gel en el que el canal 1 y 2 (pertenecientes a DNA extraído de heces de individuos sanos) no se observa banda mientras que si aparece en los canales restantes correspondientes 3 y 4 a heces de un paciente con CU y 5 y 6 a DNA de *Phocaeicola dorei*.

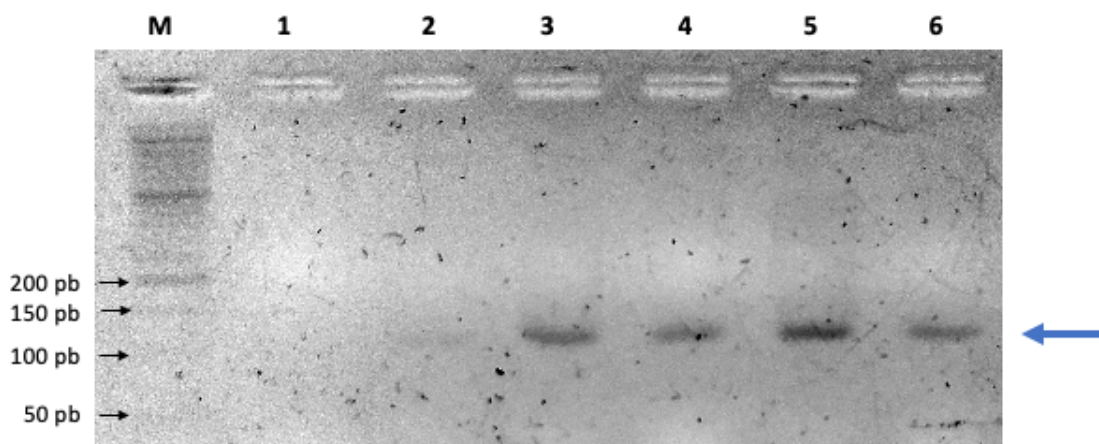


Figura 24. Gel de agarosa al 2% con amplicones obtenidos por PCR con los primers FGENC4/RGENC4 en 1 y 2 control, 3 y 4 caso colitis ulcerosa y 5 y 6 DNA de *Phocaeicola dorei*.

En la **figura 25** se muestra la totalidad de la secuencia de 118 pares de bases empleada conteniendo los primers FGENC4/RGENC4 y la sonda de reconocimiento de la secuencia de C4.

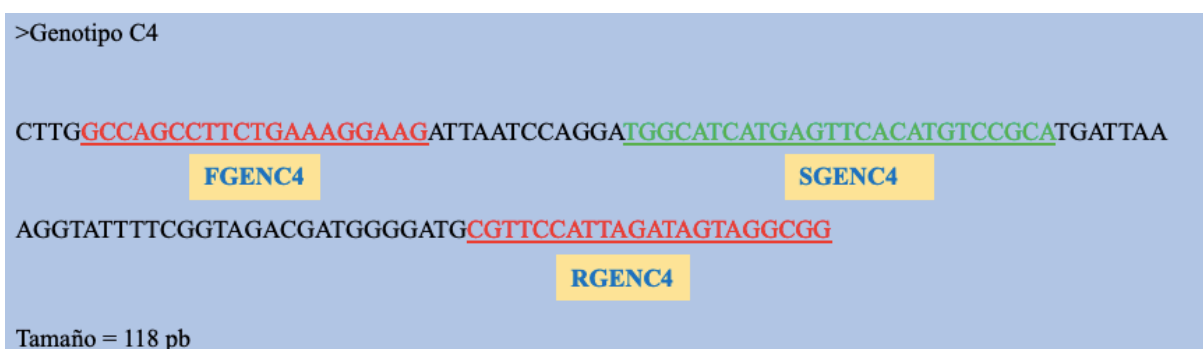


Figura 25. secuencia de reconocimiento de C4 (sonda + primers)

fg	Cr
1000000	7,75469828
100000	11,4805069
10000	14,8438263
1000	18,6160259
100	22,6253128
10	27,0971527
1	28,2552109

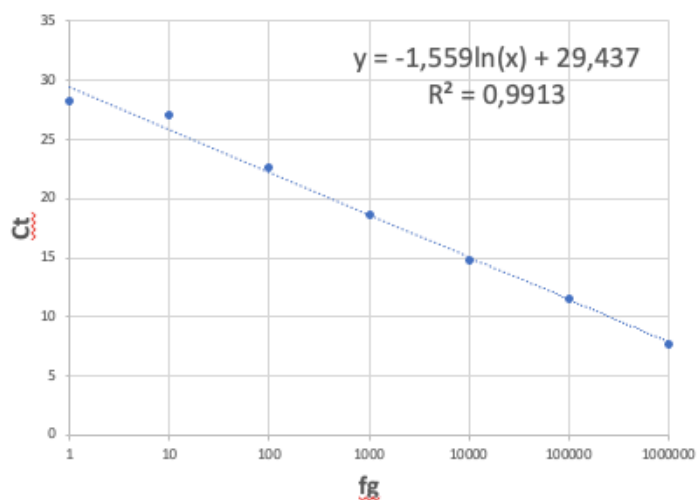


Figura 26. Regresión lineal qPCR

La mediana de concentración mediante qPCR de C4 en heces de los controles fue de 0,37 fg con un RIQ (0,35-4,87) mientras que la mediana en heces de los casos fue significativamente superior 1218,13 fg (RIQ 190,12 - 4278,97) $p = (0,001)$. **Figura 27.** Los datos de la cuantificación mediante qPCR indican que las muestras de heces intestinales de pacientes con CU presentan mayor concentración de *Bacteroides* con el genotipo C4 que los controles sanos. En las biopsias de los pacientes con CU la concentración fue de 0,67 fg (RIQ 0,11-4,49).

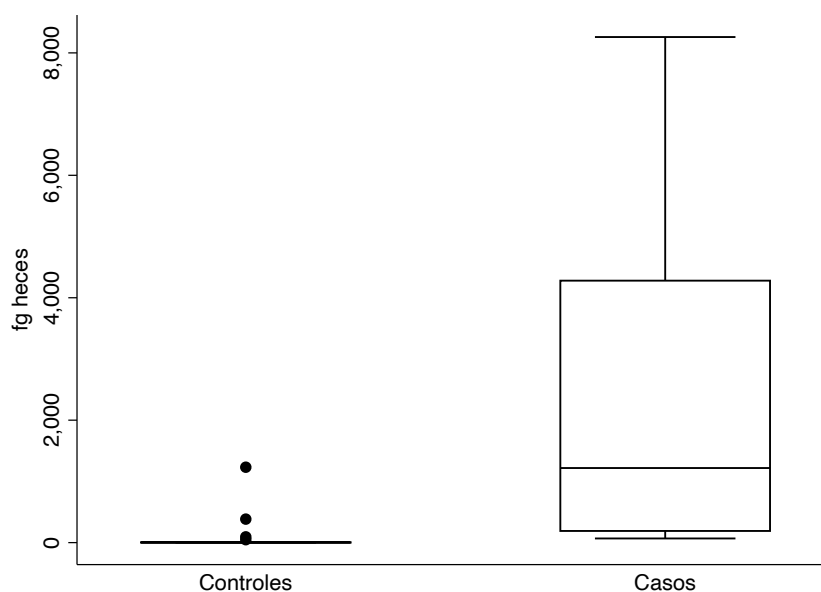


Figura 27. Concentración de genotipo C4 (fg) en heces de controles y pacientes con colitis ulcerosa de debut.

Una medida global de la exactitud de la prueba para el conjunto de todos los posibles puntos de corte se obtuvo mediante una curva ROC. El área bajo la curva que obtuvimos fue de 0,9412 (**Figura 28**). El punto de corte óptimo que maximizó el porcentaje total de clasificaciones correctas fue 68 fg dado que con él se obtiene una sensibilidad del 100%, una especificidad del 82%, un valor predictivo positivo del 85% y un valor predictivo negativo del 100%.

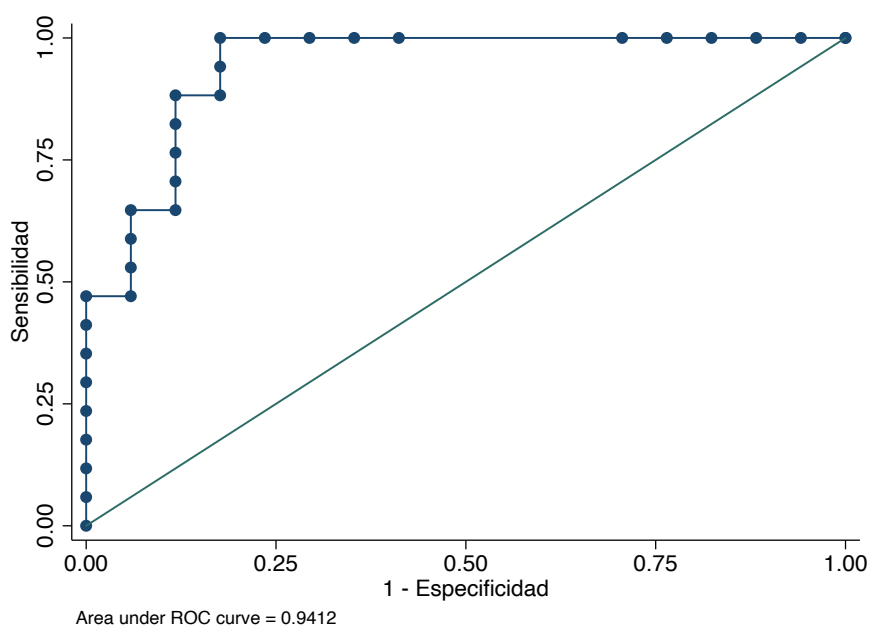


Figura 28. Curva ROC de evaluación de la capacidad de discriminación de la sonda creada para la detección del genotipo C4.

5.4 Resultados Estudio 3. Experimento en ratones

Tras la amplificación con los primers HUM en el día 1 no se observó ningún tipo de asentamiento de bacterias humanas en las heces de los ratones, pero en el día 3 el grupo de ratones inoculados con heces de pacientes con EC presentaron asentamiento de bacterias humanas (**Figura 29**).

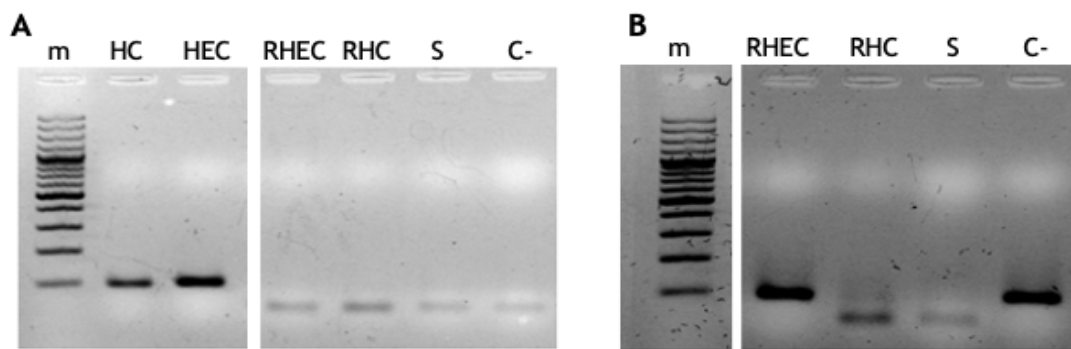


Figura 29. Gel de agarosa que muestra la amplificación mediante PCR con primers HUM de ADN presente en heces de ratones con inoculación previa de bacterias de humanos sanos y con EC. A) Primer día tras la inoculación B) Tercer día tras la inoculación [m: marcador; HC: bacterias procedentes de individuo sano; HEC: bacterias procedentes de paciente con EC; RHEC: heces de ratones inoculados con bacterias de paciente con EC; RHC: heces de ratones inoculados con bacterias de control sano. S: heces de ratones control (sin inóculo); C-: control negativo PCR

Tras sacrificar a los ratones se extrajeron heces y se realizó raspado intestinal para estudio de bacterias adheridas. La amplificación con primers HUM del AND extraído de estas muestras se presenta en la **figura 30**.

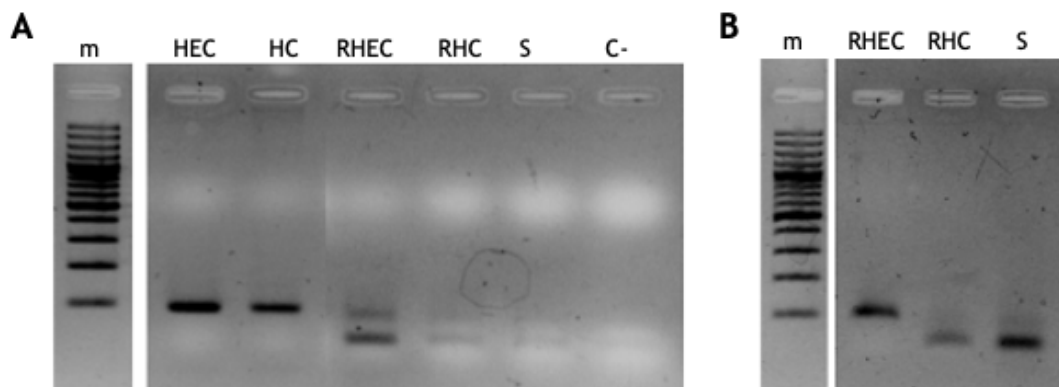


Figura 30. Amplificación de bacterias extraídas de ratones tras inoculación de bacterias de controles sanos y de pacientes con EC. A raspado intestinal B heces. [m: marcador; HC: bacterias control sano; HEC: bacterias procedentes de paciente con EC; RHEC: ratones inoculados con HEC; RHC: ratones inoculados con HC; s: heces de ratones control (sin inóculo); C-: control negativo PCR.

Podemos observar tanto en muestra de raspado como de heces el asentamiento de bacterias humanas en el grupo de ratones inoculados con heces de pacientes con EC. En grupo de ratones

inoculados con heces de controles sanos y el grupo de ratones control (sin inóculo) no presentan asentamiento de microbiota humana ni en muestra fecal ni en raspado.

Se realizaron cortes histológicos intestinales al micrótopo (grosor: 7 μ m) realizando la tinción según lo descrito en apartado de material y métodos con hematoxilina y eosina. Se observó engrosamiento parietal en el 60% de los ratones que habían sido inoculados con las bacterias del paciente con EC activa mientras que no se observó este engrosamiento en ningún ratón inoculado con bacterias de controles sanos ni en los ratones control (sin inóculo). Se observó que el engrosamiento parietal estaba compuesto por infiltrado transmural linfoplasmocitario con agregados y folículos linfoides, especialmente en la submucosa. Además, se observó la existencia de abundantes neutrófilos indicativo de actividad inflamatoria a este nivel (**Figura 31**).

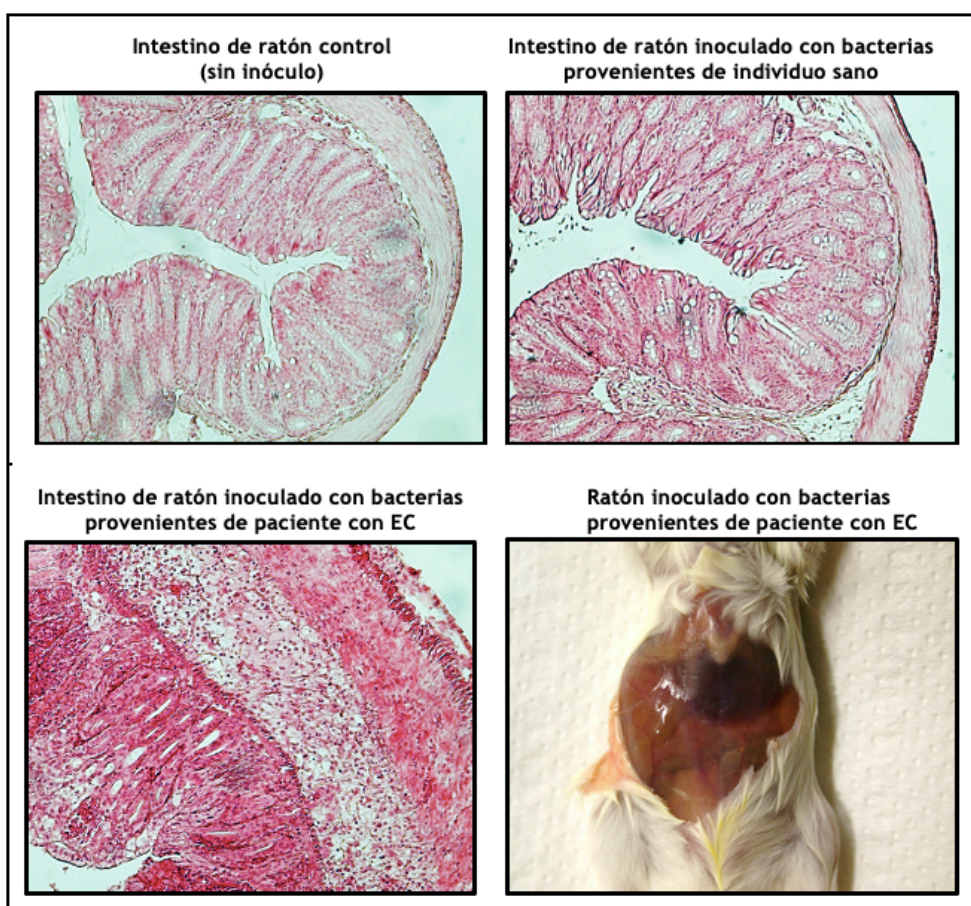


Figura 31. Cortes histológicos experimento ratones. Escala 100x

En las heces de ratones inoculados con bacterias de pacientes con EC se observó un 30% de genotipo C4 mientras que en las heces de ratones inoculados con bacterias de controles sanos y sin inóculo no se observó la presencia de C4.

Los resultados de la qPCR indican una mayor concentración de Bacteroidetes en el grupo de ratones inoculados con bacterias de pacientes con EC (**Figura 32**).

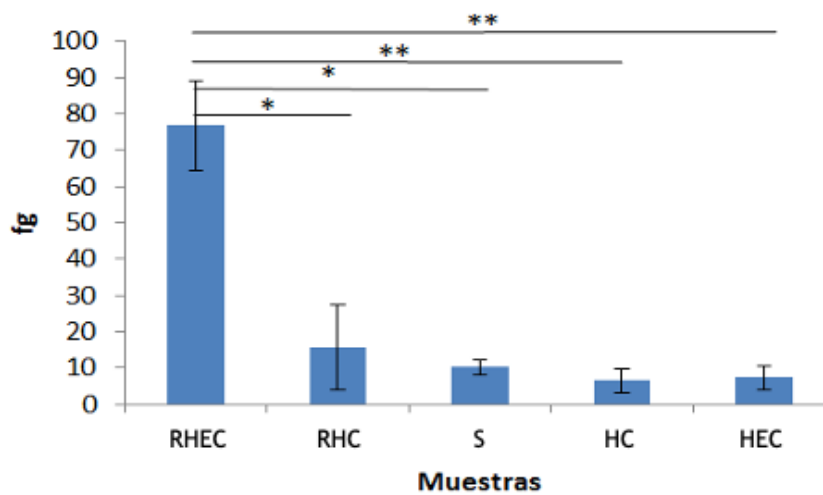


Figura 32. Concentración (fg) obtenida mediante qPCR en muestras fecales. [RHEC: ratones con inoculación de heces de paciente con EC; RHC: ratones con inoculación de heces de controles sanos; S: heces de ratones control (sin inóculo); HC: bacterias de control sano; HEC: bacterias de paciente con EC; * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$]

6. DISCUSIÓN

En las últimas décadas la incidencia de la EII ha ido en aumento por lo que son muchos los grupos de investigación que centran su esfuerzo en descifrar la etiopatogenia de la enfermedad. Las alteraciones genéticas asociadas al sistema inmune, la disbiosis de la microbiota intestinal unidos a la influencia del ambiente parecen ser los responsables del desarrollo de la enfermedad. Esta tesis ha profundizado en el estudio de la microbiota intestinal y dentro de esta se ha centrado en el filo Bacteroidetes uno de los dos filos mayoritarios en el ser humano. Varios estudios han encontrado variabilidad en cuanto a la abundancia de bacterias pertenecientes al filo Bacteroidetes en pacientes con EII. Además de las observaciones generales sobre la abundancia, varios investigadores también han encontrado cambios específicos en ciertas especies bacterianas dentro de este filo pudiendo presentar implicaciones funcionales que inducen cambios en la respuesta inmune dado lugar a un aumento de la actividad inflamatoria a este nivel. Además de las alteraciones observadas en los componentes visualizados en modelos animales, heces y biopsias de pacientes con EII, también se ha evidenciado que la disbiosis incide en la producción de metabolitos por parte de las bacterias intestinales. En individuos con EII, se ha observado una disminución en la producción de ácidos grasos de cadena corta, los cuales son comúnmente generados por las bacterias comensales. Estos ácidos grasos desempeñan un papel crucial como fuente de energía para el epitelio intestinal y la ausencia de los mismos podría dar lugar al daño intestinal [151]. Dentro de este filo, *Bacteroides* es el género predominante y en múltiples estudios y con diferentes técnicas que incluían biopsias y heces de pacientes con EII se han observado tanto aumentos como disminuciones en la abundancia relativa de especies específicas de *Bacteroides* en comparación con individuos sanos. Pero de nuevo no sólo estamos hablando de cambios en la abundancia, sino que se han revelado cambios significativos en la composición de estos *Bacteroides* [219][220][221]. En nuestro estudio hemos analizado los diferentes genotipos mayoritarios de Bacteroidetes presentes en muestras de biopsias de pacientes con EC y CU y en una segunda parte hemos comparado estos genotipos en heces de pacientes con CU e individuos sanos. La diferencia fundamental la hemos encontrado en un genotipo que denominamos C4 que se encuentra presente en pacientes con EII activa y prácticamente ausente cuando la enfermedad se encuentra inactiva o se trata de individuos sanos. Mediante la secuenciación del mismo

hemos creado una sonda de detección de 118 pares de bases de este genotipo C4 con la que hemos podido cuantificar mediante qPCR la concentración de este genotipo. Hemos observado que las muestras de heces intestinales de pacientes con CU presentan significativamente una mayor concentración de genotipo C4 que los controles sanos pudiendo establecer un punto de corte con un alto valor predictivo negativo que nos ayudaría a la hora de descartar una posible existencia de una CU. Estos resultados pueden ser útiles a la hora de realizar un diagnóstico diferencial al debut de la enfermedad dado que en la práctica clínica no existe ningún test diagnóstico “gold standard” y para el diagnóstico nos basamos en el conjunto de los hallazgos clínicos, analíticos, endoscópicos e histológicos. La sonda de reconocimiento de C4 tendría utilidad por su rapidez de ejecución y ausencia de necesidad de realización de pruebas invasivas para la extracción de la muestra a analizar (heces), constituyendo una buena primera aproximación diagnóstica ante la sospecha de CU.

