

MONITORATGE DE LA MALALTIA  
INFLAMATÒRIA INTESTINAL EN LA PRÀCTICA  
CLÍNICA MITJANÇANT MARCADORS DE LA  
MICROBIOTA INTESTINAL EN MOSTRES  
FECALS. ESTUDI PROSPECTIU

**Josep Oriol Miquel Cusachs**

Per citar o enllaçar aquest document:  
Para citar o enlazar este documento:  
Use this url to cite or link to this publication:  
<http://hdl.handle.net/10803/674008>



<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ca>

Aquesta obra està subjecta a una llicència Creative Commons Reconeixement

Esta obra está bajo una licencia Creative Commons Reconocimiento

This work is licensed under a Creative Commons Attribution licence



## TESI DOCTORAL

**Monitoratge de la malaltia inflamatòria intestinal en la pràctica clínica mitjançant marcadors de la microbiota intestinal en mostres fecals. Estudi prospectiu.**

**Josep Oriol Miquel Cusachs**

**2021**





## TESI DOCTORAL

Monitoratge de la malaltia inflamatòria intestinal  
en la pràctica clínica mitjançant marcadors de la  
microbiota intestinal en mostres fecals.

Estudi prospectiu.

Josep Oriol Miquel Cusachs

2021

Programa de Doctorat en Biologia Molecular, Biomedicina i Salut.

Dirigida per: Prof. Dr. Jesús Garcia Gil

Codirector: Dr. Xavier Aldeguer Manté

Tutor: Prof. Dr. Jesús Garcia Gil

Memòria presentada per optar al títol de doctor per la  
Universitat de Girona





El Prof. Dr. Jesús García Gil i el Dr. Xavier Aldeguer Manté,

DECLAREM:

Que el present treball titulat MONITORATGE DE LA MALALTIA INFLAMATÒRIA INTESTINAL EN LA PRÀCTICA CLÍNICA MITJANÇANT MARCADORS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN MOSTRES FECALS. ESTUDI PROSPECTIU, que presenta el candidat JOSEP ORIOL MIQUEL CUSACHS per a l'obtenció del títol de doctor, ha estat realitzat sota la nostra direcció.

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

Signatura, Dr. Xavier Aldeguer,

Signatura, Prof. Jesús García-Gil

Girona, Juliol de 2021.



*“La vida és ara”*

Dita popular “mil·lenista”.

“La necessitat de la raó no s’inspira en la recerca de la veritat, sinó en la recerca del sentit. I la veritat i el significat no són el mateix. La fal·làcia bàsica, que té prioritat sobre totes les fal·làcies metafísiques específiques, és interpretar el significat segons el model de la veritat.”

Hannah Arendt, *The Life of the Mind* 1978, New York





*A la Cris,*

*Per guiar-me en algunes ocasions i per seguir en d'altres. Un pal de paller i el meu far.*

*Per la família que hem fet, els senyors (Aniol i Iu), que em doneu tot el que necessito per ser feliç.*

*Per la meua família de sang i per la postissa, sense vosaltres no sabria quina cançó tocar.*

*I als meus amics, per ser quelcom més en aquest viatge estrany que és la vida.*



## Agraïments

Mai m'hauria imaginat que escriure una tesi fos una empresa tant complicada. És impossible comptar totes les hores efectives, i no efectives, dedicades al projecte. Tanmateix, m'ha aportat un coneixement addicional que d'altre manera mai hauria adquirit. La tesi és tot un tancament d'etapa; i és difícil poder agrair a tothom per escrit el suport i l'ajuda.

He hagut d'aprendre tècniques de laboratori, tècniques de recollida de dades i processament, tècniques de redacció científica, estadística bàsica, R, Excel i Word nivell avançat i, sobretot, a raonar i perfeccionar el mètode científic, que és un dels objectius del doctorat.

En primer lloc agrair al doctor Aldeguer per iniciar-me en el món de la recerca biomèdica. Sense la seva motivació i perseverança inicial, segurament no m'hauria posat mai a fer recerca, i ni molt menys acabar fent una tesi. Has fet que la recerca m'agradi, Gràcies Xevi! També vull agrair al Prof. Jesús per acceptar fer de director d'aquesta tesi i ser una de les *alma mater* d'aquest projecte de la microbiota en malalties digestives. A la Mariona, quan al principi dubtava si continuar o no amb la tesi, em va animar a continuar el projecte; i vist en perspectiva li estic agraït, Gràcies! I als companys de GoodGut que hem compartit pacients, sou molt bona gent! I per la beca de la Associacion Espanyola de Gastroenterologia .

A tot l'equip de investigació del Grup de malalties digestives i microbiota del Servei de digestiu/ IdIBGi (Carlota, Montse; i totes les infemer@s de inflamàtoria) i al personal del biobanc de l'IdIBGi; però sobretot a l'Anna Bahí perquè ha tingut paciència infinita amb mi, buscant mostres; i per ensenyar-me a pipetejar!). I en Marc, que has tingut l'honor de convertir-te en el meu guru acadèmic. Has estat molt important per aquesta tesi i per mi, sempre disposat a contestar-te els 2 milions de dubtes que tenia (i resoldre's), i sobretot per estar colze a colze amb mi en la present tesi i ser el metrònom de molts aspectes de la tesi. Sense els teus consells i la teva orientació, penso que aquest projecte no hauria anat endavant!!! Espero que no sigui l'últim projecte que fem plegats. A la Mireia Vila, que tantes hores hem compartit en aquest projecte. Tu has pogut acabar abans que jo i ja et vaig dir que això té molt de mèrit, felicitats!

Als companys del servei de Digestiu de l'hospital Trueta que m'han recolzat, i als companys del Consorci Hospitalari de Vic que no oblidó. Ja sabeu com de pesat que puc ser a vegades! Al personal de l'equip de investigació i al personal del laboratori per deixar-me guardar les mostres al congelador-80! I al Dr. Saló, que sempre em vas recolzar en poder fer investigació al servei. I sobretot no em vull oblidar d'en Carles Leal, que ets una de les millors coses que em vaig emportat de Vic; tot i que en el fons som amics epistolars 2.0.

No m'oblidó de la Maria Buxo, on malgrat la primera malaguanyada reunió que vam fer per discutir el pla estadístic, vist amb perspectiva els teus canvis en el disseny van ser importants.

A en Benet per la revisió i per ser part de la família. A la M<sup>a</sup> Angels per les solucions del Word. Gràcies a Optimot ([www.optimot.cat](http://www.optimot.cat)) i Termcat ([www.termcat.cat](http://www.termcat.cat)) per ser la meua

referència lingüística .Gràcies a la BSO com a leitmotiv creatiu de fons: NOFX, Sidonie, Godsped, you! Black emperor, Pau Vallvè, Tame Impala, Ferran Palau entre molts d'altres.

I sobretot, al meu tendó d'Aquil·les trencat. Sense la teva ruptura espontània potser no hauria acabat la tesi; i com que d'un gran mal en surt un gran bé, és millor sempre veure-ho en positiu! Malgrat em va costar molts mesos acceptar el què havies fet, ara veig que m'has fet canviar a nivell individual i créixer, i replantejar-me el què sóc i cap on vaig. Gràcies!

## Llista d'Abreviacions

- 2X: Risc augmentat per 2, el doble.
- 5-ASA: Salicilats, si tòpic afegir *t* (5-ASAt).
- 6MP: 6-mercaptapurina
- ATB: Antibiòtics.
- Ac: Anticòs.
- Act: Activitat clínica de la malaltia.
- ADA: Adalimumab
- ADN / ARN: Àcid desoxiribonucleic / àcid ribonucleic.
- Ag: Antigen.
- ALB: Albúmina.
- ANA: Anticòsos anti-Nuclear.
- AntiTNF: Fàrmac anti tumor necrosi factor.
- AP: Anatomia patològica.
- AZA: Azatioprina.
- BEE: Barrera Epitelial Efectiva.
- Bio: Fàrmacs biològics.
- Bude: Budesonida.
- CCR: Càncer Colorectal.
- Cdif: *Clostridioides difficile*.
- CE: Corticoesteroides.
- CEIC: Comitè d'ètica i investigació assistencial.
- CI: Consentiment Informat.
- CM: Curació mucosa.
- CP: Calprotectina fecal.
- CS: Controls sans.
- CU: Colitis ulcerosa.
- CY: Ciclosporina.
- DE: Desviació estàndard.
- DMI / DMII: Diabetis Mellitus tipus I i tipus II.
- DS: Disbiosi.
- EC: *Escheríchia coli*.
- ET: Eubacteris totals.
- FCS: Colonoscòpia
- FdR: Factor de Risc.
- FP: *Faecalibacterium prausnitzii*.
- FT: Fitxa tècnica del medicament.
- GALT: Teixits limfoide associada a la mucosa intestinal ( Gut en *anglès*).
- GLM: Golimumab.
- g: gram.
- Hb: Hemoglobina.
- HBI: Índex Harvey- Bradshaw, acrònim en anglès.
- HJT: Hospital universitari de Girona "Dr. Josep Trueta".
- IB: Inici biològic.

- IBD-Q: Índex de qualitat de vida de la MII, acrònim en anglès.
- IdIBGi: Institut d'investigació biomèdica de Girona.
- IFX: Infliximab.
- Ig: Immunoglobulina.
- IMM: Immunomoduladors.
- IP: Intestí prim.
- IQ: Intervenció quirúrgica
- IV: Intravenós.
- MC: Malaltia de Crohn.
- Mg: Mil·ligram.
- MI: Microbiota intestinal.
- MII: Malaltia inflamatòria intestinal.
- MiM: Material i mètodes.
- MTX: Metotrexat.
- OR: *Odds Ratio* en anglès.
- PCR: Proteïna C reactiva.
- pe: Per exemple.
- PT: Punt de tall.
- RB: Retirada biològic.
- Rem: Remissió clínica de la malaltia.
- RP: Remissió profunda.
- RPQ: Recurrència post quirúrgica.
- SC: Subcutani.
- SCCAI: Simple Colitis Clinical Index.
- Sd. : Síndrome.
- SES-CD: Índex *Simple Endoscopic Severity Crohn's Disease*.
- SII: Síndrome intestí irritable.
- TBC: Tuberculosi.
- TGI: Tracte gastrointestinal.
- TNF $\alpha$ : Factor de Necrosi Tumoral alfa ( $\alpha$ ), acrònim en anglès.
- TTM: Tractament .
- VDZ: Vedolizumab.
- VGS: Videogastroscòpia.
- Vs.: Versus: *en front a , o comparat amb*.
- W-D: "Western-Diet".

## Índex

Agraïments.....	1
Llista d'Abreviacions.....	3
Llistat de figures.....	7
Llistat de taules.....	9
Resum / Resumen / Abstract.....	11
1- Introducció.....	15
1.1 Concepte de microbiota intestinal (MI):.....	15
1.2 Evolució històrica:.....	15
1.3 Composició de la microbiota Intestinal:.....	16
1.4 Funció de la microbiota intestinal:.....	21
1.5 Concepte de Disbiosi en la MII.....	22
1.6 Bacteris estudiats.....	24
1.6.1-.Faecalibacterium prausnitzii (FP).....	24
1.6.2-.Escherichia coli (EC).....	26
1.7 Malaltia inflamatòria intestinal (MII): Malaltia de Crohn i Colitis ulcerosa.....	27
1.7.1-. Etiologia:.....	27
1.7.2-. Epidemiologia:.....	34
1.7.3-. Factors de risc (FdR):.....	35
1.7.4-. Clínica:.....	38
1.7.5-. Història Natural.....	40
1.7.6-. Classificació:.....	41
1.7.7-. Diagnòstic:.....	44
1.7.8-. Tractament.....	45
2- Hipòtesi i objectius.....	53
2.1- Antecedents i experiència prèvia del grup.....	53
2.2- Justificació del treball.....	54
2.3- Hipòtesi de treball:.....	55
2.4- Objectius:.....	55
3- Materials i Mètodes:.....	57
3.1 Disseny estudi.....	57
3.2 Població a estudi i cronograma.....	59
3.3 Criteris inclusió /exclusió:.....	60
3.4 Variables principals a analitzar.....	61
3.4.1-. Dades demogràfiques :.....	61
3.4.2-. Variables a estudi.....	61
3.5 Metodologia de recollida variables.....	69
3.6 Justificació de la utilització de mostres fecals.....	70
3.7 Metodologia per estudiar la MI.....	70
3.8 Explicació índex FEI.....	73
3.9 Mètode estadístic.....	74
4 Resultats.....	77
4.1 Dades demogràfiques basals dels pacients.....	77



4.2 Dades per marcadors analítics:.....	81
4.3 Dades d'activitat clínica i endoscòpica: .....	82
4.4 Descripció dades microbiològiques: .....	87
4.4.1 Descripció global dades microbiològiques.....	87
4.4.2 Descripció dades microbiològiques desglossada per malaltia (MC/CU).....	88
4.4.3 Descripció dades analítiques i evolució temporal.....	89
4.5 Controls sans (CS):.....	91
4.6 Correlació entre indicadors clínics i microbiològics.....	92
4.7 Determinació del FEI com a biomarcador d'activitat i remissió en T0.....	95
4.8 Comparació de les variables microbiològiques entre pacients amb MII respecte Controls sans (CS) en T0. ....	96
4.9 Comparació marcadors analítics i microbiològics segons activitat i remissió per a T0, T1 i T2.....	99
4.10 Descripció concordança dels indicadors microbiològics amb la CP per discriminar Activitat de la remissió.....	105
4.11 Descripció de l'aplicabilitat dels marcadors microbiològics en diferents escenaris clínic.....	106
5-. Discussió .....	109
5.1 Característiques demogràfiques globals dels pacients.....	110
5.1.1 Característiques clíniques dels pacients en relació a la malaltia.....	111
5.2 Dades paràmetres analítics globals.....	113
5.3 Anàlisi de la utilitat dels índex d'activitat clínics i endoscòpics.....	114
5.4 Anàlisi dades microbiològiques.....	117
5.4.1- Anàlisi de les dades microbiològiques globals.....	117
5.4.2-. Descripció de l'evolució de les mitjanes microbiològiques desglossat per malaltia a cada temps.....	117
5.4.3-.Anàlisi de l'evolució dels valors analítics desglossats per malaltia i temps.....	121
5.5 Anàlisi dels resultats de CS.....	122
5.6 Anàlisi de les correlacions marcadors analítics i microbiològics.....	124
5.7 Determinació del FEI com a biomarcador d'activitat i remissió en T0 .....	128
5.8.- Anàlisi de la comparació de les variables microbiològiques de cohort MII respecte dels CS en T0.....	129
5.9 Anàlisi de la utilitat dels marcadors analítics i microbiològics per discriminar entre activitat i remissió.....	132
5.10 Anàlisi concordança dels indicadors microbiològics amb la CP per discriminar Activitat de la remissió.....	135
5.11 Anàlisi de l'aplicabilitat dels marcadors microbiològics en diferents escenaris clínic. .....	136
6-. Aplicabilitat futura i limitacions estudi: .....	141
7-. Conclusions: .....	143
8-. Bibliografia : .....	145
9-. Annex.....	159

## Llistat de figures

Figura 1.1: Representació esquemàtica de la abundància relativa dels majors filums de la MI humana.....	17
Figura 1.2: Variació de la microbiota intestinal segons l'edat.....	18
Figura 1.3: Variació específica de la MI en funció de l'anatomia i pH.....	20
Figura 1.4: Subconjunts de cèl·lules immunes i citocines en la MII.....	32
Figura 1.5: Prevalença de la MII a nivell mundial.....	35
Figura 1.6: Piramidal del tractament de la MII.....	46
Figura 1.7: Algoritme esquemàtic del tractament de la MC.....	47
Figura 3.8: Fórmula índex FEI.....	73
Figura 4.9: Descripció de l'evolució dels paràmetres analítics per a la malaltia global.....	82
Figura 4.10: Descripció dels resultats classificats per l'Índex H-B .....	84
Figura 4.11: Descripció dels resultats segons índex SCCAI.....	84
Figura 4.12: Descripció de la mostra classificada segons l'índex endoscòpic SES-CD.....	85
Figura 4.13: Descripció dels resultats classificats segons Índex de Mayo .....	86
Figura 4.14: Representació gràfica de la AUC pel FEI en T0 per MII global.....	96
Figura 4.15A: Comparativa variables microbiològiques per MII global respecte dels CS en T0 .....	97
Figura 4.15B: Comparativa variables microbiològiques desglossat per tipus de MII (MC i CU) respecte dels CS en T0.....	97
Figura 4.15C: Mediane dels valor del FEI en T0 .....	98
Figura 16A descripció de la microbiota i 16B descripció dels paràmetres analítics per MII global.....	101
Figura 17A: descripció de la microbiota i 17B descripció dels paràmetres analítics per la CU.....	102
Figura 18A: descripció de la microbiota i 18B, descripció dels paràmetres analítics per la MC.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 4.19A: Descripció dels paràmetres analítics del grup Inici Biològic (IB) i Retirada Biològic (RB) entre els 2 punts temporals (T0 i T1).....	107
Figura 4.19B: Descripció comportament dels marcadors microbiològics del grup Inici Biològic (IB) i Retirada Biològic (RB) entre els 2 punts temporals.....	107
Figura 5.20: Resum de la distribució dels fàrmacs desglossat per malaltia en T0. ....	112
Figura 5.21: Evolució esquemàtica de les mitjanes dels microorganismes desglossats per malaltia i per temps.....	118
Figura 5.22: Relació de valors mitjans índex FEI. ....	128



## Llistat de taules

Taula 1.1: Composició genèrica quantitativa de la MI en el tracte gastrointestinal .....	18
Taula 1.2: Factors ambientals relacionats amb els hàbits de vida moderns i la seva relació amb la composició de la MI.....	21
Taula 1.3: Evidència del rol de MI en la patogènia de la MII.....	23
Taula 1.4: Característiques diferencials principals entre MC i CU.....	28
Taula 1.5: Relació dels principals factors de risc ambientals per a la MII (CU /MC).....	36
Taula 1.6: Resum dels diferents patrons de comportament de la MC.....	39
Taula 1.7: Classificació de Montreal de la MC.....	42
Taula 1.8: Classificació de la CU segons l'extensió i les manifestacions clíniques principals .....	43
Taula 1.9: Classificació de Montreal de la severitat de la CU .....	43
Taula 1.10: Criteris diagnòstics de Lennard-Jones per a la MC i la CU.....	44
Taula 1.11 : Maneig general simplificat de la CU.....	48
Taula 1.12: Resum de les indicacions i posologies dels fàrmacs biològics inclosos en la present tesi.....	50
Taula 3.13: Resum dels estudis sobre els valors de la CP per a descartar malaltia activa.....	62
Taula 3.14: Classificació Índex simple de Harvey-Bradshaw.....	66
Taula 3.15: Índex SES-CD.....	67
Taula 3.16: Valors Índex de Mayo Global .....	69
Taula 3.17: Resum dels encebadors, sondes del gen 16S rARN i condicions de la qPCR utilitzades.....	72
Taula 4.18: Resum pacients inclosos en T0.....	77
Taula 4.19: Característiques demogràfiques globals dels pacients inclosos en l'estudi en el moment T0 .....	78
Taula 4.20: Descripció de les característiques clíniques dels pacients inclosos.....	80
Taula 4.21A: Distribució dels pacients segons classificació IBDQ.....	86
Taula 4.21B: Relació de les mitjanes del valor IBDQ segons tipus malaltia i temps.....	87
Taula 4.22: Descripció del perfil microbiològic global i dels CS amb evolució temporal... ..	88
Taula 4.23: Anàlisi de la MI en relació amb el tipus de malaltia i l'evolució temporal.....	89
Taula 4.24: Relació MI amb els paràmetres analítics i l'evolució temporal .....	90
Taula 4.25A: Descripció dades demogràfiques CS.....	91
Taula 4.25B: Descripció dades analítiques dels CS .....	92

Taula 5.26:Resum de les correlacions significatives entre variables desglossat per malaltia. ....	93
Taula 4.27-. Relació de AUC i els PT per al FEI en temps 0 .....	95
Taula 4.28: Evolució clínica dels pacients classificats en activat i remissió en T0.....	99
Taula 4.29: Comparativa dels valors dels bacteris classificats en activitat i remissió amb els controls sans en T0.....	104
Taula 4.30: Concordança dels diferents indicadors amb la CP en T0.....	105

## Resum

La microbiota intestinal (MI), entre altres factors, desenvolupa un paper clau en el manteniment de l'homeòstasi intestinal i la patogènesi de la malaltia inflamatòria intestinal (MII) que inclou la Malaltia de Crohn (MC) i la Colitis ulcerosa (CU). L'activitat de la MII, i conseqüentment de la inflamació intestinal, modifica la composició de la MI en un patró alterat respecte dels control sans (CS) anomenat disbiosi. Aquest grau de disbiosi és un bon indicador de l'activitat de la MII i pot ser utilitzat pel seu monitoratge.

L'objectiu de la present tesi és la quantificació del grau de disbiosi de la MI per determinar-ne la utilitat com a biomarcador per monitorar l'activitat de la MII respecte dels CS. Es van incloure prospectivament 80 pacients amb MII d'una cohort de 2 hospital terciaris de Catalunya (Girona i Vic). Com a estudi de pràctica clínica, es van incloure pacients en remissió clínica (Rem), definida per un valor de la Calprotectina fecal (CP) <250 µg/gr i en activitat (Act), definida per CP>250 µg/gr i que presentaven malaltia de lleu a moderada. Es van recollir mostres de sang (per determinar PCR, Albúmina i Hemoglobina (Hb)) i una fecal (per a determinar nivells de CP i quantificar la MI). S'ha quantificat mitjançant tècniques de qPCR en temps real el DNA bacterià de 3 grups bacterians (*Faecalibacterium prausnitzii* (FP), *Escherichia coli* (EC) i els eubacteris totals (ET)) altament representatius del grau de disbiosi de la MI. La relació entre FP i EC es calcula a través de un índex anomenat FEI (relació FP/EC) que quantifica de manera simple el grau de disbiosi de la MI. Es van recollir dades dels índex endoscòpics de la MII (SES-CD i Índex de Mayo), d'activitat (HBI i SCCAI) i de qualitat de vida (IBD-Q) i els marcadors habituals d'activat (Hb, PCR, CP i Alb) per comparar amb els indicadors microbiològics (FEI). El període de seguiment va ser de 6 mesos amb mostres cada 3 mesos (T0, T1 i T2).

L'anàlisi dels resultats va mostrar que els valors de PCR i CP mostraven diferències significatives entre les 3 mitjanes temporals i els 2 tipus de malaltia; i entre els valors classificats com activitat o remissió. La MI de la MII respecte dels CS es va caracteritzar per una menor abundància relativa de FP, i major abundància d'ET, significativament. Es va observar un augment no significatiu de l'abundància d'EC. El tipus de malaltia va influenciar en els nivells de FP, EC i FEI, de forma significativa. El valor FEI mitjà va ser inferior en els pacients amb MC respecte de la CU indicant major disbiosi en la MC. Les 2 MII van mostrar un valor FEI inferior significativament respecte dels CS; per tant les 2 malalties es comporten diferent en la cohort. Es va determinar un punt de tall del FEI com a biomarcador d'activitat en T0 (1,869). L'índex FEI va mostrar correlació significativa amb la PCR, l'Hb i l'índex de Mayo. L'abundància relativa de FP, ET i l'índex FEI van mostrar diferències significatives entre les mitjanes del grup activitat i el grup remissió, tant per MC com per CU.

La utilització dels marcadors microbiològics de la MI permeten diferenciar entre tipus MII i CS; i entre activitat i remissió. La combinació de PCR, CP i FEI pot esdevenir un potencial biomarcador d'activitat de la MII.

## Resumen

La microbiota intestinal (MI), entre otros factores, desarrolla un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) que incluye la Enfermedad de Crohn (MC) y la Colitis ulcerosa (CU). La actividad de la EII, y consecuentemente de la inflamación intestinal, modifica la composición de la MI en un patrón alterado respecto de los Controles sanos (CS) llamado disbiosis. El grado de disbiosis es un buen indicador de la actividad de la EII y puede ser utilizado para su monitorización.

El objetivo de la presente tesis es la cuantificación del grado de disbiosis de la MI para determinar su utilidad como biomarcador para monitorizar la actividad de la EII respecto de los CS. Se incluyeron prospectivamente 80 pacientes con EII de una cohorte de 2 hospital terciarios de Cataluña (Girona y Vic). Como estudio de práctica clínica, se incluyeron pacientes en remisión clínica de su enfermedad (Rem), definida por el valor de la Calprotectina fecal (CP) <250 mg/gr y en actividad (Act), definida por CP>250 mg/gr) que presentaron una enfermedad de leve a moderada. Se recogieron muestras de sangre (para determinar PCR, Albúmina y Hemoglobina (Hb)) y una fecal (para determinar niveles de CP y cuantificar la MI). Se ha cuantificado el DNA mediante técnicas de qPCR en tiempo real de 3 grupos bacterianos (*Faecalibacterium prausnitzii* (FP), *Escherichia coli* (EC) y eubacterias totales (ET)), altamente representativos del grado de disbiosis. La relación entre FP i EC se cuantifica a través de un índice llamado FEI (relación FP/EC) que cuantificar el grado de disbiosis. Se recogieron datos de los índices endoscópicos de la EII (SES-CD y Índice de Mayo endoscopico), de actividad (HBI y SCCAI) y calidad de vida (IBD-Q) y de los marcadores habituales (Hb,PCR,CP y Alb) para comparar con los indicadores microbiológicos (FEI). El período de seguimiento fue de 6 meses con muestras cada 3 meses (T0, T1 y T2).

El análisis de los resultados mostró que los valores de PCR y CP mostraron diferencias significativas entre las 3 medias temporales y los 2 tipos de enfermedad; y entre los valores clasificados como actividad o remisión. La MI de la EII respecto de los CS se caracterizó por una menor abundancia relativa de FP, y mayor abundancia de ET, de forma significativa. Se observó un aumento no significativo de la abundancia de EC. El tipo de enfermedad influyó en los niveles de FP, EC y FEI, de forma significativa. El valor FEI medio fue inferior en los pacientes con EC respecto de la CU indicando mayor disbiosis en la MC. Las 2 EII mostraron un valor FEI inferior significativamente respecto de los CS; por tanto las 2 enfermedades se comportan diferente en la cohorte. Se determinó un punto de corte del FEI como biomarcador de actividad en T0 (1.869). El índice FEI mostró correlación significativa con la PCR, la Hb y el índice de Mayo. La abundancia relativa de FP, ET y el índice FEI mostraron diferencias significativas entre las medias del grupo actividad y el grupo remisión, tanto para MC como por CU.

Los microorganismos analizados permiten diferenciar entre tipos EII y CS; y entre actividad y remisión. La combinación de PCR, CP y FEI puede convertirse en un potencial biomarcador de actividad de la EII.

## Abstract

The gut microbiota (GM) plays a pivotal role in the maintenance of gut homeostasis, and the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD) which includes Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). The degree of IBD activity, and therefore of inflammation, modifies the composition of the GM towards an altered pattern called dysbiosis. This IBD-dysbiosis pattern is different from healthy individuals (HI). The degree of dysbiosis is a good indicator of IBD disease activity and could be useful in monitoring IBD disease activity.

The AIM of this study is to quantify the degree of IBD dysbiosis of the GM, and determine the utility as a biomarker for monitoring IBD disease compared with HI. METHODS: 80 prospective IBD patients from a cohort of 2 tertiary hospitals from Catalonia (Girona and Vic) have been included. As a clinical practice study, we included patients with clinical Remission, defined as Faecal Calprotectin (FC) levels  $<250 \mu\text{g}/\text{gr.}$ , and Activity (defined as  $\text{FC} >250 \mu\text{g}/\text{gr.}$ ) with mild to moderate disease. A blood sample (to determine RCP, albumin and haemoglobin (Hb) levels) and stool sample (to determine Faecal calprotectin (FC) and GM analysis) have been collected. Of the fecal samples, DNA was extracted using real-time qPCR techniques and 3 bacterial groups (*Faecalibacterium prausnitzii* (FP), *Escherichia coli* (EC) and total eubacteria (TE), that are highly representative of GM dysbiosis degree, were analyzed. An index called FEI has been created to quantify GM dysbiosis. Data has been collected from Endoscopic IBD index (SES-CD and Mayo score), clinical IBD activity index (HBI and SCCAI) and quality of life index (IBD-Q) along with standard analytical disease activity markers (Hb, PCR, CP and Alb) in order to compare with microbial markers (FEI). The duration of this study is 6 months (every three months samples, T0, T1 and T2)).

The analysis of the results showed that RCP and FC levels showed significant differences between the 3 temporal points and the 2 diseases; and between values sorted as activity or remission. The IBD's GM compared to HI, was characterized by a lower FP relative abundance, and an increased TE abundance, both significantly. A non-significant increase in EC abundance was observed. Disease type influenced FP, EC, and FEI levels significantly. Median FEI values were lower in CD patients compared to UC patients, indicating greater dysbiosis in CD. The 2 IBD types showed significantly lower FEI value compared to HI, indicating that 2 IBD subtypes had distinct behaviour in the study cohort. A FEI cut-off point was calculated as an activity biomarker in T0 (1,869). FEI index showed significant correlation between RCP, Hb levels, and Mayo Index. FP, TE, and FEI index mean relative's abundance showed significant differences between activity and remission groups both for CD and UC.

Microbiological markers and FEI index were able to differentiate between IBD types and HI; and between activity and remission. The combination of RCP, FC and FEI index can become a potential IBD activity biomarker.





## 1-. Introducció.

### 1.1 Concepte de microbiota intestinal (MI):

A escala del tracte gastrointestinal (TGI) humà existeix un complex ecosistema establert, format per una part pròpia de l'organisme i un conjunt de microorganismes, que constitueixen una interrelació simbiòtica pel bon funcionament de l'homeòstasi de l'organisme i la maduresa del sistema immunitari. Tot el conjunt de microorganismes bacterians, virals, fúngics, arqueus i parasitaris del còlon es coneix com a microbiota intestinal (MI). Ens referim al microbioma intestinal a la interrelació entre microorganismes i les condicions ambientals, formant un ecosistema bacterià; específic de cada persona tant en l'aspecte quantitatiu com qualitatiu (Ley *et al* 2008; Qin *et al*, 2010).

### 1.2 Evolució històrica:

A llarg de la història de la humanitat ja es va intuir la presència dels bacteris doncs hi han descripcions en la literatura mèdica xinesa del segle IV, la qual descriu com tractar la intoxicació alimentària i la diarrea severa amb "bacteris vius" de femta de pacients sans. Una altra descripció en la medicina tradicional xinesa, la trobem en el segle XV on Li Shizhen utilitza la "sopa groga" (coneguda com a "xarop daurat") per via oral que contenia excrements secs o fermentats provinents de persones sanes per a tractar malalties abdominals (Qin *et al.* 2010).

El 1862 Louis Pasteur se li atribueix el descobriment dels anaerobis amb el cultiu de *Clostridium butyricum* en absència d'oxigen atmosfèric i es considera el pare de la microbiologia. Al començament del segle XX, nombroses descripcions de la literatura francesa i alemanya revisaven el paper dels bacteris anaeròbics en diversos tipus d'infeccions en múltiples localitzacions que produeixen la gangrena gasosa (Veillon *et al.* 1897; Schottmueller *et al.* 1910).

Clàssicament l'estudi microbiològic s'ha dut a terme a través del cultiu cel·lular pur estàndard segons els postulats de Koch. (1876) per a demostrar l'agent causal de determinades malalties infeccioses. Aquesta tècnica resulta molt econòmica però

únicament es cultiven amb mètodes habituals menys del 30% de les espècies de bacteris que habiten en el TGI (Othman *et al* 2008). El coneixement de la MI s'ha desenvolupat els darrers 20 anys en relació amb al desenvolupament de noves tècniques de seqüenciació massiva d'àcid desoxiribonucleic (ADN) i d'àcid ribonucleic (ARN) utilitzant la qPCR i el desenvolupament de encebadors i la metagenòmica (Qin *et al* 2010).

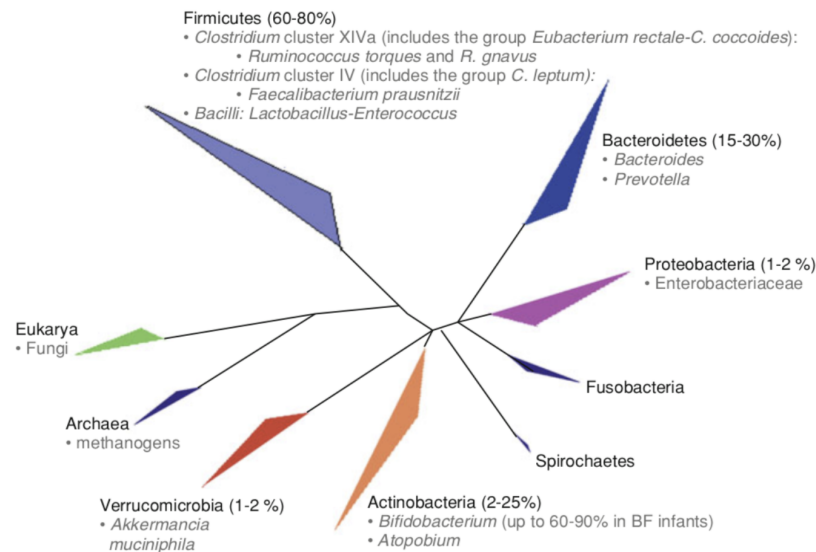
Durant els darrers anys, s'han realitzat projectes (MetaHIT finançat per la Unió Europea i el *Human Microbiome Project* (HMP), subvencionat per *National Institutes of Health* (NIH)) per desxifrar l'estructura, les funcions de la MI en relació el binomi salut/malaltia (Turnbaugh *et al.* 2007; Nash *et al.* 2017; HMP consortium 2019).

### **1.3 Composició de la microbiota Intestinal:**

La MI té en el TGI humà les condicions òptimes pel seu establiment i creixement donades les característiques de temperatura constant, extensa superfície per adherir-se (augmentada per les vellositats intestinals) i un flux constant de nutrients. El TGI constitueix un sistema ecològic amb un nombre de bacteris proper ( $10^{11}$ ) al nombre de cèl·lules humanes ( $\pm 10^{13}$ ) i un pes estimat de 2 Kgr (Sender *et al.* 2016), majoritàriament dominat per bacteris anaerobis (99-99,9%) (Eckburg *et al.* 2005).

L'any 2005 es va determinar per primera vegada la composició bacteriana de la MI mitjançant la seqüenciació del gen 16S rARN, on es va estimar la presència d'unes 1000-1500 espècies diferents amb gran variabilitat bacteriana interindividual que sembla fortament influenciada per la dieta i fàrmacs (Eckburg *et al.* 2005).

L'ecosistema intestinal humà es pot classificar al voltant de tres grups estratificats de forma estable anomenats enterotips, agrupats segons l'abundància relativa de tres gèneres: *Bacteroides* (enterotip 1), *Prevotella* (enterotip 2) i *Ruminococcus* (enterotip 3) (Lay *et al.* 2005; Qin *et al.* 2010). Es desconeixen la causa exacta de l'agrupament en enterotips encara que s'especula que pot estar relacionat amb patrons dietètics de llarga evolució (Wu *et al.* 2011; Arumugam *et al.* 2014).



**Figura 1.1:** Representació esquemàtica de la abundància relativa dels majors fílums de la MI humana. En parèntesis la proporció respecte de la MI total. Adaptat de Chen *et al.* 2013.

### 1.3.1.-Composició específica anatòmica de la microbiota del tracte digestiu:

Vies Altes i cavitat oral (Othman *et al.* 2008): Les vies respiratòries superiors i la cavitat oral acullen una microbiota oral amb una diversitat diferent a la resta del TGI formada principalment (90%) anaerobis. Els bacteris anaeròbics es defineixen com a bacteris que creixen en absència o amb poca concentració d'oxigen (Othman *et al.*, 2008).

Tracte gastrointestinal (TGI) (Chen *et al.* 2018) :

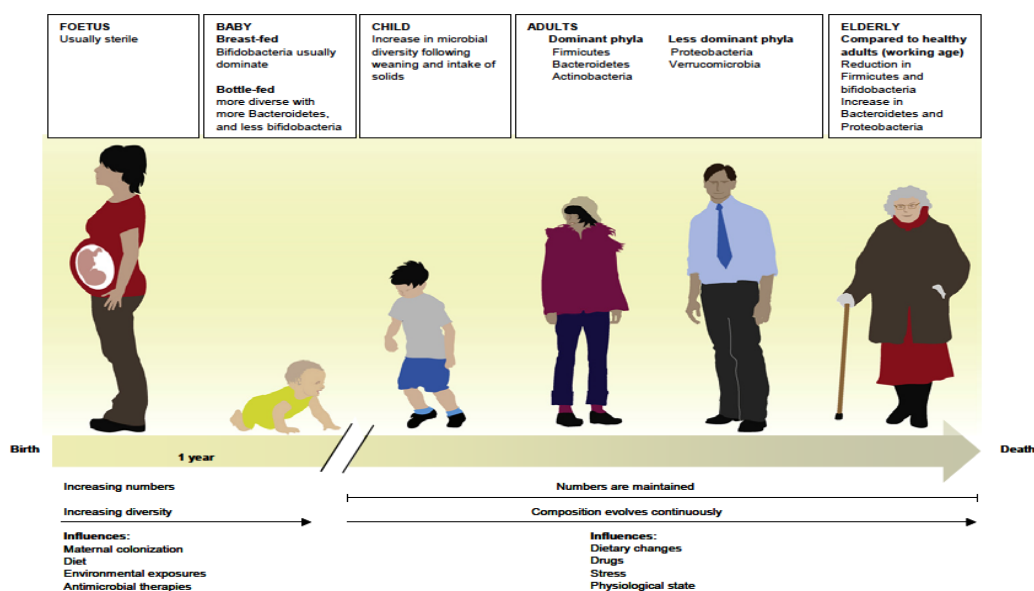
- Estómac: Inclou un nombre menor d'espècies bacterianes predominantment gram positiu (per la barrera àcida). La quantitat i diversitat bacteriana augmenta amb la pèrdua de l'acidesa gàstrica.
- Intestí prim (IP): La majoria de bacteris són transitoris per la ràpida motilitat. L'alentiment intestinal augmenta la concentració d'anaerobis facultatius que es relaciona amb el sobrecreixement bacterià intestinal.
- Còlon: Les concentracions més grans d'anaerobis estrictes (fins a 99,99%) es troben a la zona relativament estancada de ili terminal i cec .

**Taula 1.1:** Composició genèrica quantitativa de la MI en el tracte gastrointestinal. Adaptat de Ohtman *et al.* 2008; Chen *et al.* 2018; McBurney *et al.* 2019.

COMPOSICIÓ GENERAL TRACTE GASTROINTESTINAL		
LOCALITZACIÓ	Composició total (ml o gr)	Anaerobi /Aerobi ràtio
ESTÓMAC	0-10 <sup>5</sup>	1:1
INTESTÍ PRIM	10 <sup>2</sup> a 10 <sup>4</sup>	1:1
ILI TERMINAL	10 <sup>4</sup> a 10 <sup>7</sup>	1:1
COLON	10 <sup>11</sup> a 10 <sup>13</sup>	1000:1

### 1.3.2-. Evolució temporal de la microbiota intestinal:

Múltiples factors poden alterar l'equilibri de forma transitòria o definitiva tal com s'observa en la figura següent. El contacte amb la MI s'inicia immediatament després del naixement quan el TGI del lactant es colonitza ràpidament pels microorganismes de la mare i l'ambient. El tipus de part (cesària o vaginal) i la lactància materna tenen un rol per establir l'estructura de la MI del nounat (Bäckhed *et al.* 2015). La MI s'estabilitza al voltant de la pubertat (Barclay *et al.* 2009; Chen *et al.* 2013), i es manté relativament estable en adults sans sent una característica pròpia de cada individu (Liu *et al.* 2015).



**Figura 1.2:** Variació de la microbiota intestinal segons l'edat. La MI es modifica progressivament amb variacions importants en la seva configuració. Factors com dieta, fàrmacs, estres i malalties en modifiquen la composició de forma transitòria o definitiva. Adaptat de Duncan *et al.* 2013; Lopez-Siles, Tesi 2015.

### 1.3.3-. Altres component del microbioma del TGI:

El microbioma intestinal està format per bacteris (99,1%), virus (0,1%), fongs (0,2-0,3%), i arqueus (Hillmann *et al.* 2017).

Arqueus: El domini dels arqueus (procariotes) representa poques espècies, majoritàriament pertanyents a *Methanobrevibacter smithii* que s'intueix que té un rol important en el manteniment homeòstasi intestinal (Hillmann *et al.* 2017).

Fongs: El microbioma fúngic compren aproximadament el 0,03% de la microbiota fecal; aproximadament 3.300 vegades menys abundants que els bacteris (Wang *et al.* 2014). La quantitat de fongs és variable i la diversitat de fongs entre diferents individus és inferior als bacteris amb poques espècies comuns.

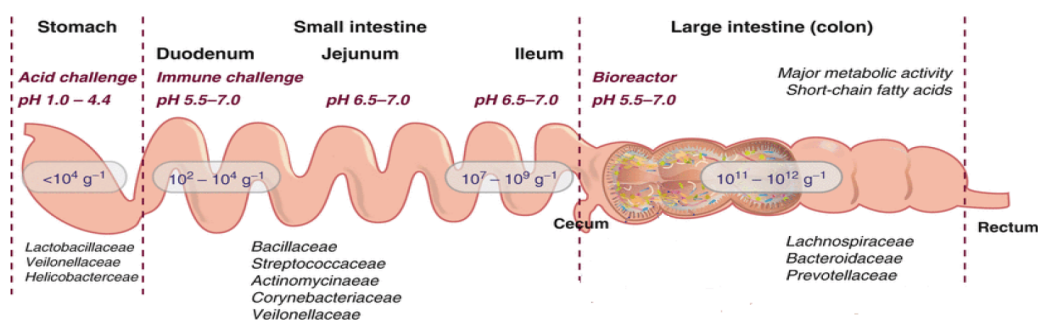
- Les anàlisis basades en cultius directes han identificat típicament *Candida* com el gènere més comú. Es van detectar 66 gèneres de fongs utilitzant piroseqüenciació massiva en 98 pacients sent els gèneres *Saccharomyces*, *Candida* i *Cladosporium* els més prevalents. El gènere *Mucor* és freqüent a Espanya respecte d'altres països. La dieta influeix en la composició de la població fúngica ja que en humans amb dieta vegetariana la prevalença dels gèneres mostra diferències (Wang *et al.* 2014).
- Els fongs es desenvolupen en el TGI des de primera infància. L'equilibri del microbioma fúngic és inestable i certes espècies com *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* o *Cryptococcus* es poden comportar com patògenes. Estudis en pacients amb MII suggereixen que en el microbioma fúngic existeix una disbiosi fúngica, donat que s'han descrit diferències en la composició respecte dels CS. La presència de fongs permanent en el TGI pot indicar que juguen un paper important en l'homeòstasi digestiva i és una línia interessant de recerca en els propers anys (Wang *et al.* 2014).

Virus: Els viroma intestinal humà ha estat poc estudiat degut a les limitacions tècniques del seu cultiu, per tant la informació disponible és limitada. La majoria les dades estan relacionades principalment amb desenvolupament de patologies concretes i no s'estudien des d'un punt de vista del viroma comensal. La dificultat per estudiar i cultivar els virus del TGI justifica la manca de dades clares al respecte. La majoria de comunitats estan formades per bacteriòfags (90%) que tenen un paper clau en mantenir l'homeòstasi intestinal perquè regulen la població

bacteriana intestinal selectivament. Per tant l'ús de virus bacteriòfags específics en el TGI podria servir per controlar poblacions bacterianes i pot tenir un paper en regular la inflamació crònica de la MII (Reyes *et al.*, 2012).

1.3.4-. Factors que determinen la composició de la microbiota intestinal:

La MI no està homogèniament distribuïda al llarg del TGI, com mostra la figura 1.3. La influència genètica és un factor important per determinar la composició de la MI, ja que membres de la mateixa família mostren una MI similar, fet que s'utilitza per la recerca de donants en trasplantament fecal. Les variacions en la composició de la MI per influència genètica podria explicar, entre altres factors, la diferent incidència geogràfica de MII (Wang *et al* 2016; Lloyd-Price *et al*, 2017).



**Figura 1.3:** Variació específica de la MI en funció de l'anatomia i pH del budell. Presenta una marcada heterogeneïtat lineal en funció de la localització anatòmica. Factors interns químics (pH), físics (motilitat intestinal), el sistema immunològic de l'hoste; o externs com tòxics, dieta i fàrmacs; contribueixen a la modulació de l'heterogeneïtat longitudinal generant comunitats específiques per cada tram del TGI. Adaptat de Martínez-Medina *et al.* 2009; Kovatcheva-Datchary *et al.* 2013.

Els antibiòtics (ATB) són àmpliament utilitzats i redueixen la riquesa, diversitat i uniformitat de la MI. La composició de la MI es recupera a partir de les 3-4 setmanes post tractament (TTM), tot i que certes espècies poden necessitar fins a 6 mesos (Suez *et al.* 2018). L'alteració de l'equilibri de la MI per part dels ATB pot induir la colonització patògena (p.e., CD) (Isaac *et al.* 2016).

**Taula 1.2:** Factors ambientals relacionats amb els hàbits de vida moderns i la seva relació amb la composició de la MI. Adaptat de Manichanh et al, 2012; Soon *et al.* 2012.

HÀBITS DE VIDA MODERN	ESTIL DE VIDA TRADICIONAL
PART A HOSPITAL, ↑ TAXA CESÀRIES.	PART A DOMICILI.
FAMÍLIES DE POCOS MEMBRES	FAMÍLIES NOMBRESES.
AMBIENT URBÀ	AMBIENT RURAL
ALTA HIGIENE DEL MEDI	COLONITZACIÓ MICROBIOLÒGICA PEL MEDI
ÚS D'ATB EN EDAT JOVE	NO ÚS D'ATB
HIGIENE DIÀRIA	ACCÉS RESTRINGIT A AIGUA I SABÓ
BAIXA COLONITZACIÓ PER HP	ALTA COLONITZACIÓ PER HP
DESCENS PARÀSITS INTESTINALS	PARÀSITS INTESTINALS ENDÈMICS
ALIMENTS CONSERVATS A NEVERA	CONSERVACIÓ D'ALIMENTS PER FERMENTACIÓ BIOLÒGICA
CONSUM ALIMENTS PROCESSATS	CONSUM D'ALIMENTS NATURALS.

En la taula anterior es descriu els múltiples factors de la vida moderna (principalment urbana) que afecten a la composició de una MI més immadura i associada a trastorns del sistema immunitari.

La restricció de la ingesta de fibra en la dieta provoca la disminució de la proporció dels grups *F. prausnitzii* (FP) i *Roseburia spp* (bactèries sacarolítiques). La dieta occidental (W-D), rica en greix total, proteïnes d'origen animal, àcids grassos poliinsaturats i sucres refinats; provoca canvis en la composició de la MI amb una marcada disminució de la proporció de Firmicutes, especialment dels membres del grup *Lactobacillus* (Bouter *et al.* 2014; Martínez *et al.* 2017). La dieta i l'obesitat són factors moduladors de la composició de la MI, però no necessàriament causals (Blaut *et al.*, 2016).

#### 1.4 Funció de la microbiota intestinal:

La MI té un rol en el manteniment de la salut de l'hoste perquè estableix un entorn d'equilibri ecològic estable evitant la colonització per organismes exògens.

Les funcions metabòliques consisteixen en la recuperació d'energia, digestió d'aliments concrets, producció de vitamines essencials i adquisició de nutrients dels aliments. Malgrat la variabilitat entre individus de la MI, l'activitat metabòlica és relativament estable. La colonització bacteriana en una edat primerenca ens



permet adquirir unes rutes metabòliques per la síntesi de components nutricionals elementals els quals el nostre organisme no té la capacitat. La depuració de xenobiòtics és una funció important doncs la MI és capaç d'induir l'expressió d'enzims metabolitzadors de fàrmacs (Guarner *et al.*, 2003).

Les funcions defensives consisteixen en l'anomenat efecte barrera: presència de bacteris comensals que ocupen nínxols ecològics estables protegint de la colonització d'elements microbians patògens en l'ecosistema (Guarner *et al.*, 2003).

En les funcions immunològiques cal destacar el paper de la colonització bacteriana com motor fonamental de la inducció del sistema immunitari adquirit i dels seus mecanismes de regulació. El sistema immune és capaç de tolerar la MI pròpia i respondre amb activació de la inflamació quan hi ha augment de la MI patògena o reconeguda com exògena (Diaz Heijtz *et al.*, 2016).

Un altra funció important és de mutualisme amb l'hoste i té capacitat per regular la salut. La composició final estable de la MI determina la quantitat de metabòlits beneficiosos per l'hoste, la proporció de bacteris comensals beneficiosos respecte potencial patògens i la producció relativa de senyals pro inflamatòries vs antiinflamatòries rebudes pel sistema immune (Lynch *et al.*, 2016).

### **1.5 Concepte de Disbiosi en la MII.**

La disbiosi es defineix com una desviació de la normalitat en la composició de la MI. Diversos estudis de la composició bacteriana intestinal en pacients amb MII han demostrat que existeix una disrupció en l'equilibri entre espècies protectores i inflamatòries. Diferents patologies es veuen associades a canvis en la composició de la MI però el fet de l'associació no implica necessàriament causalitat, doncs aquests canvis poden ser conseqüència de la pròpia activitat de les patologies. S'ha relacionat una MI disbiòtica en patologies diverses tant de caràcter digestiu (Sd. intestí irritable (SII), malaltia celíaca), com metabòlic (Sd. metabòlica, malaltia del fetge gras no alcohòlic (MFGNA)) com conductuals (trastorns de la conducta tipus autisme) com inflamatòries (artritis inflamatòria, asma) (Hills *et al.*, 2019).