La mayor parte de la microbiota intestinal se trata de bacterias anaerobias estrictas con requerimientos de crecimiento específicos lo que supone gran dificultad a la hora de realizar su aislamiento mediante cultivo. Por este motivo hemos empleado técnicas moleculares de selección mediante la amplificación del ARNr 16S mediante PCR. En la década de 1980, científicos como Carl Woese y George Fox comenzaron a utilizar la secuenciación del ARN ribosómico 16S para estudiar la diversidad microbiana. Woese y Fox propusieron la utilización del ARN ribosómico como marcador molecular para la clasificación filogenética de microorganismos [137]. A mediados de la década de 1980, se desarrolló la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, lo que permitió la amplificación de fragmentos específicos del ARN ribosómico 16S. Este avance revolucionó la secuenciación genética y permitió el estudio detallado de comunidades microbianas sin necesidad de cultivar microorganismos en medios de cultivo especializados, lo que permite detectar y analizar una amplia gama de especies bacterianas. Esta técnica se ha utilizado ampliamente en la investigación de la microbiota humana, la ecología microbiana ambiental, la taxonomía microbiana y la identificación de nuevos microorganismos por lo que se trata de una técnica bien establecida y estandarizada facilitando la comparación de resultados entre diferentes estudios y la interpretación de los hallazgos. Hemos seleccionado esta técnica de amplificación del ARNr 16S mediante PCR dado que nos permite detectar y amplificar secuencias específicas del genoma bacteriano proporcionándonos una alta sensibilidad y especificidad en la identificación

de diferentes tipos de bacterias presentes en la muestra, incluso en concentraciones bajas [222][223]. Otra ventaja añadida es que se puede realizar a partir de muestras fecales, lo que proporciona un enfoque no invasivo para obtener información sobre la microbiota intestinal con buena tolerancia y adherencia a la entrega de muestras por parte de los pacientes. Esto es particularmente relevante en el estudio de la CU, ya que evita la necesidad de procedimientos invasivos como la toma de biopsias. Los primers empleados en este estudio se diseñaron con el objetivo de detectar este grupo de bacterias del orden Bacteroidales en aguas residuales a partir de una pequeña región conservada del ARNr 16S permitiendo una gran especificidad a la hora de seleccionarlas [216]. Teniendo en cuenta las importantes diferencias en el rendimiento de los kits utilizados para aislar el ADN bacteriano hemos seleccionado el Kit comercial de la casa QIAGEN. Estos kits utilizan una columna de sílice como matriz de purificación. El principio general implica la unión específica de los ácidos nucleicos a la sílice en condiciones adecuadas, seguido de lavados para eliminar impurezas y finalmente la elución de los ácidos nucleicos purificados. Los ácidos nucleicos purificados suelen ser de alta pureza y rendimiento, lo que es esencial para la realización de la PCR. El sesgo de este Kit es su preferencia a la hora de seleccionar bacterias Gram negativas pero en el caso de nuestro estudio, esto supone una ventaja por lo que todas las muestras fueron preparadas con este método de extracción de ADN lo que garantiza su comparabilidad [224].

La gran diversidad del género *Bacteroides* lo convierte en un candidato atractivo para su estudio en la EII dadas las variaciones de actividad y funcionalidad de las diferentes especies. Los resultados que hemos obtenido de la secuenciación y posterior BLAST nos muestran una variabilidad reducida del orden bacteroidal. Este hecho puede deberse a una estrecha relación filogenética entre las especies que caracterizan a los genotipos encontrados. Dado que el genotipo N1 presenta alta homología con la especie *P dorei* y el C1 con *B vulgatus* suponemos que la relación de estas especies con las del resto de genotipos está basada en algún tipo de parentesco. En diferentes investigaciones, se han informado cambios en la abundancia relativa de diferentes especies de *Bacteroides*. Algunos estudios han sugerido que ciertas especies de *Bacteroides*, como *Bacteroides fragilis* y *Bacteroides vulgatus*, podrían estar aumentadas en pacientes con CU [225][226]. Sin embargo, estos resultados pueden variar según las poblaciones estudiadas y las técnicas de secuenciación utilizadas en cada investigación.

En nuestro estudio en biopsias hemos encontrado variación significativa en la proporción de pacientes que presentaron las diferentes especies mayoritarias de *Bacteroides* entre la EC y la CU. Esto concuerda con los resultados obtenidos en un estudio realizado en biopsias mediante PCR en tiempo real por Bibiloni *et al* en 20 pacientes con EC y 15 pacientes con CU en el que concluye que la microbiota asociada a la mucosa (incluyendo el grupo de *Bacteroides*) es específica de cada tipo de enfermedad encontrando diferencias entre la EC y la CU [227]. En nuestro estudio la variación más marcada entre ambas enfermedades ha sido con la especie *B vulgatus*, una de las especies más estudiadas a lo largo de las últimas décadas por sus conocidos efectos pro-inflamatorios en EII [183]. En un estudio reciente, se ha confirmado un aumento de su actividad proteolítica en pacientes con CU incluso antes del debut de la enfermedad [228]. En nuestro estudio en biopsias, *B vulgatus* se detectó en la práctica totalidad de los pacientes con EC (96,15%) y en un 69,23% de los pacientes con CU ($p=0,024$). Esto concuerda con el estudio de Ruseler-van Embden *et al* en el que la especie *B vulgatus* representó más del 40% de la microbiota intestinal total de los pacientes con EC [229]. Teniendo en cuenta la presencia de actividad o inactividad de la enfermedad, en nuestro estudio *B vulgatus* no parece variar con la misma dado que aparece en un 87% de los pacientes con enfermedad inactiva y en un 80% de los pacientes con enfermedad activa sin diferencias significativas ($p=0,71$). Sin embargo, sí que hemos encontrado diferencias en el genotipo C4, que podría tratarse de una especie de *Bacteroides* no identificada, en cuanto a presencia de actividad o no en la mucosa. Hemos visto que esta especie se encuentra presente en el 86% de los pacientes en actividad frente al 26% de los pacientes sin actividad ($p=0,0001$). En varios estudios previos se ha intentado establecer si existe una disbiosis localizada en la EII entre el tejido con inflamación y sin inflamación con resultados contradictorios. En el estudio de Bibiloni *et al* que previamente hicimos referencia no se observaron diferencias entre las especies encontradas entre las áreas inflamadas y las no inflamadas al igual que en el estudio de Gophna *et al* en la que la composición microbiana entre las diferentes áreas activas e inactivas se mantuvo estable tanto en pacientes con EC como con CU [157]. Sin embargo, en el estudio de Sephri *et al* se observaron perfiles RFLP diferentes en los tejidos con inflamación y sin inflamación en pacientes con EII encontrando en el caso de los *Bacteroides* una supuesta pérdida de especies a medida que el tejido se inflama [230] al igual que en el estudio de Walker *et al* en el que desarrollaron bibliotecas genómicas en las que se observó que la carga bacteriana era generalmente menor en las áreas inflamadas con una composición diferente al compararlas con los tejidos sin inflamación [231]. Cabe pensar que

estas discrepancias puedan deberse al uso de una metodología molecular diferente o probablemente a la mayor profundidad de secuenciación que se emplee. En nuestro estudio al realizar el análisis multivariable sólo el genotipo C4 se asoció a la actividad de la enfermedad con una OR 9,56 (IC95: 1,27-71,73) no encontrándose asociación con el resto de genotipos incluido *B vulgatus*.

En varios estudios se han identificado diferencias significativas en la composición de la microbiota luminal de las heces y las biopsias de colon [131]. De todas formas, estos resultados deben interpretarse siendo conscientes del procedimiento para la obtención de dichas biopsias. Para la obtención de tejido se requiere la realización de una colonoscopia, procedimiento invasivo que requiere uso de sedación y preparación previa y que puede suponer una serie de riesgos para el paciente (perforación intestinal, sangrado, desequilibrio electrolítico con la solución evacuante...). Por este motivo en el segundo estudio hemos recogido biopsias y muestras de heces de los pacientes al debut con el objetivo de comparar si una muestra es equivalente a la otra empleando las mismas técnicas en su procesamiento.

De manera reproducible a lo encontrado en las biopsias del estudio 1 en donde *B vulgatus* se encontraba presente en el 69% de las biopsias de pacientes de CU, *B vulgatus* estuvo presente en las biopsias de los casos de CU del estudio 2 en un 65% de pacientes. Sin embargo, cuando estudiamos su presencia en las muestras de heces tanto de casos como de controles fue escasa (11,8% y 17,7% respectivamente). *B vulgatus* fue la única excepción dado que el resto de genotipos encontrados incluyendo el C4 se encuentra en la misma proporción en heces que en biopsias. En numerosos estudios en humanos con EII se ha detectado la presencia de *B vulgatus* en biopsias formando parte de la microbiota adherida a la mucosa. Esto ha confirmado su capacidad para invadir células epiteliales intestinales induciendo la expresión de citoquinas proinflamatorias activando la señalización inflamatoria intracelular con diferencias significativas en su presencia al compararlas con biopsias de individuos sanos [183][231]. En nuestro estudio no hemos recogido biopsias en controles sanos por lo que esta comparativa no la hemos podido realizar.

En el estudio 2, al comparar las heces de individuos sanos con la de los pacientes con CU de debut hemos encontrado una proporción de genotipos mucho más estable en sanos que en pacientes donde la aparición de otros genotipos es mayor. Revisando la evidencia hasta la

actualidad en cuanto a la estabilidad de la microbiota en CU frente a controles sanos los resultados son contradictorios. El ADNr 16S se ha utilizado para investigar los taxones dominantes utilizando la hibridación de oligonucleótidos, la PCR en tiempo real y la hibridación fluorescente in situ. También los análisis de polimorfismos de conformación de una sola cadena y otras técnicas de huellas genéticas se han empleado en determinar la diversidad microbiana en muestras complejas. Nuestro patrón de resultados de estabilidad coincide con los de Martínez- Medina *et al* y Loh *et al* en los que la microbiota en los casos de EII es menos estable que en los controles [48][232]. En el estudio de Ott *et al*, al contrario que lo encontrado por nosotros se observó una reducción de la diversidad en la EII debido a la pérdida de bacterias anaerobias comensales incluyendo especies *Bacteroides*, *Eubacterium* y *Lactobacillus* confirmada mediante PCR en tiempo real. Esta reducción de la diversidad también se observó en el estudio de Michail *et al* en pacientes con CU en edad pediátrica al compararlo con controles sanos mediante PCR de ARNr 16S observándose una pérdida de especies bacterianas en CU versus en controles.

Si comparamos los genotipos encontrados en biopsias frente a heces en pacientes con CU, hemos detectado genotipos en biopsias que no hemos detectado en las heces. Estos genotipos no responden a un único patrón de bandas en el RFLP por lo que podrían ser grupos diferentes de bacterias. La otra opción menos probable es que se trate de contaminación por ADN de origen humano obtenido durante la extracción del ADN bacteriano en las biopsias (ADN humano celular). En las biopsias existen altas concentraciones de ADN humano por lo que podrían existir áreas de ADN con posibilidad de hibridación con los primers REI produciendo amplificaciones inespecíficas de genes de origen humano. En el estudio de Andoh *et al* se empleó también amplificación mediante PCR de ARNr 16S y digestión mediante enzimas de restricción en heces de 44 pacientes con CU comparándolo con 46 individuos sanos. La mayoría de los individuos sanos presentaban una microbiota perteneciente a un mismo cluster sin embargo, los pacientes con CU fueron divididos en 7 clusters más derivados de bacterias no clasificadas (*Bacteroides* y *Lactobacillus*) que no se detectaron en los controles sanos. Los patrones de RFLP también en este estudio fueron diferentes entre los pacientes activos y en remisión lo que coincide con los datos obtenidos en nuestro estudio [233].

El genotipo C4 se ha encontrado en una elevada proporción de los casos tanto en heces como en biopsias frente a las heces en controles sanos. A pesar del número limitado de muestras

analizado, lo que podemos decir con nuestro estudio es que el genotipo C4 se encuentra en diferente proporción de los casos activos frente a los casos inactivos o controles sanos. Estos resultados centrados en el genotipo C4 sólo indican diferencias en la composición de la microbiota intestinal pero realmente no podemos definir si es causa o consecuencia de la misma. Con este tipo de estudios sólo podemos demostrar asociación, pero no nos proporciona información sobre el mecanismo o la causalidad. Estos cambios de composición podrían desempeñar un papel en la patogénesis de la enfermedad, pero también pueden haber ocurrido como resultado de la enfermedad. Por lo tanto, las dos teorías que barajamos una vez obtenidos estos resultados son dos. La primera es que la especie con el genotipo C4 presenta actividad dañina tisular que activa la respuesta inflamatoria de la EII. Esta teoría se ha comprobado para *Bacteroides* como *B. fragilis* que en modelos animales (ratones libres de gérmenes) indujo una colitis persistente mediante la producción de toxina activando Il-8 y la proliferación de células epiteliales contribuyendo al proceso inflamatorio [234]. También *B. vulgatus* en varios estudios ha demostrado un papel etiopatogénico en el desarrollo de la EII tanto en modelos animales como experimentales clínicos en los que indujo inflamación colónica mediante la invasión de células epiteliales [235][183]. La segunda teoría se basa en el principio de la disbiosis en la que la especie con el genotipo C4 no está directamente relacionada con la acción dañina directa sobre la mucosa, sino que indirectamente el desequilibrio o cambios en la microbiota intestinal favorecen la proliferación de otras especies desencadenantes de la inflamación que producirán el cuadro característico de la enfermedad.

A lo largo del estudio de casos-contrroles hemos evaluado la relación entre la presencia del genotipo C4 encontrado y diversos factores que podrían asociarse a la variación del mismo. Los pacientes investigados en nuestro estudio eran recién diagnosticados por lo que todos tenían actividad y aún no habían recibido tratamiento alguno para su enfermedad inflamatoria. Este criterio de selección de pacientes en el momento del debut lo hemos propuesto para eliminar el efecto y por lo tanto el posible sesgo que pudiese tener la administración de los diferentes tratamientos. Los 5-ASA se han asociado a cambios en la diversidad y composición bacteriana con mayor concentración de bacterias con actividad anti-inflamatoria del género *Faecalibacterium* y menor concentración de bacterias pro-inflamatorias [236] y en una revisión sistemática reciente en pacientes con enfermedades inmunomediadas, el tratamiento con

fármacos biológicos resultó en un cambio en el microbioma en 5 de los 7 estudios incluidos [237].

A lo largo de la vida, la microbiota intestinal experimenta cambios extensos, y los procesos relacionados con la edad pueden afectar tanto al microbioma como a las alteraciones metabólicas asociadas. En una revisión sistemática que incluyó 27 estudios se evaluaron las modificaciones asociadas con el envejecimiento en la diversidad, composición y características funcionales del microbioma intestinal. Las diferencias en la composición taxonómica y el potencial funcional variaron entre estudios, pero *Akkermansia* fue consistentemente más abundante con el envejecimiento, mientras que *Faecalibacterium*, *Bacteroidaceae* y *Lachnospiraceae* fueron reducidos [238]. La mediana de edad de diagnóstico de nuestra cohorte ha sido de 47 años (rango de 35 a 54 años). Esta edad de diagnóstico concuerda con la observada en el estudio epidemiológico multicéntrico español EpidemIBD [239] que fue de 45 años (rango 33-56 años) y también es semejante a la observada en la cohorte europea que fue de 39 años (rango 15-90 años) [240]. Es importante destacar que la EII es una enfermedad heterogénea y la edad de diagnóstico puede variar ampliamente, sobre todo en colitis donde se ha descrito un segundo pico de edad alrededor de los 60 años. Además, algunos pacientes pueden experimentar un retraso en el diagnóstico debido a la naturaleza insidiosa de los síntomas o la falta de conciencia sobre la EII. Se conoce que la composición de la microbiota intestinal varía con la edad, en algunos estudios la diversidad de especies de *Bacteroides* aumentó en las heces de los sujetos de edad avanzada mientras que las Bifidobacterias se redujeron [241], mientras que en otro estudio se sugirió que tanto el número de *Bacteroides* como la diversidad de especies disminuían con la edad [242].

En nuestro estudio no encontramos asociación entre la presencia del genotipo C4 y la edad del diagnóstico de la CU. Hemos analizado la asociación del genotipo C4 con la edad porque se ha confirmado que en general al diagnóstico, los pacientes jóvenes presentan un curso más agresivo de la enfermedad que los diagnosticadas a edades más avanzadas con mayor afectación endoscópica y afectación más grave anátomo-patológica [243]. También la edad específicamente en pacientes con EII ha demostrado ser un posible factor confusor sobre la modulación en abundancia y diversidad de los taxones del microbioma intestinal mediante el análisis de gen ARNr 16S extraído en muestras de pacientes con CU [244]. En el estudio de Fite *et al* mediante PCR en tiempo real en biopsias de pacientes con CU de diferentes edades

observaron que algunas especies como *Eubacterium rectale* y *Clostridium clostridioforme* presentaban una elevada dependencia de la edad, mientras que la prevalencia de otros, como las Enterobacterias y los *Desulfovibrios*, se veía menos afectada por este factor [245]. En nuestra cohorte en biopsias tampoco se identificaron diferencias en los genotipos encontrados al separarlos por grupos de edad.

Se ha visto en varios estudios en ratones que las diferencias de la microbiota intestinal atribuidas al sexo no aparecen hasta después de la pubertad lo que respalda el papel de los factores hormonales y otros factores del hospedador relacionados con la madurez sexual en la configuración del microbioma intestinal. En investigaciones en ratones se ha visto que la abundancia de Bacteroidetes es menor en las hembras [246]. Además de las relaciones entre hormonas y el microbioma, también el sexo puede influir en la composición de la microbiota intestinal mediante diferencias en el tiempo de tránsito intestinal dado que tiende a ser más prolongado en mujeres que en hombres [247]

En población general un estudio realizado por la plataforma Roche 454 de NGS (Next Generation Sequencing) para el análisis del patrón global de la comunidad bacteriana mostró que las mujeres se caracterizaban por una menor abundancia de Bacteroidetes [248]. Sin embargo, en otros estudios realizados en niveles inferiores al de filum se observaron diferencias específicas de género en el grupo *Bacteroides-Prevotella* con niveles más altos en los hombres que en las mujeres y ausencia de diferencias relacionadas con el género para las dos sondas específicas de especie dirigidas a *Bacteroides vulgatus* y *Bacteroides putredinis* [249].

Con respecto a nuestro estudio de casos controles sí que se observaron diferencias significativas en cuanto a la presencia del genotipo C4 en pacientes dado que un 89% de los hombres al diagnóstico presentaron C4 en la muestra de heces frente a un 25% de las mujeres ($p=0,015$).

Los datos en modelos animales de EII de variación de microbiota intestinal relacionados con el género son escasos, en el estudio de Kozik *et al* utilizando la secuenciación Illumina de los genes ARNr 16S encontró diferencias entre la microbiota fecal de los ratones macho y hembra y observaron además que los ratones macho tuvieron una colitis más grave que los ratones hembra [250]. Sin embargo, en otro estudio del mismo grupo en ratones a los que le indujeron colitis mediante TNBS observaron que el microbioma de la mucosa colónica estaba correlacionado con la gravedad de la enfermedad pero no observaron diferencias significativas asociadas con el sexo [251].