La manca de diversitat bacteriana en l'intestí s'associa a un risc augmentat de malalties metabòliques. Els individus amb una baixa diversitat microbiològica presenten un clar fenotip inflamatori (Gill *et al.*, 2006; Cotillard *et al.*, 2013).

**Taula 1.3:** Evidència del rol de MI en la patogènia de la MII. Adaptat Sartor *et al.*, 2008.

Evidència clínica que relaciona la MI amb la patogènesi de la MII
La MC, la CU i la reservoritis es localitzen freqüentment en segments intestinals amb alta concentració bacteriana.
Evidència de colonització per MI anormal en la MII.
Augment de la virulència de l'EC en la MC ( <i>pe</i> , AIEC).
Alteració de l'activitat metabòlica de la MI en la MII (inclòs <i>pouchitis</i> ).
Augment dels bacteris associats a la mucosa en pacients amb MII.
Augment de la invasió i translocació bacteriana de la mucosa en la MII activa.
Derivació fecal preveu i tracta la MC i la <i>pouchitis</i> .
Respostes serològiques i de Cèl·lules TH a Ag microbians entèrics en pacients amb MII.
Els ATB poden tractar la <i>pouchitis</i> i la MC/CU ( amb evidència dèbil).
Els probiòtics fan prevenció de la recaiguda de la <i>pouchitis</i> .

La hipòtesi més consensuada que justifica el rol etiològic de la MI en el desenvolupament de la MII es basa en l'alteració dels mecanismes de colonització microbiològica intestinal (veure taula anterior). Per tant és assumible que en la MII hi ha un factor luminal, presumiblement la MI colonitzadora intestinal, enfront de la qual es desenvolupa una resposta inflamatòria immunomediada intestinal excessiva en individus genèticament predisposats (Dominguez-Bello *et al.* 2019).

Aquesta reactivitat anormal del sistema immune enfront a la MI autòctona, és de causa multifactorial i s'explica per la susceptibilitat genètica individual, defectes en la barrera mucosa intestinal i desequilibris previs en la comunitat bacteriana de l'ecosistema del TGI (Frank *et al.*, 2007; Sokol *et al.*, 2009; Dominguez-Bello *et al.*, 2019).

En relació als bacteris amb característiques antiinflamatòries, s'ha apreciat una menor abundància relativa d'FP, tant en pacients afectes de CU en remissió com en la CU i la MC activa. En un altre estudi (Short *et al.*, 2014) que va reclutar pacients amb CU en remissió, familiars de primer grau i CS, es va quantificar mitjançant PCR el recompte total de bacteris i de FP. Es va identificar un descens de FP tant en pacients com en familiars respecte dels CS.

Diferents estudis amb tecnologia molecular demostren que els pacients amb la MC tenen una concentració bacteriana augmentada amb la diversitat reduïda (Lopes-Siles *et al.* 2018; Camprubí-Font *et al.* 2019; Mirsepasi-Lauridsen *et al.* 2019).

Actualment no hi ha cap bacteri associat a la MI que es consideri causal de la MII i s'està estudiant si la disbiosi és la causa o conseqüència de la MII, o bé té un rol en perpetuar la malaltia. (Lynch *et al.* 2016; Chassard *et al.* 2008; Lopes-Siles *et al.* 2018)

Les dades actuals conclouen que hi ha prou evidència del potencial rol etiològic de la MI en tant que la disbiosi és un element que precipita i perpetua de la inflamació. La qüestió per definir si és la disbiosi conseqüència de la inflamació de base present; o bé la disbiosi és l'element que pot activar la cascada inflamatòria (Ni, *et al.*, 2017; Schirmer *et al.* 2018).

Tot i que s'ha descrit que la MI de pacients amb CU en remissió profunda perllongada pot ser similar als CS, actualment es pensa que la comunitat microbiana de la CU és relativament inestable amb reducció de la diversitat i riquesa microbiana malgrat estar en remissió (Schirmer *et al.* 2018). Aquesta inestabilitat microbiana es relacionaria amb la tendència clínica d'alguns pacients oscil·lar entre períodes de remissió breu i activitat lleu. Molts dels estudis descriptius de la MI en la CU són de cohorts amb una mostra reduïda (Sokol *et al.* 2009).

En la MII activa es descriu típicament una disminució de l'abundància de *Faecalibacterium prausnitzii* (FP) amb un increment de l'abundància d'*Escherichia coli* (EC), una concentració bacteriana augmentada i diversitat reduïda en un ecosistema menys estable respecte dels CS (Pascal *et al.*, 2017;Franzoza *et al.* 2019).

## 1.6 Bacteris estudiats

S'ha demostrat que la concentració de *Faecalibacterium prausnitzii* i *Escherichia coli* varia considerablement en pacients amb MII, perquè són altament representatiu de l'ecosistema intestinal i de l'estat de disbiosi de la MI ( Martínez-Medina *et al.* 2014; Lopez-Siles tesi 2015).

### 1.6.1-*Faecalibacterium prausnitzii* (FP)

El FP va ser anomenat inicialment com *Fusobacterium prausnitzii* (Cato *et al.* 1974). Actualment *F. prausnitzii* és l'única espècie aïllada de *faecalibacteria*. El FP és un

microorganisme que forma part de la MI habitual, que pertany al *Phylum Firmicutes*, classe *Clostridia* i la família *Ruminococcaceae*. Metabòlicament és un bacteri anaerobi i productor de butirat, D-lactat i fumarat. Utilitza acetat durant la fermentació de la glucosa. La seva presència també s'ha detectat en femtes i com a part dels biofilms bacterians que colonitzen els residus alimentaris (Duncan *et al.*, 2002).

El FP és un bacteri no mòbil, amb forma bacil·lar, no formador d'espores, d'aproximadament 2 µm de longitud. Tot i estar classificats al filum de *Firmicutes* gram-positius, tots els aïllaments de FP analitzats fins ara han respost negativament a la tinció de Gram (Suau *et al.* 2001).

Tots els cultius de FP poden créixer en fructosa, fructo-oligosacàrid, midó i inulina; mentre que cap pot utilitzar arabinosa, rafinosa, ribosa i xilosa. El FP és un bacteri que ha estat difícil de cultivar des del primer aïllament per Prausnitz del pus procedent d'un cas d'empiema pleural el 1922 (Prausnitz 1922).

La dificultat de cultivar FP a través de mètodes convencionals és, d'una banda, perquè les seves necessitats metabòliques encara no són ben conegudes i, per l'altra, perquè és un bacteri sensible a l'oxigen. No obstant això, recentment s'ha demostrat que es pot cultivar en condicions micro-aeròbiques. Per tant, amb el creixent interès per aquesta espècie, en els darrers anys s'han desenvolupat diversos mètodes moleculars per detectar i/o quantificar aquest bacteri en les mostres intestinals (Suau *et al.* 2001; Khan *et al.* 2012).

La capacitat de FP de canviar el metabolisme entre el creixement estrictament anaeròbic (proper a la llum intestinal) i les condicions micro-aeròbiques (proper a l'epiteli oxigenat intestinal) pot explicar la seva ubiqüitat en el còlon. S'ha trobat associat amb la mucosa intestinal formant dos tipus d'adherència: adherència de capa o de corda i adhesió irregular (Bartosch *et al.*, 2004).

La seva principal funció a l'intestí s'ha relacionat amb la producció de butirat, un àcid gras de cadena curta (AGCC) obtingut a partir de la fermentació de carbohidrats. Al butirat, principal font d'energia dels colonòcits, se li atribueixen propietats protectores respecte el CCR i la MII, ja que pot reduir la inflamació de la mucosa intestinal a través de la inhibició de l'activació del factor de transcripció

NF- $\kappa$ B, regulació del PPAR $\gamma$  o la inhibició de l'INF- $\gamma$  (Archer *et al.*, 1998). Per tant, la deficiència de bacteris productors de butirat pot predisposar a la inflamació (Qui *et al.*, 2013).

També s'ha demostrat que el sobrenedant de FP disminueix la permeabilitat de la barrera intestinal. El mecanisme pel qual FP disminueix la permeabilitat sembla relacionat amb l'augment d'expressió de determinades "tight-junction"(unions estretes en català)(Qui *et al.* 2013), que són complexos d'unió cel·lulars epitelials que creen una barrera amb la funció de separar i mantenir la diferenciació de dos dominis evitant difusió de molècules. FP també podria influir en la fisiologia intestinal a través de modificar la capa de mucus i estimular la producció de O-glicans, i ajudar a mantenir l'homeòstasi intestinal (Miquel S *et al.*, 2014).

#### 1.6.2.-*Escherichia coli* (EC)

EC és un bacteri anaerobi facultatiu gram-negatiu que pertany al *Phylum Proteobacteria*, i a la Família *Enterobacteriaceae* i és l'espècie predominant de la MI humana. Té un paper important en la promoció de l'estabilitat de la comunitat microbiana luminal i mantenir l'homeòstasi intestinal sana. L'EC colonitza el TGI del nadó poques hores després del naixement. Les soques d'EC comensals no solen causar malalties, però hi ha certes soques que adquireixen factors de virulència via bacteriòfags. Un exemple és la presència d'uns patovars adherent-invasiu (AEIC) de l'EC que tenen capacitat per adherir-se i envair les cèl·lules epitelials intestinals, resistir la destrucció pels macròfags i generar una gran resposta inflamatòria, via alliberació de grans quantitats de TNF $\alpha$ . Les propietats de virulència de l'AEIC, present en diversos conjunts d'EC, permeten explicar característiques de la fisiopatologia de la MC com la inflamació, la translocació bacteriana i la formació de granulomes (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2002, 2004; Martínez-Medina *et al.* 2014).

En relació a la CU, sembla que les soques d'EC tenen un comportament més toxicogènic que no pas invasiu, fet que pot contribuir a l'inflamació de la mucosa i al dany tissular. Així doncs, malgrat l'evidència que en la MII hi ha una desregulació de la MI, no està tan clar si aquests canvis microbians poden causar la MII o són conseqüència de la MI alterada (Scaldaferri *et al.*, 2013; Orel, *et al.*, 2014; Mirsepasi-Lauridsen *et al.*, 2018).

## 1.7 Malaltia inflamatòria intestinal (MII): Malaltia de Crohn i Colitis ulcerosa.

Per MII s'entén un conjunt de malalties cròniques amb afectació inflamatòria del tub digestiu d'origen desconegut. Es considera la MII com un trastorn heterogeni d'etiologia multifactorial (Gajendran *et al.* 2018). Actualment el concepte de MII engloba principalment 2 entitats ben diferenciades: la Malaltia de Crohn (MC) i la colitis ulcerosa (CU). Les característiques principals de cada tipus es descriuen en la taula 1.4 de la pàgina següent (Allison *et al.* 2008; Torres *et al.* 2017). Pot desenvolupar-se a qualsevol edat i gènere però té un pic bimodal, amb una incidència als 20 anys i un altre, menor, als 50-70 anys. No s'han trobat diferències entre sexes (Ng *et al.* 2018; Tran *et al.*, 2019).

### 1.7.1-. Etiologia:

Es tracta d'una malaltia poligènica complexa en la qual tant actuen factors genètics com epigenètics (Khanna *et al.* 2017; Neurath *et al.* 2019). La teoria etiològica més acceptada actualment és la desregulació de la resposta immune de l'hoste enfront diferents estímuls (com una MI resident anòmala o Ag externs) que actuen com a gallet ("*trigger*") per a desencadenar una resposta inflamatòria augmentada i descontrolada (de Lange *et al.* 2015).

#### 1.7.1.1-. Mecanismes immunes i microbiològics en l'etiologia de la MII

Un dels factors claus pel desenvolupament de la MII es troba en l'alteració immune a nivell mucosa del TGI. Per protegir l'hoste, s'ha de proporcionar una resposta immune efectiva i ràpida contra microorganisme patògens i mantenir tolerància cap a Ag coneguts (alimentaris, tòxics o de la Microbiota) (Neurath *et al.* 2019):

Barrera epitelial efectiva (BEE): Els pacients amb MII presenten defectes en la BEE amb un increment de la permeabilitat intestinal. La BEE està formada per:

- Capa de moc (*mucus layer* en anglès): Primera barrera física. Està formada per una capa fina interna estèril (anomenada glicocàlix) i una capa externa formada per immunoglobulines (Ig) A secretades per epiteli, mucines, pèptids antimicrobians (ribonucleases, criptidines, defensines) i bacteris comensals; i factors microbians com ara REG-3-γ.

Les cèl·lules caliciformes secreten mucina, un mucopolisacàrid viscos (Hansson *et al.* 2010).

**Taula 1.4:** Característiques diferencials principals entre MC i CU. \*ASCA: *anti-Saccharomyces cerevisiae*. Adaptat de Sairenji *et al.* 2017

Característiques	MC	CU
<b>Debut</b>	<i>Sobtat (dies / setmanes)</i>	<i>Progressiu (setmanes/mesos)</i>
<b>Localització</b>	<i>Qualsevol part TGI</i>	<i>Recte i còlon (proximal)</i>
<b>Dolor abdominal</b>	<i>Freqüent</i>	<i>Rar</i>
<b>Sagnat</b>	<i>+</i>	<i>+++</i>
<b>Manifestacions extra intestinals</b>	<i>Freqüent</i>	<i>Rar</i>
<b>Astènia</b>	<i>+++</i>	<i>++</i>
<b>Pèrdua pes</b>	<i>+++</i>	<i>+</i>
<i>Exploració física</i>		
<b>Febre</b>	<i>+++</i>	<i>+</i>
<b>Palpació massa</b>	<i>+++</i>	<i>+</i>
<b>Malaltia perianal</b>	<i>+++</i>	<i>+</i>
<i>Analítica</i>		
<b>Anèmia</b>	<i>+++</i>	<i>++</i>
<b>Augment PCR/VSG</b>	<i>+++</i>	<i>+</i>
<b>ASCA*</b>	<i>++</i>	<i>-</i>
<b>p-ANCA</b>	<i>+</i>	<i>+++</i>
<i>Endoscòpia</i>		
<b>Afectació rectal</b>	<i>+/-</i>	<i>+++</i>
<b>Afectació continua</b>	<i>-</i>	<i>+++</i>
<b>Afectació transmural (AP)</b>	<i>+++</i>	<i>-</i>
<b>Granulomes</b>	<i>+++</i>	<i>+/-</i>

- Epiteli intestinal: Segona barrera defensiva formada per enteròcits i cèl·lules epitelials especialitzades anomenades cèl·lules caliciformes i cèl·lules de Panneth, les quals formen una monocapa continua connectades mitjançant complexos d'unió: *tight junctions*, unions d'ancoratge i unions comunicants (*GAP junctions*). Les cèl·lules epitelials intestinals juguen un paper clau en la barrera mucosa, perquè eviten la

invasió dels Ag luminals patògens o comensals. Les cèl·lules de Panneth segreguen defensines amb propietats bactericides (Salvo-Romero *et al.* 2015).

- Teixit limfoide associat a la mucosa intestinal (GALT en anglès): El GALT és la barrera més efectiva enfront els patògens, ja que permet frenar patògens i induir la immunotolerància en resposta als Ag inofensius (Yoo *et al.* 2017). Es divideix en:
  - El GALT difús compost per poblacions de limfòcits dispersos en l'epiteli.
  - El GALT organitzat (inductor de la resposta immunitària intestinal), està format per plaques de Peyer (agregats limfoides). Les cèl·lules M de les plaques de Peyer capten Ag luminals per fagocitosi i els transporten cap a les cèl·lules presentadors d'antígens (CPA, cèl·lules dendrítiques) que processen els Ag perquè siguin reconeguts pels limfòcits T situats en les plaques de Peyer

La resposta immune innata és una resposta ràpida (minuts-hores) i inespecífica. Reconeix patrons moleculars i no requereix una sensibilització prèvia. El sistema immunitari innat està format per cèl·lules derivades mieloides (neutròfils, monòcits, cèl·lules dendrítiques i macròfags), cèl·lules NK (de l'anglès *natural killers*) i cèl·lules limfoides innates. Aquestes cèl·lules, a més de cèl·lules epitelials, endotelials i estromals, expressen receptors tipus *Toll-Like-Receptor* (TLR) entre d'altres, que en conjunt es coneixen com a receptors de reconeixement de patrons (PRR). L'estimulació per un Ag unit als PRR pels seus respectius lligands, activa la ruta de senyalització de la resposta immunitària (Neurath *et al.* 2019). Tal com s'observa em la figura 1.4.

El sistema immunitari adaptatiu es compon principalment de limfòcits B i T, que confereixen immunitat específica i es caracteritza per ser de caràcter clonal, tenir especificitat, memòria i ser autoregurable. Aquest sistema immunitari està dissenyat per respondre a Ag externs mostrats prèviament (Neurath *et al.* 2019).

- Limfòcits B (LB): immunitat humoral. El LB contacta amb un determinat Ag, s'activa i prolifera generant memòria immunològica i Ac (immunoglobulines principalment). Els Ac són el component clau de la resposta immune humoral



contra patògens. En humans hi ha 5 classes d'immunoglobulines: IgG, IgA, IgM, IgD i IgE (de major a menor concentració sèrica) amb 4 subclasses de IgG (IgG1-4) i 2 subclasses de IgA (IgA1-2) (Shirmer *et al.* 2019; Na *et al.* 2019).

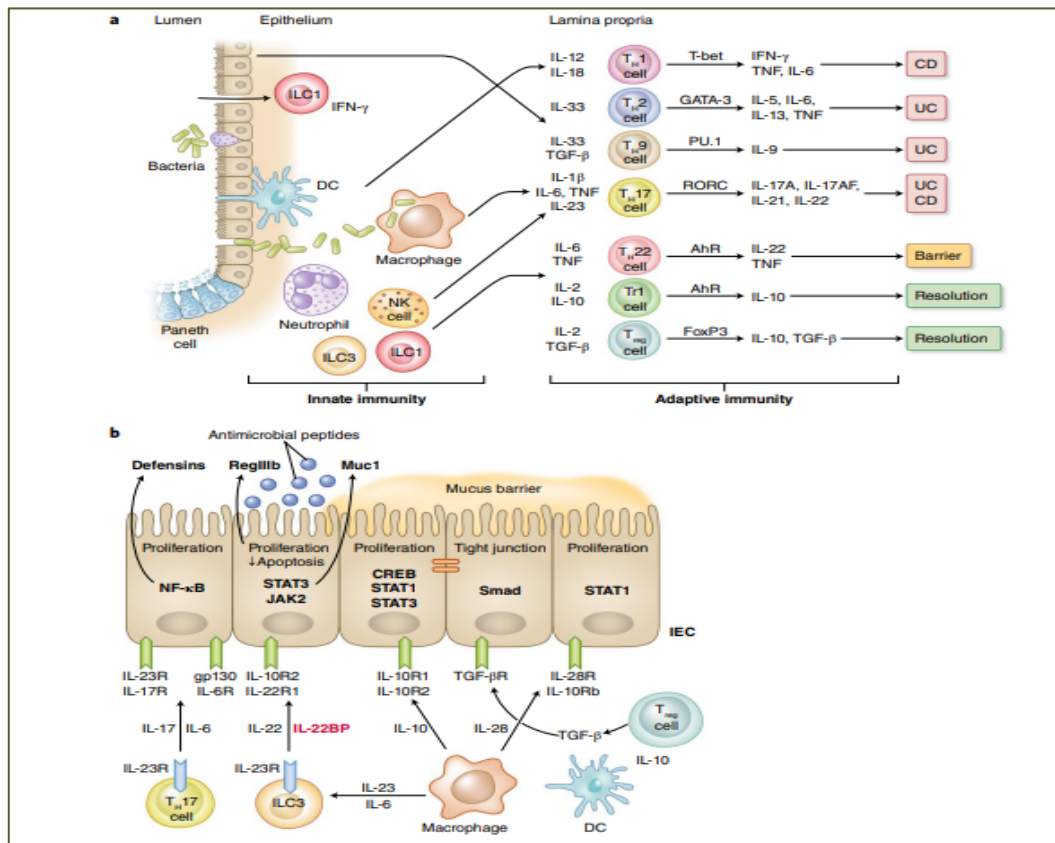
- L'estructura de les Ig compren 2 cadenes polipeptídiques lleugeres (L; *light*) i 2 cadenes pesades (H; *heavy*) adoptant la configuració en forma de Y. Cada Ac engloba 2 dominis: la regió variable o Fab (*antigen-binding region*) i regió constant o Fc (*constant region*) que s'uneix a l'Ac.
- La IgA és la immunoglobulina més abundant en la mucosa intestinal (80-90%) i s'excreta a la mucosa intestinal. Té un rol crucial com a primera defensa davant toxines i a la colonització de patògens.
- **Limfòcits T (LT):** Les cèl·lules dendrítiques presenten l'Ag als LT (en els ganglis limfàtics mesentèrics), s'originen LT activats i s'inicia la resposta adaptativa. Els LT es poden dividir funcionalment en cèl·lules T auxiliars CD4 (Th, *helpers* en anglès), cèl·lules T CD8 (citotòxiques) i cèl·lules T reguladores (TReg).
  - Les cèl·lules T CD4 responen a un Ag processat per les CPA en associació amb molècules CMH classe II. Es poden subdividir funcionalment en diversos subconjunts de cèl·lules T (Neurath *et al.* 2019).
    - CD4 Th1: segreguen IFN-gamma, factor de necrosi tumoral (TNF)  $\alpha$  i interleucina (IL)-12, que consisteix en l'heterodímer p35/p40 i és secretada per les CPA i és fonamental per a la generació de cèl·lules Th1.
    - CD4 Th2: Són induïdes per IL-4 i inhibides per IL-12. Regulen la diferenciació de les cèl·lules B.
    - CD4 Th17: Són cèl·lules Th que tenen un paper crític en regular el procés inflamatori i les respostes a nivell de la mucosa. La IL-23 (que consisteix en l'heterodímer p19/p40), és important per al manteniment de cèl·lules Th17. Mutacions del receptor IL-23 s'han associat amb la susceptibilitat a la MII. S'ha observat que la IL-17 juga un paper important en la inflamació intestinal perquè la IL-17 és sobreexpressa a nivell de la mucosa en la MII activa. (Na *et al.* 2019)

- Les cèl·lules T CD8 responen a l'Ag processat de tots els tipus cel·lulars en associació amb molècules de classe I MHC. Els limfòcits TReg (reguladors) consisteixen en diversos subconjunts cel·lulars que inclouen Th3, tipus 1 regulador (Tr1) i (CD4+, CD25+, FOXP3+). Bloquegen o regulen les cèl·lules Th1, Th2 i Th17. Són limfòcits importants per la seva capacitat immunitària: suprimeixen respostes immunes anormals contra microorganismes habituals de l'intestí i alguns Ag de la dieta; prevenen l'autoimmunitat i mantenen la auto tolerància cel·lular. (Brown *et al.* 2019).

Altres grups cel·lulars, com ara els macròfags tenen funcions essencials de manteniment intestinal amb la depuració de les cèl·lules apoptòtiques. Els neutròfils són responsables de la resposta inicial a estímuls microbians, i probablement modular les respostes adaptatives en l'estat agut inflamatori de la producció de citocines. Les cèl·lules limfoides innates (ILC) és una població heterogènia implicada en el manteniment de la integritat de la barrera intestinal. Responen a senyals microbianes i dietètiques entre altres estímuls, produint citocines tals com TNF $\alpha$ , IL-17, IL-22 i IFN $\gamma$  (Pickard *et al.*, 2017).

### 1.7.1.2-. Alteració Immunitària i malaltia inflamatòria intestinal:

Molts estudis recolzen el concepte que la MII és producte d'una resposta desregulada del sistema immunitari de la mucosa respecte de la MI que es troba dins del lumen intestinal (Pickard *et al.* 2017; Na *et al.* 2019). En condicions normals, la mucosa conté poques cèl·lules Th i predominen cèl·lules T-Reg, per tant una possible hipòtesi etiològica de la resposta inflamatòria pot ser deguda a un canvi en aquest equilibri (Brown *et al.* 2019).



**Figura 1.4:** Subconjunts de cèl·lules immunes i citocines en la MII. a) Esquema de l'activació de cèl·lules immunes innates i adaptatives en la MII. A la dreta s'observen els subconjunts de cèl·lules T amb els seus principals factors de transcripció, les citocines i el tipus de MII que es relacionen. La figura b) mostra les citocines produïdes per les cèl·lules immunes de la mucosa per mantenir les condicions del medi intestinal, i la seva interacció amb les cèl·lules epitelials intestinals, alterant les condicions i fomentant microbiota comensal per la patogènesi de la MII, incloses les molècules de senyalització intracel·lular activades per citocines, i les conseqüències funcionals de la senyalització de les citocines. Adaptat de Neurath *et al.* 2019.