Otro posible factor que hemos tenido en cuenta a la hora de identificar una posible asociación con los genotipos encontrados fue el tabaco. Los efectos del tabaco sobre la microbiota intestinal podrían estar vinculados a cambios en el equilibrio inmunológico, la formación de biofilms, la tensión de oxígeno o a través del contacto directo con los microorganismos que contiene [252]. La teoría más simple sería que el propio cigarrillo es causa directa de la exposición de bacterias o debido a las diferencias nutricionales entre fumadores y no fumadores [253]. Otras teorías postulan que la disbiosis inducida por el hábito tabáquico está relacionada con modificaciones en el sistema inmune intestinal al reducir las vías inflamatorias al disminuir la fosforilación de FNkB-P65, un mediador clave en la vía inflamatoria de FNkB [254]. También se ha visto que fumar altera los niveles de citocinas como CXCL2, IL-6, INF- γ y TGF- β [255] y también que genera especies reactivas de oxígeno que se liberan al torrente sanguíneo dando lugar a un estrés oxidativo celular [256]. En un estudio de base poblacional que incluyó 758 individuos sanos en el análisis de la composición bacteriana, los fumadores activos presentaron una mayor proporción de Bacteroidetes y una disminución del porcentaje de Firmicutes y Proteobacteria en comparación con los no fumadores, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los ex fumadores y los no fumadores [257]. Estos resultados concuerdan con los de Benjamin *et al* donde se vio que individuos sanos fumadores presentaban un porcentaje más alto de *Bacteroides-Prevotella* (34,8%) en contraste con los no fumadores (24,1%) [258]. Dos estudios prospectivos controlados en individuos sanos, demostraron la existencia de una alteración del microbioma intestinal tras dejar de fumar, basándose en la secuencia del ARNr 16S, el análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal y la hibridación in situ con fluorescencia. Después de 8 semanas tras el abandono del hábito tabáquico, se encontraron Firmicutes y Actinobacterias en mayor cantidad, mientras que Bacteroidetes (*Prevotella* y *Bacteroides* spp.) y Proteobacterias (subgrupos β y γ) disminuyeron en un 50%. Los grupos control de no fumadores y los fumadores activos no presentaron alteraciones significativas del microbioma durante todo el periodo de investigación [259][260].

En cuanto a la EII, el tabaco ha demostrado ser un factor protector en la CU con menor probabilidad de desarrollo de la misma así como menor necesidad de uso de tratamientos y tasas de colectomía en aquellos fumadores que la desarrollaban [261]. Los mecanismos mediante los cuales el tabaco presenta este efecto sobre la CU son desconocidos, pero se postula

que la regulación sobre la microbiota intestinal y su influencia en el sistema inmune pueden ser el origen de esta relación. En un modelo de colitis en ratones expuestos a sulfato de dextrano sódico y tabaco se realizó un análisis comparativo exhaustivo e integrado del transcriptoma del colon y el microbioma. El análisis reveló que el tabaco inhibió vías específicas dependiendo de la concentración, afectando tanto el estado inflamatorio como a la composición del microbioma intestinal. El análisis metagenómico demostró que el tabaco puede modular la disbiosis en géneros bacterianos específicos, contribuyendo a resolver la inflamación o acelerar la recuperación [262]. En pacientes con EC mediante hibridación in situ con fluorescencia se observó que los fumadores tenían mayores proporciones de Bifidobacterias, *Bacteroides-Prevotella* y menos *F. prausnitzii* en comparación con los no fumadores [258] pero en CU no hemos encontrado estudios sobre la variación de microbiota intestinal en función del hábito tabáquico en humanos.

En nuestro estudio en biopsias el 54% de los pacientes nunca habían fumado frente al 21% que seguían fumando y el 25% que eran exfumadores. Al dividir los pacientes según el tipo de EII, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el hábito tabáquico, con un mayor porcentaje de fumadores activos en los pacientes con EC en comparación con la CU (35% vs. 8%). Sin embargo, en relación con la presencia del genotipo C4 y el hábito tabáquico, no se demostró una asociación significativa una vez que se estratificaron las variables por la presencia o ausencia de actividad. Esto sugiere que, aunque hay diferencias en el hábito tabáquico entre los tipos de EII, esta variación no parece correlacionarse directamente con la presencia del genotipo C4 en función de la actividad de la enfermedad.

En la cohorte de pacientes con debut de CU se observó que al diagnóstico un 41% de los pacientes presentaban afectación pancolónica, un 24% afectación del colon izquierdo y un 35% afectación exclusiva del recto. La distribución presentada es similar a la observada en el estudio epidemiológico multicéntrico español EpidemIBD [239] con un 31% de los casos con presentación pancolónica, un 31% colitis izquierda y un 38% proctitis y a la observada en la cohorte europea 37% pancolitis, 37% afectación izquierda y 26% afectación rectal [240].

En el estudio de Cardoneanu *et al* [221] se observó una correlación significativa entre la extensión de la CU y la presencia de *Bacteroides*, encontrándose concentraciones mayores en aquellos pacientes que presentaban una CU izquierda que en aquellos con proctitis. También la extensión de la CU demostró modular diferencialmente la abundancia de las

Bifidobacteriaceae, *Rikenellaceae*, *Christensenellaceae*, *Marinifilaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Lactobacillaceae* *Streptococcaceae* y *Peptostreptococcaceae* [244].

Al contrario que en la CU, la localización de la EC suele permanecer estable a lo largo del tiempo tras el diagnóstico. Hoy en día es punto de debate que las afectaciones colónicas e ileales puedan ser consideradas como enfermedades separadas por asociaciones epidemiológicas diferentes consistentes en la mayoría de los estudios. Esto lleva a pensar que tienen una historia natural diferente y la tendencia actual es a encauzar la investigación hacia la comprensión de la patogénesis de ambas localizaciones [263]. Tanto el riesgo de progresión como de complicaciones en ambas localizaciones es diferente. En un estudio poblacional se observó que los pacientes con EC con extensión ileal aislada presentaban 7 veces mayor riesgo de cambio de patrón de la enfermedad y 9 veces más riesgo de desarrollar complicaciones a lo largo de la vida que aquellos con afectación colónica exclusivamente [264]. Por ello existen varios estudios que intentan relacionar la extensión de la EC con diferentes variaciones de la microbiota intestinal. En el estudio de Naftali *et al*, se extrajo ADN de biopsias de 31 pacientes con EC ileal, ileocólica o limitada al colon y se analizó el gen 16S rRNA mediante pirosecuenciación. Además de una mayor disbiosis en los pacientes con enfermedad ileal frente a los pacientes con afectación colónica, se observó una diferenciación muy significativa entre la composición bacteriana de la EC ileal en comparación con la EC colónica. En este caso esta diferenciación no se vio afectada por la localización de la biopsia o el estado inflamatorio (remisión o brote). *Faecalibacterium* se encontró en bajas concentraciones en la EC ileal al compararla con la EC con afectación colónica, mientras que *Enterobacteriaceae* fue más abundante en la localización ileal. La abundancia relativa de *Fusobacterium* sí que se asoció de manera significativa con la actividad de la enfermedad en los pacientes con EC con afectación ileal, pero no en la EC con afectación colónica. Otro de los hallazgos en este estudio fue que las muestras de pacientes con EC ileal eran más ricas en *Escherichia*, mientras que la EC con afectación colónica presentaba niveles más elevados de 2 géneros no identificados de *Clostridiales* y *Ruminococceae* [265]. Estos resultados también coincidían con los datos obtenidos en otros estudios en EC en los que el mayor grado de disbiosis se correlacionó positivamente con la extensión de la enfermedad y la actividad de la misma [188][221]. Existen varios estudios que evalúan la disbiosis tanto en EC como en CU teniendo en cuenta las diferentes localizaciones. En el estudio de Shin *et al*, las muestras fecales fueron amplificadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa y secuenciadas utilizando Illumina MiSeq realizando un análisis bioinformático para establecer

las relaciones entre las bacterias fecales y los fenotipos de la EII. Se observaron diferencias significativas en las composiciones de las comunidades bacterianas entre pacientes con proctitis y aquellos con colitis izquierda o extensa sin embargo en pacientes con EC no se detectaron diferencias significativas ni en la diversidad alfa ni en la composición de la comunidad en relación con la extensión de la enfermedad [266]. Sin embargo, en un estudio en población pediátrica que incluyó 80 pacientes con EC y 27 con CU el estudio de la microbiota mediante ARNr 16S utilizando la tecnología GA-Map identificó una mayor presencia de *Ruminococcus gnavus* ($p=0.02$) en la afectación ileocólica en la EC y la afectación pancolónica en CU en comparación con los pacientes con EC colónica o CU izquierda. También en aquellos pacientes con EC con afectación alta se observó una mayor abundancia de *Veillonella* ($p<0.01$) [267]. Nuestros resultados en biopsias en pacientes con EII ya establecida muestran una correlación moderada en cuanto al porcentaje de genotipo C4 y la extensión de la CU sin encontrarse correlación entre este genotipo y la localización de la EC. En la segunda cohorte del estudio no hubo una correlación significativa entre la extensión de la enfermedad y el porcentaje de genotipo C4 en las muestras analizadas. Esta correlación moderada en CU indica que a medida que la enfermedad es más extensa la proporción de genotipo C4 aumenta paralelamente. Sin embargo, en el caso de la EC, los resultados sugieren que el genotipo C4 no está directamente correlacionado con la localización o el patrón de la enfermedad. Es importante tener en cuenta que la correlación no implica causalidad y que otros factores pueden estar influyendo en estos resultados. Además, la ausencia de correlación en la EC podría indicar una mayor heterogeneidad en esta enfermedad en comparación con la CU. De todas formas, se necesitarían más investigaciones para comprender la relación entre la extensión, la localización y el patrón de la enfermedad con el genotipo C4 en ambos casos. En nuestro estudio el número de pacientes con EC puramente colónica fue muy bajo, por lo que es difícil poder realizar asociaciones en cuanto a la localización

En varios estudios se ha sugerido una relación entre la gravedad de las lesiones endoscópicas encontradas y la composición de la microbiota intestinal en pacientes con EII. Se ha visto en modelos animales un aumento significativo de *Fusobacteria* demostrando su habilidad para adherirse e invadir células epiteliales colónicas observándose una correlación positiva entre esta bacteria y la gravedad de la afectación inflamatoria sugiriendo así el papel de *Fusobacterium spp.* en impulsar la progresión de la EII [268]. En las biopsias de nuestros pacientes con CU ya

establecida, observamos una buena correlación ($r = 0,70$) entre la existencia de un mayor porcentaje de C4 y una mayor puntuación en el índice endoscópico Mayo. En la cohorte de pacientes con reciente diagnóstico no se observó esta correlación significativa, pero si se observó que existe un mayor porcentaje de pacientes con C4 entre los que presentaron un índice endoscópico Mayo 3 (80%) vs un Mayo 2 (50%). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Fite *et al.* En su estudio demostraron que la microbiota no sólo es variable entre las personas con CU e inflamación activa e inactiva, sino que parece haber una variación longitudinal en las poblaciones bacterianas asociadas a la gravedad de la enfermedad. En este estudio el sistema de clasificación endoscópico incluía un sumatorio de friabilidad, hemorragia, patrón vascular y aspecto general, sin embargo, en el nuestro hemos utilizado el índice endoscópico de Mayo, que es el recomendado por las guías ECCO y el consenso STRIDE, lo que le da una mayor robustez a nuestros hallazgos endoscópicos a la hora de establecer posibles correlaciones con la clínica. Las densidades mucosas de enterobacterias, desulfovibrios, *Bacteroides* y *E. faecalis* se correlacionaron positivamente con mayor puntuación en el índice endoscópico, mientras que se observó una asociación negativa de *C. butyricum*, *R. albus* y *E. rectale* con estos parámetros [245]. En otro estudio reciente, comparando datos metagenómicos y metaproteómicos, se identificaron muestras de pacientes con CU con sobreproducción o infraproducción de proteasas de *B. vulgatus* y *P. dorei*. Se observó que los pacientes con aumento de proteasas tenían una gravedad clínica y una actividad endoscópica significativamente mayores en comparación con el grupo con disminución de proteasas. Estos análisis refuerzan la importancia no sólo de la presencia de estos microorganismos sino la importancia de la proteólisis en los pacientes con CU y su asociación con la presencia de una mayor gravedad de las lesiones encontradas [226]. También existen estudios contradictorios en cuanto a la asociación de densidad de las diferentes especies y la gravedad de la enfermedad como es el caso del estudio de Fujita *et al* en el que se incluían pacientes con CU y EC. En este estudio, las tasas de detección de *B vulgatus* y *E coli* en pacientes con actividad inflamatoria se mantuvo estable independientemente de la gravedad de las lesiones en ambas enfermedades [269]. El estudio de Shin *et al*, se identificaron *Lactobacillus salivarius* y *Clostridioides difficile* como posibles biomarcadores de la presencia de una CU moderada-grave en comparación con la colitis leve. Además, *Lactobacillus lactis*, *Intestinibacter bartlettii*, *C. difficile*, *Weissella confusa*, *Anaerostipes hadrus*, *Clostridium spiroforme*, *Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus plantarum*, se

identificaron como posibles biomarcadores para la CU moderada-grave en comparación con la colitis en remisión [266].

Estos estudios previos evaluaban la gravedad de la EII según datos endoscópicos, pero existen también investigaciones donde la gravedad es evaluada mediante índices clínicos. En el estudio de Naftali *et al*, se utilizó el índice clínico CDAI. Cuando se investigó la cohorte con afectación colónica, no se identificó correlación entre la composición bacteriana y la puntuación del CDAI $r = -0,030$, $p = 0,88$ mientras que el estudio de la cohorte con afectación ileal mostró una correlación positiva moderada con el CDAI ($r = 0,43$). Cuando se evaluó la correlación con las diferentes géneros, en el grupo de pacientes con afectación ileal se encontró una correlación positiva fuerte y significativa entre *Fusobacterium* y CDAI ($r = 0,59$) sin embargo en la cohorte colónica no se encontraron correlaciones significativas con ningún género [265].

En el caso de la EII, los biomarcadores analíticos pueden ser útiles para ayudar en el diagnóstico, la monitorización del curso de la enfermedad, la predicción del pronóstico y la evaluación de la respuesta al tratamiento. En nuestro estudio hemos incluido la CF, la proteína C reactiva y la VSG y hemos estudiado su asociación con los diferentes genotipos encontrados. En la cohorte de pacientes con debut de CU encontramos que la mediana de CF en pacientes sin presencia de C4 fue de 566 (RIQ 350-1722), comparada con una mediana de 566 (RIQ 192-1398) en aquellos con presencia de C4. ($p=0,85$). Estos hallazgos sugieren que la presencia de C4 no está vinculada a niveles más altos de CF en esta muestra específica. Sin embargo, si se han encontrado asociaciones significativas entre la CF y la diversidad en la microbiota intestinal sin hacer referencia a una especie específica. En el estudio de Kowalska-Duplaga *et al.*, realizado sobre población pediátrica con 64 pacientes con EC sin tratamientos previos y 18 controles sanos se identificaron disparidades tanto en las diversidades alfa como beta en relación con los valores de CF. Los pacientes con $CF < 100 \mu\text{g/g}$ presentaron una mayor riqueza y diversidad en la microbiota intestinal en comparación con aquellos que presentaban niveles de CF entre $100 \mu\text{g/g}$ y $1800 \mu\text{g/g}$ y niveles $>1800 \mu\text{g/g}$. Con otros parámetros bioquímicos como la proteína C reactiva, hierro sérico y niveles de albúmina no se encontraron asociaciones [270].

La ventaja de la determinación de biomarcadores en heces como la CF es que es más específica dado que no se eleva en procesos extradigestivos si bien es cierto que pueden elevarse con la toma de antiinflamatorios u otras entidades como neoplasias o infecciones entéricas. La

proteína C reactiva se puede ver alterada en cualquier proceso inflamatorio de cualquier origen incluyendo manifestaciones extraintestinales de la EII mientras que la VSG presenta una menor sensibilidad y especificidad que la proteína C reactiva por lo que su uso suele ser más limitado en la práctica clínica diaria [271].

El uso de la CF está ampliamente extendido para discriminar entre la EII y otros trastornos funcionales. En este contexto clínico, el umbral más comúnmente aceptado para la CF es de 50 µg/g. En una revisión sistemática reciente que incluyó 17 estudios con un total de 1956 pacientes la sensibilidad obtenida con este punto de corte de 50 µg/g fue del 85,8% (IC del 95%: 78,3-91), y la especificidad del 91,7% (IC del 95%: 84,5-95,7) [272]. Aunque la CF es una herramienta útil, no es específica para la EII y puede verse elevada en otras condiciones inflamatorias. Por lo tanto, se utiliza formando parte de una evaluación integral junto con la historia clínica y exploraciones complementarias. El punto de corte establecido a partir del cual está recomendado realizar una ileocolonoscopia ante la sospecha de EII se sitúa entre 100 y 150µg/g sobre todo si esta elevación permanece en dos determinaciones separadas [273]. En nuestra cohorte de pacientes de debut de CU observamos que el 100% presentaban elevación de CF por encima de 150µg/g. La mediana de CF al diagnóstico fue 708µg/g (380-1547) lo que ya permitiría establecer la sospecha de la existencia de una EII previamente a la realización de la colonoscopia. Pero no sólo es útil la CF en el diagnóstico, sino que la monitorización regular de la misma puede ayudar a evaluar la eficacia del tratamiento y a realizar la predicción de un brote de la enfermedad. Una disminución en los niveles de CF después del tratamiento sugiere una buena respuesta, mientras que niveles persistentemente altos indican en la mayoría de los casos la necesidad de ajuste de tratamiento.

El metaanálisis realizado por Mosli *et al*, que incluyó 19 estudios con un total de 2499 pacientes, confirmó que la CF y la proteína C reactiva son marcadores predictores de actividad endoscópica en pacientes con EII [274]. Se observó que la CF presentó cifras de sensibilidad y especificidad globalmente superiores a la proteína C reactiva, alcanzando un rango de 80-90% y 70-80%, respectivamente, en función del punto de corte utilizado [273]. En el estudio de Ferreiro-Iglesias *et al*, se evaluó prospectivamente durante 16 meses la evolución de 95 pacientes con EII en remisión con mediciones de CF cada 4 meses. La concentración de CF fue significativamente mayor en los pacientes que presentaron recaída a lo largo del seguimiento (477 µg/g) que aquellos que mantuvieron la remisión (65 µg/g) ($p<0,005$) [275]. Estos resultados concuerdan con nuestro estudio dado que en la cohorte de pacientes con EII ya

diagnosticada, los pacientes con EII activa presentaban niveles más altos que los inactivos con una mediana de 286 mg/kg (RIQ 30-490) frente a 30 mg/kg (RIQ 30-101) ($p=0,04$) respectivamente.

Con respecto a la proteína C reactiva, los pacientes con actividad endoscópica presentaron una mediana de 1,72 mg/dl (RIQ 0,67-2,8) frente a 0,31 mg/dl (RIQ 0,15-0,67) ($p=0,002$) en los que estaban inactivos. Se ha estudiado la asociación entre la proteína C reactiva y los diferentes índices clínicos de actividad en la EC con resultados modestos. En un estudio con 150 pacientes con EC se observó que niveles superiores a 0,4 mg/dL tenían un VPP del 45.5% para un CDAI >220 [276]. Sin embargo, la correlación entre la proteína C reactiva y la actividad endoscópica de la enfermedad suele ser más consistente. En el estudio de Jones *et al.* la elevación de proteína C reactiva fue capaz de predecir la existencia de un SESCD >7 con un área bajo la curva de 0.787 [277] sin embargo en otros estudios no se ha podido lograr discriminar entre actividad endoscópica y remisión mediante proteína C reactiva [278][279]. Estas diferencias de resultados pueden estar en relación a la falta de homogeneidad en cuanto a las definiciones de remisión/actividad, así como a la variabilidad interobservador a la hora de evaluar las imágenes endoscópicas. En CU los resultados son similares; En un metaanálisis de Mosli *et al.*, la proteína C reactiva presentó una sensibilidad de 0,49 y una especificidad de 0,92 para el diagnóstico de actividad endoscópica [274]. En cuanto a la capacidad de predicción de curación mucosa en CU, la proteína C reactiva también demostró resultados modestos en este sentido encontrándose unas sensibilidades y especificidades medias del 66% y el 82% respectivamente [280]. En nuestra cohorte de pacientes con debut de CU, los niveles de proteína C reactiva medios fueron de 0,22 mg/dl (0,12-0,72) situándose dentro de la normalidad. Cabe destacar que sólo el 23,5% de los pacientes con debut de CU elevó proteína C reactiva por encima de 0,5 mg/dl frente a la elevación de CF que tuvo lugar en el 100% de estos pacientes. Estas diferencias, de acuerdo con los estudios previamente descritos, hacen pensar que la CF se trata de un mejor biomarcador a la hora de discriminar entre trastornos digestivos funcionales y la presencia de una EII.