Les alteracions de les respostes immunitàries observades en la MII:

- **Alteració BEE:** S'ha associat el risc de desenvolupar la MII amb l'alteració de la composició del mucus, alteració de la MI del mucus i l'augment de la permeabilitat intestinal. L'alteració de la capa de mucus per factors dietètics (W-D) o per mutacions del gen MUC-2 promou la translocació bacteriana. Les cèl·lules epitelials tenen un procés anomenat autofàgia i els defectes relacionats amb l'autofàgia s'han identificat en gens com l'ATG16L1 i el IRGM sent FdR importants especialment per la MC (Hansson *et al.* 2010).

- Alteració a nivell cèl·lules immunes: S'ha detectat una activitat i un reclutament de cèl·lules immunes anòmals en diferents subconjunts de cèl·lules immunitàries. Les cèl·lules mieloides amb un fenotip "inflamatori" que produeixen nivells superiors de citocines, estan presents a nivell de la làmina pròpia dels pacients amb MII.
  - Les respostes de les cèl·lules T enfront bacteris o fongs estan implicats en la possible patogènia de la malaltia. Els infiltrats inflamatoris intestinals en la MC contenen cèl·lules Th1 i Th17 principalment. Els Ac antimicrobians, com l'Ac *anti-Saccharomyces cerevisiae*, l'Ac anti-I2, l'Ac anti-porina C de la membrana externa, l'Ac anti-flagelina i l'Ac antianglicà; es veuen freqüentment augmentats en pacients amb MC. No obstant els estudis no han pogut demostrar que la producció d'Ac estigui directament relacionada amb la MII. La presència d'Ac suggereix que les cèl·lules B intestinals generen una resposta immune exagerada enfront els Ag luminals però el rol patogènic encara no està clarament definit. (Neurath *et al.* 2019)
  - Algunes cèl·lules inflamatòries com els neutròfils que es troben en la mucosa no solen estar presents a la làmina pròpia i s'han de reclutar dels vasos sanguinis per un procés, anomenat "*homing*". Els leucòcits "roden" al llarg de l'endoteli i les quimiocines secretades pels teixits activen les molècules d'adhesió. Un cop adherits els leucòcits recorren l'endoteli (un procés anomenat "*diapedesi*"). Una estratègia terapèutica consisteix en bloquejar la migració dels leucòcits a través de 2 fàrmacs aprovats que bloquegen l'acció de la integrina  $\alpha 4\beta 7$  bloquejant la migració de limfòcits cap a la làmina pròpia (natalizumab i vedolizumab) (Na *et al.* 2019).
- Alteració mediadors inflamatoris: Nivells anormals de citocines immunorreguladores i inflamatòries es correlacionen amb la MII activa. Els TCD4 aïllats de pacients amb MC secreten grans quantitats d'IFN-gamma i TNF  $\alpha$ , citocines amb marcat efecte pro inflamatori, implicant així les cèl·lules Th1 en la patogènia de la MII. Aquests estudis han donat lloc a estratègies terapèutiques amb Ac's antiTNF per a MC i CU. La secreció d'interleucina IL-4,

IL-5 i IL-13 per cèl·lules Th2 suprimeix les respostes dirigides per Th1, però també condueix a infiltració de eosinòfils i pot contribuir a la inflamació intestinal de la MII. Totes les cèl·lules reguladores es poden generar en el GALT (Fernández-Clotet *et al.* 2019).

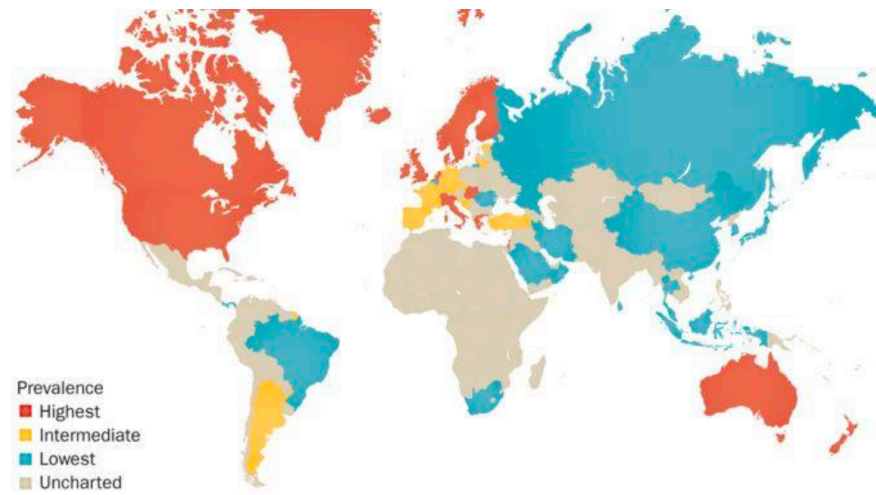
#### 1.7.2-. Epidemiologia:

Fins a la segona meitat del segle XX, la MII es va considerar una malaltia rara a Amèrica del Nord i Europa. Els estudis mostren que hi ha hagut un increment global de la incidència de MII des de finals dels anys 90, fet que s'atribueix a la millora dels processos diagnòstics i a l'augment real de la prevalença (Ng *et al.* 2018).

La incidència anual més alta és a Canadà (20,2/100.000 hab.), nord d'Europa (10,6/100.000 habitants) i Nova Zelanda (16,5/100.000 habitants) amb una distribució que es pot observar en la figura 1.5. La prevalença més alta és a Europa (322/100.000 habitants), Canadà (319/100.000 habitants) i als Estats Units (214/100.000 habitants). Estudis recents han descrit que les àrees amb baixa incidència i prevalença (sud-est asiàtic) han augmentat lleugerament la incidència en els darrers 10 anys en paral·lel al desenvolupament tecnològic i la urbanització (Ng *et al.* 2018).

Pel que fa a Espanya la incidència de la MII ha incrementat els últims anys. S'evidencia que el gradient nord-sud actualment és gairebé inexistent i les taxes d'incidència són similars a les dels països del nord d'Europa (Chaaro-Benallal *et al.* 2017; Chaparro *et al.* 2019).

La incidència i prevalença de CU està augmentant globalment en proporció similar a la MC. La incidència de CU a escala global és de 10 casos/100.000 habitants/any. A Europa la incidència és 24,3 cas/100000/any, seguit de 19,2 cas/100000/any als EUA i de 6,3 cas/100000/any a Àsia (Molodecky *et al.* 2012). La prevalença a Europa és d'uns 505 casos/100000 persona/any, i als EUA és de 214-286 casos/100,000 persona /any. (Harbord *et al.* 2017).



**Figura 1.5:** Prevalença de la MII a nivell mundial. Adaptat de Kaplan *et al*, 2015.

### 1.7.3-. Factors de risc (FdR):

Molts factors ambientals s'han relacionat amb la MII i alguns factors es comporten de manera totalment diferent en la CU i en la MC. Veure taula 1.5 (Bernstein *et al.* 2008).

#### 1.7.3.1-. Tabac

La importància del tabaquisme rau en el fet que és un FdR modificable. El tabaquisme està associat a un risc superior de desenvolupar la MC, sobretot si hi ha exposició precoç o és fumador passiu. Clàssicament el tabaquisme en la MC s'associa a pitjor evolució de la malaltia i amb la recurrència post quirúrgica (RPQ). No obstant això, actualment el rol exacte del tabaquisme es qüestiona en tant que zones amb altes taxes de tabaquisme com Àfrica i Àsia presenten una molt baixa incidència de la MC; i en canvi al Nord d'Europa o els EUA, amb baixa taxa de tabaquisme, presenta una de les incidències més altes de la MC. S'ha descrit que deixar de fumar és beneficiós per l'evolució de pacients amb MC (Mokbel M *et al.* 1998; Cosne *et al.* 2001; Mahid *et al.* 2006; Higuichi *et al.* 2012; Casetta *et al.* 2017; Wang *et al.* 2018).

Clàssicament s'havia descrit que existia una associació inversament proporcional entre el tabac i el risc de desenvolupar CU. Un estudi poblacional conclou que els fumadors i no fumadors amb CU tenen taxes similars de brots, ús de tiopurines, dependència de corticoides, hospitalització i taxa de colectomia. El fet de deixar de

fumar no s'associa amb pitjor evolució de la malaltia (OR 1.6, 95% IC 1,3-1,9). Els riscos relacionats amb el tabaquisme superen qualsevol benefici possible en CU (Blackwell et al, 2019).

**Taula 1.5:** Relació dels principals factors de risc ambientals per a la MII (CU /MC). OR 1,76; 95% (IC 1,40–2,22 ) \* OR 1.84 (95% IC 1.08 to 3.15) \*\* OR 6.14, 95%. IC= 1.8–21.3). Adaptat de Ananthakrishnan *et al.*, 2015; Torres *et al.* 2017.

Factors de risc	CU	MC
<b>Fumador</b>	Dubtós Factor protector	↑ 2x risc MC (↑ risc RPQ)
<b>Ex fumador</b>	Possible Factor de risc	Possible Factor protector
<b>No fumador</b>	Possible Factor de risc	Possible Factor protector
<b>Apendicectomia</b>	dubtós factor protector	Factor de risc
<b>Anticonceptius orals</b>	Probable Factor risc	↑↑ Risc (x1.5)
<b>Predisposició genètica</b>	Factor de risc	Factor de risc
<b>Dieta</b>	WD ↑ risc.	WD ↑ risc.
<b>Reducció Fibra dieta</b>	↑ risc	↑↑↑ risc
<b>Augment greixos saturats</b>	↑ risc	↑↑↑ risc
<b>Infeccions bacterianes</b>	Contribució patogènica	Contribució patogènica
<b>AINE's</b>	Controvertit	↑↑ Risc dosi depenent
<b>AAS</b>	No dades	↑ Risc **
<b>Exposició AB infància</b>		↑↑ Risc *
<b>Nivell baix Vitamina D</b>	Controvertit ↑ risc	Controvertit ↑ risc
<b>Lactància materna</b>	Protector	No dades
<b>Ambient rural</b>	Protector	Protector
<b>Contacte animals</b>	Protector	Protector
<b>Cesària</b>		Dubtós ↑ Risc
<b>Part vaginal</b>		Dubtós factor protector
<b>Estatines</b>		↓ Risc (edat avançada)
<b>Edat jove al diagnòstic</b>		Factor mal pronòstic.
<b>Malaltia extensa I. Prim</b>		Factor mal pronòstic.
<b>Afectació alta</b>		Probable factor mal pronòstic
<b>Mala qualitat del son</b>	Factor risc en els brots	Factor de risc
<b>Estrès</b>		Factor de risc
<b>Activitat física</b>		Factor bon pronòstic

### 1.7.3.2- Genètica:

La influència de la susceptibilitat genètica en la CU és menor que en la MC, ja que hi ha significativament menys concordança entre bessons monozigòtics (Bernstetin *et al.* 2008; Molodecky *et al.* 2012). S'observa agregació familiar, ja que al voltant del 13,1% dels pacients amb MC i un 9% de pacients amb CU tenen antecedents familiars de la MII (Moller FT *et al.* 2015). El primer gen de susceptibilitat identificat associat a la MC codifica per a la proteïna NOD2 (NOD2/CARD15). Actualment no s'utilitza el diagnòstic genètic en la pràctica clínica degut a la gran variabilitat d'expressió gènica que els pacients amb MII presenten i a l'elevat preu dels tests disponibles (Torres *et al.* 2017).

### 1.7.3.3- Dieta

La dieta occidental ("western-diet" (WD)) és proposada com un factor clau perquè els països amb WD i forta industrialització tenen més prevalença de la MII. Estudis observacionals han mostrat una relació inversa entre la ingesta de fibra vegetal i risc de patir MC. S'especula que determinats Ag alimentaris no identificats poden desencadenar una resposta immune que "activi" la MII (Graf *et al.*, 2015; Hills *et al.*, 2019).

### 1.7.3.4- Estil de vida

La qualitat del son, factors psicològics i l'exercici físic influeixen en l'evolució de la MII. L'associació entre alteració del son i MII és bidireccional: la malaltia activa altera el patró del son; i la qualitat pobre del son pot agreujar l'activitat inflammatòria. En un estudi de cohorts, dormir <6 o >9 hores/dia evidencien un major risc de desenvolupar CU respecte dormir 7-8 hores/dia (OR 1,5, 95% IC 1,1-2,1, i OR 2,1, 95% IC 1,4-2,9). Estudis de cohorts a gran escala han demostrat que en la MC, la presència d'ansietat i/o depressió s'associa a recaiguda, hospitalització, cirurgia, pitjor qualitat de vida i eficàcia reduïda dels IMM, fet que es relaciona amb l'eix intestí-cervell (*Gut-Brain axis* en anglès) on es comparteixen nombrosos neurotransmissors. L'activitat física de moderada a intensa sembla que pot estar associada un risc menor de desenvolupar la MC (44% inferior respecte del sedentarisme), en canvi no influeix a disminuir el risc de desenvolupar la CU (Ananthakrishnan *et al.* 2014, 2018; Piovani *et al.* 2019).



#### 1.7.3.5-.Apendicectomia:

L'apendicectomia a una edat jove prèvia al diagnòstic de la CU és un factor protector pel desenvolupament d'aquesta, tal com evidencia en una metanàlisi de 17 casos-contròls (reducció del 69% del risc de CU; OR 0,58, 95% IC 0,38-0,87) i s'associa a un risc menor de colectomia i hospitalitzacions (OR 0,44, 95% IC 0,0,7,27-0,72). En un estudi de cohorts longitudinal, els pacients apendicectomitzats amb limfadenitis mesentèrica tenen incidències més baixes de CU però majors de MC. S'ha relacionat amb el fet que moltes apendicectomies s'han realitzat en confondre un brot de MII (Andersson *et al.* 2001; Myrelid *et al.* 2017).

#### 1.7.3.6-. Fàrmacs:

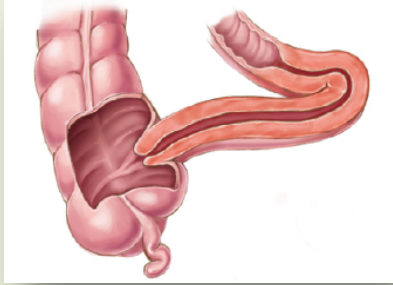
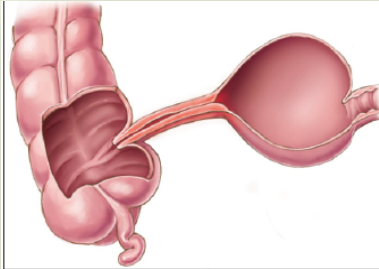
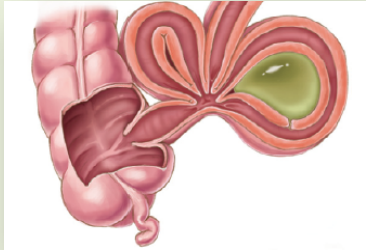
Els ATB, aspirina (AAS), antiinflamatoris no esteroïdals (AINE's) i anticonceptius orals (ACO) s'han relacionat amb ser un potencial FdR pel desenvolupament de la MC. En un estudi de cohorts, l'ús de AINE's més de 15 dies/mes, s'associa a risc augmentat de CU (OR 1,87 (95% IC 1,16-2,99)) comparat amb CS pel dany de la mucosa (Hviid *et al.* 2011).

#### 1.7.4-. Clínica:

##### *Malaltia de Crohn:*

La clínica de la MC és variable en funció de la localització i patró inflamatori tal com es mostra en la taula 1.6. La MC pot afectar qualsevol zona del tracte digestiu, de la boca a l'anus. Les àrees afectades amb major freqüència són ili terminal i cec (Torres *et al.*, 2017, 2020). La triada de símptomes clàssica de presentació són diarrea, dolor abdominal i pèrdua de pes, però només és present en el 25% dels casos.

**Taula 1.6:** Resum dels diferents patrons de comportament de la MC. Adaptat de Ungaro *et al.* 2017.

	<p><b><u>Patró inflamatori:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Diarrea</li> <li>Pèrdua de pes</li> <li>Dolor abdominal</li> <li>Febre inflamatòria</li> <li>Fatiga</li> <li>Retard de creixement (nens)</li> <li>Desnutrició</li> </ul>
	<p><b><u>Patró estenosant /fibròtic:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Dolor postprandial.</li> <li>Distensió Abdominal</li> <li>Nàusees i vòmits.</li> <li>Oclusió / Subocclusió</li> <li>Restrenyiment</li> </ul>
	<p><b><u>Patró penetrant / fistulitzant:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Fístula entero urinària: fecalúria, pneumatúria i infecció tracte urinari (ITU) recurrent.</li> <li>Fístula rectovaginal: Disparèunia, emissió femta per la vagina.</li> <li>Fístula entero entèrica: Asimptomàtica o abscess abdominal.</li> </ul>

*Colitis ulcerosa:*

La principal característica clínica de la CU és la colitis. Els símptomes associats inclouen diarrea associada a restes hemàtiques, dolor abdominal tipus còlic, urgència, tenesme i incontinença. Els pacients amb afectació distal poden tenir restrenyiment. L'aparició dels símptomes sol ser progressiva al llarg de setmanes, i la severitat és molt variable. Poden haver-hi símptomes sistèmics associats a malaltia greu (Ordàs *et al.* 2012). L'exploració física pot ser normal. Es pot detectar ocasionalment inflamació difusa a ili terminal i periapendicular per continuïtat de l'afectació dreta severa (Ungaro *et al.* 2017).

La CU, a diferència de la MC, pot presentar complicacions agudes pròpies greus potencialment que poden establir-se en hores com ara hemorràgia digestiva ( $\pm 10\%$  dels pacients); colitis fulminant associada o no a megacòlon tòxic i perforació, que poden requerir colectomia urgent pel seu maneig (Ordàs *et al.* 2012).

Aproximadament 25-50% dels pacients amb MII experimenten almenys una manifestació extra intestinal (MEI), que és clínicament heterogènia i es pot presentar abans, durant o després del diagnòstic de la MII amb un curs independent. En la CU, aproximadament menys del 10% pacients té una MEI al diagnòstic (Trikudanathan, *et al.* 2012; Zippi *et al.* 2014; Yu *et al.* 2017).

#### 1.7.5-. Història Natural

La MC es caracteritza per períodes de remissió clínica alternat amb períodes de recurrència. Una revisió recent (Freeman *et al.* 2014) mostra que aproximadament un terç dels pacients tenien ileïtis, colitis o ileocolitis en el moment del diagnòstic. La localització de la MC tendeix a ser estable, però el comportament de la malaltia es modifica evolutivament. La presència de complicacions (estenosi, fístula o abscess) està present en el 20% dels pacients en el diagnòstic. La incidència anual d'ingrés hospitalari és del 20%, i al cap de 10 anys el 50% dels pacients requereixen intervenció quirúrgica (IQ). Un 30% necessitarà múltiples IQ i aproximadament el 14% dels pacients amb afectació greu, especialment rectal concomitant, requeriran un estoma permanent. Al cap de 20 anys d'evolució, el 50% dels pacients tenen una complicació intestinal associada. Únicament el 10% tenen una remissió profunda (RP) clínica perllongada (*“Deep Remission”*).

La CU evoluciona en forma d'exacerbacions intermitents alternada amb períodes llargs de remissió clínica. Existeix un petit percentatge (5-10%) de pacients amb símptomes crònics. La presentació en forma de proctitis s'associa a un curs clínic més benigne respecte els que debuten amb una malaltia extensa (Ungaro *et al.* 2017). La majoria de pacients amb CU debuten amb una presentació lleu, un 27% debuten amb un brot moderat i 2% tenen un debut amb malaltia severa (inclòs fulminant).

Els factors que influeixen l'evolució de la CU:

- Edat al diagnòstic: el 67% dels pacients tindrà recaiguda en els primers 10 anys. La CU diagnosticada tardanament sol tenir un curs indolent (Abeu *et al.* 2007).
- Curació mucosa (CM): És predictor de bona resposta al tractament a llarg termini i menor risc de colectomia (Cholapranee *et al.* 2017).
- Extensió de la malaltia: Un 10-19% dels pacients presenta progressió de l'extensió de la colitis durant els primers 5 anys. Els pacients amb proctitis tenen un risc del 5% anual d'extensió proximal, i l'afectació proximal al colon sigmoide presenta risc del 9% bianual de progressió a pancolitis. La pancolitis al debut s'associa pitjor pronòstic a llarg termini (Jess *et al.* 2007).

Els pacients amb CU tenen risc incrementat de displàsia i de CCR respecte població sana (Rubin *et al.*, 2013; Meeker *et al.* 2016). L'extensió de la malaltia i el temps d'evolució en anys són els principals FdR pel CCR. Altres factors associats al risc de CCR són inflamació activa severa, antecedents familiars de CCR esporàdic (risc 2x), pseudopòlips infamatoris (risc 2x) i la presència de CEP concomitant (Jess *et al.* 2007; Bewtra *et al.* 2013).

Aproximadament un 10-15% de pacients amb CU requereixen colectomia per complicacions agudes al llarg de la seva evolució. La taxa de colectomia en la pancolitis és del 19% al cap de 10 anys del diagnòstic, respecte 5% dels pacients amb proctitis. La taxa de colectomia global durant el primer any és del 10% (Bemelman *et al.*, 2018).

### 1.7.6-. Classificació:

La MC és clínicament molt heterogènia. La classificació més utilitzada actualment és la de Montreal, que té en compte 3 categories: edat del diagnòstic (A), localització (L) i patró evolutiu (B). La primera classificació es va crear durant la reunió de l'Organització Mundial de Gastroenterologia (*WGO* en anglès) a Roma el 1991, que el 1998 es va substituir per la classificació de Viena; la qual es va modificar el 2005 per l'actual classificació de Montreal. Aquesta classificació és la

recomanada per la WGO i la *European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO)* (Gasche *et al.* 2000; Satsangi *et al.* 2006; Pariente *et al.*, 2015).

**Taula 1.7:** Classificació de Montreal de la MC: Adaptat de Satsangi *et al.*, 2006; Silverberg *et al.*, 2005.

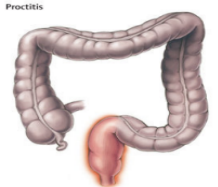
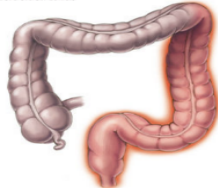
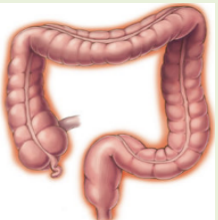
Edat diagnòstic (A)	Característiques més freqüents
<b>A1: &lt;16 anys</b>	<i>Localització colònica principalment</i>
<b>A2: 17-40 anys</b>	<i>Inflamació extensa i severa, afectació de tot el tracte digestiu</i>
<b>A3: &gt;40 anys</b>	<i>Localització colònica més freqüent</i>
Localització (L)	Característiques
<b>L1 : ileal (i-CD)</b>	<i>30% pacients. Manifestacions clíniques típiques: vòmits, dolor, distensió abdominal, estenosi, diarrea, pèrdua de pes, febre. Menys diarrea que afectació colònica.</i>
<b>L2 : Colònic (C-CD)</b>	<i>20% pacients. Afectació segmentària de cec fins recte. Diarrea, rectorràgies, dolor i pèrdua de pes. Correlació amb malaltia extra intestinal i perianal.</i>
<b>L3 : ileocolònic (IC-CD)</b>	<i>45% pacients. Clínica similar a L1 i L2.</i>
<b>L4: Afectació alta</b>	<i>5 % pacients. Intestí proximal, jejú, duodè, estómac, esòfag, orofaringe.</i>
<i>L4 es pot afegir a qualsevol localització</i>	
Comportament (B)	Característiques
<b>B1 (no estenosant/ no penetrant)</b>	<i>Afectació inflamatòria superficial, Diarrea i dolor abdominal</i>
<b>B2 : estenosant</b>	<i>Presència estenosi i fibrosi. Nàusees, dolor, distensió abdominal. Baixa recurrència. Refractarietat. Opció quirúrgica de tractament.</i>
<b>B3: penetrant</b>	<i>Perforació. Formació de fistules i abscessos. Cirurgia necessària. Alta recurrència.</i>
<i>p</i>	<i>Si malaltia perianal afegir "p" al diagnòstic. (5-40%)</i>

Seguint les recomanacions del grup de treball que va realitzar la classificació de Montreal per a la MC, el 2005 es va desenvolupar la classificació per la CU. Aquesta classificació és més simple que en la MC i es basa en l'extensió i la gravetat de la malaltia (veure taula 1.8). L'extensió s'ha associat amb un major risc de colectomia i pitjor pronòstic (Satsangi *et al.*, 2006). Aquesta classificació és la més utilitzada actualment.

La severitat de la malaltia en pacients amb CU és important pel maneig clínic i predir la resposta a llarg termini. La severitat de la malaltia pot ser mesurada usant

índexs d'activitat clínica. La classificació de Montreal de severitat de la CU es pot descriu en la taula 1.9.

**Taula 1.8:** Classificació de la CU segons l'extensió i les manifestacions clíniques principals. Adaptat de Ungaro *et al.*, 2017.

Fenotip CU i localització	Característiques clíniques
<b>E1: Proctitis ulcerosa</b> 	Inflamació limitada al recte (< 18 cm). Clínica: Sagnat rectal moderat intermitent i tenesme. Urgència. Prevalença 30-50%
<b>E2: Distal o Colitis Esquerra</b> 	Recte, sigma i Còlon Esquerre fins angle esplènic. Clínica: diarrea amb sang, còlics intestinals, pèrdua de pes i dolor difús. Prevalença de 20-40%
<b>E3: Pancolitis o colitis universal</b> 	Inflamació de tot el còlon (proximal a angle esplènic). Clínica: Diarrea amb sang, dolor abdominal amb còlics, pèrdua de pes, astènia i afectació sistèmica (febres). Risc ↑ colectomia i CCR. Prevalença 10-20%.

**Taula 1.9:** Classificació de Montreal de la severitat de la CU. Adaptat de Satsangi *et al.*, 2006; Magro *et al.*, 2017.

CLASSIFICACIÓ DE MONTREAL DE LA SEVERITAT DE LA CU					
Severitat (S)	Deposicions /dia	Sang femta	↑ VSG	Afectació sistèmica	Desnutrició
Remissió (S0)	Normal	-	-	-	-
Lleu (S1)	<4	+/-	-	-	-
Moderada (S2)	4-6	+/-	+/-	-	+/-
Severa (S3)	>6	+	+	+	++
Fulminant	>12	+	+	+++	++++
p	afegir si afectació perianal (poc freqüent en la CU)				

### 1.7.7-. Diagnòstic:

Les característiques clau pel diagnòstic de la MC inclou una combinació de troballes clíniques, radiològiques, endoscòpiques i patològiques (Tontini *et al.*, 2015). El diagnòstic de CU es basa en la presència de clínica compatible (p.e.: diarrea crònica >4 setmanes), evidència de inflamació activa per endoscòpica i canvis en l'AP específics de la CU (Magro *et al.*, 2017).

Les alteracions analítiques més freqüents en la MII inclouen trombocitosi, augment dels reactants de fase aguda (RFA) (especialment proteïna C reactiva (PCR) i la velocitat de sedimentació globular (VSG  $\geq 30$  mm/h)) i anèmia per bloqueig medul·lar (Tontini *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2020). Les concentracions de calprotectina fecal (CP) es correlacionen directament amb la quantitat de neutròfils infiltrats en la mucosa intestinal (Naismith *et al.*, 2014; Magro *et al.*, 2017; Rokkas *et al.*, 2018).

**Taula 1.10:** Criteris diagnòstics de Lennard-Jones per a la MC i la CU. Adaptat Lennard-Jones *et al.*, 1989.

Criteris	MC	CU
<b>Clínic</b>	Dolor abdominal recurrent, diarrea crònica, pèrdua de pes, massa abdominal palpable, malaltia perianal, fístules i MEI.	Rectorràgia, diarrea crònica, dolor abdominal i MEI.
<b>Radiològics</b>	Canvis Mucosa: úlceres aftoses longitudinals, pòlips inflamatoris, edema i eritema. Calibre llum intestinal: Estenosi, dilatació, fístules, lesions asimètriques.	Canvis mucosa: aspecte granular, úlceres i pseudopòlips. Canvis calibre llum intestinal: estenosi inflamatòria, pèrdua haustració colon.
<b>Endoscòpics</b>	<u>Colon:</u> aftes, ulceracions lineals profundes o serpiginoses, aspecte d'empedrat, estenosis, orificis fistulosos, pseudopòlips i pòlips. Les lesions són característicament segmentàries, d'extensió variable i amb recte preservat. <u>Ili:</u> aftes, úlceres, estenosis	Mucosa eritematosa, granular, edematosa / friable. Presència d'exsudats o ulceracions, hemorràgia al frec o espontània, pseudopòlips i pòlips. Les lesions són contínues (característica) i amb afectació del recte.
<b>Histològics</b>	<u>Majors:</u> inflamació transmural, focal i discontinu, granulomes epiteloide no caseificant, agregats limfoides sense centre germinal (troballes característiques). <u>Menors:</u> inflamació de caràcter discontinu, inflamació de la submucosa amb arquitectura epitelial conservada, retenció de moc amb inflamació crònica, fissures, metaplàsia de les glàndules de Panneth.	<u>Majors:</u> inflamació exclusiva de la mucosa, úlceres superficials, distorsió de les criptes, mico abscessos de criptes, Depleció de les cèl·lules caliciformes. <u>Menors:</u> infiltrat inflamatori crònic, augment de la vascularització de la mucosa, metaplàsia de les cèl·lules de Panneth, atròfia mucosa hiperplàsia limfoide; agregats limfoides basals amb infiltració per eosinòfils.

L'endoscòpia segueix sent el “*gold standard*” pel diagnòstic de la MII amb afectació ileocolònica o alta, i té un paper important en el monitoratge de l'activitat i la vigilància de la neoplàsia colorectal. La utilització de CE es reserva pels casos amb estudis endoscòpics negatius. Les troballes endoscòpiques no són patognomòniques (Spiceland *et al.* 2018).

Les proves d'imatge han adquirit una importància creixent en el diagnòstic i seguiment de la MC. L'Ecografia intestinal (*GIUS* en anglès) o la entero-RM s'han de fer en el diagnòstic per avaluar l'extensió de la malaltia i la presència de complicacions com estenosis o fístules; i per avaluar el seguiment de l'activitat de la malaltia ja que no irradien al pacient. L'ecografia intestinal amb Doppler és més barata que l'enterografia per TC o RM amb S del 85% (95% IC 83-87%) i E del 98% (95% IC 95-99%) per avaluar l'activitat. La TC és útil per descartar complicacions (Maaser *et al.*, 2019, 2020).

### 1.7.8-. Tractament.

#### 1.7.8.1-. Objectius del tractament i estratègies terapèutiques.

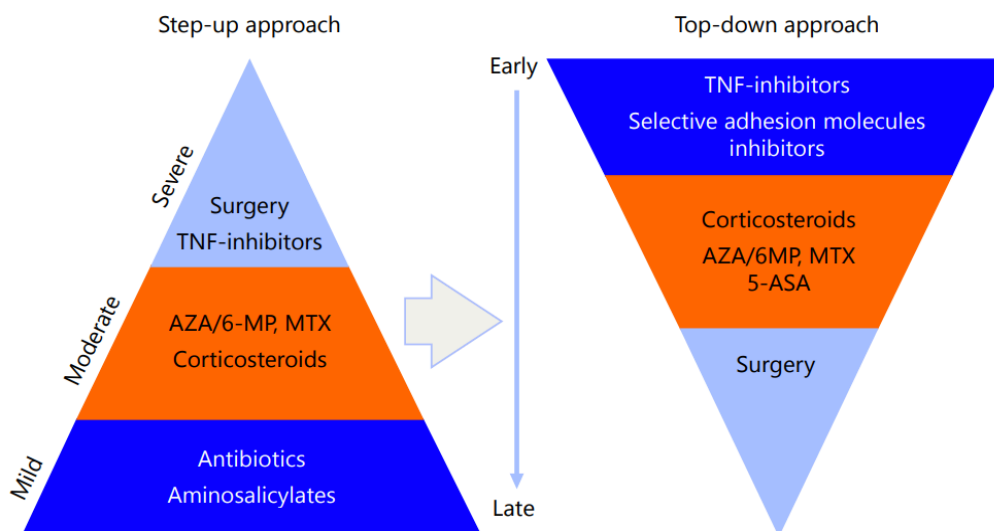
Clàssicament, el tractament es basava en l'ús de 5-ASA, IMM, corticoides (CE), suport nutricional i cirurgia. Aquesta estratègia no modificava el curs de la malaltia, i el marc del tractament va evolucionar amb l'aparició dels biològics: des del control dels símptomes cap al bloqueig de la progressió de la malaltia amb la voluntat de modificar la història natural. Actualment, la “*deep remission*” (és a dir remissió profunda clínica, histològica i endoscòpica) i la CM s'estan desenvolupant com a principals objectius terapèutics en la MII perquè es correlacionen amb la reducció de les taxes de recaiguda i menor necessitat de IQ (Cholapranee *et al.* 2017; Maaser *et al.*, 2019).

L'elecció del tractament en la MII ve determinada bàsicament per 5 factors: localització, patró de la MC (inflamatori, estenosant i fistulitzant), presència de MEI, severitat de la malaltia i les opcions del pacient. (De Jong *et al.*, 2018)

El tractament mèdic està enfocat en reduir l'activitat de la malaltia, induir la remissió clínica, aconseguir la CM, prevenció de la recidiva (o RPQ) i disminuir risc de complicacions a llarg termini. La naturalesa autoimmunitària inflamatòria de la

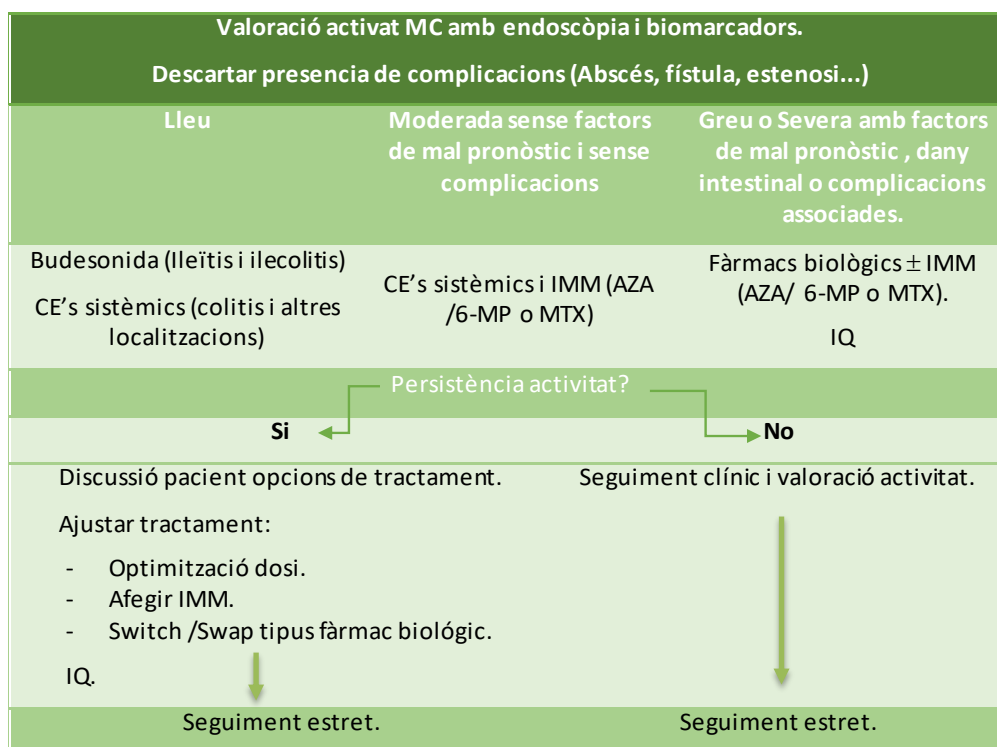


malaltia fa que la majoria de tractaments van dirigits a modular el sistema immunes per controlar l'activitat inflamatòria. (Maaser *et al.*, 2019; Torres *et al.*, 2020)



**Figura 1.6:** Piramidal del tractament de la MII. Enfocament *Top-Down vs Step-Up*. La cirurgia és el tractament més radical. Els fàrmacs biològics són els tractaments més potents però cal adaptar a cada pacient segons la situació clínica determinada. Basat i adaptat de Mosli *et al.*, 2018 i Salahudeen *et al.*, 2019.

En l'àmbit de la pràctica clínica s'acostuma a utilitzar un enfocament "escalonat" del tractament de forma piramidal com es pot observar en la figura anterior. Aquests enfocaments es basen en utilitzar tractament menys potents d'inici i afegir-ne de més potents segons l'evolució (*Step-Up*) i està indicada en casos de bon pronòstic i afectació lleu de la malaltia. En canvi, l'estratègia "Top-Down" consisteix en utilitzar fàrmacs més potents d'inici i desescalar en funció de l'evolució de la malaltia i està indicada en casos de mal pronòstic o afectació severa inicial. Actualment no hi ha consens clar sobre si un enfocament és superior a l'altre. No obstant això, l'estratègia d'introducció precoç dels fàrmacs biològics ("Top Down") ha canviat la història natural de la malaltia, i dades recents post-hoc suggereixen que aquest enfocament en fases inicials és més eficaç per controlar la malaltia a llarg termini (Tsui *et al.*, 2018; Doherty *et al.*, 2018; Salahudeen *et al.*, 2019).



**Figura 1.7:** Algoritme esquemàtic del tractament de la MC. El tractament inicial s'ajusta en funció de la severitat de la malaltia. Posteriorment re avalua la situació clínica del pacient amb proves complementàries i ajustar el tractament utilitzant les diferents opcions que disposem (optimització dosi, fer canvi dins la mateixa classe de fàrmac (*switch*), canvi entre diferents classe de fàrmacs (*swap*)). Adaptat de Torres *et al.* 2017.

En el tractament de la CU, clàssicament es descrivien altes taxes de colectomia ja que aquesta, en últim terme, pot modificar la història natural de la CU. L'aparició dels biològics va tenir un impacte important en reduir la taxa de colectomia. Un particularitat és la indicació de 5-ASA en casos no greus (Ungaro *et al.*, 2017).

En les formes lleus el tractament es basa amb 5-ASA oral i tòpica i si no resposta es poden valorar CE orals de baixa absorció sistèmica. En la CU de moderada a severa es recomana iniciar CE orals i dosis altes de 5-ASA oral i tòpica. Si s'observen signes de toxicitat sistèmica es recomana ingrés hospitalari, CE IV, i suport nutricional. En els casos fulminants o corticorefractaris s'utilitza Ciclosporina o anti-TNF (Infliximab), tal com s'expressa en la taula 1.11. Si no presenta resposta es valora la IQ. En el manteniment es pot utilitzar 5-ASA, IMM (AZA, 6-MP) o fàrmacs biològics.

**Taula 1.11** : Maneig general simplificat de la CU. Adaptat de Magro *et al.* 2017; Harbor *et al.* 2017; Ungaro *et al.* 2017.

ACTIVITAT	EXTENSIÓ		
	PROCTITIS	COLITIS ESQUERRA	COLITIS EXTENSA
LLEU	5-ASA TÒPICA	5-ASA TÒPICA I/O ORAL	5-ASA TÒPICA I ORAL
MODERADA	5-ASA TÒPICA I ORAL	5-ASA TÒPICA I ORAL. CE ORAL /TÒPICS	5-ASA TÒPICA I ORAL. CE ORAL /TÒPICS
SEVERA	5-ASA TÒPICA I ORAL. CE ORAL / TÒPICS. VALORAR INGRÉS PER CE IV. SUPORT NUTRICIONAL.	5-ASA TÒPICA + CE ORAL I/O TÒPICS. VALORAR INGRÉS PER CE IV. SUPORT NUTRICIONAL.	5-ASA TÒPICA + CE ORAL I/O TÒPICS. VALORAR INGRÉS PER CE IV. SUPORT NUTRICIONAL.
CORTICOREFRACTÀRIA	ANTI-TNF. CICLOSPORINA IV. IQ		
MANTENIMENT	5-ASA ORAL, IMM, BIOLÒGICS .		

#### 1.7.8.2-. Tractaments disponibles:

- Àcid aminosalicílics (5-ASA, oral i tòpica): Són fàrmacs antiinflamatoris que exerceixen el seu efecte a través de la inhibició de l'enzim COX, i la producció de Interleuquina 1 (IL-1) i el TNF $\alpha$  a escala de la mucosa intestinal. Tenen una baixa absorció oral (<10%) i la resta arriba al colon de forma inalterada, per aquest motiu s'utilitza més en CU que en MC. Per acció de la microbiota colònica, es metabolitza a sulfapiridina i 5-ASA, essent aquest últim el principi actiu que exerceix acció antiinflamatòria local (Greenfield SM *et al.* 1993) (Fitxa tècnica 5-ASA). La 5-ASA es pot utilitzar tant per al tractament de la fase aguda com de manteniment. Segons l'evidència actual no es recomana el seu ús en el manteniment de la MC (Harbord *et al.*, 2017a)
- Corticosteroides (CE): Són fàrmacs antiinflamatoris i immunosupressors que permeten l'alliberament de quinases inhibidores de l'alliberació de l'àcid araquidònic que redueix la formació de metabòlits inflamatoris. (Tsui *et al.*, 2018; Torres *et al.*, 2020). La MC lleu-moderada pot ser tractada amb CE orals de baixa absorció (budesonida). En el maneig dels brots greus i moderats, o bé que no responen al ttm convencional tant en la MC i la CU s'utilitzen els CE sistèmics (oral o IV) per la inducció de la remissió. Els CE no són eficaços per

mantenir la remissió i s'associen a importants efectes secundaris (hiperglucèmia, sd. de Cushing, etc.). Al voltant del 20-28% dels pacients poden esdevenir corticodepenents (Ramamoorthy *et al.*, 2016; Harbord *et al.*, 2017; Dorrington *et al.*, 2020).

- Immunomoduladors (IMM): Les tiopurines (Azatioprina (AZA) i 6-mercaptopurina (6MP)) i el metotrexat (MTX) s'han de considerar per al tractament de manteniment doncs el seu paper en la inducció en monoteràpia és discutit (Torres *et al.*, 2020).
  - L'AZA s'absorbeix a l'intestí i és metabolitzada a 6-mercaptopurina, la qual inhibeix la síntesi de purines, interferint en la síntesi d'ADN i ARN. La seva acció immunosupressora es basa en una disminució dels limfòcits B i T. No és útil pel tractament agut del brot de MII perquè els efectes terapèutics es manifesten a partir de les 3 setmanes. Augmenta el risc de neoplàsies (limfoma, càncer de pell no melanoma, principalment) i presenta efectes adversos importants (mielosupressió, pancreatitis, hepatotoxicitat, principalment) en el 2-5% dels tractaments. (Aarbakke, *et al.*, 1997; Fitxa tècnica medicament Imurel®)
  - El MTX és un anàleg dels folats, capaç d'inhibir la dihidrofolat reductasa, enzim implicada en la síntesi de nou de purines i pirimidines, interferint en la síntesi d'ADN i ARN. Perfil similar a l'AZA, però és teratogènic. Segons FT es pot utilitzar per a la inducció i manteniment de la remissió de la MC lleu o moderada, en pacients refractaris o intolerants a tiopurines. (Mantzani *et al.*, 2017; Fitxa tècnica medicament MTX).
- Fàrmacs Biològics: Els fàrmacs biològics són els agents més potents disponibles actualment (deixant a banda el trasplantament de precursors hematopoètics). Els fàrmacs biològics actuen sobre diverses vies amb diferents mecanismes d'acció: bloquejant el TNF, inhibidors de les molècules d'adhesió, o inhibidors de les molècules JAK (tofacitinib) entre d'altres (Magro *et al.* 2017; Torres *et al.* 2020). Els fàrmacs biològics presenten particularitats com la no resposta primària (persistència d'activitat clínica durant la fase d'inducció, 3-40% en els estudis clàssics), la no resposta secundària (pèrdua de resposta en la fase de manteniment) i la formació d'Ac contra el propi fàrmac. (Barré *et al.* 2018). Els

darres anys han aparegut els medicaments biològics similars (biosimilars) que són medicaments biològics equivalents en qualitat, eficàcia i seguretat al seu biològic original, anomenat de referència. Actualment només disposem d'IFX i ADA biosimilars.

**Taula 1.12:** Resum de les indicacions i posologies dels fàrmacs biològics inclosos en la tesi. Veure FT infliximab, adalimumab, golimumab, vedolizumab.

MEDICAMENT	INDICACIONS/ GENERALITATS	POSOLOGIA
<b>INFLIXIMAB</b>	<p>Ac monoclonal (IgG1) quimèric no humà. Bloqueja el receptor TNF.</p> <p>Ttm MC activa, moderada a greu, en pacients que no han respost a CE i/o IMM o intolerants o amb contraindicacions al tractament; malaltia fistulitzant en pacients sense resposta al ttm convencional (Regueiro et al.,2007)</p> <p>Ttm CU activa, moderada a greu en pacients que han presentat resposta inadequada a la teràpia convencional, inclòs CE i/o IMM o que presentin intolerància o contraindicació.</p>	<p>Pauta d'inducció a 5mg/kg intravenós administrat a les setmanes 0, 2 i 6 i si resposta, pauta manteniment dosis de 5mg/kg cada 8 setmanes.</p>
<b>ADALIMUMAB</b>	<p>Ac monoclonal humà. Subcutani. Bloqueja els receptors TNF. (TNFR1 i el TNFR2).</p> <p>Ttm de la MC activa, moderada a greu, en pacients que no han respost a CE i/o IMM o intolerants o amb contraindicacions.</p> <p>Ttm de la CU activa moderada a greu en pacients que han presentat una resposta inadequada a la teràpia convencional, inclòs CE i IMM o que amb intolerància o contraindicació.</p>	<p>Pauta d'inducció de 160 mg setmana 0, 80mg setmana 2 i seguit d'una dosi de manteniment de 40mg cada 2 setmanes administrat per via SC.</p>
<b>GOLIMUMAB</b>	<p>Ac Monoclonal SC Humà. Fàrmac antiTNF amb experiència prèvia en reumatologia. Forma complexes estables que bloquegen el TNF<math>\alpha</math> (soluble i transmembrana),</p> <p>CU activa, moderada a greu en pacients que han presentat una resposta inadequada a la teràpia convencional, inclòs CE, i IMM o que presentin intolerància o contraindicació .</p>	<p>Pes &lt;80kg: 200mg, seguit de 100 mg setmana 2, 50mg setmana 6 i posteriorment 50mg cada 4 setmanes.</p> <p>Pes &gt; 80kg: 200mg seguit de 100mg setmana 2 i posteriorment 100mg cada 4 setmanes.</p>
<b>VEDOLIZUMAB</b>	<p>Ac monoclonal (anti integrina), IV, bloqueja la integrina <math>\alpha 4\beta 7</math> (anti-alfa-4-beta-7) recombinant humanitzada</p> <p>Ttm de la MC o CU activa, moderada a greu, en pacients amb resposta inadequada, pèrdua de resposta o intolerants al tractament amb un antagonista del factor de necrosis tumoral alfa (TNF<math>\alpha</math>).</p>	<p>300mg administrats en perfusió IV a les setmanes 0, 2 i 6 i després cada 8 setmanes.</p>

#### 1.7.8.4.-Cirurgia (IQ):

La indicació del moment exacte del tractament IQ és complex i cal avaluació per un equip multidisciplinari format per radiòlegs, digestòlegs, cirurgians i nutricionistes (Maaser *et al.*, 2019).

Els pacients amb MC que desenvolupen complicacions (abscessos/estenosi), símptomes obstructius, presenten malaltia refractària o intolerància al tractament mèdic són candidats a IQ. La recurrència clínica post IQ és freqüent al llarg del temps (Fornaro *et al.* 2015; Adamina *et al.* 2020).

En la CU la IQ, habitualment proctocolectomia restauradora amb reservori ileoanal, està indicada en pacients amb no resposta o intolerància al tractament mèdic, o per la displàsia o CCR. És un tractament definitiu que pot associar-se a complicacions posteriors (Sica *et al.* 2015; Harbord, *et al.* 2017).



## 2-. Hipòtesi i objectius

### 2.1-. Antecedents i experiència prèvia del grup.

El grup de recerca en malalties digestives i microbiota, creat dins de l'institut d'investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi), és un equip multidisciplinari format per metges i microbiòlegs, investigadors post doctorals centrats en l'estudi de la MI i de la disbiosi intestinal en diferents patologies per tal de desenvolupar marcadors clínics. El grup està lligat a la unitat de malaltia inflamatòria (UMI) de l'Hospital Universitari de Girona Doctor Josep Trueta (HUJT) i el grup de microbiologia del departament de biologia de la Universitat de Girona (UdG).

Publicacions inicials del grup van descriure una composició microbiana anòmala a escala de la mucosa ileocòlica en pacient amb MC detectada a través de qPCR. Posteriorment es va descriure una *E. coli* (*EC*) enteroinvasiva i adherent (*AIEC* en anglès) que tenia un possible rol causal en la disbiosi de la MC donada la seva capacitat per crear biofilms com una característica fenotípica especial (Martínez-Medina *et al.* 2009). Treballs posteriors van detectar seqüències de DNA bacterià específic amb possible relació amb el CCR i la seva detecció precoç (Teresa Mas-de-Xaxars, Tesi doctoral Universitat de Girona, 2011; Chen *et al.* 2017).