En nuestro estudio en pacientes con CU de debut no se observó relación entre la gravedad endoscópica medida por el índice Mayo y los niveles de CF. La mediana de CF en los pacientes con Mayo endoscópico = 2 fue de 578 (RIQ 407,5-1560) mientras que la mediana de CF en los pacientes con Mayo endoscópico = 3 fue de 411 (RIQ 151-1078) $p=0,85$. Estos niveles son muy similares a los que presentaron los pacientes con CU en nuestro primer estudio con pacientes con EII ya establecida. La mediana de CF en pacientes con Mayo endoscópico = 0 fue de 30

mg/kg (RIQ 30-41), mientras que en aquellos que presentaban un Mayo 2 o 3 endoscópico la mediana fue 460 mg/kg (RIQ 280 – 490) y 814 (RIQ 400-1228) ($p=0,18$). En varias publicaciones previas se ha estudiado la correlación entre el nivel de CF y su valor en la predicción de gravedad de actividad endoscópica y de gravedad global en la evolución de la EII. En cuanto a la correlación con la actividad endoscópica los coeficientes de correlación en pacientes con CU oscilan entre 0,51 y 0,83. En un estudio prospectivo que incluyó 102 pacientes con CU se observó buena correlación entre los niveles de CF y la gravedad de la actividad endoscópica $r = 0,86$, $p < 0,001$. Los niveles medios de CF fueron de 35,2 mcg/g, 103,3 mcg/g, 295,0 mcg/g y 751,9 mcg/g y mostraron una buena correlación con una puntuación del índice Mayo de 0, 1, 2 y 3, respectivamente ($p < 0,01$) [281]. En el estudio de Schoepfer *et al* se observó una buena correlación entre la actividad endoscópica de la CU y la CF ($r = 0,834$). En este estudio el índice endoscópico utilizado fue el “Rachmilewitz Activity Index” con un rango que va de 0 a 12 puntos según va aumentando la gravedad de los hallazgos endoscópicos. Los niveles de CF fueron significativamente más bajos en los pacientes con CU con enfermedad inactiva (puntuación endoscópica 0-3, CF $42 \pm 38 \mu\text{g/g}$), en comparación con los pacientes con enfermedad leve (puntuación 4-6, CF $210 \pm 121 \mu\text{g/g}$, $p < 0,001$), moderada (puntuación 7-9, CF $392 \pm 246 \mu\text{g/g}$, $p = 0,002$) y grave (puntuación 10-12, CF $730 \pm 291 \mu\text{g/g}$, $p < 0,001$) [282]. Schoepfer *et al.* también publicaron otro estudio relacionando la actividad endoscópica y los niveles de CF, pero esta vez en pacientes con EC usando el índice endoscópico SES-CD. En su cohorte de 122 pacientes con EC observaron una estrecha relación entre las concentraciones de CF y la puntuación SES-CD. Se observó que la CF era capaz de discriminar de manera significativa entre curación mucosa y enfermedad leve (104 ± 138 frente a $231 \pm 244 \mu\text{g/g}$, $P < 0,001$), así como entre enfermedad leve y moderada (231 ± 244 frente a $395 \pm 256 \mu\text{g/g}$, $P = 0,008$) y entre enfermedad moderada y grave (395 ± 256 frente a $718 \pm 320 \mu\text{g/g}$, $P < 0,001$) [278]. En nuestro estudio que incluyó pacientes con EII ya diagnosticada los resultados van en consonancia con el estudio previo descrito; la mediana de CF fue de 30 mg/kg (RIQ 5-30) en pacientes con enfermedad quiescente o leve definida como un SES-CD ≤ 6 y de 178 mg/kg (RIQ 30-1043) en aquellos que presentaban un SES-CD > 6 ($p = 0,043$) permitiendo discriminar entre pacientes con enfermedad quiescente/leve y moderada/grave.

En nuestra cohorte de pacientes con debut de CU no se observaron diferencias significativas en cuanto a los niveles de CF y necesidad de escalada de tratamiento a inmunosupresor o biológico durante el primer año. La mediana de CF al diagnóstico en los pacientes que continuaron con

mesalazina a lo largo del primer año fue de 578 (rango 271-1560) mientras que la mediana de CF en los que necesitaron escalada de tratamiento fue de 542 (411-847) ($p = 0,84$). En cuanto este uso de la CF como marcador pronóstico el escenario más evaluado ha sido el brote grave de CU y no el brote leve-moderado. En el estudio de Sasidharan *et al.*, que abarcó a pacientes hospitalizados con un brote grave de CU, aquellos que requirieron tratamiento de rescate (infliximab, ciclosporina o tofacitinib) mostraron niveles significativamente más altos de CF en comparación con los que no lo necesitaron (con una media de 1748 mcg/g frente a 1353 mcg/g, $p = 0,02$). Además, la presencia de una CF superior a 800 mcg/g se identificó como un predictor independiente de la necesidad de tratamiento médico de rescate hospitalario (OR 2,61; IC95%, 1,12-6,12) [283]. También en este escenario Ho *et al.* evaluaron la capacidad de discriminación de la CF en 90 pacientes hospitalizados en cuanto a prever la respuesta a los esteroides intravenosos, la necesidad de inicio de tratamiento con infliximab y la colectomía. Se observaron niveles más elevados de CF en los pacientes que requirieron una colectomía (1.200 mcg/g frente a 887 mcg/g; $P = 0,04$) [284]. De manera similar, Beswick *et al.* llevaron a cabo un estudio prospectivo con la participación de 24 pacientes con ASUC refractaria a esteroides que fueron tratados con infliximab. De estos, el 50% logró la remisión a los 3 meses, mientras que el 25% se sometió a colectomía. La CF demostró predecir la remisión clínica con una sensibilidad del 100% y la futura necesidad de colectomía con una sensibilidad del 89%. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio de Jain *et al.*, en el que el 43% de los pacientes con CU grave experimentaron fallo a los corticosteroides IV y el 31% se sometieron a colectomía. Se observaron niveles significativamente más elevados de CF en aquellos pacientes con ausencia de respuesta a corticoides IV (2522 [RIQ 590-9654] $\mu\text{g/g}$) en comparación con aquellos que respondieron adecuadamente (1530 [RIQ 352-10278] $\mu\text{g/g}$) ($p = 0,04$). También en este estudio se observó que niveles de CF $>1000 \mu\text{g/g}$ al tercer día del ingreso demostraron ser factores predictores independientes del fracaso en la respuesta a los esteroides y de la necesidad de tratamiento biológico de rescate o colectomía [285].

En resumen, los niveles de CF pueden ser de utilidad como predictor no invasivo del pronóstico en pacientes que presentan brote grave de CU pudiendo facilitar intervenciones terapéuticas precoces, lo que podría traducirse en una mejora en los resultados clínicos pero los resultados de los estudios previos debemos de tomarlos con cautela dado que presentan todos ellos un pequeño tamaño muestral, posible limitación en cuanto a validez externa (infliximab como

opción de rescate pero en práctica clínica pacientes ingresados con fracasos previos a biológicos) y corta duración del seguimiento.

La elevación persistente de la CF se asocia con la necesidad de realizar cambios en el tratamiento biológico en pacientes con EII. Esta asociación sugiere que niveles persistentemente altos de CF son un indicador clave de la falta de respuesta al tratamiento actual y, por lo tanto, se debe de considerar la posibilidad de un cambio en el tratamiento. [286]. En los últimos años existe una búsqueda incesante de estos marcadores no invasivos dado que sirven de herramienta a la hora de guiar las decisiones clínicas permitiendo la identificación temprana de la falta de respuesta a un tratamiento mediante la monitorización regular mejorando los resultados clínicos y la calidad de vida de los pacientes con EII. Existen varios estudios en los que los marcadores microbianos han sido utilizados para evaluar la actividad de la EII, así como la efectividad de las intervenciones terapéuticas emergiendo como una vía prometedora para su implementación en el ámbito clínico. En nuestro estudio 1 en pacientes con EII ya diagnosticada, al año de la colonoscopia un 57,7% de los pacientes continuaban con el mismo tratamiento, 9 pacientes (17,3%) habían intensificado la dosis del biológico que previamente tenían pautado y 13 (25%) habían escalado el tratamiento. Teniendo en cuenta los cambios de tratamiento requeridos, la presencia del genotipo C4 se asoció de manera significativa a la necesidad de cambio de tratamiento al año ($p=0,0001$). En cuanto a la necesidad de esteroides en el primer año tras la colonoscopia, la presencia de C4 también se asoció significativamente a mayor necesidad de los mismos ($p=0,007$). La asociación significativa entre la presencia del genotipo C4 y la necesidad de cambios en el tratamiento al año en este estudio piloto indica que podría tratarse de un potencial biomarcador de actividad una vez comprobada la consistencia de estos hallazgos en futuros estudios. Sin duda este es uno de los grandes problemas que tenemos los clínicos a la hora de tratar los pacientes con EII, la falta de un marcador que nos prediga la evolución o el curso de la enfermedad, así como la necesidad de un tratamiento avanzado precoz. Por ello, nuestros hallazgos con la presencia del genotipo C4, pensamos que pueden suponer una potencial herramienta en esta área, permitiéndonos adelantar líneas con tratamientos, que suelen ser más eficaces en las enfermedades no tan evolucionadas.

Los datos multiómicos respaldan la influencia del microbioma en la EII permitiendo un mayor conocimiento en cuanto a la composición bacteriana y capacidad funcional de estas bacterias.

Este análisis se ha utilizado en la monitorización, diagnóstico o detección de complicaciones y se está investigando su aplicación para diseñar estrategias de tratamiento [287]. En la EII la detección de la reducción de bacterias específicas en heces demostró ser un indicador más eficaz que la disminución de las bacterias en la mucosa. Esto supone una ventaja a la hora de evitar exploraciones invasivas para la obtención de las muestras permitiendo a su vez una monitorización más estrecha. Se identificaron *Christensenellaceae_R-7* y *Ruminococcus* como biomarcadores, al mantener una presencia constante en las heces de individuos sanos (con una frecuencia superior al 71,4%) y sólo transitoria en las muestras fecales de pacientes con EC, registrando una frecuencia inferior al 5,5% [288]. Pero no sólo se evaluó su utilidad como biomarcadores en el diagnóstico, sino que se han realizado varios estudios que buscaron testar la capacidad predictiva de los cambios en la microbiota asociados con las recaídas de la EII. En el estudio de Rajca *et al* que incluyó 33 pacientes con EC a los que se le suspendió el tratamiento con infliximab se evaluó a los 2, 6 y 18 meses los perfiles taxonómicos poniéndolos en relación con el mantenimiento de la remisión o la reaparición de la actividad inflamatoria. Observaron tasas más bajas de Firmicutes en los pacientes con recidiva en comparación con los que no la presentaron y además los autores identificaron que niveles bajos de *F. prausnitzii* ($p = 0,014$) y *Bacteroides* ($p = 0,03$) fueron predictores de brote [289]. Estos resultados coinciden con los informados por Sokol *et al.*, en un estudio realizado en pacientes con EC sometidos a resección ileocecal evaluando la composición microbiana a los 6 meses de la cirugía. Se identificó una asociación entre los niveles bajos de *Faecalibacterium prausnitzii* con un mayor riesgo de recurrencia postquirúrgica en la EC ileal [161]. Se llevó a cabo otro estudio más reciente del mismo grupo en 201 pacientes con EC ileal intervenidos mediante secuenciación del ARNr 16s de la microbiota intestinal asociada a la mucosa. Fueron evaluados en el momento de la cirugía y al año de la misma. Comparando los pacientes con recurrencia postquirúrgica y sin ella, se observó un aumento de varios miembros del filo Proteobacteria y una disminución de varios miembros de *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* dentro del filo Firmicutes. También la abundancia de *Gammaproteobacteria*, *Corynebacterium* y *Ruminococcus gnavus* se asociaba significativamente con el riesgo de recurrencia endoscópica al año de la cirugía [290]. Fuera del escenario de la recurrencia posquirúrgica también se han publicado datos que concuerdan con los hallazgos descritos en población con EC postoperados. En un metaanálisis que incluyó 10 estudios con un total de 231 pacientes con EC y 392 con CU se observó que la presencia de *F. prausnitzii* era inferior en aquellos con EC y CU activa en comparación con aquellos en

estado de remisión por lo que sugieren que podría considerarse como un marcador de actividad inflamatoria y secundariamente de monitorización [291].

Se han publicado varios estudios que han explorado la relación entre la microbiota intestinal y la respuesta a fármacos biológicos en pacientes con EII.

En nuestro estudio 1, el 13,4% de los pacientes no tenían ningún tratamiento de mantenimiento pautado. El 36,5% estaban a tratamiento con mesalazina, el 13,5% tenían pautado azatioprina y el 36,5% recibían tratamiento biológico. Todos los biológicos usados en nuestros pacientes fueron de la familia de los anti-TNF. No observamos diferencias significativas en cuanto a la presencia de C4 y los diferentes tratamientos en el momento de realizar la colonoscopia una vez ajustado por presencia/ausencia de actividad endoscópica ($p=0,86$). En el estudio 2 sólo disponemos del análisis de la microbiota al diagnóstico por lo que tampoco podemos conocer el patrón de respuesta con los diferentes tratamientos empleados. En los últimos años, se ha observado un creciente interés en la investigación de la relación entre la microbiota intestinal y la respuesta a fármacos biológicos en pacientes con EII. Numerosos estudios han abordado esta conexión, buscando comprender cómo la composición y la diversidad de la microbiota pueden influir en la eficacia de los tratamientos biológicos. En varios de ellos han utilizado el análisis de secuenciación de genes para explorar la composición específica microbiana en pacientes que reciben Anti-TNF. Se ha encontrado que ciertos perfiles microbianos podrían estar asociados con una respuesta más efectiva a estos fármacos, mientras que otros podrían estar vinculados a una menor eficacia o a efectos secundarios. En un estudio prospectivo multicéntrico que incluyó 27 pacientes con EC se analizaron las modificaciones de la composición microbiana mediante la secuenciación del ARNr 16S al inicio del fármaco anti-TNF y a los 6 meses de tratamiento. Posterior al tratamiento anti-TNF, se observó un incremento del phylum Proteobacteria en los no respondedores en comparación con los respondedores (13/27) ($p < 0,005$), acompañado de un aumento en la clase Clostridia. Además, la diversidad alfa aumentó en los respondedores en comparación con los no respondedores ($p < 0,01$), indicando una tendencia hacia la eubiosis. También en este estudio se estableció una asociación significativa ($p < 0,001$) en la relación *F. prausnitzii*/*E. coli* entre respondedores y no respondedores. El cociente *F. prausnitzii*/*E. coli* demostró ser un buen marcador pronóstico para prever la respuesta al tratamiento anti-TNF, con un área bajo la curva de 0,87 [292]. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio de Zhou *et al.*, que incluyó 72 pacientes con EC y 51 con CU. En él se evidenció una

restauración en la diversidad de la microbiota intestinal y un incremento significativo en la presencia de Clostridiales en los pacientes con buena respuesta tras el inicio de infliximab en comparación a aquellos que no la presentaban. Concretamente ciertas especies pertenecientes a la clase Clostridiales, demostraron ser buenos predictores de la respuesta al anti TNF con una precisión del 86,5% cuando no se combinaba con otros biomarcadores y del 93,8% cuando se combinaron con los niveles de CF y el CDAI [293]. En el estudio de Kohlo *et al* se observó que los seis pacientes que respondieron al tratamiento con infliximab presentaban un aumento significativo en la diversidad alfa en comparación con los cinco pacientes que no respondieron ($p < 0.01$). Ya en semana 6 tras el inicio de tratamiento con infliximab se identificó una mayor similitud entre los respondedores y los controles sanos que entre los no respondedores y los controles sanos. En este estudio la abundancia de seis grupos de bacterias, incluidas las relacionadas con *Eubacterium rectale* y *Bifidobacterium spp.* predijo la respuesta a la medicación anti-TNF- α [294]. También Wang *et al* lograron demostrar un aumento en la diversidad alfa tras el inicio de tratamiento con infliximab en pacientes con EC, observándose diferencias estadísticamente significativas en las unidades taxonómicas ($p < 0.05$). Tanto la riqueza como la diversidad de post-infliximab era comparable a la del grupo de control, sugiriendo una reducción progresiva en la disimilitud entre los casos de EC y los controles sanos durante el tratamiento con IFX. Específicamente, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Planococcaceae* y *Streptococcaceae* disminuyeron durante el tratamiento con infliximab, mientras que las familias que eran significativamente menos abundantes previamente al inicio de infliximab experimentaron un aumento [295]. Lewis *et al* recogieron prospectivamente muestras fecales de 90 pacientes con EC de los cuales 52 iniciaron tratamiento con anti-TNF. Las muestras fueron recogidas antes del inicio del anti-TNF, a la semana 1, semana 4 y semana 8 desde el inicio del mismo. Se observaron tendencias similares a los hallazgos descritos previamente, los pacientes que respondieron al tratamiento con anti-TNF mostraron una diversidad cercana a los controles sanos después de recibir IFX, aunque estos resultados no alcanzaron significación estadística ($P = 0.06$)[296].

Con respecto a la evaluación de los cambios en la microbiota y la respuesta a otros biológicos no anti TNF se han publicado dos estudios. Uno en pacientes con EC que iniciaron ustekinumab y otro en pacientes con EC y CU a los que se les inició tratamiento con vedolizumab. En el estudio de Ananthakrishnan *et al* se incluyeron 85 pacientes (43 con CU y 42 con EC) la mayoría con fallo previo a tratamiento con anti TNF. Se observó que aquellos pacientes con EC

que lograban alcanzar la remisión en la semana 14 con vedolizumab presentaban basalmente una diversidad alfa (medida mediante la diversidad alfa de Fisher) superior en comparación con aquellos pacientes que no lograban la remisión. Estas diferencias significativas no se encontraron en la cohorte de pacientes con CU. A nivel especie, *Roseburia inulinivorans* y una variedad de *Burkholderiales* presentaron una disparidad con un aumento significativo en la abundancia relativa al inicio del estudio en los pacientes con EC que lograron la remisión en la semana 14 en comparación con aquellos que no la consiguieron ($q=0,09$ para *R. inulinivorans*, $q=0,06$ para *Burkholderiales sp.*). En términos de resultados a largo plazo, este estudio evidenció que los pacientes que lograban una respuesta en la semana 14 y la mantenían hasta el año también presentaban una persistencia en los cambios de la microbiota, en contraste con aquellos que perdían la respuesta al no mantener estables estos cambios. Estos resultados sugieren que las modificaciones tempranas en el microbioma podrían desempeñar un papel crucial como indicadores tanto de la respuesta a vedolizumab a corto como a largo plazo [297].

Dentro del ensayo clínico fase 2 CERTIFI en pacientes con EC que iniciaron ustekinumab se investigó la asociación entre la microbiota fecal y la respuesta terapéutica. Se analizaron las muestras fecales mediante la secuenciación del gen 16S rRNA a lo largo de 22 semanas. Se encontró basalmente mayor abundancia de *Faecalibacterium* ($p = 0,003$) y *Bacteroides* ($p = 0,022$) en aquellos pacientes que se encontraron en remisión a las 6 semanas del inicio del tratamiento en comparación con aquellos que continuaban con la enfermedad activa. También a lo largo de las 22 semanas la diversidad de la microbiota en los respondedores a ustekinumab fue aumentando en contraste con los que no habían respondido ($p=0,012$), la diversidad comunitaria de los pacientes en remisión 6 semanas después del inicio del fármaco fue 1,7 veces mayor en comparación con aquellos que presentaban actividad de la enfermedad ($p = 0,020$)[298]. Se ha publicado recientemente un metaanálisis que incluyó 19 estudios acerca de la relación entre los diferentes tratamientos empleados en la EII y la microbiota intestinal. Se encontró que aquellos pacientes que respondían a los distintos tratamientos (incluyendo la nutrición enteral exclusiva) presentaban un aumento en la diversidad alfa basal en comparación con aquellos que no respondieron. En particular se identificó un incremento en la presencia de *Faecalibacterium prausnitzii* después del tratamiento en pacientes que respondieron a aminosalicilatos, anti-TNF y ustekinumab. También en este análisis se observó que *Escherichia* se asociaba consistentemente con una respuesta farmacológica desfavorable [299]. Los resultados de estos estudios sugieren que la personalización de los tratamientos, teniendo en

cuenta la diversidad de la microbiota de cada paciente, podría ser una dirección prometedora en la optimización de la eficacia de los fármacos biológicos. Sin embargo, es importante destacar que el campo aún se encuentra en evolución, y se necesitan más investigaciones para comprender completamente la compleja interacción entre la microbiota intestinal y la respuesta a los tratamientos biológicos en pacientes con EII.

Hemos visto que la composición de la microbiota podría tener un papel en la EII como biomarcador para la evaluación de la actividad de la enfermedad y la predicción de la respuesta a los diferentes tratamientos biológicos, pero también podría tener una aplicación como biomarcador universal para el diagnóstico mediante la utilización de sondas de detección de una secuencia específica. Estas sondas estarían diseñadas para identificar secuencias genéticas particulares asociadas con perfiles microbianos característicos. La qPCR mediante sondas de detección específicas para Bacteroidetes se ha utilizado en una amplia variedad de aplicaciones, incluyendo estudios de microbioma, diagnóstico de enfermedades infecciosas, monitoreo ambiental y muchas otras áreas de investigación relacionadas con la microbiología y la biología molecular. Lo que sabemos sobre el impacto de la microbiota se limita sobre todo al nivel de filo, pero como hemos visto, existen determinantes bacterianos específicos, a nivel de especie o de cepa, que siguen estando poco explorados por lo que la realización de qPCR mediante sondas de detección específicas podría ser de utilidad. Se han establecido correlaciones entre determinadas bacterias y distintas enfermedades. Entre ellas la bacteria enterotoxigénica *Bacteroides fragilis*, que produce la toxina *B. fragilis* asociada al cáncer colorrectal [187] y la bacteria *Akkermansia muciniphila* correlacionada con trastornos metabólicos como la obesidad [300]. En EII también *Bacteroides fragilis* ha demostrado su presencia e interacción con este grupo de pacientes. En estudios en ratones *B. fragilis* provocó colitis persistente con infiltración de células inflamatorias, abscesos de criptas y ulceración [301]. En el año 2000, una cepa específica enterotoxigénica de *B. fragilis* mostró su vinculación con la presencia de actividad de la EII [302] y en otro estudio, el gen bft que codifica esta enterotoxina se detectó en el 51,4% de las biopsias intestinales de pacientes con CU y sólo en el 1,6% de los controles sanos[187]. Este enfoque de detección de bacterias específicas mediante sondas de detección proporcionaría una herramienta altamente específica y sensible para discernir las alteraciones microbianas que pueden estar implicadas en el desarrollo o la progresión de la EII. Al identificar tempranamente las alteraciones microbianas características, podríamos intervenir de manera más efectiva y

diseñar estrategias de tratamiento personalizadas desde las primeras etapas de la enfermedad conduciendo a un alivio más rápido de los síntomas, lo que supondría un impacto en la prevención de complicaciones a largo plazo asociadas con la EII.