Posteriorment es va descriure un rol de *F. prausnitzii* (*FP*) en la disbiosi, com a efecte protector i es van descriure 2 filotips que s'associaven a un comportament específic de la MII i la seva modificació en el CCR. També es va descriure com la riquesa microbiològica del FP estava reduïda en la MC (Lopez-Siles *et al.* 2011, 2015).

Arran de l'estudi sobre FP i EC com a possibles microorganismes clau i bons indicadors de la disbiosi intestinal, es va relacionar que la disbiosi en la MII (MC i CU) i en els CS es podria resumir a través de la proporció relativa de les abundàncies d'ambdós microorganismes. Aquesta proporcionalitat seria definida per una relació inversament proporcional entre FP i EC respecte els eubacteris totals (ET), en forma d'índex que permet "quantificar" el grau de disbiosi present de forma relativa. Es va descriure que la relació FP/EC anomenada índex FEI; podia distingir entre els fenotips de la MII i el SII (Lopez-Siles *et al.* 2009, 2014). Es va



realitzar un estudi pilot amb CU de marcadors de disbiosi en una intervenció amb un fàrmac on es va objectivar una excel·lent correlació amb mostres fecals (Miquel-Cusachs *et al.* 2015). També es va analitzar com el tractament biològic amb ADA en la MC indueix canvis en la MI en relació amb la resposta al tractament (Mas-de-Xaxars *et al.* 2009; Busquets *et al.* 2015).

## **2.2.- Justificació del treball.**

Actualment disposem de diferents eines per monitorar la MII. Els darrers danys s'ha desenvolupat l'estudi de la MI i el possible paper en l'etiopatogènia de la mateixa. La descripció de determinats patrons microbiològics associat a diferents situacions clíniques ha permès descobrir signatures bacterianes que plantegen la seva utilització com una eina més per el diagnòstic i seguiment de la MII. Actualment la descripció de signatures bacterianes lligades a diferents patologies és un tema d'interès creixent en la literatura mèdica amb nombroses empreses que estan iniciant en aquest camp

Donada la complexitat creixent de la MII en relació a les opcions de tractament diferents disponibles i la resposta dels mateixos cal afegir més eines per el seguiment de la MII. S'ha postulat que els canvis en la MI poden predir la resposta al tractament, però en tot cas la MI associada a la MII és diferent respecte dels CS per l'activitat de la mateixa malaltia.

El nostre grup de treball va ser pioner en aquest camp però mancaven estudis dirigits específicament a descriure el comportament de la MI en la MII i validar les descripcions prèvies que s'havien fet respecte FP i EC com a eines simples pel monitoratge de la MII.

La Justificació de la realització de la present tesi és l'estudi de l'aplicació de les quantificacions microbiològiques per a la descripció de la MI en el monitoratge dels canvis de la MII (MC i CU) respecte dels CS, i valorar-ne la utilitats respecte dels paràmetres clínics en un escenari proper a la pràctica clínic habitual.

### 2.3.- Hipòtesi de treball:

- 1-. La MI presenta un patró de disbiosi diferent dels CS degut a l'activitat de la MII.
- 2-. La quantificació de 2 grups bacterians i el seu quocient són bons indicadors de la disbiosi intestinal en la MI.
- 3-. L'Índex FEI és útil com a biomarcador d'activitat de la MII.

### 2.4.- Objectius:

- A) Valorar la possible utilitat clínica de l'Índex FEI com a biomarcador clínic per:
- i. Diferenciar subtipus de MII (MC/CU).
  - ii. Diferenciar pacients amb MII dels CS.
  - iii. Diferenciar MII activa de la remissió i valorar la resposta al tractament.
  - iv. Eina per a monitorar la MII.

Objectius secundaris:

- B) Determinar el punt de tall del FEI per diferenciar l'activitat de la remissió clínica respecte dels CS.
- C) Demostrar la capacitat de la quantificació bacteriana com a eina útil per mesurar l'efectivitat i la resposta al tractament en pacients amb MII en una intervenció concreta.
- i. Analitzar el comportament temporal de la MI en la MII en pacients amb MII i remissió profunda.
  - ii. Analitzar l'impacte del tractament biològic sobre la MI en la MII activa naïf a biològics.
  - iii. Descriure el comportament dels marcadors microbiològics en relació als paràmetres clínics, endoscòpics i analítics habituals en el seguiment de la MII.



### 3-. Materials i Mètodes:

#### 3.1 Disseny estudi

Es va dissenyar un estudi prospectiu, transversal i multicèntric entre Hospital universitari de Girona "Dr. Josep Trueta" (HUJT) i el Consorci hospitalari de Vic (CHV).

Vam incloure inicialment 96 pacients però es van descartar per mala qualitat d'algunes mostres o bé per mostra fecal insuficient, quedant finalment 80 pacients inclosos (40 MC i 40 CU); dels quals disposem de mostra inicial (T0) i mostra al cap de 3 mesos (T1); així com mostres addicionals cada 3 mesos després (T2). Tots els pacients complien els criteris d'inclusió i cap d'exclusió.

Vam incloure 8 CS que no presentaven patologia digestiva, ni cap altra patologia no digestiva ni consum de medicació que alteri la MI. Vam recollir mostres fecals dels mateixos i es van custodiar al Biobanc (Col·lecció HCC i CSD (*Controls Sans Digestiu*)).

Per tal de complir amb els objectius d'analitzar els canvis en la MI relacionats amb l'activitat de la MII es van incloure pacients en els següents escenaris:

- Pacients amb malaltia activa o no responedors:
  - Mostra T0 previ al canvi de tractament i segona mostra 3 mesos després (T1) i una eventual 3 mesos després (T2). Inclou pacients amb i sense tractament biològic, i naïf al mateix, amb i sense consum d'immunomoduladors per poder avaluar el possible efecte sobre la MI.
  - En la present tesi per tal de definir pacients amb activitat de la MII o bé la no resposta al tractament inicial en T0 en una mostra de qualsevol temps d'una forma objectiva vam considerar aquells pacients amb CP >250µg/g.
- Pacients en remissió o responedors:
  - Pacients amb CP <250µg/g.

- Pacients en remissió profunda els quals se'ls retira el tractament biològic i/o estan en tractament amb immunomodulador en T0.
- Pacient amb remissió clínica que mantenen el mateix tractament en T1 i T2.

Per tal d'estudiar l'efecte de l'activitat de la MII en els canvis de la MI es van distribuir els pacients en 2 grups en relació a la situació clínica en T0: en activitat (CP>250) i remissió (CP<250), i desglossat per les dos malalties i el conjunt de la MII global. Dels pacients del grup activitat en T0, en T1 es van classificar en responedors o remissió (CP<250 grup remissió) i no responedors (CP>250, grup activitat) i es van comparar les mitjanes de les variables. En T2 es va actuar amb el mateix criteri. No es va poder establir 2 grups amb igual nombres de pacients per la MC i per la CU.

Es va dissenyar una sub anàlisi per tal d'avaluar la resposta de la MI en relació a la malaltia en un entorn clínic més real, i es van analitzar 2 sub grups de pacients:

- Sub grup Retirada Biològic (RB): Pacients en remissió clínica profunda (endoscòpica, analítica i clínica) durant més de 6 mesos i en tractament biològic. Mostra T0 previ a la retirada del biològic i mostra cada 3 mesos posteriors (T1 i T2) sense ttm biològic i amb el seu ttm de base. Es van comparar els valors analítics (PCR,CP, Alb i Hb) i microbiològics (FP,EC i ET). Aquesta estudi va valorar els canvis en la MI dels pacients en remissió clínica profunda (RP), i si existeix un canvi del patró microbiològic associat a la remissió. N= 8.
- Sub grup Inici Biològic (IB): Pacients amb MII activa, naïf a un tractament biològic que presenten un brot lleu/moderat (segons CP i índex d'activitat clínica) que requereix iniciar tractament amb fàrmac biològic. Mostra en T0 en el brot modera/lleu previ a la introducció del ttm i mostra T1 als 3 mesos posteriors avaluant la resposta. Aquest grup va analitzar l'efecte del control del grau d'activitat sobre els canvis en la MI. Es van incloure pacients que si havien rebut PDN, dosi màxima 10mg. N= 19.

Es van incloure pacients amb malaltia colònica (o ileocòlica en la MC) i es van excloure els pacients amb resecció intestinal o bé malaltia fistulitzant concomitant; per tal d'homogeneïtzar la mostra.

Els pacients amb malaltia severa es van excloure de l'estudi, ja que es tracta d'un grup de pacients amb una MI molt alterada, diferent de la malaltia lleu o la remissió (Michail *et al.* 2011; Kedia *et al.* 2020).

Es van comparar els marcadors microbiològics estudiats (FP, EC, ET i FEI) amb les variables analítiques, clíniques i endoscòpiques de referència habituals. (veure apartat 3.4).

#### **3.2. Població a estudi i cronograma.**

La Població a estudi és una cohort de pacients extrets de la col·lecció 003/2014-MII del BioBanc de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi), la qual inclou pacients amb MII dels hospitals Hospital Universitari De Girona "Josep Trueta" (HJT) i el Consorci Hospitalari de Vic (CHV) provinents de les consultes externes i dels serveis d'hospitalització d'aquests hospitals terciaris de referència.

La col·lecció 003/2014-MII és una col·lecció de mostres biològiques (sang i femta) de pacients amb MII (MC, CU i colitis indeterminada) que es recullen de forma prospectiva i consecutiva. Les mostres s'inclouen en la col·lecció quan compleixen els criteris d'inclusió/exclusió i la signatura del consentiment informat (CI). Actualment la col·lecció inclou uns 270 pacients amb MII i unes 800 mostres de femta i unes 250 mostres de sang.

La custòdia de les mostres al Biobanc de l'IdIBGi, es realitza seguint els protocols del Biobanc d'inclusió de mostres biològiques per a estudis. S'inclouen en la col·lecció mostres de sang a l'inici de l'estudi o quan l'investigador ho sol·liciti (determinants genètics, nivells de fàrmac, etc.) i fecals cada 3 mesos o quan hi ha un canvi clínic o de tractament significatiu. La col·lecció es va iniciar el 2014 i actualment està vigent. El període de seguiment de pacients és variable. Els controls sans (CS) s'obtenen de la col·lecció "Control Sans Digestiu" del Biobanc de l'IdIBGi.

La proposta d'inclusió de pacients a la col·lecció MII va ser presentada i aprovada al CEIC del HJT i del CHV. Aquest estudi s'ha dut a terme segons el Codi de Bones Pràctiques en Recerca de l'IdIBGi, així mateix, s'han respectat tots els principis fonamentals de la Declaració de Hèlsinki (1975). El tractament, la comunicació i la cessió de dades de caràcter personal dels participants s'ajusta a la LO 3/2018, de 5 de desembre de 2018 en Protecció de dades personals i drets digitals (LOPDGDD), publicada el 6 de desembre de 2018.

Els pacients analitzats en la present tesi es van incloure en la col·lecció MII entre setembre de 2014 i febrer del 2018. Posteriorment es van analitzar les mostres al IdIBGi fins al setembre 2018. De octubre 2018 a gener 2019 es van realitzar les anàlisis estadístiques. Es van incloure en la cohort de la tesi només els pacients de la col·lecció MII que compleixen els criteris d'inclusió.

### 3.3 Criteris inclusió /exclusió:

Criteris inclusió:

- > 18 anys.
- Signatura consentiment informat (CI).
- MII (MC/CU) diagnosticada pels procediments habituals (Maaser *et al.* 2019).
- MC amb almenys afectació ileocòlica (distal) o colònica pura.
- 6 mesos de seguiment mínim amb mostra cada 3 mesos.
- Almenys 1 mostra prèvia al canvi de tractament.
- Continuitat de la recollida de mostres

Criteris exclusió:

- Embaràs / lactància activa.
- Consum d'ATB les 4 setmanes prèvies.
- Cirurgia prèvia o durant l'estudi o altres cirurgies que comprometin el tracte intestinal.
- Ús de probiòtic i/o prebiòtics 4 setmanes prèvies a la recollida.
- Tuberculosis o altres infeccions cròniques actives.

- Presència de malaltia fistulitzant activa.
- Pèrdua de seguiment de les mostres.
- Malaltia greu concomitant
- Afectació rectal distal aïllada.
- Inclusió en assaig clínic.
- Malaltia severa per la valoració del clínic tractant, o bé HBI  $\geq$  17 o SCCAI  $\geq$  8, o signes d'afectació sistèmica.

### 3.4 Variables principals a analitzar.

La valoració de l'activitat de la malaltia es va referir a l'avaluació en un punt de temps concret i és important per escollir el tipus de tractament inicial, avaluar la necessitat d'ingrés hospitalari o valorar clínicament la resposta a un fàrmac. Per tal de valorar l'activitat en la MII és necessari l'ús de diferents índexs d'activitat (clínic i endoscòpic), marcadors analítics i el judici clínic del propi metge.

#### 3.4.1-. Dades demogràfiques :

Hem recollit dades d'edat (anys), sexe, hospital origen, ètnia (caucàsica), índex de Massa corporal (IMC), antecedents de cirurgies prèvies, tipus de malaltia, any del diagnòstic de la MII, temps d'evolució de la MII, edat al diagnòstic, extensió de la malaltia, comportament malaltia, gravetat de la malaltia, complicacions sobreafegides, medicació concomitant, tractaments previs i actuals i durada del mateix , tabaquisme (fumador, ex-fumador, no fumador).

#### 3.4.2-. Variables a estudi.

Per valorar l'activitat de la malaltia i el comportament de les variables microbiològiques s'han recollit les següents variables :

- Analítics: Hemoglobina (Hb) g/dL, CP  $\mu$ g/g, PCR mg/L i Albúmina (Alb) g/dL.
- Qualitat de vida en la MII: IBD-Q (sense unitats).
- Índex Activitat clínica: SCCAI (per CU) i HBI (per MC) (sense unitats).
- Índex Endoscòpic: Mayo parcial (per CU) i SES-CD (per MC) (sense unitats).



- Microbiològics (veure introducció): FP,EC, ET(còpies/g) i Índex FEI.

Es van recollir les dades de endoscòpies realitzades com a màxim 1 setmana prèvia o posterior de la inclusió de la mostra dins la mateixa situació clínica del pacient.

### 3.4.2.1- Variables analítiques:

#### Calprotectina fecal (CP):

La CP és una proteïna fixadora de calci i zinc que representa el 60% de les proteïnes presents en el citoplasma dels neutròfils i en la membrana dels monòcits i els macròfags activats. En un procés inflamatori es produeix una migració dels leucòcits cap a la llum intestinal a través de la mucosa inflamada alliberant la CP que s'excreta en femtes proporcionalment al grau d'inflamació intestinal. És un marcador fecal que permet avaluar la inflamació intestinal de manera simple, ràpida, fiable, no invasiva i reproduïble. Això juntament amb la seva resistència a la degradació bacteriana i l'estabilitat en femta (fins a 7 dies) fan que la CP sigui un bon marcador clínic. (Manceuau *et al.* 2017; Heida *et al.* 2017; Mumolo *et al.* 2018).

**Taula 3.13:** Resum dels estudis sobre els valors de la CP per a descartar malaltia activa.  
\*: es descarta malaltia activa.

Estudi	MC	S / E	CU	S / E
D'Haens 2012 (Estudi CALM)	CP>250 µg/g Úlceres: CP>250µg/g+ PCR >5mg/L	S 63,6% i E 94,4%  S 71,4% i E 85,2%.  S 77,4% i E 85,07%	CP>250µg/g	S 71 E 100%
Colombel 2018 (Estudi CALM)	CP>250µg/g i/o PCR >5mg/L	S 60% i E 80%		
De Vos 2013			CP>300µg/g en 2 mostres	S 73,3% E 89,8%
Lasson 2015			CP>300µg/g CP < 50µg/g remissió	S 46% i E89,9% S77% i E 71%
Sollelis 2019	Remissió: CP< 300µg/g CP<300µg/g + PCR <2,9mg/l + CDAI<250*	S 84,6% i E 77,8%  S69,2% i E 100%		
Rokkas 2018		Correlació amb activitat inflamatòria :r= 0,61 S85% i E 75% (AUC 0,88). CP<40µg/g (1% risc de MII)		

S'utilitza principalment per confirmar la curació de la mucosa i preveure la recaiguda de la malaltia i pel diagnòstic diferencial amb el SII. Els pacients en remissió clínica i concentracions elevades de la CP van tenir un risc de recaiguda de 2 i 14 vegades superior (MC i CU respectivament) que els pacients sense elevació de la CP (Mosli *et al.* 2015). Els nivells de CP s'eleven de forma precoç abans de presentar clínica de brot agut. Finalment per avaluar la resposta al tractament, una disminució dels nivells de la CP superior al 20% va estar associada a la millora clínica i endoscòpica ( Solleis *et al.* 2019).

La gran limitació que presenta aquest marcador és que no estan clarament definits els punts de tall òptims sobretot en les indicacions fora de la MII com ara el SII (Walsh *et al.*, 2019). En l'estudi CALM (Colombel *et al.*, 2018) el punt de tall (PT) de la CP per definir MC activa es va definir en un valor de CP >250 µg/g amb. Una sub anàlisi del estudi CALM (D'Haens *et al.*, 2012) va determinar que el PT per definir MC activa era CP>250 µg/g amb una sensibilitat (S) del 63,6% i especificitat (E) del 94,4%. El mateix valor per detectar úlceres mucoses endoscòpiques va tenir una S del 71,4% i E del 85,2%. El mateix estudi va determinar que la combinació de CP<250 µg/g i PCR <5mg/l tenia una S del 77,4% i E de 85,7 per a determinar remissió clínica i endoscòpica. El mateix estudi va determinar que el valor de CP>250 µg/g s'associa a activitat per la CU (S del 71% i E del 100%).

Per la present tesi quan es va definir els punts de tall per activitat de la MII es va considerar malaltia activa com CP>250 µg/g, trastorn orgànic lleu o malaltia inflamatòria intestinal en fase de remissió: 100-150 µg/g, remissió profunda <50-100 µg/g (Colombel *et al.* 2017).

La determinació quantitativa de la CP en femta s'ha realitzat mitjançant tècnica ELISA de microplaca en fase sòlida d'Ac monoclonals de CP humana utilitzant kit comercial en el laboratori del HJT i del CHV (BioHit HealthCare, Madrid 2004).

#### Proteïna C reactiva (PCR):

La proteïna C reactiva (PCR) és una proteïna reactant de fase aguda d'algun procés específic. En condicions normals es sintetitza al fetge pels hepatòcits (aproximadament 0,8 mg/L/dia) i aquests, enfront d'estímuls inflamatoris, n'incrementen la síntesi, procés que està bàsicament dirigit per la IL-6 però també

pel TNF $\alpha$  i la IL-1B. La PCR té una curta semivida d'eliminació de 19 hores pel que s'aixeca de forma precoç a l'inici de qualsevol procés inflamatori agut però disminueix ràpidament després de la seva resolució, fet que permet veure l'evolució clínica de la malaltia en el temps (Menees *et al.* 2015).

Diferents estudis mostren que nivells elevats de PCR són indicatius de malaltia activa o de complicació infecciosa. En el cas de la MII, s'ha observat una bona correlació entre l'activitat clínica i endoscòpica i nivells alts de PCR. També s'ha vist que una disminució dels nivells de la PCR són indicatius de resposta al tractament, mentre que nivells de PCR elevats persistentment estan associats a activitat de la malaltia (Mosli *et al.* 2015; Menees *et al.* 2015).

No obstant això, diferents autors descriuen que el comportament de la PCR difereix considerablement entre la MC i la CU. En els pacients amb CU hi ha una menor síntesi de PCR respecte la MC activa i per tant conclouen que la PCR és un marcador menys fiable de la inflamació i l'activitat en la CU (Peyrin-Biroulet *et al.* 2016). Els punts de tall per activitat/remissió utilitzats en la tesi són els següents: remissió/baixa activitat <5 mg/l, malaltia activa  $\geq$ 50 mg/l (5 mg/dl) (Veure taula 3.13 estudis CP) (Colombel *et al.* 2017). La tècnica per determinar la PCR en sang és l'estàndard aprovat pel laboratori del HJT i del CHV (EuroLyser, Madrid).

#### Albúmina (Alb):

L'albúmina és la proteïna de major concentració (50-65%) plasmàtica i és de síntesi hepàtica exclusiva. Aquesta molècula està composta d'hidrogen, oxigen, nitrogen i un petit percentatge de sofre (<2%). A grans trets es pot dir que és una proteïna "transportadora". Les funcions principals de l'Alb és el manteniment de la pressió oncòtica, control del pH, transport de fàrmacs, hormones, àcids grassos i bilirubina no conjugada. En ser un compost bàsicament proteic, la seva síntesi va lligada a l'estat nutricional del pacient i a l'activitat de la malaltia de base. En cas d'un estat nutricional deficitari per una malaltia activa, la seva síntesi està disminuït. La mesura de l'albúmina a la sang és un bon indicador de la funció sintètica del fetge i de l'estat nutricional de retruc. A l'organisme hi ha aproximadament 500 g d'albúmina, amb una producció de 15 g/dia. La vida mitjana és de 20 dies i la concentració plasmàtica és de 3,5-5 g/dL (Ghoneima *et*

al., 2019). La tècnica per determinar Albúmina en sang és l'estàndard aprovat pel laboratori del HJT i del CHV.

#### Hemoglobina (Hb):

L'hemoglobina (també anomenada haemoglobina) és la proteïna que transporta l'oxigen i conté ferro. Es troba als glòbuls vermells. És una de les proteïnes amb una funció més important en l'organisme. Es considera un marcador poc específic d'activitat ja que en cas de malaltia activa es produeix un bloqueig medul·lar en la síntesi de Hb per efecte de l'hepcidina entre d'altres, que causa anèmia de malalties cròniques; i tant l'absorció de Ferro com la producció es troben bloquejades. Els valors habituals en homes són de 13,8-17,2 g/dL i en dones de 12,1-15,1 g/dL (Murphy *et al.* 2014). La tècnica per determinar nivells Hb en sang és l'estàndard aprovat pel laboratori del HJT i del CHV .

#### 3.4.2.2-. Índexs d'activitat clínica en la MII:

##### SCCAI: ("Simple Clinical Colitis Activity Index"):

És un índex clínic d'activitat específic de la colitis ulcerosa que utilitza 6 variables (nombre de deposicions diürnes, nombre de deposicions nocturnes, urgència defecatòria, presència de sang en femta, estat general i complicacions extraintestinals). El rang de puntuació és de 0-19 punts. No ha estat validat. Es considera remissió clínica quan s'obté una puntuació  $\leq 2$ . Es considera resposta quan hi ha una disminució de  $>1,5$  punts respecte a la situació basal. També serveix per definir una recaiguda de la colitis ulcerosa: una puntuació  $\geq 5$  defineix recaiguda amb una sensibilitat del 92% i una especificitat del 91% dels casos. (Walmsley *et al.* 1998; Samuel *et al.* 2013, Sturm *et al.* 2019). Es va calcular en un estudi que el SCCAI té una S, E i VVP i VVN de 43%, 96%, 94% i 51% respectivament per a valoració d'activitat en la CU (Falvey *et al.* 2015). Els valors de tall de l'índex SCCAI són els següents:

- Remissió:  $\leq 2$ .
- LLeu: 3-7.
- Moderat:  $> 8$ .

### Índex Harvey-Bradshaw (HBI):

L'índex de HBI s'utilitza per mesurar l'activitat clínica en pacients amb MC. Es va crear el 1980 (Harvey *et al.* 1980) com una versió simplificada de l'índex d'activitat de la malaltia de Crohn (CAI). Consisteix únicament en 5 paràmetres clínics (estat general, dolor abdominal, nombre de deposicions líquides diàries, presència de massa abdominal i complicacions). Es pot realitzar en un únic dia. Comparativament amb el CAI, aquest inclou 7 variables clíniques i un paràmetre analític (hematòcrit) i es necessiten 7 dies per la seva complementació i per tant no és senzill d'aplicar-lo en la pràctica clínica. Aquest índex té la debilitat que no és fàcil de calcular i inclou variables subjectives com la valoració subjectiva per part del pacient i l'estat general, que en limiten l'ús. L'índex de HBI té una correlació positiva forta (0,89) amb el CAI (Sturm *et al.* 2019). El CAI puntua CAI <150 en malaltia inactiva, 150-450 en MC activa i >450 en la MC greu. Una caiguda en el CAI de 100 punts correspon a una disminució de 3 punts en el HBI. Així, els pacients amb MC que puntuen 4 punts o menys en l'HBI és molt probable que estiguin en remissió clínica perquè es correlaciona amb el CAI ≤150 punts.

**Taula 3.14:** Classificació Índex simple de Harvey-Bradshaw. Adaptat de Vermèire *et al.*, 2010.

Variable	Descripció	Puntuació
1	Estat general	0 = Excel·lent 1= Lleugerament alterat 2 = Dolent 3 = Molt dolent 4= Terrible
2	Dolor abdominal	0 = No 1 = Lleuger 2 = Moderat 3 = Sever
3	Nombre de deposicions líquides / dia.	1 per deposició (màxim 8)
4	Massa abdominal	0 = No 1 = Dubtosa 2 =Definida 3 = Definida i tova
5	Complicacions	1 punt per cada complicació.
<b>Puntuació total</b>	remissió (<4), lleu 5-7; moderat 8-16 i sever > 17.	

Al llarg d'aquesta tesi doctoral es va utilitzar l'índex de Harvey-Bradshaw ja que és un índex senzill, àmpliament utilitzat en pràctica clínica, còmode d'usar i calcular (Harvey Bradshaw *et al.* 1980; Best *et al.* 2006; Vermeire *et al.* 2010).

### 3.4.2.3-. Índex endoscòpics:

#### SES-CD (Simple Endocopy Crohn Disease en anglès):

L'any 1989 (Guyatt *et al.*) es va publicar el primer índex per valorar l'activitat endoscòpica en la MC anomenat índex endoscòpic de gravetat de la MC (CDEIS sigles en francès) de la societat francesa de MII (GETAID). Aquest índex és complex de calcular doncs consta de 4 paràmetres i cada un s'avalua en 5 segments del colon (ili terminal, còlon ascendent, transvers, descendent-sigma i el recte) i no s'utilitza de forma rutinària per la seva dificultat de càlcul.

L'any 2004 es va validar un índex anomenat índex endoscòpic simplificat d'activitat en MC (SES-CD) que es basa en el CDEIS. En el procés de validació, es va mostrar forta correlació entre SES-CD i CDEIS ( $r=0,920$ ) (Sipponen *et al.* 2010). El SES-CD es correlaciona amb paràmetres clínics i nivell sèrics de PCR. És un índex més senzill i fàcil d'aplicar. En la taula 3.15 es desglossa la puntuació de l'índex. Els punts del tall del SES-CD són: remissió: 0-2, activitat lleu: 3-6, moderada: 7-15, greu:  $\geq 16$  (Daperno *et al.* 2004).

**Taula 3.15:** Índex SESCD. Extret de Daperno *et al.*, 2004.

ÍNDEX SES-CD				
VARIABLES	0	1	2	3
MIDA ÚLCERES (CM)	CAP	ÚLCERES AFTOSES (DIÀMETRE $\leq 0,5$ )	ÚLCERES GRANS (DIÀMETRE 0,5-2)	ÚLCERES GEGANTS (DIÀMETRE $\geq 2$ )
SUPERFÍCIE ULCERADA	CAP	< 10%	10-30%	>30%
SUPERFÍCIE AFECTADA	CAP	< 50%	50-75%	>75%
PRESÈNCIA ESTENOSIS	CAP	ÚNICA, FRANQUEJABLE	MÚLTIPLES, FRANQUEJABLE	NO FRANQUEJABLE
SUMA (RANG TOTAL 0-60) DE LES VARIABLES EN ELS 5 SEGMENTS EXAMINATS: ILI TERMINAL, COLÓN ASC, TRANSVERS, DESCENDENT I RECTE. RANG SEGMENT (0-15)				

En la literatura es descriu que els índex d'activitat endoscòpica (SES-CD) i d'activitat clínica (HBI) es correlacionen directament amb la MC activa (Spiceland *et al.* 2018). Malgrat que el SES-CD es va dissenyar amb la voluntat de valorar

paràmetres objectivament, són explorador depenent i mostren variabilitat en els estudis (Sturm *et al.* 2019).

Índex de Mayo (o Índex de Schroeder):

Índex d'activitat en la CU. Considera 4 variables: freqüència defecatòria, sagnat rectal, aparença endoscòpica de la mucosa i valoració mèdica. Barem Rang de puntuació de 0 a 12 punts. Aquest índex s'utilitza en diferents estudis on es valora la resposta als tractaments. Es considera un índex mixt perquè inclou variables clíniques i endoscòpiques. Es va desenvolupar un *sub score* purament endoscòpic, àmpliament utilitzat en la pràctica clínica, malgrat que en l'estudi inicial no es va validar de forma específica ja que es va validar l'índex global.

Es considera resposta clínica quan hi ha una disminució  $\geq 3$  punts sobre la situació basal i ha d'incloure una disminució del sagnat rectal d'almenys 1 punt o una puntuació absoluta de sagnat rectal no superior a 1. La remissió clínica es considera quan el valor total és de 2 punts o menys sense cap individual *sub-score* que sumi més d'un punt. La remissió endoscòpica és definida com una puntuació endoscòpica de 0. En la present tesi per tal de valorar l'activitat endoscòpica en la CU es va utilitzar el *sub-score* de Mayo aplicat a l'endoscòpia (valors de 0 a 3). Es va preferir utilitzar l'índex de Mayo per la seva facilitat d'aplicació i per l'ampli us en la pràctica clínica respecte al UCEIS (Travis *et al.*, 2012), que és un altre índex utilitzat però relativament més complex d'aplicar (Schroeder *et al.* 1987; D'Haens *et al.* 2012).

En relació amb els índex d'activitat endoscòpica i clínica, un estudi (Irani *et al.* 2017) va demostrar una excel·lent correlació ( $r=0,92$ ; 95% IC,  $p < 0,001$ ) entre l'índex de Mayo i la histologia en la CU. Un altre estudi (Ryu *et al.* 2019) va demostrar que la CP i el Test de sang oculta en femta (TSOF) va mostrar una correlació de  $r=0,68$  ( $p < 0,001$ ) i  $r=0,64$  ( $p < 0,001$ ) respectivament amb l'índex endoscòpic UCEIS.

**Taula 3.16:** Valors Índex de Mayo Global. Extret de Schroeder *et al.*, 1987.

Índex de Mayo/Endoscòpic	Sub-score endoscòpic
0-2: remissió	0 = Normal
>2-5: lleu	1= Friabilitat mucosa, Eritema, Disminució patró vascular
>5-9 moderada	2= Patró vascular absent, friabilitat moderada, Erosions
>9 greu	3= Hemorràgia espontània, Ulceracions.

#### 3.4.2.4-. Qüestionari de qualitat de vida en la MII: IBD-Q:

Qüestionari de qualitat de vida específic per la MII (de l'anglès *Inflammatory Bowel Disease Questionnaire*). Es va desenvolupar per valorar la qualitat de vida en paral·lel amb el CDAI incorporant elements socials, sistèmics, intestinals i emocionals. Té bona correlació amb el CDAI ( $r= 0,56$ ,  $p<0,002$ ). L'avaluació de la qualitat de vida és un marcador indirecte d'activitat de la malaltia (Gower-Rousseau *et al.* 2107). La principal limitació és que és un índex totalment subjectiu que el pacient ha de contestar (Marín-Fernàndez *et al.* 2016).

El IBD-Q és el qüestionari més extensament validat i més utilitzat per mesurar la qualitat de vida en pacients amb MII tant en la pràctica clínica com en investigació. Consta de 32 ítems distribuïts en 4 dimensions (síntomes intestinals (10 ítems), síntomes sistèmics (5 ítems), funció emocional (12 ítems) i funció social (5 ítems)). Les respostes de cada ítem estan expressades en rang de puntuació de 32 a 224 punts. Es considera baixa qualitat de vida quan la puntuació total oscil·la entre 32 i 95 punts, moderada entre 96-159 i alta qualitat de vida puntuació >160 punts. Existeix una versió reduïda anomenada SIBD-Q (en anglès *short-IBD-Q*) que és més simple d'aplicar en la pràctica clínica (Guyatt *et al.* 1989, Masachs *et al.*, 2007, Torres *et al.*, 2020).

### **3.5 Metodologia de recollida variables.**

El dia de la visita es va entregar un full d'informació on l'explicava l'estudi i posteriorment s'entregava el CI, que els pacients portaven signat el dia d'entrega de la mostra fecal (uns 2-5 dies posteriors en funció de la situació clínica del pacient). Aquest dia s'extreia una mostra de sang per a determinats genètics que es va custodiar al Biobanc però no es va utilitzar en la present tesi. Els paràmetres analítics s'extreien de les dades de la historia clínica del pacient un màxim de 3 dies



abans o després de l'entrega de la mostra. En la visita d'entrega de la mostra fecal es recollien els qüestionaris de qualitat de vida i es van recollir les dades de la resta dels índex inclosos en la present tesi i es pesava al pacient. Les dades endoscòpiques es van recollir segons el protocol estàndard hospitalari. Es van fer visites addicionals telefòniques per recollir dades addicionals.

### **3.6 Justificació de la utilització de mostres fecals.**

Per tal de realitzar l'anàlisi de la MI en aquesta tesi, es van obtenir mostres biològiques fecals en lloc de mostres de biòpsies rectals (directe de la mucosa colònica) donat que les mostres fecals són menys invasives, fàcils d'obtenir, amb una proporció molt similar de microorganismes, major facilitat per manipular i conservar les mostres i facilitat per l'emmagatzematge.

Un estudi va comparar la MI present en una biòpsia de mucosa colònica i una mostra aconseguida a través del rentat colònic en l'endoscòpia sense trobar diferències entre els 2 mètodes, i per tant vam assumir que la MI de la femta representa una proporció relativament precisa de la composició de la MI (Watt *et al*, 2016; Amoedo, Tesi 2020).

### **3.7 Metodologia per estudiar la MI.**

L'estudi microbiològic es va realitzar a partir d'una mostra fecal presa almenys 24 hores prèvies a la visita del pacient i una mostra de sang a la mateixa consulta dipositat en via estèril seguint estrictes mesures d'asèpsia i posteriorment cada 3 mesos seguint les mateixes condicions i custodiades posteriorment al BioBanc de l'IdIBGi. Les femtes es van homogeneïtzar i es van introduir en un vial estèril en sec i es van crioconservar a -80 °C en el Biobanc. Periòdicament es van transportar els recipients amb mostres biològiques (sang i femta) mitjançant neu carbònica al Biobanc pel seu processament, emmagatzematge i estudi.

#### *Extracció d'ADN:*

L'extracció de l'ADN de les mostres fecals es va realitzar mitjançant el kit comercial *Nucleo Spin Soil* (Macherey-Nagel®) seguint les instruccions del fabricant i la seva quantificació es va realitzar mitjançant un espectrofotòmetre *Nanodrop ND-1000*

*UV-Vis.* Posteriorment es van preparar alíquotes a una concentració de 10ng/μl de cada una de les mostres i les mostres fecals es van congelar a -20 °C.

#### *Marcadors bacterians*

Per valorar la disbiosi de la MI en pacients amb MII es va realitzar la determinació de la quantitat per gram de femta del gen 16S de l'ADN ribosomal (ADNr) dels microorganismes *Faecalibacterium prausnitzii* (FP), *Escherichia coli* (EC) i el conjunt total d'eubacteris (ET) presents a les mostres mitjançant PCR quantitativa (qPCR). Podem inferir la composició bacteriana a través de l'anàlisi de la subunitat 16S rARN de forma aïllada sense necessitat d'una anàlisi de seqüenciació massiva del genoma bacterià o de la comunitat de bacteris. Les característiques que fan que el gen de la subunitat 16S sigui un bon marcador de la quantitat de l'ADN total bacterià són les següents: estar present en tots els membres d'una població, només diferir entre individus amb genomes diferents i idealment diferir de forma proporcional a la distància evolutiva entre els genomes diferents. Aquestes característiques són satisfetes pel gen 16S, comú a tots els bacteris i amb un contingut d'uns 1500 parells de bases que es classifiquen en regions constants i regions variables (Lopez-Siles *et al.* 2012).

#### *PCR quantitativa (qPCR):*

El nombre de còpies del gen 16S ADNr d'EC, FP i ET presents en les mostres de femta es van determinar mitjançant qPCR. Les qPCR es van realitzar en un sistema *QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR (AppliedBiosystems®)* usant encebadors i les condicions descrites i validades anteriorment (Huijsdens *et al.* 2002; López-Siles Tesi doctoral 2015) tal com es mostra a la següent taula 3.17.

Les reaccions van ser realitzades en plaques òptiques MicroAmp® EnduraPlate™ (*AppliedBiosystems®*) de 96 pouets amb un volum total de 20 μl. Cada pouet contenia 1x TaqMan® Universal PCR Master Mix 2x (*AppliedBiosystems®*), 300 nM de cada encebador, 250 nM de sonda i ca. 50 ng/μl d'ADN. Es va utilitzar un control d'amplificació intern (IAC) en la quantificació de FP a 300nM de cada encebador, 250nM de sonda i 2x10<sup>4</sup> còpies/μL d'ADN IAC. Es van realitzar totes les reaccions per triplicat i per a les anàlisis de les dades es va utilitzar la mitjana dels triplicats.

Els valors es van considerar vàlids, si la desviació estàndard (SD) entre els cicles de quantificació (Ct) era <0,125.

**Taula 3.17:** Resum dels encebadors, sondes del gen 16S ARNr i condicions de la qPCR utilitzades.

Microorganisme	Encebador	Seqüència 5'-3'	Cicle	Desnaturalització (°C)	Aïllament i extensió (°C)	Referència
Bacteris	F_Bact 1369	CGGTGAATCGTTCCCGG	50	95; 15	60; 60	Furet <i>et al.</i> 2009.
	R_Prok 1492	TACGGCTACCTTGTACGACTT				
	P_TM 1389F	6FAM-CTTGTACA CACCGCCCGTC-TAMRA				
FP	Fpra 428 F	TGTAAACTCCTGTTGTTGAGGAAGATAA	40	95; 15	60; 60	Lopez-Siles, 2015
	Fpra 583	GCGCTCCCTTACACCC A				
	Fpra 493 PR	6FAMCAAGGAGTGACGGGCTAACTACG TGCCG				
EC	EC 395F	CATGCCGCGTGTATGGAAGAA	40	95;15	60; 60	Huijsden <i>et al.</i> 2002
	EC490 R	CGGGTAACGTCAA TGAGCAAA				
	EC 438 R	6-FAMTATTA ACT TTACTCCCTTCTCCCCGCTGAATAMRA				
ADN IAC	IAC F	TACGGATGAGGGAGGACAAAAGGA				Lopez-Siles, 2015
	IAC R	CACTTCGCTCTGATCCATTGG VIC- CGCCGTAGGG ATCGCA_TAMRA				

Les rectes patrons per quantificar les mostres problema, es van realitzar mitjançant dilucions seriades de 7 punts de concentració coneguda. Els estàndards de cada grup de microorganismes utilitzats en la recta patró pertanyen a la biblioteca de clons del grup d'investigació de malalties digestives i microbiota de l'IdIBGi. Així doncs, es va utilitzar un estàndard del gen 16S ADNr de FP per la quantificació de FP, un estàndard del gen 16S ARNr d'EC per les quantificacions

d'EC. En cada quantificació, es van incloure controls negatius a l'inici i al final de la preparació de les mostres i en tots els casos es va obtenir un Ct indetectable. Les eficiències de les reaccions de quantificació van ser superiors al 91,0% (88-93%) en tots els casos i amb valors de R2 >0,99 (0,98-0,999).

Totes aquelles mostres que van donar valors per sota del llindar de detecció de la tècnica i controls, van ser substituïts per a valors numèrics mínims ( $1 \times 10^4$  còpies del gen per tub de reacció) per tal de poder treballar estadísticament les mostres.

### 3.8 Explicació índex FEI.

L'índex FEI relaciona l'abundància d'EC i FP en mostres d'un mateix pacient. Aquest 2 bacteris són altament representatius de l'estat de l'ecosistema bacterià. Aquests índex fou descrit per primera vegada per Lopez-Siles (Tesi doctoral, 2015) utilitzant mostres de mucosa intestinal a partir de biòpsies colòniques en pacients amb MII amb l'objectiu de valorar els canvis en la MI associats a diferents patologies digestives on es va demostrar que hi havia una reorganització microbiana (Ramió-Pujol *et al.* 2020; Amoedo, Tesi 2020). Aquest índex es va dissenyar per demostrar que l'abundància de FP en combinació amb l'abundància d'EC era millor biomarcador que FP aïllat com a prova de cribratge no invasiva pel diagnòstic de la MII. S'utilitza una versió simplificada de l'índex FEI per tal de fer seguiment dels canvis en la MI dels pacients amb MII en activitat i remissió, en un escenari proper a la pràctica clínica real. Els valors alts de FEI s'associen a menor disbiosi, i si el FEI disminueix, proper a 1, vol dir que augmenta la disbiosi del ecosistema.

L'índex FEI ha estat calculat mitjançant els valors de còpies del gen 16S ARNr d'EC per gram de femtes analitzades i còpies del gens 16S ARNr de FP per gram de femtes analitzades, respectivament, mitjançant la fórmula següent:

$$\text{Índex FEI} = \frac{(\text{Log}_{10} F. \text{Prausnitzii} / \text{Log}_{10} ET)}{(\text{Log}_{10} E. \text{Coli} / \text{Log}_{10} ET)}$$

**Figura 3.8:** Fórmula índex FEI. No s'ha corregit els valors de bacteris per nombre de cèl·lules humanes perquè no hem treballat amb biòpsies, sinó en mostres fecals.

### 3.9 Mètodes estadístics.

Com a pas previ a l'anàlisi estadístic, i en particular per la font d'informació provinent de les històries clíniques informatitzades, es varen revisar amb detall les dades mitjançant l'anàlisi exploratori observant les seves distribucions de freqüència i buscant possibles errors de registre o de codificació.

La descripció de les variables demogràfiques, clíniques i microbiològiques dels pacients inclosos en l'estudi es varen resumir a través de tècniques descriptives univariants: (a) Les variables categòriques amb taules de freqüències (absolutes i relatives) i (b) les variables numèriques mitjançant els estadístics de posició (mitjana o mediana) i els de dispersió (desviació estàndard o amplitud interquartílica i amplitud). La normalitat de les dades es va avaluar a través del test de Shapiro-Wilk i dels gràfic quantil-quantil.

La comparació de variables numèriques entre grups es va realitzar amb la prova de la t de Student (2 grups) o anàlisi de la variància d'una via (més de 2 grups) aplicant la correcció de Bonferroni per les comparacions a posteriori. Quan no es podia assumir la igualtat de variàncies poblacionals, es va utilitzar l'estadístic de Brown-Forsythe. Si la condició de normalitat no es complia es varen aplicar els corresponents testos no paramètrics: "U" de Mann-Whitney i Kruskal-Wallis, respectivament. La relació entre dues variables de tipus categòric es va estudiar mitjançant el test Xi-quadrat o test exacte de Fisher, quan el percentatge de freqüència esperada <5 era major del 30%. La relació entre dues variables de tipus numèric es va avaluar a través del coeficient de correlació rho de Spearman i la seva concordança amb el coeficient de correlació intraclasse (ICC) i la significança mitjançant l'anàlisi de les variàncies intraclasse.

L'evolució temporal dels diferents paràmetres analítics, clínics i microbiològics es va avaluar a través dels models d'anàlisi de variància d'un factor amb mesures repetides o de dos factors amb mesures repetides en un factor. La condició d'esfericitat es va verificar amb el test de Mauchly i el mètode de Bonferroni va ser el seleccionat per estudiar les comparacions *post hoc*. En cas de falta de normalitat es va aplicar la transformació logarítmica.

L'avaluació de la capacitat discriminatòria dels potencials biomarcador es va examinar a través del mètode de la corba ROC, mesurat a través de l'àrea sota la

corba ROC (AUC) i el seu corresponent interval de confiança al 95%. També es va determinar el punt de tall òptim definit com aquell punt que maximitza la sensibilitat i l'especificitat.

Tots els resultats es consideren estadísticament significatius amb un valor de  $p < 0.05$  i es va realitzar mitjançant els programes estadístics IBM SPSS Statistics 23 (IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.), STATA IC 13 (StataCorp. 2013. *Stata Statistical Software: Release 13*. College Station, TX: StataCorp LP.) i R 3.3.1 (*R Core Team (2020). R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.*)



## 4 Resultats.

### 4.1 Dades demogràfiques basals dels pacients.

Es van incloure un total de 80 pacients a l'estudi que complien tots els criteris d'inclusió i cap d'exclusió. Es van classificar els pacients en temps 0 (T0) per tipus de malaltia (MC i CU) i en relació amb la situació clínica, en activitat i remissió. En el temps inicial (T0) es van incloure 36 pacients amb activitat clínica i 44 en remissió, 45 amb MC i 35 amb CU, distribuïts com es descriu a la taula 4.18. La distribució dels grups mostra diferències significatives indicant que els 2 grups són heterogenis.

**Taula 4.18:** Resum pacients inclosos en T0. Dades expressades en freqüències relatives. Estadístic utilitzat T Student ( $p= 0,013$ ).

	ACTIVITAT	REMISSIÓ	TOTAL
COLITIS ULCEROSA	22	13	35 (43,8%)
MALALTIA DE CROHN	14	31	45 (56,3%)
	36 (45%)	44(55%)	80

A continuació es descriuran les característiques basals demogràfiques (Taula 4.19) i clíniques (Taula 4.20) globals de la mostra de pacients inclosos en l'estudi.

L'edat mitjana de la cohort és de 47,21 anys amb una desviació estàndard (DE) de  $\pm 14,75$  amb una edat mínima de 22 anys i una màxima de 89 anys. L'edat mitjana és diferent per la MC i la CU (44,71 vs. 50,43) sense diferències significatives.

L'edat mitjana al diagnòstic és de 36,43 anys amb DE  $\pm 15,27$  anys (edats compreses 8-76 anys). L'edat mitjana per MC és de  $32,78 \pm 14,52$ , mentre que per la CU és de  $41,11 \pm 15,13$  amb  $p=0,014$  i per tant l'edat mitjana és diferents entre els 2 grups. El temps d'evolució mig de la malaltia des del diagnòstic fins a la inclusió és de 12,05 anys (14,19 anys per MC i 9,56 anys per la CU). El seguiment previ fins al moment d'inclusió de l'estudi és de 29,4 mesos, sent discretament superior per la MC (30,11 mesos de mitjana) respecte a la CU (28,49 mesos).



**Taula 4.19:** Característiques demogràfiques globals dels pacients inclosos en l'estudi en el moment T0. Els valors expressats com a mitjana amb la seva desviació estàndard (DE) per variables numèriques; i com a freqüència absoluta per variables categòriques. Percentatge relatiu entre parèntesis. Per variables numèriques, test de T-Student(\*) i el test no paramètric U de Mann Whitney; i per variables categòriques el test Chi-quadrat (†) i test de Fisher(●).

	Global	MC	CU	p	
N	80	45 (56,25%)	35 (43,75%)		
Edat (anys ± DE; rang)	47,21 ± 14,75 (22-89)	44,71 ±13,64 (22-83)	50,43 ±15,68 (22-89)	0,085*	
Edat al diagnòstic (anys; rang)	36,43 ± 15,27 (8-76)	32,78 ± 14,52	41,11 ± 15,13	0,014*	
Temps evolució MII (anys; DE)	12,05 (± 3,56)	14,19	9,56	0,04 *	
Seguiment clínic fins T0 (mesos; DE, rang)	29,4 ± 14,03 (6-144)	30,11 ± 25,66	28,49 ± 35,92	0,814 *	
Sexe (N (%))	H: 34 (42,5%) D: 46 (57,5%)	16 (35,6%) 29 (64,4%)	18 (51,4%) 17 (48,6%)	0,067†	
Hospital	CHV 18 (22,4%) HJT 62 (77,6%)	N/A	N/A	N/A	
Tabac (n (%))	No	43 (53,8%)	21 (26,3%)	22 (27,5%)	0,601 ●
	Ex fumador >10a:	14 (17,5%)	9 (11,3%)	5 (6,3%)	
	Ex fumador <10a:	11(13,8%)	7 (8,8%)	4 (5%)	
	Fumador actiu:	12 (15%)	8 (10%)	4 (5%)	
IMC (Kg/M <sup>2</sup> )	24,5 ± 3,79 (17,58-37,1)	24,23 ±3,9	24,85 ±3,67	0,47*	
Cirurgia	NO 67 (83,8%)	33 (73,3%)	34 (97,1%)	0,05†	
	SI 13 (16,3%)	12 (26,7%) 9 Apendicectomia 3 fistules perianals	1 (2,9%) Abscés anal		

Hi ha un predomini del sexe femení (46 dones, un 57,5% del total de la població, MC 29 (64,4%) i CU 17 (48,6%)) i uns 45 pacients amb MC (56,25%) respecte d'uns 35 amb CU. La majoria dels pacients (77,6%) són del HJT i el 22,4% dels pacients que provenen del CHV.

Uns 43 pacients (53,8%) són no fumadors respecte d'uns 12 (15%) de pacients fumadors actius dins la cohort de l'estudi. Uns 25 pacients són ex fumadors (31,3%); 14 ex-fumadors de més de 10 anys de durada (17,5%) i 11 ex-fumadors de menys de 10 anys de durada (13,8%). Únicament hi ha 12 fumadors actius (8 per MC i 4 per CU).