A partir de la secuenciación del genotipo C4 creamos una sonda que permitió la cuantificación de C4 en la totalidad de las muestras obtenidas en la segunda parte de nuestro estudio. Los resultados obtenidos a partir de la cuantificación mediante qPCR de la concentración de C4 en heces proporcionan evidencia significativa de diferencias entre los controles y los casos con CU. La mediana de la concentración de C4 en heces de los controles fue de 0,37 fg, con un rango intercuartílico de 0,35 a 4,87. En comparación, los casos de CU mostraron una mediana significativamente más alta de 1218,13 fg (RIQ 190,12 - 4278,97) con un valor $p = 0,001$. La evaluación global de la exactitud de la prueba a través de una curva ROC reveló un área bajo la curva de 0,9412. Este alto valor de AUC sugiere una fuerte capacidad de discriminación entre resultados positivos y negativos. El punto de corte óptimo de 68 fg, maximizó el porcentaje total de clasificaciones correctas, mostrando una sensibilidad del 100%, indicando la habilidad de la prueba para identificar de manera efectiva a los verdaderos positivos (casos de CU). La especificidad, aunque ligeramente más baja, 82%, sigue siendo bastante robusta, indicando que la prueba también es capaz de evitar falsos positivos en gran medida. El valor predictivo negativo del 100% es particularmente destacado, ya que indica que, cuando la prueba muestra un resultado negativo, existe una alta probabilidad de que el paciente no tenga CU. En conjunto, estos resultados respaldan la utilidad de la prueba de qPCR para la detección de la concentración de C4 como un indicador potencial de CU con fuertes características discriminativas y un alto valor predictivo negativo que podría ser útil en la exclusión de la enfermedad en los pacientes evaluados. Es importante tener en cuenta que estos resultados son basados en un punto de corte específico (68 fg) y, por lo tanto, la interpretación puede depender en parte de la prevalencia de la enfermedad en la población evaluada. Además, consideraciones adicionales, como la especificidad y sensibilidad deseadas en un contexto clínico particular, deberían de tenerse en cuenta al aplicar estos resultados en la práctica clínica. En otros estudios se han empleado estas sondas de reconocimiento de secuencias genéticas de especies específicas tanto dentro como fuera del ámbito de la EII. El objetivo principal del estudio de Zamani *et al* fue diseñar cebadores y sondas específicas para la PCR cuantitativa en tiempo real basados en las secuencias de los genes 16S rRNA y bft de *Bacteroides fragilis* enterotoxigénico. Se analizaron biopsias colónicas de 35 pacientes con CU y 60 pacientes sin EII. Las secuencias del gen bft y

del gen 16S rRNA se obtuvieron de Genbank. Los cebadores y las sondas se diseñaron basándose en las secuencias de la región conservada de los genes y la especificidad de las secuencias de los cebadores y las sondas se determinó mediante la comparación de todas las secuencias disponibles, utilizando el programa de búsqueda en la base de datos BLAST. Los genes bft se detectaron en el 51,4% de las muestras de pacientes con CU y en el 1,6% de las muestras de controles sin EII, respectivamente [187]. También recientemente se ha publicado un estudio utilizando qPCR utilizando una sonda específica diseñada según las secuencias del gen 16S ARNr de *Veillonella spp* validándose en pacientes con EII. Se verificaron los resultados mediante métodos de aislamiento con buena correlación por lo que, los ensayos moleculares dirigidos al gen 16S ARNr, podrían ser una herramienta importante para el diagnóstico rápido de patologías en las que especies particulares estén implicadas [303]. En el estudio de Mondot *et al* en muestras fecales de 16 individuos sanos y 16 pacientes con EC se cuantificaron grupos bacterianos específicos mediante qPCR y sondas diseñadas específicamente para 9 especies. Se detectaron diferencias en los microbiomas fecales de individuos sanos y pacientes con EC. Las sondas específicas para *Ruminococcus bromii*, *Oscillibacter valericigenes*, *Bifidobacterium bifidum* y *Eubacterium rectale* produjeron señales de hibridación más fuertes que las muestras de ADN de sujetos sanos. Por el contrario, las especies sobreexpresadas en los pacientes con EC fueron *E. coli*, *Enterococcus faecium* y especies de Proteobacteria no encontradas normalmente en controles sanos. En consonancia con los estudios descritos previamente, estos autores sugieren que determinados componentes bacterianos intestinales pueden estar asociados con las EII y que ciertas especies bacterianas podrían servir como biomarcadores potenciales para estas enfermedades [304].

Es importante destacar que, aunque esta área de investigación muestra promesas significativas, todavía se requieren estudios adicionales para validar la efectividad y la fiabilidad de estas sondas de detección. Además, la implementación exitosa de estas tecnologías en entornos clínicos requerirá la colaboración entre investigadores, profesionales de la salud y la industria para garantizar su aplicación práctica y beneficio máximo en la atención a pacientes con EII.

La tesis se centra en la microbiota intestinal, que es un área de investigación crucial en la comprensión de la EII combinando métodos retrospectivos y prospectivos, proporcionando una visión más completa y coherente de los resultados. Se han empleado técnicas avanzadas de detección y cuantificación de especies bacterianas, como la secuenciación del genotipo C4 y la

qPCR, lo que permite una evaluación más precisa de las especies encontradas. La realización de un estudio experimental en ratones proporciona una validación adicional de los hallazgos observados en pacientes humanos, lo que fortalece la relación entre la presencia del genotipo C4 y la presencia de actividad inflamatoria. En cuanto a las limitaciones de la tesis, el tamaño de la muestra, especialmente en el estudio prospectivo, es relativamente pequeño, lo que podría limitar la generalización de los resultados. En el estudio 1 aunque se han incluido pacientes consecutivamente existe un posible sesgo de selección debido a la inclusión de pacientes en función de la práctica clínica habitual, lo que podría afectar la representatividad de la muestra. No se han abordado todos los posibles factores de confusión, como la dieta y el estilo de vida, que podrían influir en la composición de la microbiota intestinal y los resultados del estudio. Se necesitan estudios adicionales para confirmar los hallazgos y explorar más a fondo los mecanismos subyacentes que vinculan la presencia del genotipo C4 con la actividad de la enfermedad en la EII

7. CONCLUSIONES

- Se ha identificado dentro del filo Bacteroidetes un genotipo al que denominamos C4 con asociación significativa a la presencia de actividad inflamatoria en pacientes con EC y CU
- No existe correlación entre la detección del porcentaje del genotipo C4 y el sexo, edad o consumo de tabaco una vez estratificados los pacientes según la presencia de actividad inflamatoria
- La presencia del genotipo C4 no se ha visto influenciada por la extensión de la enfermedad ni en pacientes con CU ni en pacientes con EC
- Se observó una buena correlación entre el porcentaje de genotipo C4 y el índice endoscópico Mayo con una mayor concentración a medida que aumenta la gravedad de las lesiones endoscópicas visualizadas en pacientes con CU
- No se observó una buena correlación entre el porcentaje de genotipo C4 y el índice endoscópico SES-CD en pacientes con EC
- Mediante la creación de la sonda de reconocimiento del genotipo C4 en heces se observó un aumento significativo de los niveles de ADN de este genotipo en pacientes con CU frente a individuos sanos
- Estableciendo como de punto de corte 68 fg se obtiene una sensibilidad del 100%, una especificidad del 82%, un valor predictivo positivo del 85% y un valor predictivo negativo del 100% a la hora de detectar este genotipo mediante la sonda desarrollada.
- Las sondas de detección específicas de genotipos de Bacteroidetes podrían ofrecer un valioso recurso diagnóstico en EII permitiendo una identificación más precisa y temprana de las alteraciones microbianas asociadas.
- La creación de sondas de reconocimiento podrían ser útiles para monitorizar la respuesta al tratamiento en pacientes con EII permitiendo una evaluación más detallada de los cambios en la composición microbiana y su relación con la eficacia terapéutica
- Se necesitan más investigaciones para validar la utilidad clínica de estas sondas y establecer protocolos estandarizados para su implementación efectiva en el día a día de nuestra consult

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, Ardizzone S, Barreiro-de Acosta M, et al. Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. *J Crohn's Colitis* 2017;11:649–70.
- [2] Gomollón F, Dignass A, Annesse V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, et al. 3rd European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016: Part 1: Diagnosis and medical management. *J Crohn's Colitis* 2017;11:3–25
- [3] Baron JH. Inflammatory bowel disease up to 1932. *Mt Sinai J Med* 2000;67:174–89.
- [4] Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: A pathologic and clinical entity. *J Am Med Assoc* 1932;99:1323–9.
- [5] Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012;142.
- [6] Burisch J, Pedersen N, Čuković-Čavka S, Brinar M, Kaimakliotis I, Duricova D, et al. East-West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: The ECCO-EpiCom inception cohort. *Gut* 2014;63:588–97.
- [7] Chaparro M, Barreiro-de Acosta M, Benítez JM, Cabriada JL, Casanova MJ, Ceballos D, et al. EpidemIBD: rationale and design of a large-scale epidemiological study of inflammatory bowel disease in Spain. *Therap Adv Gastroenterol* 2019;12.
- [8] Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: Controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;55:749–53.
- [9] Cosnes J, Cattán S, Blain A, Beaugerie L, Carbonnel F, Parc R, et al. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8:244–50.
- [10] Beaugerie L, Seksik P, Nion-Larmurier I, Gendre J-P, Cosnes J. Predictors of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006;130:650–6.
- [11] Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott IDR, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005;19 Suppl A.
- [12] Kaplan GG, Ng SC. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2017;152:313–321.e2.

- [13] Huang H, Fang M, Jostins L, Umićević Mirkov M, Boucher G, Anderson CA, et al. Fine-mapping inflammatory bowel disease loci to single-variant resolution. *Nature* 2017;547:173–8.
- [14] Mirkov MU, Verstockt B, Cleynen I. Genetics of inflammatory bowel disease: beyond NOD2. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017;2:224–34.
- [15] Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012;491:119–24.
- [16] Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature* 2001;411:599–603.
- [17] Watanabe T, Kitani A, Murray PJJ, Wakatsuki Y, Fuss IJ, Strober W. Nucleotide Binding Oligomerization Domain 2 Deficiency Leads to Dysregulated TLR2 Signaling and Induction of Antigen-Specific Colitis. *Immunity* 2006;25:473–85.
- [18] Wang G, Van Driel BJ, Liao G, O’Keeffe MS, Halibozek PJ, Flipse J, et al. Migration of myeloid cells during inflammation is differentially regulated by the cell surface receptors Slamf1 and Slamf8. *PLoS One* 2015;10.
- [19] Withers DR, Hepworth MR, Wang X, Mackley EC, Halford EE, Dutton EE, et al. Transient inhibition of ROR- γ t therapeutically limits intestinal inflammation by reducing TH17 cells and preserving group 3 innate lymphoid cells. *Nat Med* 2016;22:319–23.
- [20] De Lange KM, Moutsianas L, Lee JC, Lamb CA, Luo Y, Kennedy NA, et al. Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2017;49:256–61.
- [21] Peters LA, Perrigoue J, Mortha A, Iuga A, Song WM, Neiman EM, et al. A functional genomics predictive network model identifies regulators of inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2017;49:1437–49.
- [22] Mokry M, Middendorp S, Wiegerinck CL, Witte M, Teunissen H, Meddens CA, et al. Many inflammatory bowel disease risk loci include regions that regulate gene expression in immune cells and the intestinal epithelium. *Gastroenterology* 2014;146:1040–7.
- [23] Ray G, Longworth MS. Epigenetics, DNA Organization, and Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2019;25:235.
- [24] Nebbioso A, Carafa V, Benedetti R, Altucci L. Trials with “epigenetic” drugs: An update. *Mol Oncol* 2012;6:657–82.

- [25] Boyd M, Thodberg M, Vitezic M, Bornholdt J, Vitting-Seerup K, Chen Y, et al. Characterization of the enhancer and promoter landscape of inflammatory bowel disease from human colon biopsies. *Nat Commun* 2018;9.
- [26] Torres J, Petralia F, Sato T, Wang P, Telesco SE, Choung RS, et al. Serum Biomarkers Identify Patients Who Will Develop Inflammatory Bowel Diseases Up to 5 Years Before Diagnosis. *Gastroenterology* 2020;159:96–104.
- [27] Sartor RB. Mechanisms of disease: Pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006;3:390–407.
- [28] Abreu MT, Fukata M, Arditi M. TLR Signaling in the Gut in Health and Disease. *J Immunol* 2005;174:4453–60.
- [29] Elson CO, Cong Y. Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* 2012;3:332–44.
- [30] Choy MC, Visvanathan K, De Cruz P. An overview of the innate and adaptive immune system in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2017;23:2–13.
- [31] Cario E. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:1583–97.
- [32] Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, et al. Unique CD14⁺ intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN- γ axis. *J Clin Invest* 2008;118:2269–80.
- [33] Breese E, Braegger CP, Corrigan CJ, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Interleukin-2- and interferon-gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology* 1993;78:127–31.
- [34] Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007;8:967–74.
- [35] Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P, Sarra M, Knowles CH, Rampton DS, et al. Differential regulation of interleukin 17 and interferon γ production in inflammatory bowel disease. *Gut* 2009;58:1629–36.
- [36] Franke A, McGovern DPB, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 2010;42:1118–25.
- [37] Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006;116:1310–6.

- [38] Barnes MJ, Powrie F. Regulatory T Cells Reinforce Intestinal Homeostasis. *Immunity* 2009;31:401–11.
- [39] Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2010;10:849–59.
- [40] Koenen HJPM, Smeets RL, Vink PM, Van Rijssen E, Boots AMH, Joosten I. Human CD25^{high}FOxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17 producing cells. *Blood* 2008;112:2340–52.
- [41] Omenetti S, Pizarro TT. The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. *Front Immunol* 2015;6:639.
- [42] Kaplan MH. Th9 cells: Differentiation and disease. *Immunol Rev* 2013;252:104–15.
- [43] Nalleweg N, Chiriac MT, Podstawa E, Lehmann C, Rau TT, Atreya R, et al. IL-9 and its receptor are predominantly involved in the pathogenesis of UC. *Gut* 2015;64:743–55.
- [44] Pabst O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat Rev Immunol* 2012;12:821–32.
- [45] Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* 2009;9:15–27.
- [46] Lin Z, Hegarty JP, Yu W, Cappel JA, Chen X, Faber PW, et al. Identification of disease-associated DNA methylation in B cells from Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *Dig Dis Sci* 2012;57:3145–53.
- [47] Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011;473:174–80.
- [48] Martinez-Medina M, Aldeguer X, Gonzalez-Huix F, Acero D, Garcia-Gil LJ. 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.
- [49] Burke KE, Boumitri C, Ananthakrishnan AN. Modifiable Environmental Factors in Inflammatory Bowel Disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2017;19:21.
- [50] Barreiro-de Acosta M, Alvarez Castro A, Souto R, Iglesias M, Lorenzo A, Dominguez-Muñoz JE. Emigration to western industrialized countries: A risk factor for developing inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2011;5:566–9.
- [51] Piovani D, Danese S, Peyrin-Biroulet L, Nikolopoulos GK, Lytras T, Bonovas S. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology* 2019;157:647-659.e4.

- [52] De Souza HSP, Fiocchi C, Iliopoulos D. The IBD interactome: An integrated view of aetiology, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:739–49.
- [53] Bach JF. The hygiene hypothesis in autoimmunity: The role of pathogens and commensals. *Nat Rev Immunol* 2018;18:105–20.
- [54] Johnson GJ, Cosnes J, Mansfield JC. Review article: Smoking cessation as primary therapy to modify the course of Crohn’s disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;21:921–31.
- [55] Higuchi LM, Khalili H, Chan AT, Richter JM, Bousvaros A, Fuchs CS. A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women. *Am J Gastroenterol* 2012;107:1399–406.
- [56] Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 2006;81:1462–71.
- [57] Boyko EJ, Koepsell TD, Perera DR, Inui TS. Risk of Ulcerative Colitis among Former and Current Cigarette Smokers. *N Engl J Med* 1987;316:707–10.
- [58] Reif S, Klein I, Lubin F, Farbstein M, Hallak A, Gilat T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997;40:754–60.
- [59] Hart A, Tjonneland A, Olsen A, Overvad K, Bergmann MM, Boeing H, et al. Linoleic acid, a dietary n-6 polyunsaturated fatty acid, and the aetiology of ulcerative colitis: A nested case-control study within a European prospective cohort study. *Gut* 2009;58:1606–11.
- [60] De Chambrun GP, Body-Malapel M, Frey-Wagner I, Djouina M, Deknuydt F, Atrott K, et al. Aluminum enhances inflammation and decreases mucosal healing in experimental colitis in mice. *Mucosal Immunol* 2014;7:589–601.
- [61] Walter J, Ley R. The Human Gut Microbiome: Ecology and Recent Evolutionary Changes. *Annu Rev Microbiol* 2011;65:411–29.
- [62] De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:14691–6.
- [63] Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* (80-) 2011;334:105–8.
- [64] Sigall-Boneh R, Levine A, Lomer M, Wierdsma N, Allan P, Fiorino G, et al. Research Gaps in Diet and Nutrition in Inflammatory Bowel Disease. A Topical Review by D-ECCO Working Group [Dietitians of ECCO]. *J Crohns Colitis* 2017;11:1407–19.

- [65] Martinez-Medina M, Denizot J, Dreux N, Robin F, Billard E, Bonnet R, et al. Western diet induces dysbiosis with increased *e coli* in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut* 2014;63:116–24.
- [66] Cœffier M, Marion-Letellier R, Déchelotte P. Potential for amino acids supplementation during inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:518–24.
- [67] Zhao H, Zhang H, Wu H, Li H, Liu L, Guo J, et al. Protective role of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ in the mucosal injury and epithelial barrier disruption in DSS-induced acute colitis in mice. *BMC Gastroenterol* 2012;12:57. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-12-57>.
- [68] Levine A, Sigall Boneh R, Wine E. Evolving role of diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Gut* 2018;67:1726–38. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315866>.
- [69] Ruemmele FM, Veres G, Kolho KL, Griffiths A, Levine A, Escher JC, et al. Consensus guidelines of ECCO/ESPGHAN on the medical management of pediatric Crohn's disease. *J Crohn's Colitis* 2014;8:1179–207.
- [70] Svolos V, Hansen R, Nichols B, Quince C, Ijaz UZ, Papadopoulou RT, et al. Treatment of Active Crohn's Disease With an Ordinary Food-based Diet That Replicates Exclusive Enteral Nutrition. *Gastroenterology* 2019;156:1354-1367.e6.
- [71] Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2010;105:2687–92.
- [72] Ungaro R, Bernstein CN, Gearry R, Hviid A, Kolho KL, Kronman MP, et al. Antibiotics associated with increased risk of New-Onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: A meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2014;109:1728–38.
- [73] Turpin W, Espin-Garcia O, Xu W, Silverberg MS, Kevans D, Smith MI, et al. Association of host genome with intestinal microbial composition in a large healthy cohort. *Nat Genet* 2016;48:1413–7.
- [74] Sheehan D, Moran C, Shanahan F. The microbiota in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2015;50:495–507.
- [75] Dignass A, Eliakim R, Magro F, Maaser C, Chowers Y, Geboes K, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis Part 1: Definitions and diagnosis. *J Crohn's Colitis* 2012;6:965–90.
- [76] Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1989;24:2–6.
- [77] Perler B, Ungaro R, Baird G, Mallette M, Bright R, Shah S, et al. Presenting symptoms in inflammatory bowel disease: Descriptive analysis of a community-based inception cohort. *BMC Gastroenterol* 2019;19:47.

- [78] Day AS, Ledder O, Leach ST, Lemberg DA. Crohn's and colitis in children and adolescents. *World J Gastroenterol* 2012;18:5862–9.
- [79] Sleisenger MH, Feldman M, Friedman LS, Lawrence S, Brandt LJ. Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease : pathophysiology, diagnosis, management. Saunders/Elsevier; 2010.
- [80] Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89–95.
- [81] Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:661–5.
- [82] Ferreira-Iglesias R, Acosta MB De, Santiago MO, Gonzalez AL, De La Peñ CA, Estevez AJB, et al. Fecal calprotectin as predictor of relapse in patients with inflammatory bowel disease under maintenance infliximab therapy. *J Clin Gastroenterol* 2016;50:147–51.
- [83] Annese V, Daperno M, Rutter MD, Amiot A, Bossuyt P, East J, et al. European evidence based consensus for endoscopy in inflammatory bowel disease. *J Crohn's Colitis* 2013;7:982–1018.
- [84] Abdelrazeq AS, Wilson TR, Leitch DL, Lund JN, Leveson SH. Ileitis in ulcerative colitis: Is it a backwash? *Dis Colon Rectum* 2005;48:2038–46.
- [85] Barreiro-de Acosta M, Vallejo N, de la Iglesia D, Uribarri L, Bastón I, Ferreira-Iglesias R, et al. Evaluation of the Risk of Relapse in Ulcerative Colitis According to the Degree of Mucosal Healing (Mayo 0 vs 1): A Longitudinal Cohort Study. *J Crohns Colitis* 2016;10:13–9.
- [86] Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, Baert F, Bulois P, Maunoury V, et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: The SES-CD. *Gastrointest Endosc* 2004;60:505–12.
- [87] Magro F, Langner C, Driessen A, Ensari A, Geboes K, Mantzaris GJ, et al. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *J Crohn's Colitis* 2013;7:827–51.
- [88] Langner C, Magro F, Driessen A, Ensari A, Mantzaris GJ, Villanacci V, et al. The histopathological approach to inflammatory bowel disease: A practice guide. *Virchows Arch* 2014;464:511–27.
- [89] Samuel S, Bruining DH, Loftus E V., Becker B, Fletcher JG, Mandrekar JN, et al. Endoscopic Skipping of the Distal Terminal Ileum in Crohn's Disease Can Lead to Negative Results From Ileocolonoscopy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;10:1253–9.

- [90] Peyrin-Biroulet L, Sandborn W, Sands BE, Reinisch W, Bemelman W, Bryant R V., et al. Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target. *Am J Gastroenterol* 2015;110:1324–38.
- [91] Feagan BG, MacDonald JK. Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst. Rev.*, John Wiley & Sons, Ltd; 2012.
- [92] Lim WC, Wang Y, Macdonald JK, Hanauer S. Aminosalicylates for induction of remission or response in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2016;2016:CD008870.
- [93] Gomollón F, García-López S, Sicilia B, Gisbert JP, Hinojosa J. Therapeutic guidelines on ulcerative colitis: A GRADE methodology based effort of GETECCU. *Gastroenterol Hepatol* 2013;36.
- [94] Khan KJ, Dubinsky MC, Ford AC, Ullman TA, Talley NJ, Moayyedi P. Efficacy of immunosuppressive therapy for inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2011;106:630–42.
- [95] Gisbert JP, Linares PM, McNicholl AG, MatÉ J, Gomollón F. Meta-analysis: The efficacy of azathioprine and mercaptopurine in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;30:126–37.
- [96] Feagan BG, Fedorak RN, Irvine EJ, Wild G, Sutherland L, Steinhart AH, 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.
- [97] Carbonnel F, Colombel JF, Filippi J, Katsanos KH, Peyrin-Biroulet L, Allez M, et al. Methotrexate Is Not Superior to Placebo for Inducing Steroid-Free Remission, but Induces Steroid-Free Clinical Remission in a Larger Proportion of Patients with Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 2016;150:380-388.e4.
- [98] Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: The ACCENT I randomised trial. *Lancet* 2002;359:1541–9.
- [99] Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005;353:2462–76.
- [100] Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, Macintosh D, et al. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: The CLASSIC-I trial. *Gastroenterology* 2006;130:323–33.
- [101] Sandborn WJ, Van Assche G, Reinisch W, Colombel J, D'Haens G, Wolf DC, et al. Adalimumab induces and maintains clinical remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2012;142.

- [102] Sandborn WJ, Feagan BG, Rutgeerts P, Hanauer S, Colombel JF, Sands BE, et al. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2013;369:711–21.
- [103] Feagan BG, Rutgeerts P, Sands BE, Hanauer S, Colombel JF, Sandborn WJ, et al. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2013;369:699–710.
- [104] Sands BE, Sandborn WJ, Panaccione R, O'Brien CD, Zhang H, Johanns J, et al. Ustekinumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2019;381:1201–14.
- [105] Feagan BG, Sandborn WJ, Gasink C, Jacobstein D, Lang Y, Friedman JR, et al. Ustekinumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2016;375:1946–60.
- [106] Bretto E, Ribaldone DG, Caviglia GP, Saracco GM, Bugianesi E, Frara S. Inflammatory Bowel Disease: Emerging Therapies and Future Treatment Strategies. *Biomedicines* 2023;11.
- [107] Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006;124:837–48.
- [108] Rajilić-Stojanović M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev* 2014;38:996–1047.
- [109] Lynch S V., Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease. *N Engl J Med* 2016;375:2369–79.
- [110] Chong CYL, Bloomfield FH, O'Sullivan JM. Factors affecting gastrointestinal microbiome development in neonates. *Nutrients* 2018;10.
- [111] Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe* 2015;17:690–703.
- [112] Negele K, Heinrich J, Borte M, Von Berg A, Schaaf B, Lehmann I, et al. Mode of delivery and development of atopic disease during the first 2 years of life. *Pediatr Allergy Immunol* 2004;15:48–54.
- [113] Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section. *Gut* 2014;63:559–66.
- [114] Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006;118:511–21.

- [115] Groer MW, Luciano AA, Dishaw LJ, Ashmeade TL, Miller E, Gilbert JA. Development of the preterm infant gut microbiome: A research priority. *Microbiome* 2014;2:38.
- [116] Weng M, Walker WA. The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. *J Dev Orig Health Dis* 2013;4:203–14.
- [117] Jakaitis BM, Denning PW. Commensal and probiotic bacteria may prevent NEC by maturing intestinal host defenses. *Pathophysiology* 2014;21:47–54.
- [118] Kaplan JL, Shi HN, Walker WA. The role of microbes in developmental immunologic programming. *Pediatr Res* 2011;69:465–72.
- [119] Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010;464:59–65.
- [120] Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012;486:207–14.
- [121] Claesson MJ, O’Sullivan O, Wang Q, Nikkilä J, Marchesi JR, Smidt H, et al. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS One* 2009;4.
- [122] Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009;457:480–4.
- [123] Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012;489:220–30.
- [124] Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012;486:222–7.
- [125] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*. 2005;308:1635–8.
- [126] Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* 2002;217:133–9.
- [127] Hooper L V., Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* (80-) 2001;291:881–4.
- [128] Schifffrin EJ, Morley JE, Donnet-Hughes A, Guigoz Y. The inflammatory status of the elderly: The intestinal contribution. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 2010;690:50–6.

- [129] Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, et al. Through ageing, and beyond: Gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One* 2010;5.
- [130] Booijink CCGM, Zoetendal EG, Kleerebezem M, de Vos WM. Microbial communities in the human small intestine: Coupling diversity to metagenomics. *Future Microbiol* 2007;2:285–95.
- [131] Zoetendal EG, Von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans ADL, De Vos WM. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:3401–7.
- [132] Atuma C, Strugala V, Allen A, Holm L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: Thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 2001;280.
- [133] Wang Y, Devkota S, Musch MW, Jabri B, Nagler C, Antonopoulos DA, et al. Regional mucosa-associated microbiota determine physiological expression of TLR2 and TLR4 in murine colon. *PLoS One* 2010;5:e13607.
- [134] Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, De Vos WM. Intestinal microbiota in human health and disease: The impact of probiotics. *Genes Nutr* 2011;6:209–40.
- [135] Weiss GA, Hennot T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell Mol Life Sci* 2017;74:2959–77.
- [136] Amaral-Zettler L, Peplies J, Ramette A, Fuchs B, Ludwig W, Glöckner FO. Proceedings of the international workshop on Ribosomal RNA technology, April 7-9, 2008, Bremen, Germany. *Syst Appl Microbiol* 2008;31:258–68.
- [137] Woese CR, Stackebrandt E, Macke TJ, Fox GE. A Phylogenetic Definition of the Major Eubacterial Taxa. *Syst Appl Microbiol* 1985;6:143–51.
- [138] Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, James H. Jorgensen, Marie Lousie Landry MAP. *Manual of Clinical Microbiology* (2 Volume set) 9 E (2007). 9th ed., Washington D.C.: ASM Press; 2007, p. 1762–81.
- [139] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5463–7.
- [140] Stellwagen NC, Stellwagen E. Effect of the matrix on DNA electrophoretic mobility. *J Chromatogr A* 2009;1216:1917–29.
- [141] Giebel R, Worden C, Rust SM, Kleinheinz GT, Robbins M, Sandrin TR. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Adv Appl Microbiol* 2010;71:149–84.

- [142] Andersson AF, Lindberg M, Jakobsson H, Bäckhed F, Nyrén P, Engstrand L. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS One* 2008;3.
- [143] Lepage P, Leclerc MC, Joossens M, Mondot S, Blottière HM, Raes J, et al. A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut* 2013;62:146–58.
- [144] Reigstad CS, Kashyap PC. Beyond phylotyping: Understanding the impact of gut microbiota on host biology. *Neurogastroenterol Motil* 2013;25:358–72.
- [145] McNulty NP, Yatsunenko T, Hsiao A, Faith JJ, Muegge BD, Goodman AL, et al. The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. *Sci Transl Med* 2011;3.
- [146] Verberkmoes NC, Russell AL, Shah M, Godzik A, Rosenquist M, Halfvarson J, et al. Shotgun metaproteomics of the human distal gut microbiota. *ISME J* 2009;3:179–89.
- [147] Lehmann T, Schallert K, Vilchez-Vargas R, Benndorf D, Püttker S, Sydor S, et al. Metaproteomics of fecal samples of Crohn's disease and Ulcerative Colitis. *J Proteomics* 2019;201:93–103.
- [148] Hansen J, Gulati A, Sartor RB. The role of mucosal immunity and host genetics in defining intestinal commensal bacteria. *Curr Opin Gastroenterol* 2010;26:564–71.
- [149] Frank DN, St. Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:13780–5.
- [150] Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* 2011;60:631–7.
- [151] Takahashi K, Nishida A, Fujimoto T, Fujii M, Shioya M, Imaeda H, et al. Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease. *Digestion*, vol. 93, S. Karger AG; 2016, p. 59–65.
- [152] Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 2008;453:620–5.
- [153] Klaassen MAY, Imhann F, Collij V, Fu J, Wijmenga C, Zhernakova A, et al. Anti-inflammatory Gut Microbial Pathways Are Decreased During Crohn's Disease Exacerbations. *J Crohns Colitis* 2019;13:1439–49.
- [154] Bang B, Lichtenberger LM. Methods of Inducing Inflammatory Bowel Disease in Mice. *Curr Protoc Pharmacol* 2016;72.

- [155] Ye J, Lee JW, Presley LL, Bent E, Wei B, Braun J, et al. Bacteria and bacterial rRNA genes associated with the development of colitis in IL-10^{-/-} mice. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:1041–50.
- [156] Bibiloni R, Simon MA, Albright C, Sartor B, Tannock GW. Analysis of the large bowel microbiota of colitic mice using PCR/DGGE. *Lett Appl Microbiol* 2005;41:45–51.
- [157] Gophna U, Sommerfeld K, Gophna S, Doolittle WF, Veldhuyzen Van Zanten SJO. Differences between tissue-associated intestinal microfloras of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Microbiol* 2006;44:4136–41.
- [158] Kotlowski R, Bernstein CN, Sepehri S, Krause DO. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* 2007;56:669–75.
- [159] Carvalho FA, Barnich N, Sivignon A, Darcha C, Chan CHF, Stanners CP, et al. Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med* 2009;206:2179–89.
- [160] Garrett WS, Gallini CA, Yatsunencko T, Michaud M, Dubois A, Delaney ML, et al. Enterobacteriaceae Act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. *Cell Host Microbe* 2010;8:292–300.
- [161] Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, 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.
- [162] Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988;29:990–6.
- [163] Gordon H, Trier Moller F, Andersen V, Harbord M. Heritability in inflammatory bowel disease: From the first twin study to genome-wide association studies. *Inflamm Bowel Dis* 2015;21:1428–34.
- [164] Lepage P, Hösler R, Spehlmann ME, Rehman A, Zvirbliene A, Begun A, et al. Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2011;141:227–36.
- [165] Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, Andersson AF, Lucio M, Zheng Z, et al. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology* 2010;139:1844–1854.e1.
- [166] Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, Vázquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B, et al. The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe* 2014;15:382–92.

- [167] Michail S, Durbin M, Turner D, Griffiths AM, Mack DR, Hyams J, et al. Alterations in the gut microbiome of children with severe ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2012;18:1799–808.
- [168] Tabaqchali S, O'Donoghue DP, Bettelheim KA. *Escherichia coli* antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1978;19:108–13.
- [169] Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, Singh R, et al. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 2004;127:80–93.
- [170] Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:44–54.
- [171] Boudeau J, Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Mol Microbiol* 2004;39:1272–84.
- [172] Bringer MA, Rolhion N, Glasser AL, Darfeuille-Michaud A. The oxidoreductase DsbA plays a key role in the ability of the Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 to resist macrophage killing. *J Bacteriol* 2007;189:4860–71.
- [173] Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantscheff P, Allez M, et al. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* 2007;117:1566–74.
- [174] Feller M, Huwiler K, Stephan R, Altpeter E, Shang A, Furrer H, et al. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007;7:607–13.
- [175] Abubakar I, Myhill D, Aliyu SH, Hunter PR. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from patients with Crohn's disease using nucleic acid-based techniques: A systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:401–10.
- [176] Frank DN. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease. *Lancet Infect Dis* 2008;8:345.
- [177] Selby W, Pavli P, Crotty B, Florin T, Radford-Smith G, Gibson P, et al. Two-Year Combination Antibiotic Therapy With Clarithromycin, Rifabutin, and Clofazimine for Crohn's Disease. *Gastroenterology* 2007;132:2313–9.
- [178] Kalischuk LD, Inglis GD, Buret AG. *Campylobacter jejuni* induces transcellular translocation of commensal bacteria via lipid rafts. *Gut Pathog* 2009;1:2.

- [179] Gradel KO, Nielsen HL, Schønheyder HC, Ejlersen T, Kristensen B, Nielsen H. Increased Short- and Long-Term Risk of Inflammatory Bowel Disease After Salmonella or Campylobacter Gastroenteritis. *Gastroenterology* 2009;137:495–501.
- [180] Kalischuk LD, Buret AG. A role for Campylobacter jejuni-induced enteritis in inflammatory bowel disease? *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 2010;298:G1-9.
- [181] Ohkusa T, Sato N, Ogihara T, Morita K, Ogawa M, Okayasu I. Fusobacterium varium localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:849–53.
- [182] Ohkusa T, Okayasu I, Ogihara T, Morita K, Ogawa M, Sato N. Induction of experimental ulcerative colitis by Fusobacterium varium isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut* 2003;52:79–83.
- [183] Ohkusa T, Yoshida T, Sato N, Watanabe S, Tajiri H, Okayasu I. Commensal bacteria can enter colonic epithelial cells and induce proinflammatory cytokine secretion: A possible pathogenic mechanism of ulcerative colitis. *J Med Microbiol* 2009;58:535–45.
- [184] Kato K, Ohkusa T, Terao S, Chiba T, Murakami K, Yanaka A, et al. Adjunct antibiotic combination therapy for steroid-refractory or -dependent ulcerative colitis: An open-label multicentre study. *Aliment Pharmacol Ther* 2014;39:949–56.
- [185] Nomura T, Ohkusa T, Okayasu I, Yoshida T, Sakamoto M, Hayashi H, et al. Mucosa-associated bacteria in ulcerative colitis before and after antibiotic combination therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;21:1017–27.
- [186] Matsuda H, Fujiyama Y, Andoh A, Ushijima T, Kajinami T, Bamba T. Characterization of antibody responses against rectal mucosa-associated bacterial flora in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:61–8.
- [187] Zamani S, Hesam Shariati S, Zali MR, Asadzadeh Aghdai H, Sarabi Asiabar A, Bokaie S, et al. Detection of enterotoxigenic Bacteroides fragilis in patients with ulcerative colitis. *Gut Pathog* 2017;9.
- [188] Vrakas S, Mountzouris KC, Michalopoulos G, Karamanolis G, Papatheodoridis G, Tzathas C, et al. Intestinal bacteria composition and translocation of bacteria in inflammatory bowel disease. *PLoS One* 2017;12.
- [189] Rhee KJ, Wu S, Wu X, Huso DL, Karim B, Franco AA, et al. Induction of persistent colitis by a human commensal, enterotoxigenic Bacteroides fragilis, in wild-type C57BL/6 mice. *Infect Immun* 2009;77:1708–18.
- [190] Ó Cuív P, de Wouters T, Giri R, Mondot S, Smith WJ, Blottière HM, et al. The gut bacterium and pathobiont Bacteroides vulgatus activates NF-κB in a human gut epithelial cell line in a strain and growth phase dependent manner. *Anaerobe* 2017;47:209–17.

- [191] Vineis JH, Ringus DL, Morrison HG, Delmont TO, Dalal S, Raffals LH, et al. Patient-specific *Bacteroides* genome variants in pouchitis. *MBio* 2016;7.
- [192] Varela E, Manichanh C, Gallart M, Torrejón A, Borruel N, Casellas F, et al. Colonisation by *Faecalibacterium prausnitzii* and maintenance of clinical remission in patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;38:151–61.
- [193] Cao Y, Shen J, Ran ZH. Association between *Faecalibacterium prausnitzii* Reduction and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis and Systematic Review of the Literature. *Gastroenterol Res Pract* 2014;2014:872725.
- [194] Zhou L, Zhang M, Wang Y, Dorfman RG, Liu H, Yu T, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* Produces Butyrate to Maintain Th17/Treg Balance and to Ameliorate Colorectal Colitis by Inhibiting Histone Deacetylase 1. *Inflamm Bowel Dis* 2018;24:1926–40.
- [195] Byndloss MX, Olsan EE, Rivera-Chávez F, Tiffany CR, Cevallos SA, Lokken KL, et al. Microbiota-activated PPAR- γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science* (80-) 2017;357:570–5.
- [196] P852 A metabolomics approach to discover biomarkers of chronic intestinal inflammation associated with gut microbiota dysbiosis in ulcerative colitis and Celiac Disease. *Journal of Crohn's and Colitis*. https://academic.oup.com/ecco-jcc/article/12/supplement_1/S547/4808455?searchresult=1.
- [197] Callaway TR, Edrington TS, Anderson RC, Harvey RB, Genovese KJ, Kennedy CN, et al. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. *Anim Health Res Rev* 2008;9:217–25.
- [198] Medellín-Peña MJ, Wang H, Johnson R, Anand S, Griffiths MW. Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:4259–67.
- [199] Martin FPJ, Dumas ME, Wang Y, Legido-Quigley C, Yap IKS, Tang H, et al. A top-down systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model. *Mol Syst Biol* 2007;3:112.
- [200] Derwa Y, Gracie DJ, Hamlin PJ, Ford AC. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of probiotics in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2017;46:389–400.
- [201] Steed H, MacFarlane GT, Blackett KL, Bahrami B, Reynolds N, Walsh S V., et al. Clinical trial: The microbiological and immunological effects of synbiotic consumption A randomized double-blind placebo-controlled study in active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;32:872–83.

- [202] Kruis W, Frič P, Pokrotnieks J, Lukáš M, Fixa B, Kaščák M, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004;53:1617–23.
- [203] Sood A, Midha V, Makharia GK, Ahuja V, Singal D, Goswami P, et al. The Probiotic Preparation, VSL#3 Induces Remission in Patients With Mild-to-Moderately Active Ulcerative Colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:1202–9, 1209.e1.
- [204] Tursi A, Brandimarte G, Papa A, Giglio A, Elisei W, Giorgetti GM, et al. Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: A double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol* 2010;105:2218–27.
- [205] Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti GM, Forti G, Modeo ME, Gigliobianco A. Low-dose balsalazide plus a high-potency probiotic preparation is more effective than balsalazide alone or mesalazine in the treatment of acute mild-to-moderate ulcerative colitis. *Med Sci Monit* 2004;10.
- [206] Holubar SD, Cima RR, Sandborn WJ, Pardi DS. Treatment and prevention of pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis for chronic ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst. Rev.*, John Wiley & Sons, Ltd; 2010.
- [207] Quraishi MN, Widlak M, Bhala N, Moore D, Price M, Sharma N, et al. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of faecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent and refractory *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2017;46:479–93.
- [208] Colman RJ, Rubin DT. Fecal microbiota transplantation as therapy for inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *J Crohn's Colitis* 2014;8:1569–81.
- [209] Moayyedi P, Surette MG, Kim PT, Libertucci J, Wolfe M, Onischi C, et al. Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* 2015;149:102-109.e6.
- [210] Rossen NG, Fuentes S, Van Der Spek MJ, Tijssen JG, Hartman JHA, Duflou A, et al. Findings From a Randomized Controlled Trial of Fecal Transplantation for Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 2015;149:110-118.e4.
- [211] Imdad A, Nicholson MR, Tanner-Smith EE, Zackular JP, Gomez-Duarte OG, Beaulieu DB, et al. Fecal transplantation for treatment of inflammatory bowel disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2018;2018:CD012774.
- [212] Kump P, Wurm P, Gröchenig HP, Wenzl H, Petritsch W, Halwachs B, 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.

- [213] Paramsothy S, Kamm MA, Kaakoush NO, Walsh AJ, van den Bogaerde J, Samuel D, et al. Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2017;389:1218–28.
- [214] Nunes T, Etchevers MJ, Merino O, Gallego S, García-Sánchez V, Marín-Jiménez I, et al. Does smoking influence Crohn's disease in the biologic era? the TABACROHN study. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:23–9.
- [215] Ausubel FM. Short protocols in molecular biology : a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. Greene Pub. Associates; 1992.
- [216] Reischer GH, Kasper DC, Steinborn R, Farnleitner AH, Mach RL. A quantitative real-time PCR assay for the highly sensitive and specific detection of human faecal influence in spring water from a large alpine catchment area. *Lett Appl Microbiol* 2007;44:351–6.
- [217] De Felipe AP, Leiro Vidal JM. Diseño de un método de detección de bacteroides sp. asociados a la enfermedad inflamatoria intestinal. Universidade de Santiago de Compostela, 2014.
- [218] Shanks OC, Kelty CA, Sivaganesan M, Varma M, Haugland RA. Quantitative PCR for Genetic Markers of Human Fecal Pollution. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:5507.
- [219] Lucke K, Miehke S, Jacobs E, Schuppler M. Prevalence of Bacteroides and Prevotella spp. in ulcerative colitis. *J Med Microbiol* 2006;55:617–24.
- [220] Wang C, Zhao J, Zhang H, Lee YK, Zhai Q, Chen W. Roles of intestinal bacteroides in human health and diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2021;61:3518–36.
- [221] Cardoneanu A, Mihai C, Rezus E, Burlui A, Popa I, Prelipcean CC. Gut microbiota changes in inflammatory bowel diseases and ankylosing spondylitis. *J Gastrointest Liver Dis* 2021;30:46–54.
- [222] Zuo W, Wang B, Bai X, Luan Y, Fan Y, Michail S, et al. 16S rRNA and metagenomic shotgun sequencing data revealed consistent patterns of gut microbiome signature in pediatric ulcerative colitis. *Sci Rep* 2022;12.
- [223] Pascal V, Pozuelo M, Borruel N, Casellas F, Campos D, Santiago A, et al. A microbial signature for Crohn's disease. *Gut* 2017;66:813–22.
- [224] Kennedy NA, Walker AW, Berry SH, Duncan SH, Farquarson FM, Louis P, et al. The Impact of Different DNA Extraction Kits and Laboratories upon the Assessment of Human Gut Microbiota Composition by 16S rRNA Gene Sequencing. *PLoS One* 2014;9:e88982.
- [225] Quaglio AEV, Grillo TG, De Oliveira ECS, Di Stasi LC, Sasaki LY. Gut microbiota, inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2022;28:4053–60.

- [226] Mills RH, Dulai PS, Vázquez-Baeza Y, Saucedo C, Daniel N, Gerner RR, et al. Multi-omics analyses of the ulcerative colitis gut microbiome link *Bacteroides vulgatus* proteases with disease severity. *Nat Microbiol* 2022;7:262–76.
- [227] Bibiloni R, Mangold M, Madsen KL, Fedorak RN, Tannock GW. The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *J Med Microbiol* 2006;55:1141–9.
- [228] Galipeau HJ, Caminero A, Verdu EF. Increased Bacterial Proteolytic Activity Detected Before Diagnosis of Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2021;27:e144–e144.
- [229] Ruseler-Van Embden JGH, Both-Patoir HC. Anaerobic gram-negative faecal flora in patients with Crohn's Disease and healthy subjects. vol. 49. 1983.
- [230] Sepehri S, Kotlowski R, Bernstein CN, Krause DO. Microbial diversity of inflamed and noninflamed gut biopsy tissues in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:675–83.
- [231] Walker AW, Sanderson JD, Churcher C, Parkes GC, Hudspith BN, Rayment N, et al. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol* 2011;11:7.
- [232] Loh G, Blaut M. Role of commensal gut bacteria in inflammatory bowel diseases. *Gut Microbes* 2012;3:544–55.
- [233] Andoh A, Sakata S, Koizumi Y, Mitsuyama K, Fujiyama Y, Benno Y. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the Diversity of Fecal Microbiota in Patients with Ulcerative Colitis Background: Terminal restriction fragment length polymorphism 2007.
- [234] Rhee K-J, Wu S, Wu X, Huso DL, Karim B, Franco AA, et al. Induction of Persistent Colitis by a Human Commensal, Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, in Wild-Type C57BL/6 Mice. *Infect Immun* 2009;77:1708–18.
- [235] Rath HC, Wilson KH, Sartor RB. Differential induction of colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats selectively colonized with *Bacteroides vulgatus* or *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1999;67:2969–74.
- [236] Olaisen M, Spigset O, Flatberg A, Granlund A van B, Brede WR, Albrektsen G, et al. Mucosal 5-aminosalicylic acid concentration, drug formulation and mucosal microbiome in patients with quiescent ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2019;49:1301–13.
- [237] Ruszkowski J, Daca A, Szewczyk A, Dębska-Ślizień A, Witkowski JM. The influence of biologics on the microbiome in immune-mediated inflammatory diseases: A systematic review. *Biomed Pharmacother* 2021;141.

- [238] Badal VD, Vaccariello ED, Murray ER, Yu KE, Knight R, Jeste D V., et al. The Gut Microbiome, Aging, and Longevity: A Systematic Review. *Nutrients* 2020;12:1–25.
- [239] Chaparro M, Garre A, Ortiz AN, Palomares MTD-L, Rodríguez C, Riestra S, et al. Incidence, Clinical Characteristics and Management of Inflammatory Bowel Disease in Spain: Large-Scale Epidemiological Study. *J Clin Med* 2021;10:2885.
- [240] Vegh Z, Burisch J, Pedersen N, Kaimakliotis I, Duricova D, Bortlik M, et al. Incidence and initial disease course of inflammatory bowel diseases in 2011 in Europe and Australia: Results of the 2011 ECCO-EpiCom inception cohort. *J Crohn's Colitis* 2014;8:1506–15.
- [241] Hopkins MJ, Macfarlane GT. Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with *Clostridium difficile* infection. *J Med Microbiol* 2002;51:448–54.
- [242] Woodmansey EJ. Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol* 2007;102:1178–86.
- [243] Portela F, Magro F, Lago P, Cotter J, Cremers I, De Deus J, et al. Ulcerative colitis in a Southern European country: a national perspective. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:822–9.
- [244] Teofani A, Marafini I, Laudisi F, Pietrucci D, Salvatori S, Unida V, et al. Intestinal Taxa Abundance and Diversity in Inflammatory Bowel Disease Patients: An Analysis including Covariates and Confounders. *Nutr* 2022, Vol 14, Page 260 2022;14:260.
- [245] Fite A, Macfarlane S, Furrie E, Bahrami B, Cummings JH, Steinke DT, 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.
- [246] Yurkovetskiy L, Burrows M, Khan AA, Graham L, Volchikov P, Becker L, et al. Gender bias in autoimmunity is influenced by microbiota. *Immunity* 2013;39:400–12.
- [247] Degen LP, Phillips SF. Variability of gastrointestinal transit in healthy women and men. *Gut* 1996;39:299–305.
- [248] Dominianni C, Sinha R, Goedert JJ, Pei Z, Yang L, Hayes RB, et al. Sex, Body Mass Index, and Dietary Fiber Intake Influence the Human Gut Microbiome. *PLoS One* 2015;10.
- [249] Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L, Midtvedt T, et al. Differences in Fecal Microbiota in Different European Study Populations in Relation to Age, Gender, and Country: a Cross-Sectional Study. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:1027.
- [250] Kozik AJ, Nakatsu CH, Chun H, Jones-Hall YL. Age, sex, and TNF associated differences in the gut microbiota of mice and their impact on acute TNBS colitis. *Exp Mol Pathol* 2017;103:311–9.

- [251] Kozik AJ, Nakatsu CH, Chun H, Jones-Hall YL. Comparison of the fecal, cecal, and mucus microbiome in male and female mice after TNBS-induced colitis. *PLoS One* 2019;14.
- [252] Huang C, Shi G. Smoking and microbiome in oral, airway, gut and some systemic diseases. *J Transl Med* 2019;17. <https://doi.org/10.1186/S12967-019-1971-7>.
- [253] Sapkota AR, Berger S, Vogel TM. Human Pathogens Abundant in the Bacterial Metagenome of Cigarettes. *Environ Health Perspect* 2010;118:351.
- [254] Wang H, Zhao JX, Hu N, Ren J, Du M, Zhu MJ. Side-stream smoking reduces intestinal inflammation and increases expression of tight junction proteins. *World J Gastroenterol* 2012;18:2180–7.
- [255] Allais L, Kerckhof FM, Verschuere S, Bracke KR, De Smet R, Laukens D, et al. Chronic cigarette smoke exposure induces microbial and inflammatory shifts and mucin changes in the murine gut. *Environ Microbiol* 2016;18:1352–63.
- [256] Talukder MAH, Johnson WM, Varadharaj S, Lian J, Kearns PN, El-Mahdy MA, et al. Chronic cigarette smoking causes hypertension, increased oxidative stress, impaired NO bioavailability, endothelial dysfunction, and cardiac remodeling in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;300.
- [257] Lee SH, Yun Y, Kim SJ, Lee EJ, Chang Y, Ryu S, et al. Association between Cigarette Smoking Status and Composition of Gut Microbiota: Population-Based Cross-Sectional Study. *J Clin Med* 2018;7.
- [258] Benjamin JL, Hedin CRH, Koutsoumpas A, Ng SC, McCarthy NE, Prescott NJ, et al. Smokers with active Crohn's disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2012;18:1092–100.
- [259] Biedermann L, Zeitz J, Mwinyi J, Sutter-Minder E, Rehman A, Ott SJ, et al. Smoking cessation induces profound changes in the composition of the intestinal microbiota in humans. *PLoS One* 2013;8.
- [260] Biedermann L, Brülisauer K, Zeitz J, Frei P, Scharl M, Vavricka SR, et al. Smoking cessation alters intestinal microbiota: insights from quantitative investigations on human fecal samples using FISH. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20:1496–501.
- [261] Parkes GC, Whelan K, Lindsay JO. Smoking in inflammatory bowel disease: Impact on disease course and insights into the aetiology of its effect. *J Crohn's Colitis* 2014;8:717–25.
- [262] Lo Sasso G, Phillips BW, Sewer A, Battey JND, Kondylis A, Talikka M, et al. The reduction of DSS-induced colitis severity in mice exposed to cigarette smoke is linked to immune modulation and microbial shifts. *Sci Rep* 2020;10.

- [263] Dulai PS, Singh S, Vande Casteele N, Boland BS, Rivera-Nieves J, Ernst PB, et al. Should We Divide Crohn's Disease Into Ileum-Dominant and Isolated Colonic Diseases? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2019;17:2634–43.
- [264] Thia KT, Sandborn WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Loftus E V. Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. *Gastroenterology* 2010;139:1147–55.
- [265] Naftali T, Reshef L, Kovacs A, Porat R, Amir I, Konikoff FM, et al. Distinct Microbiotas are Associated with Ileum-Restricted and Colon-Involving Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2016;22:293–302.
- [266] Shin SY, Kim Y, Kim WS, Moon JM, Lee KM, Jung SA, et al. Compositional changes in fecal microbiota associated with clinical phenotypes and prognosis in Korean patients with inflammatory bowel disease. *Intest Res* 2023;21:148–60.
- [267] Olbjørn C, Småstuen MC, Thiis-Evensen E, Nakstad B, Vatn MH, Jahnsen J, et al. Fecal microbiota profiles in treatment-naïve pediatric inflammatory bowel disease - associations with disease phenotype, treatment, and outcome. *Clin Exp Gastroenterol* 2019;12:37–49.
- [268] Ohkusa T, Yoshida T, Sato N, Watanabe S, Tajiri H, Okayasu I. Commensal bacteria can enter colonic epithelial cells and induce proinflammatory cytokine secretion: a possible pathogenic mechanism of ulcerative colitis. *J Med Microbiol* 2009;58:535–45.
- [269] Fujita H, Eishi Y, Ishige I, Saitoh K, Takizawa T, Arima T, et al. Quantitative analysis of bacterial DNA from *Mycobacteria* spp., *Bacteroides vulgatus*, and *Escherichia coli* in tissue samples from patients with inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol* 2002;37:509–16.
- [270] Kowalska-Duplaga K, Gosiewski T, Kapusta P, Sroka-Oleksiak A, Wędrychowicz A, Pieczarkowski S, et al. Differences in the intestinal microbiome of healthy children and patients with newly diagnosed Crohn's disease. *Sci Rep* 2019;9.
- [271] Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, Stray N, Sauar J, Vatn MH, et al. C-reactive protein: a predictive factor and marker of inflammation in inflammatory bowel disease. Results from a prospective population-based study. *Gut* 2008;57:1518–23.
- [272] Dajti E, Frazzoni L, Iascone V, Secco M, Vestito A, Fuccio L, et al. Systematic review with meta-analysis: Diagnostic performance of faecal calprotectin in distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2023;58.
- [273] Guardiola J, Lobatón T, Cerrillo E, Ferreiro-Iglesias R, Gisbert JP, Domènech E, et al. Recommendations of the Spanish Working Group on Crohn's Disease and Ulcerative Colitis (GETECCU) on the utility of the determination of faecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol* 2018;41:514–29.

- [274] Mosli MH, Zou G, Garg SK, Feagan SG, MacDonald JK, Chande N, 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.
- [275] Ferreiro-Iglesias R, Barreiro-De Acosta M, Lorenzo-Gonzalez A, Dominguez-Muñoz JE. Accuracy of Consecutive Fecal Calprotectin Measurements to Predict Relapse in Inflammatory Bowel Disease Patients Under Maintenance With Anti-TNF Therapy: A Prospective Longitudinal Cohort Study. *J Clin Gastroenterol* 2018;52:229–34.
- [276] Chamouard P, Richert Z, Meyer N, Rahmi G, Baumann R. Diagnostic value of C-reactive protein for predicting activity level of Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:882–7.
- [277] Jones J, Loftus E V., Panaccione R, Chen LS, Peterson S, McConnell J, et al. Relationships between disease activity and serum and fecal biomarkers in patients with Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:1218–24.
- [278] Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A, Trummel M, Vavricka SR, Bruegger LE, et al. Fecal calprotectin correlates more closely with the Simple Endoscopic Score for Crohn's disease (SES-CD) than CRP, blood leukocytes, and the CDAI. *Am J Gastroenterol* 2010;105:162–9.
- [279] Sidoroff M, Karikoski R, Raivio T, Savilahti E, Kolho KL. High-sensitivity C-reactive protein in paediatric inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2010;16:2901–6.
- [280] Sakurai T, Saruta M. Positioning and Usefulness of Biomarkers in Inflammatory Bowel Disease. *Digestion* 2023;104:30–41.
- [281] Kawashima K, Ishihara S, Yuki T, Fukuba N, Oshima N, Kazumori H, et al. Fecal calprotectin level correlated with both endoscopic severity and disease extent in ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol* 2016;16.
- [282] Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A, Trummel M, Renzulli P, Seibold F. Ulcerative colitis: correlation of the Rachmilewitz endoscopic activity index with fecal calprotectin, clinical activity, C-reactive protein, and blood leukocytes. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1851–8.
- [283] Sasidharan S, Sasson AN, Shannon KM, Ananthakrishnan AN. Fecal Calprotectin Is a Predictor of Need for Rescue Therapy in Hospitalized Severe Colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2022;28:1833–7.
- [284] Ho GT, Lee HM, Brydon G, Ting T, Hare N, Drummond H, et al. Fecal calprotectin predicts the clinical course of acute severe ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2009;104:673–8.

- [285] Jain S, Kedia S, Bopanna S, Sachdev V, Sahni P, Dash NR, et al. Faecal Calprotectin and UCEIS Predict Short-term Outcomes in Acute Severe Colitis: Prospective Cohort Study. *J Crohns Colitis* 2017;11:1309–16.
- [286] Singh S, Ananthakrishnan AN, Nguyen NH, Cohen BL, Velayos FS, Weiss JM, et al. AGA Clinical Practice Guideline on the Role of Biomarkers for the Management of Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 2023;164:344–72.
- [287] Lacroix V, Cassard A, Mas E, Barreau F. Multi-Omics Analysis of Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Diseases: What Benefits for Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Tools? *Int J Mol Sci* 2021;22.
- [288] Cai X, Zhou N, Zou Q, Peng Y, Xu L, Feng L, et al. Integration of taxa abundance and occurrence frequency to identify key gut bacteria correlated to clinics in Crohn's disease. *BMC Microbiol* 2023;23
- [289] Rajca S, Grondin V, Louis E, Vernier-Massouille G, Grimaud JC, Bouhnik Y, 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.
- [290] Sokol H, Brot L, Stefanescu C, Auzolle C, Barnich N, Buisson A, et al. Prominence of ileal mucosa-associated microbiota to predict postoperative endoscopic recurrence in Crohn's disease. *Gut* 2020;69.
- [291] Prosberg M, Bendtsen F, Vind I, Petersen AM, Gluud LL. 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.
- [292] Sanchis-Artero L, Martínez-Blanch JF, Manresa-Vera S, Cortés-Castell E, Valls-Gandia M, Iborra M, et al. Evaluation of changes in intestinal microbiota in Crohn's disease patients after anti-TNF alpha treatment. *Sci Rep* 2021;11.
- [293] Zhou Y, Xu ZZ, He Y, Yang Y, Liu L, Lin Q, et al. Gut Microbiota Offers Universal Biomarkers across Ethnicity in Inflammatory Bowel Disease Diagnosis and Infliximab Response Prediction. *MSystems* 2018;3.
- [294] Kolho KL, Korpela K, Jaakkola T, Pichai MVA, Zoetendal EG, Salonen A, et al. Fecal Microbiota in Pediatric Inflammatory Bowel Disease and Its Relation to Inflammation. *Am J Gastroenterol* 2015;110:921–30.
- [295] Wang Y, Gao X, Ghazlane A, Hu H, Li X, Xiao Y, et al. Characteristics of Faecal Microbiota in Paediatric Crohn's Disease and Their Dynamic Changes During Infliximab Therapy. *J Crohns Colitis* 2018;12:337–46.
- [296] Lewis JD, Chen EZ, Baldassano RN, Otley AR, Griffiths AM, Lee D, et al. Inflammation, Antibiotics, and Diet as Environmental Stressors of the Gut Microbiome in Pediatric Crohn's Disease. *Cell Host Microbe* 2015;18:489–500.

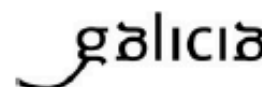
- [297] Ananthakrishnan AN, Luo C, Yajnik V, Khalili H, Garber JJ, Stevens BW, et al. Gut Microbiome Function Predicts Response to Anti-integrin Biologic Therapy in Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Host Microbe* 2017;21:603-610.e3.
- [298] Doherty MK, Ding T, Koumpouras C, Telesco SE, Monast C, Das A, et al. Fecal Microbiota Signatures Are Associated with Response to Ustekinumab Therapy among Crohn's Disease Patients. *MBio* 2018;9.
- [299] Radhakrishnan ST, Alexander JL, Mullish BH, Gallagher KI, Powell N, Hicks LC, et al. Systematic review: the association between the gut microbiota and medical therapies in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2022;55:26–48.
- [300] Xu Y, Wang N, Tan HY, Li S, Zhang C, Feng Y. Function of *Akkermansia muciniphila* in Obesity: Interactions With Lipid Metabolism, Immune Response and Gut Systems. *Front Microbiol* 2020;11.
- [301] Rhee KJ, Wu S, Wu X, Huso DL, Karim B, Franco AA, et al. Induction of persistent colitis by a human commensal, enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, in wild-type C57BL/6 mice. *Infect Immun* 2009;77:1708–18.
- [302] Prindiville TP, Sheikh RA, Cohen SH, Tang YJ, Cantrell MC, Silva J. *Bacteroides fragilis* enterotoxin gene sequences in patients with inflammatory bowel disease. *Emerg Infect Dis* 2000;6:171–4.
- [303] Ding Z, Cui J, Zhang Q, Feng J, Du B, Xue G, et al. Detecting and quantifying *Veillonella* by real-time quantitative PCR and droplet digital PCR. *Appl Microbiol Biotechnol* 2024;108:1–13.
- [304] Mondot S, Kang S, Furet JP, Aguirre De Carcer D, McSweeney C, Morrison M, et al. Highlighting new phylogenetic specificities of Crohn's disease microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:185–92.

9. ANEXOS

9.1 Dictamen del comité autonómico de ética de la investigación de Galicia



Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Teléfono: 881546425
celo@sergas.es



DICTAMEN DEL COMITÉ AUTONÓMICO DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE GALICIA

Paula M. López Vázquez, Secretaria del Comité Autonómico de Ética de la Investigación de Galicia

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 11/07/2017:

Título: Modificación de los genotipos bacteroidales en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y su aplicación en la práctica clínica

Promotor: Iria Bastón Rey

Tipo de estudio: EPA-SP

Version: HIP/CI Versión1 de 4-Enero-2017

Código del Promotor: IBR-MES-2017-01

Código de Registro: 2017/033

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables, y en particular la Ley 14/2007, de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, la ORDEN SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las Directrices sobre estudios Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos de la Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del CEIC de Galicia

Emite un **INFORME FAVORABLE** para la realización del estudio por el/la investigador/a del centro:

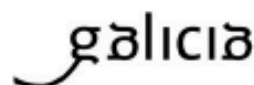


Centros	Investigadores Principales
C.H. Universitario de Santiago	Iria Bastón Rey



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Teléfono: 881546425
celc@sergas.es



Y HACE CONSTAR QUE:

- 1 El CAEIG cumple los requisitos legales vigentes (R.D 1090/2015 y la Ley 14/2007)
- 2 El CAEIG tanto en su composición como en sus PNTs cumple las Normas de Buena Práctica Clínica (CPMP/ICH/135/95).
- 3 La composición actual del CAEIG es:

Manuel Portela Romero. (Presidente). Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Irene Zarra Ferro. (Vicepresidenta). Farmacéutica de Atención Especializada.

Paula Mª López Vázquez, (Secretaria). Médico Especialista en Farmacología Clínica.

Juan Vázquez Lago (Secretario Suplente). Médico Especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública.

Jesús Alberdi Sodupe. Médico especialista en Psiquiatría.

Rosendo Bugarín González. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Juan Casariego Rosón. Médico Especialista en Cardiología.

Xoán X. Casas Rodríguez. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Juana Mª Cruz del Río. Trabajadora Social.

Juan Fernando Cueva Bañuelos. Médico Especialista en Oncología Médica.

José Álvaro Fernández Rial. Médico Especialista en Medicina Interna.

José Luis Fernández Trisac. Médico Especialista en Pediatría.

Mª José Ferreira Díaz. Diplomada Universitaria de Enfermería

Pablo Nimo Ríos. Licenciado en Derecho.

Pilar Gayoso Diz. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Agustín Pía Morandeira. Farmacéutico de Atención Primaria

Salvador Pita Fernández. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Carmen Rodríguez-Tenreiro Sánchez. Licenciada en Farmacia.

Susana María Romero Yuste. Médico Especialista en Reumatología.

Mª Asunción Verdejo González. Médico Especialista en Farmacología Clínica.

En Santiago de Compostela, a 12 de julio de 2017



9.2 Clasificación AEMPS

 MINISTERIO DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES E IGUALDAD	 agencia española de medicamentos y productos sanitarios	DEPARTAMENTO DE MEDICAMENTOS DE USO HUMANO
--	---	---

ASUNTO: RESOLUCIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE CLASIFICACIÓN DE ESTUDIO CLÍNICO O EPIDEMIOLÓGICO

DESTINATARIO: D^a IRIA BASTÓN REY

Vista la solicitud formulada con fecha **13 de enero de 2017**, por D^a IRIA BASTÓN REY, para la clasificación del estudio titulado "Modificación de los genotipos bacteroidales en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y su aplicación en la práctica clínica", con código IBR-MES-2017-01, y cuyo promotores son "Iria Bastón Rey y Manuel Barreiro de Acosta", se emite resolución a tenor de los siguientes antecedentes.

Con fecha **26 de enero de 2017**, se emite propuesta de resolución, otorgando un plazo de quince días al solicitante para presentar alegaciones. Transcurrido este plazo, no se han recibido alegaciones.

Por todo ello, el Departamento de Medicamentos de Uso Humano de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), de conformidad con los preceptos aplicables, ⁽¹⁾ **RESUELVE** clasificar el estudio citado anteriormente como "Estudio Posautorización de seguimiento prospectivo (abreviado como EPA-SP).

El promotor del estudio deberá remitir solicitud de autorización del mismo ⁽²⁾ a todas aquellas Comunidades Autónomas en las que se pretenda llevar a cabo, incluyendo la siguiente documentación (una copia en papel y otra en formato electrónico) y enviando una copia de la misma (papel y formato electrónico) a la AEMPS en el momento de la primera solicitud de autorización:

- Carta de presentación dirigida a los responsables de esta materia en la Comunidad Autónoma⁽³⁾ en la que se solicite la autorización del estudio e indique la dirección y contacto del solicitante y la relación de documentos que se incluyen⁽⁴⁾.
- Resolución de la AEMPS sobre la clasificación del estudio
- Protocolo completo, incluidos los anexos, y donde conste el número de pacientes que se pretenden incluir en España, desglosado por Comunidad Autónoma.
- Dictamen favorable del estudio por un CEIC acreditado en España.
- Listado de Centros Sanitarios donde se pretende realizar el estudio, desglosado por Comunidad Autónoma
- Listado de investigadores participantes en la Comunidad Autónoma.
- Si el estudio se pretende realizar en otros países, situación del mismo en éstos
- Documento acreditativo de haber satisfecho las tasas correspondientes, en aquellas CC.AA. donde se exijan.


 UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CORREO ELECTRÓNICO
 fernandezepi@aemps.es

C/ CAMPEZO, 1 – EDIFICIO 8
 28022 MADRID

9.3 Hoja de información al/la participante adulto/a

TÍTULO DEL ESTUDIO: “Modificación de los genotipos bacteroidales en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y su aplicación en la práctica clínica.”

INVESTIGADOR: Dra Iria Bastón Rey

CENTRO: Hospital Clínico Universitario Santiago de Compostela.

Este documento tiene por objeto facilitarle información sobre un **estudio de investigación** en el que se le invita a participar. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de Santiago de Compostela-Lugo

Si decide participar en el mismo, debe recibir información personalizada del investigador, **leer antes este documento** y hacer todas las preguntas que precise para comprender los detalles sobre el mismo. Si así lo desea, puede llevar el documento, consultarlo con otras personas, y tomar el tiempo necesario para decidir si participar o no.

La participación en este estudio es completamente **voluntaria**. Ud. puede decidir no participar o, si acepta hacerlo, cambiar de parecer retirando el consentimiento en cualquier momento sin tener que dar explicaciones. Le aseguramos que esta decisión no afectará a su relación con el médico ni a la asistencia sanitaria a la que Ud. tiene derecho.

¿Cuál es el propósito del estudio?

Demostrar que los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal presentan diferentes genotipos bacteroidales dentro de la microbiota intestinal que los individuos sanos.

¿Por qué me ofrecen participar a mí?

Ud. es invitado a participar porque está diagnosticado de enfermedad inflamatoria intestinal / o si es grupo control porque no padece la enfermedad objeto del estudio.



¿En qué consiste mi participación?

Si usted está diagnosticado de enfermedad inflamatoria intestinal:

En una primera visita en la consulta del servicio de Digestivo le informarán sobre este estudio y le darán el consentimiento informado. Solicitaremos una analítica sanguínea completa y muestra de heces para realizar el análisis de genotipo y calprotectina fecal. Se le solicitará una muestra de las biopsias ya realizadas previamente para el diagnóstico de su enfermedad para poder estudiar los diferentes genotipos bacteroidales ahí presentes. Esta cesión de la muestra no implica riesgo de pérdida de material para el diagnóstico dado que durante la colonoscopia se toman múltiples biopsias de diferentes partes de su colon para estudio histológico

Posteriormente cuando esté en remisión clínica (al menos 4 meses tras el brote diagnóstico) realizará un control analítico sanguíneo y nueva recogida de muestra de heces.

De presentar algún brote tras la remisión, avisará telefónicamente y se realizará analítica sanguínea + análisis de heces.

Tanto la analítica como el análisis de calprotectina fecal al diagnóstico, durante la remisión y el brote se encuentran dentro de la práctica clínica habitual. La alternativa es no participar en el estudio y ser atendido solo con el procedimiento habitual que en este caso correspondería a la misma actuación.

Estos datos se utilizarán sólo para los fines descritos en esta hoja de información.

La recogida de muestras será realizada por un profesional.

El investigador puede decidir finalizar el estudio antes de lo previsto o interrumpir a su participación. En todo caso se le informará de los motivos de su retirada.

Si usted es grupo control (no padece enfermedad inflamatoria intestinal):

En una primera visita en la consulta del servicio de Digestivo le informarán sobre este estudio y le darán el consentimiento informado. Solicitaremos una muestra de heces para realizar análisis de genotipo y calprotectina fecal. La alternativa es no participar sin más.

¿Qué molestias o inconvenientes tiene?

Su participación no implica molestias adicionales a las de la práctica asistencial habitual. No se espera que Ud obtenga ningún beneficio directo por participar en el estudio. La investigación pretende descubrir aspectos desconocidos o poco claros sobre la relación entre

la microbiota y la enfermedad inflamatoria intestinal. Esta información podrá ser de utilidad en un futuro para otras personas.

¿Obtendré algún beneficio por participar?

No se espera que Ud. obtenga beneficio directo por participar en el estudio. La investigación pretende descubrir aspectos desconocidos o poco claros sobre la microbiota en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. Esta información podrá ser de utilidad en un futuro para otras personas.

¿Recibiré la información que se obtenga del estudio?

Si Ud. lo desea, se le facilitará un resumen de los resultados del estudio.

También podrá recibir los resultados de las pruebas que se realicen con sus muestras si así lo solicita dirigiéndose al investigador. Estos resultados pueden no tener aplicación clínica ni una interpretación clara, por lo que, si quiere disponer de ellos, deberían ser comentados con el médico del estudio.

¿Se publicarán los resultados de este estudio?

Los resultados de este estudio serán remitidos a publicaciones científicas para su difusión, pero no se transmitirá ningún dato que pueda llevar a la identificación de los participantes.

¿Cómo se protegerá la confidencialidad de mis datos y muestras?

El tratamiento, comunicación y cesión de sus datos se hará conforme a lo dispuesto por la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. En todo momento, Ud. podrá acceder a sus datos, oponerse, corregirlos o cancelarlos, solicitándolo ante el investigador

Solo el equipo investigador, y las autoridades sanitarias, que tienen el deber de guardar la confidencialidad, tendrán acceso a todos los datos recogidos por el estudio. Se puede transmitir a terceros información que no pueda ser identificada. En el caso de que alguna información sea transmitida a otros países, se realizará con un nivel de protección de los datos equivalente, como mínimo, al exigido por la normativa de nuestro país.

Sus datos y muestras biológicas serán recogidos y conservados hasta finalizar el estudio de modo:

- **Codificados**, que quiere decir que poseen un código con el que el equipo investigador podrá conocer a quien pertenecen.

El responsable de la custodia de los datos y muestras es la Dra Iria Bastón Rey, y el lugar de realización de los análisis previstos en este estudio es la Universidad de Santiago de Compostela y el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

Al terminar el estudio, conforme al RD 1716/2011, sus muestras biológicas serán

***Codificadas**, conservados en la colección para la línea de investigación: Estudio de genotipos bacteroidales en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal nº C. 0004204 dada de alta en la Red Nacional de Biobancos, de la que es titular Iria Bastón Rey. En este caso las muestras podrán ser utilizadas para otros estudios relacionados y previo informe favorable de un Comité de Ética de la Investigación.*

- *Ud. tendrá a su disposición, si así se lo solicita al investigador/a toda la información sobre los estudios de investigación en los que se utilice la muestra. Un Comité de Ética decidirá en qué casos será imprescindible que se le envíe información de manera individualizada.*
- *Sus datos y muestras quedarán bajo la custodia del responsable de la colección, y solo tendrán acceso a datos que lo identifiquen el responsable y su equipo. Las muestras solo podrán ser cedidas a otros grupos con su consentimiento.*
- *Sepa que puede restringir el uso de sus datos y muestras dirigiéndose al responsable de la colección (Iria Bastón Rey)*
- *En caso de cierre de la colección las muestras serán destruidas*

Ud. podrá solicitar la destrucción o anonimización de su muestra en cualquier momento, así como la revocación de lo contenido en este documento dirigiéndose al investigador principal.

(Iria Bastón Rey; telf. 981950364/ iria.baston.rey@sergas.es) . Tiene que saber que esto no será de aplicación a los datos resultantes de los análisis que ya fueran hechos

¿Existen intereses económicos en este estudio?

El investigador no recibirá retribución específica por la dedicación al estudio.

Ud. no será retribuido por participar.

¿Cómo contactar con el equipo investigador de este estudio?

Ud. puede contactar con la Dra Bastón Rey en el teléfono 981950364 o correo electrónico iria.baston.rey@sergas.es

Muchas gracias por su colaboración

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: Modificación de los genotipos bacteroidales en pacientes con colitis ulcerosa y su aplicación en la práctica clínica.

Yo,

- *Leí la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, pude conversar con: _____ y hacer todas las preguntas sobre el estudio necesarias.*
- *Comprendo que mi participación es voluntaria, y que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.*
- *Accedo a que se utilicen mis datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.*
- *Presto libremente mi conformidad para participar en este estudio.*

Respecto a la conservación DE LAS MUESTRAS recogidas en este estudio *[escoger la/las opciones eliminando la/las que no sean de aplicación en función de las indicadas en la hoja de información]*

- ☐ No accedo a que sean conservadas una vez terminado el estudio.
- ☐ Accedo a que sean conservadas anonimizadas.
- ☐ Accedo a que sean conservadas codificadas, en la colección de muestras biológicas, para la línea de investigación *Estudio de genotipos bacteroidales en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal n° C. 0004204*

Fdo.: El/la participante,

Fdo.: El/la investigador/a que solicita el
consentimiento

Nombre y apellidos: _____

Nombre y apellidos:

Fecha:

Fecha:

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO ANTE TESTIGOS PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN (para los casos en los que el participante no pueda leer/escribir)

El testigo imparcial ha de identificarse y ser una persona ajena al equipo investigador

TÍTULO: Modificación de los genotipos bacteroidales en pacientes con colitis ulcerosa y su aplicación en la práctica clínica.

Yo _____, como testigo imparcial, afirmo que en mi presencia:

- Se le leyó _____ la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se le entregó, y pudo hacer todas las preguntas sobre al estudio.
- Comprende que su participación es voluntaria, y que puede retirarse del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Accede a que se utilicen sus datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.
- Presta libremente su conformidad para participar en este estudio.

Respecto a la conservación e utilización DE LAS MUESTRAS recogidas en este estudio [escoger la/las opciones eliminando la/las que no sean de aplicación en función de las indicadas en la hoja de información]

- ☐ No accedió a que sean conservadas una vez terminado el estudio.
- ☐ Accedió a que sean conservadas anonimizadas.

- ☐ Accedió a que sean conservadas codificadas, en la colección de muestras biológicas, para la línea de investigación *Estudio de genotipos bacteroidales en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal nº C. 0004204*

Fdo.: El/la testigo

Fdo.: El/la investigador/a que solicita el
consentimiento

Nombre y apellidos: _____

Nombre y apellidos:

Fecha:

Fecha:

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA REPRESENTANTE LEGAL PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: Modificación de los genotipos bacteroidales en pacientes con colitis ulcerosa y su aplicación en la práctica clínica.

Yo, _____ (nombre y apellidos), representante legal de
 _____ (nombre y apellidos):

- *Leí la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, pude conversar con _____ y hacer todas las preguntas sobre el estudio.*
- *Comprendo que su participación es voluntaria, y que puede retirarse del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.*
- *Accedo a que se utilicen sus datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.*
- *Presto libremente mi conformidad para que participe en este estudio.*

*Respecto a la conservación y utilización DE LAS MUESTRAS recogidas en este estudio
 [escoger la/las opciones eliminando la/las que no sean de aplicación en función de las
 indicadas en la hoja de información]*

- ☐ No accedo a que sean conservadas una vez terminado el estudio
- ☐ Accedo a que sean conservadas anonimizadas.

- ☐ Accedo a que sean conservadas codificadas, en la colección de muestras biológicas, para la línea de investigación. *Estudio de genotipos bacteroidales en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal nº C. 0004204*

Fdo.: El/la representante legal,

Fdo.: El/la investigador/a que solicita el consentimiento

Nombre y apellidos: _____

Nombre y apellidos:

Fecha:

Fecha:

9.4. Permiso uso de imágenes

Figura 1: Imagen adaptada de Huttenhower C y cols [120]. Nature. Copyright © 2012.

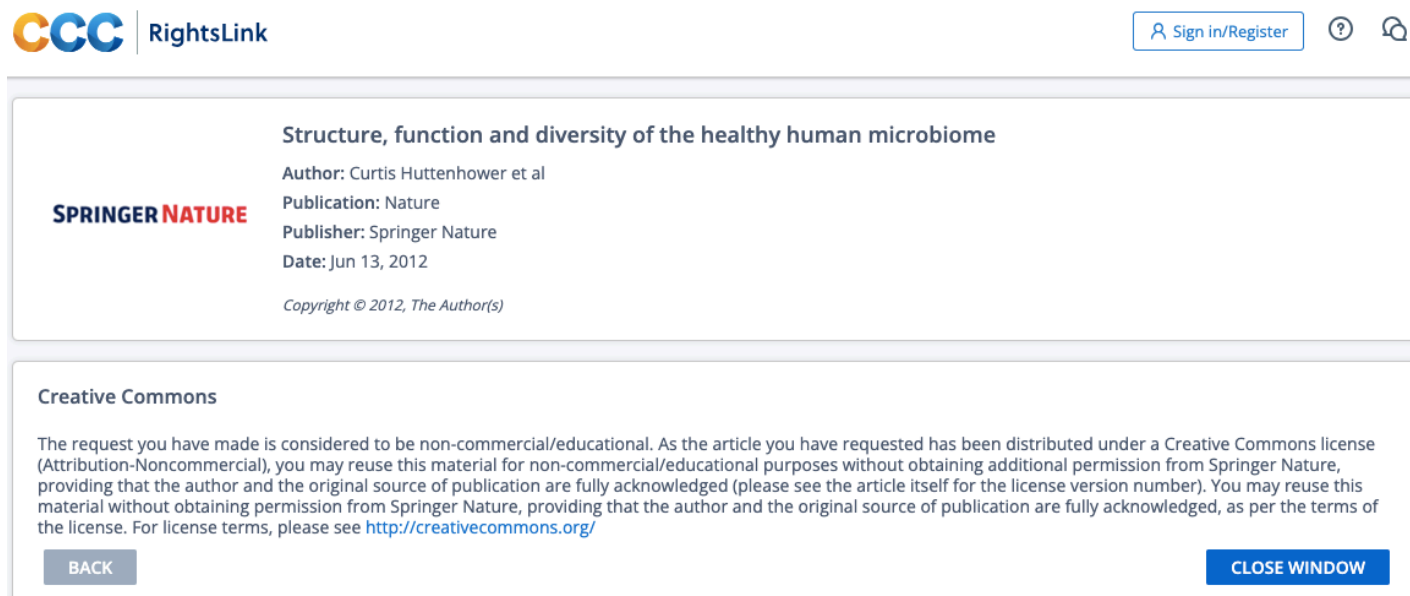
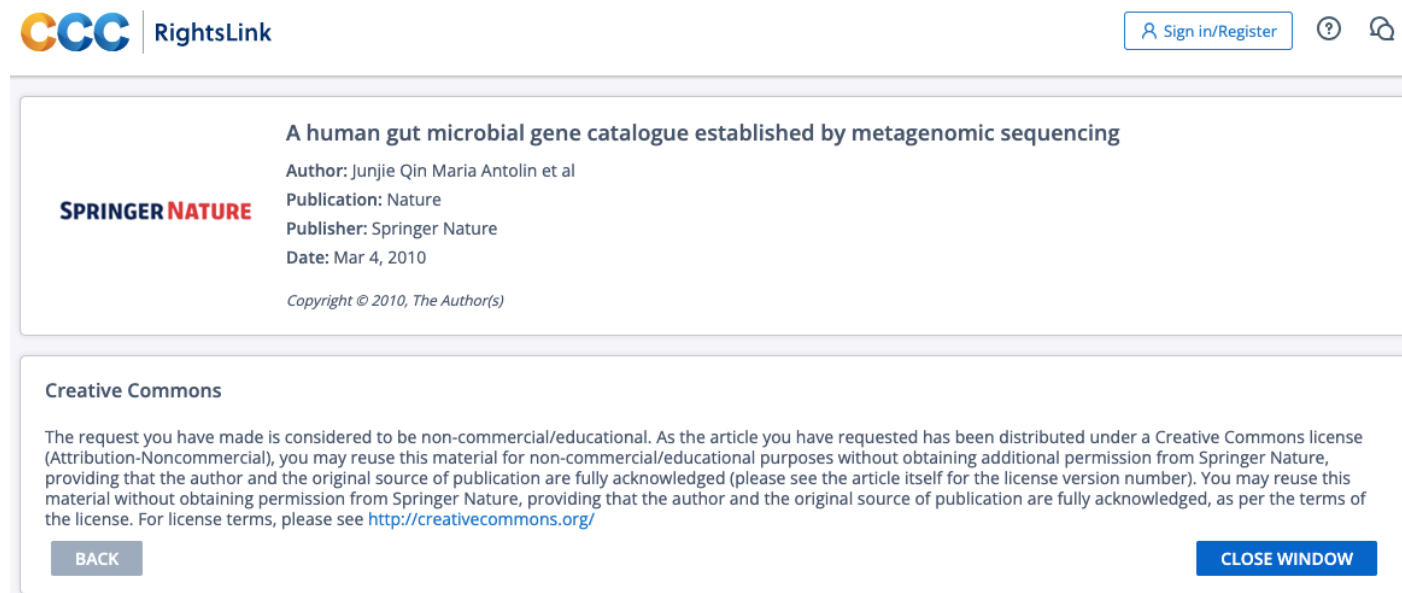


Figura 2: Imagen de Qin y cols [119]. Nature. Copyright © 2010.



Esta tesis ha profundizado en la relación entre la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y la microbiota intestinal, con un enfoque específico en el filo Bacteroidetes. Se ha estructurado en tres partes, un análisis retrospectivo inicial que incluyó a 52 pacientes con EII, donde se tomaron muestras de biopsias colónicas; un estudio prospectivo que incluyó a 17 pacientes recién diagnosticados de colitis ulcerosa y 17 individuos sanos con toma de biopsias colónicas y muestras fecales; y finalmente, un estudio experimental llevado a cabo en ratones. Durante este estudio, se ha identificado un genotipo específico denominado C4 que se ha asociado a la presencia de actividad inflamatoria y hemos creado una sonda de reconocimiento para su detección.