El pes i la talla es van registrar com a paràmetre de control del pacient. La talla mitjana va ser de 167,1 centímetres. El pes mitjà va ser en T0 (68,61 kilograms de mitjana), T1(69,17 kilograms de mitjana) i en T2 (68,49 kilograms de mitjana). L'IMC mig en T0 és dins el rang de la normalitat (IMC 20-25 Kg/m<sup>2</sup>) sense diferències significatives entre MC i CU (p= 0,47).

La majoria dels pacients, 67 (83,8%) no han rebut cap classe de cirurgia que comprometi el TGI. Dels 12 pacients amb MC amb IQ prèvia a l'estudi, 9 van ser apendicectomies i 3 fistules anals no actives en el període d'inclusió i seguiment de l'estudi. Únicament 1 pacient amb CU va ser intervingut d'un abscess anal no complicat previ al desenvolupament de la CU.

Observant les dades de la taula 4.20 la majoria de pacients (un 76.25%) reben tractament (ttm) amb fàrmac biològic (Bio) i respecte els grup sense tractament biològic, la distribució dels 2 grups no és deguda a l'atzar (p=0,008). La major part dels pacients (61 pacients (76,2%)) reben tractament biològic en el moment d'iniciar l'estudi. Els fàrmacs antiTNF (49 pacients, 61,3%) són els més freqüents, essent l'adalimumab (ADA) el fàrmac més utilitzat (33 pacients, 41,3%). S'ha descrit que infliximab (IFX) i ADA són els fàrmacs més utilitzats tant per CU com per MC.

**Taula 4.20:** Descripció de les característiques clíniques dels pacients inclosos. Valors expressats com a mitjana amb la seva desviació estàndard (DE) per variables numèriques; com a freqüència absoluta per a variables categòriques. Percentatge relatiu entre parèntesis. Per variables numèriques s'ha utilitzat el test de T-Student(\*) o el test no paramètric U de Mann Whitney; i per les categòriques el test chi-quadrat (†) o test de Fisher(●).

	Global	MC	CU	p
Tractament inicial TO (n(%))	Bio: 61 (76,25%)	34 (42,5%)	27 (33,75%)	<b>0,008●</b>
	IFX: 16 (20%)	9 (11,3%)	7 (8,8%)	
	ADA: 33 (41,3%)	22 (27,5%)	11 (13,8%)	
	GLM : 8 (10%)	0	8 (10%)	
	VDZ : 4 (5%)	3 (3,8%)	1 (1,3%)	
	No Bio: 19 (23,75%)	10 (52,7%)	9 (47,3%)	
	5-ASA: 11 (12,5%)	3 (3,8%)	8 (10%)	
	Bude: 8 (11,3%)	7 (8,8%)	1 (1,3%)	
Immunosupressors TO	No 39 (48,8%)	26	13	0,067+*
	Si 41 (51,3%)	19	22	<b>0,002●**</b>
	MTX 4 (5%)	5	0	
	AZA 27 (33,8%)	14	22	
Remissió	44 (55%)	31 (68,9%)	13 (37,1%)	<b>0,007+</b>
Activitat	36 (42,5%)	14 (31,1%)	22 (62,9%)	
Classificació Montreal MC Edat debut (A)	A1: <16 a.	4 (8,89%)		
	A2: 17-40 a.	31 (68,88%)		
	A3: >40a.	10 (22,23%)		
Classificació Montreal Localització MC (L)	Ileal (L1)	17(37,8%)(T:21,3%)		
	Còlica (L2)	9 (20%) (T: 11,3%)		
	Ileocòlica (L3)	19(42,3%)(T:23,8%)		
Classificació Montreal Comportament MC (B)	Inflamatori (B1)	24 (53,3%) (T:30%)		
	Estenosat (B2)	17 (37,8%)(T:21,3%)		
	Penetrant (B3)	4 (8,9%) (T: 5%)		
Extensió CU	Proctitis		6 (17,1%) (T: 7,5%)	
	Esquerra		15(42,9%)(T:18,8%)	
	Extensa		14 (40 %) (T: 17,5%)	
Gravetat CU	Remissió		5 (14,3%) (T: 6,3%)	
	Lleu		18 (51,4%) (T:22,5%)	
	Moderada		11 (34,3%) (T:15,1%)	

S'ha considerat que l'efecte terapèutic dels fàrmacs biològic és equivalent per tots els temps i MII. 8 pacient del grup Biològic, estaven en remissió profunda (clínica, analítica i endoscòpica) durant més 6 mesos.

Per altra banda, 19 pacients no rebien tractament biològic en el moment d'inclusió de l'estudi. D'aquests pacients, 8 (11,3%) van ser tractats amb budesonida (veure introducció) mentre que 11 pacients (12,5%) van ser tractats amb 5-ASA en monoteràpia. Tots aquests pacients (19) eren pacients naïfs als fàrmacs biològics. D'aquest grup de pacients, es va avaluar els canvis en la MI en relació a l'activitat de la MII, i la influència d'un tractament més potent, fàrmac biològic, en la microbiota intestinal. Set pacients del grup IB van rebre tractament amb Corticoides (CE) per malaltia activa però es va acceptar recollir mostra de femta a T0 sempre i quan la dosi fos com a màxim de 10 mg. de CE previ a iniciar el tractament biològic.

Respecte a l'ús d'immunosupressors, 41 pacients (51,3%) rebien tractament en el moment d'inici, sent l'AZA el fàrmac més utilitzat (33,8%) en monoteràpia o en tractament combinat.

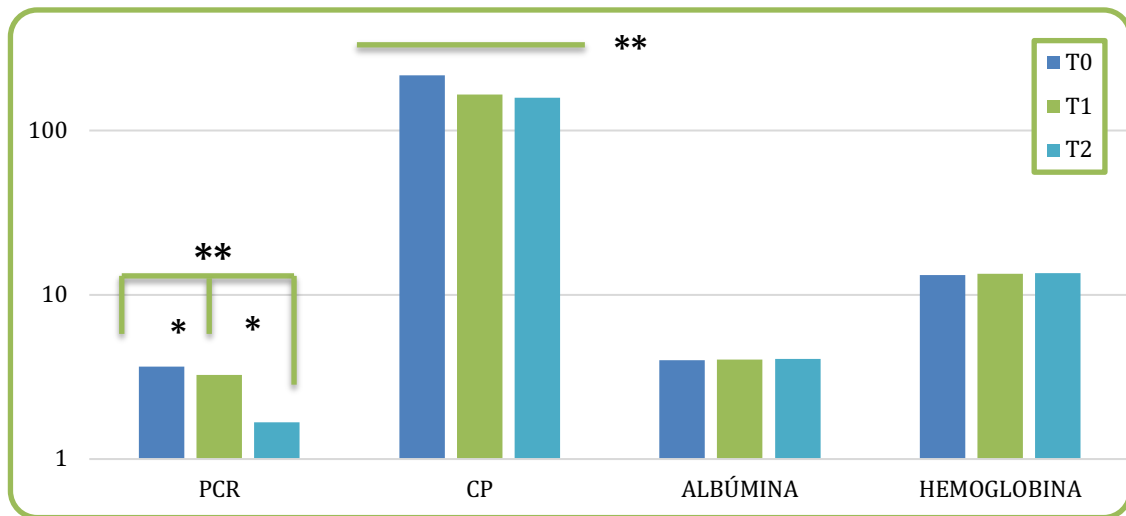
En relació a la classificació de Montreal de la MC, 4 pacients (8,89%) van debutar en la MC abans dels 16 anys (A1); 31(68,88%) pacients entre els 17 i els 40 anys (A2) i 10 (22,23%) pacients van debutar més enllà dels 40 anys (A3). Per la MC, l'afectació més freqüent va ser la ileocòlica (42,3%) seguit de la ileal pura (37,8%) i la còlica pura (19,9%). La major part de pacients amb MC van presentar un comportament inflamatori i/o estenosat (91,1% dels casos). Únicament 4 pacients havien presentat comportament fistulitzant de la malaltia i ja no presentaven signes d'activitat, i durant el període de seguiment no es va detectar cap fístula activa clínica.

Referent a la CU la majoria eren pacients amb colitis esquerra (42,9%) i colitis extensa (40% dels casos); i únicament un 17,1% de proctitis. La majoria de casos es tracten de colitis lleu a moderada (85,7%); amb 5 casos en remissió (14,3%). No hi ha diferències significatives en aquesta distribució dels grups.

#### **4.2 Dades per marcadors analítics:**

En aquest apartat es descriuen les mitjanes pels paràmetres analítics que s'han inclòs en l'estudi i es desglossen en els 3 temps que s'han recollit les dades i es compararen les diferents mitjanes. Aquests paràmetres analítics són PCR, CP, ALB

i Hb. Es descriuen els resultats globals, i en l'apartat 4.5 i 4.10 es desglossen per tipus de MII i en funció de l'activitat en T0.



**Figura 4.9:** Descripció de l'evolució dels paràmetres analítics per a la MII global. Valors expressats en mitjanes de les unitats de referència. Test estadístic One Way ANOVA i Test postHoc Bonferroni. PCR i CP: Diferències globals dels 3 punts temporals (\*\*( $p < 0,001$ ), i \* diferències entre T0-T1 i T1-T2 ( $p < 0,02$ )).

-Proteïna C reactiva (PCR): En relació als valors detectats al llarg dels temps de la PCR per MII global s'ha mostrat una disminució progressiva significativa ( $p < 0,001$ ) dels valors entre els sub-temps analitzats (en T0-T1 ( $p > 0,001$ ) i en T1-T2 ( $p = 0,011$ )).

-Calprotectina (CP): S'ha observat una disminució progressiva significativa ( $p = 0,045$ ) amb valors moderadament baixos per a MII tal com es descriu en la figura anterior. No s'han detectat diferències entre cada subgrup temporal per falta de potència estadística degut a la mida mostral reduïda.

- Albúmina (Alb) i Hemoglobina (Hb): Els valors mitjans d'Alb i Hb estan dins el rang de la normalitat i no es modifiquen de forma significativa.

### 4.3 Dades d'activitat clínica i endoscòpica:

S'han recollit dades d'índexs endoscòpics (SES-CD per la MC i Mayo endoscòpic per la CU) i clínics (HBI per MC i SCCAI per CU) per tal de comparar la utilitat dels indicadors microbiològics (FP, EC i l'índex FEI) amb els diferents paràmetres de la

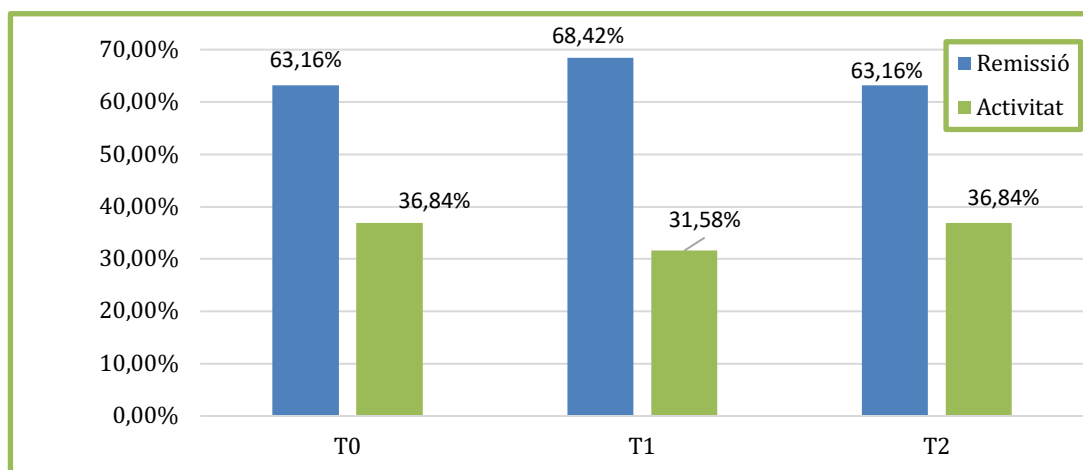
valoració clínica de la MII. També s'han recollit dades de qualitat de vida a través del qüestionari IBD-Q.

Tal com s'ha comentat prèviament en l'apartat MiM, per tal de definir i classificar els pacients en activitat i remissió, en el marc de la MII en T0, es va utilitzar el valor de CP fecal ( $>250 \mu\text{g/g}$ ). Es van analitzar el nombre de pacients en activitat/remissió, utilitzant els índexs clínics, de qualitat de vida i endoscòpics amb els seus corresponents punts de tall validats en estudis anteriors (apartat MiM), i comparar-ho amb els valors definits amb la CP. Per tal d'analitzar les dades es va utilitzar el test Cochran Q per a variables categòriques en l'evolució al llarg dels 3 temps (T0, T1 i T2).

Les variables SES-CD, Mayo, HBI, SCCAI i IBD-Q malgrat que el seu valor és numèric, es poden convertir en variables categòriques (remissió o activitat (lleu, moderada, greu)) en funció de determinats intervals de valors. Per simplificar l'anàlisi estadística d'aquest apartat, es van classificar de forma categòrica en remissió/activitat per comparar els resultats dels diferents índex amb els paràmetres analítics; per fer una aproximació més acurada del comportament de la mostra.

-Harvey-Bradshaw (HBI): S'han inclòs 45 pacients amb MC, però de 7 pacients no vam disposar de mostra en T3. L'índex HBI considera remissió si la puntuació HBI  $\leq 4$ ; i malaltia activa si la puntuació HBI  $>4$  (activitat lleu-moderada) en la baremació.

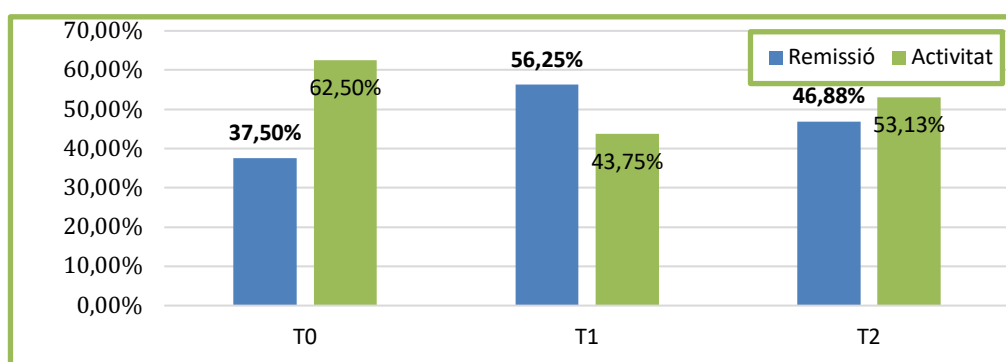
Tal com es descriu en la figura 4.10, els percentatges van mostrar que la majoria de pacients estaven classificats com a remissió (HBI  $\leq 4$ ) i aquests percentatges de classificació es mantenen al llarg dels 3 temps. En T0 i T2 és on es va detectar un percentatge superior de pacients classificats com a activitat (36,84%). No es van classificar pacients com a malaltia severa. No hi havien diferències significatives ( $p=0,079$ ) pel que fa la classificació en activitat i remissió entre els 3 punts temporals utilitzant l'índex HBI.



**Figura 4.10:** Descripció dels resultats classificats utilitzant l'Índex HBI. Resultats de la mostra classificats en activitat (>4) i remissió(≤4) al llarg dels 3 temps. Valors que mostren els percentatges relatius.

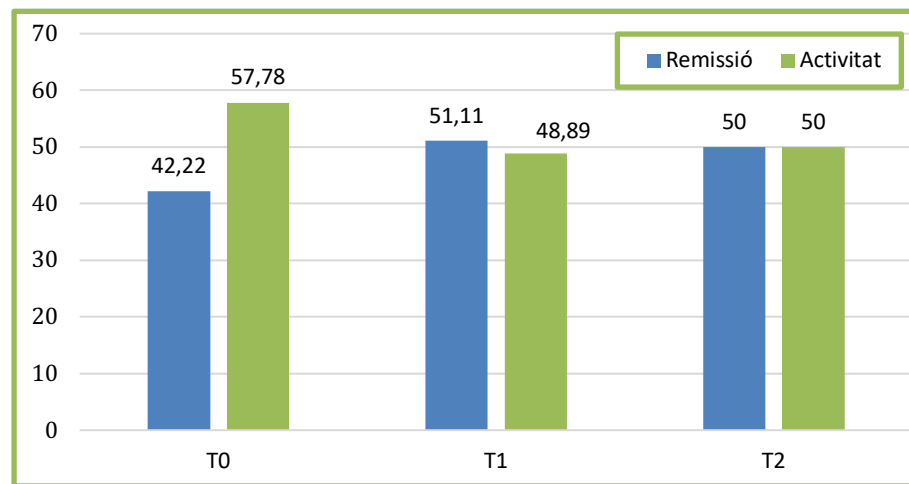
-Simple Clinical Colitis Activity Index (SCCAI): Es va analitzar el comportament de l'índex SCCAI en els pacients que disposàvem de les mostres en els 3 temps (n= 32; es van descartar 3 pacients al no tenir mostra a T3). L'índex SCCAI considera la remissió de la malaltia una puntuació inferior o igual a 2.

Els percentatges de pacients classificats com activitat i remissió utilitzant l'Índex SCCAI van ser variables al llarg dels 3 punts temporals tal com es mostra en la figura 4.11. No es van classificar pacients amb malaltia severa (puntuació>12). No es van detectar diferències significatives ( $p=0,165$ ) pel que fa pacients classificats com activitat i remissió en la CU utilitzant l'índex SCCAI en els 3 punts temporals.



**Figura 4.11:** Descripció dels resultats segons índex SCCAI. Valors que mostren els Percentatges relatius.

-Simple Endoscopy Score for Crohn's Disease (SES-CD): En analitzar el comportament del SESCD en 45 pacients amb MC, però en 7 pacients no vam disposar de mostra en T3. L'índex SES-CD considera remissió si la puntuació és  $\leq 2$ . No va haver-hi pacients classificats amb afectació endoscòpica severa (SES-CD  $>16$ ). En T0, es el punt on es van descriure la major part de pacients amb activitat (57,78%); i aquest percentatge va disminuir progressivament en el 3 punts temporals. No es van detectar diferències significatives ( $p=0,935$ ) entre els pacients amb remissió endoscòpica i activitat utilitzant el SESCD al llarg dels 3 temps.



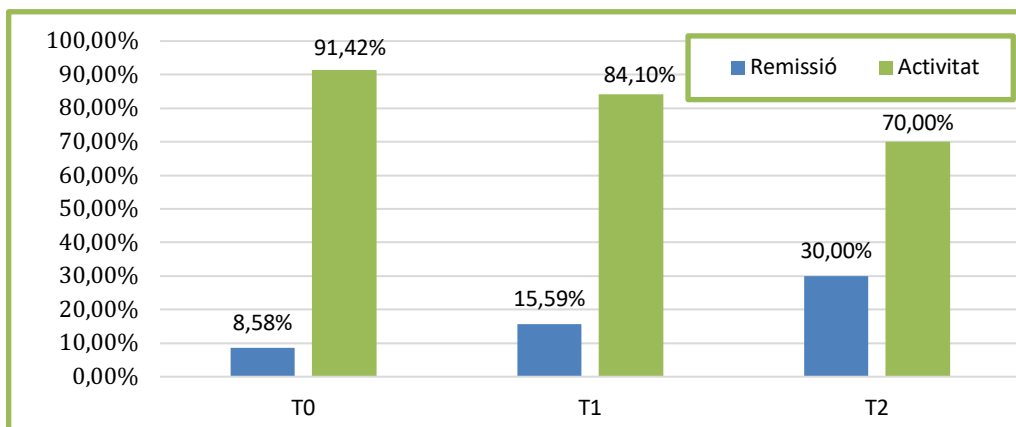
**Figura 4.12:** Descripció de la mostra classificada utilitzant l'índex endoscòpic SES-CD. Resultats classificat en activitat ( $>2$ ) i remissió ( $\leq 2$ ) al llarg dels 3 temps. Valors que mostren els Percentatges relatius.

-Índex Mayo endoscòpic: S'ha analitzat en aquells pacients en que disposàvem de les mostres en els 3 temps ( $n= 29$ ). L'índex Mayo considera remissió endoscòpica si la puntuació és igual a 0.

Utilitzant l'índex de Mayo endoscòpic, s'ha descrit que la distribució de pacients amb afectació endoscòpica va ser sensiblement més alta; comparat amb el SES-CD o amb els altres índexs. Al categoritzar la mostra en activitat i remissió, es va evidenciar que en T2 hi havia la major part de pacients en remissió (31,03%) i en T0 la major part de pacients amb malaltia activa (91,42%). Un 28,57% dels pacients van presentar activitat endoscòpica greu en T0. En analitzar els pacients



classificats com a remissió i activitat endoscòpica no es van evidenciar diferències significatives ( $p=0,694$ ) entre els 2 grups en els 3 punts temporals.



**Figura 4.13:** Descripció dels resultats classificats segons Índex de Mayo. Relació de pacients classificats en Activitat i remissió. Valors en percentatge absoluts.

Inflammatory Bowel Disease Questionnaire (IBD-Q): S'han calculat les mitjanes per malaltia global i desglossat per malaltia (MC i CU) en T0, T1 i T2.

**Taula 4.21A:** Distribució dels pacients segons classificació IBD-Q. Valors absoluts i percentatges relatius.

	T0 (N=80)	T1 (N= 80)	T2 (N=71)
Pobre Qualitat de Vida (<95p)	4 (5 %)	4 (5 %)	7 (9,86%)
Moderada QdV (96-160p)	20 (25%)	16 (20%)	28 (39,43%)
Alta QdV (161-224p)	56 (70%)	60(75%)	36 (50,70%)

En el moment T0, d'inici de la recollida de mostres, un 30 % dels pacients van expressar, mitjançant el qüestionari IBD-Q, que la seva qualitat de vida basada en la malaltia no va ser alta. Segons es descriu a la taula 4.21B, les mitjanes desglossades per malaltia no van mostrar diferències significatives ( $p=0,052$ ) al llarg dels 3 temps entre MII global, MC o CU. Desglossat per tipus de malaltia, els valors del grup activitat van mostrar mitjanes significativament més baixes ( $p=0,0012$ ) respecte del grup remissió ( $p=0,0012$ ).

**Taula 4.21B:** Relació de les mitjanes del valor IBD-Q segons tipus malaltia i temps. Valors expressats en nombres absoluts de la mitja aritmètica. Test ANOVA.

IBD-Q	T0	T1	T2	Valor p
MII GLOBAL	176,79	175,38	159,31	0,052
MC	177,04	175,38	180,33	
CU	176,46	175,37	171,24	
MC R	186,32	181,38	180,33	0,0012
MC A	161,76	170,56	177,78	
CU R	189,58	175,37	171,24	
CU A	169,61	171,89	170,45	

#### 4.4 Descripció dades microbiològiques:

En aquest punt es descriurà el comportament de la MI (a través de 3 grups bacterians) en relació el tipus de malaltia i la seva evolució temporal, un dels objectius de la tesi.

A través de la reacció en cadena de la polimerasa quantitativa (qPCR en anglès) quantifiquem, mitjançant un encebador específic, la quantitat bacteriana en una població. La quantificació dels Eubacteris totals (ET) mostra la quantitat total d'eubacteris del ecosistema. La qPCR sobre l' *Escherichia coli* (EC) i el FP ens permet quantificar el nombre exacte d'aquests 2 bacteris en la població els quals són altament representatius de la disbiosi de l'ecosistema intestinal. Per valorar la proporció de FP respecte EC es crea una relació de FP entre EC (ajustat per ET) anomenat índex FEI que facilita el treball amb un únic valor que permet comparar-ho fàcilment amb altres paràmetres d'avaluació de la MII. S'utilitza la relació de FP sobre EC perquè habitualment hi ha més quantitat de FP que d'EC i tenir índex amb valors positius. La fórmula per calcular es pot trobar descrita en l'apartat de MiM.

##### 4.4.1 Descripció global dades microbiològiques.

A continuació es descriu la relació microbiològica global dels 2 microorganismes analitzats (FP i EC) i del conjunt de bacteris (ET) presents a les mostres fecals i els 3 temps analitzats. La quantitat global (16S=còpies del gen 16S rRNA del microorganisme analitzat per gram de mostra de femta) i desviació estàndard (DE); s'ha extrapolat a partir de l'ús d'una recta de calibratge patró per a cada gen

analitzat (ET, EC i FP) i la quantitat de mostra de femta utilitzada per a les extraccions dels àcids nucleics presents (veure MiM).

**Taula 4.22:** Descripció del perfil microbiològic global i dels CS amb evolució temporal. Resultats expressats en mitjanes dels valors en còpies per gram de mostra i la DE corresponent. Valors expressats en notació científica. Test utilitzat One Way ANOVA per mesures repetides. S'ha aplicat correcció de GreenHouse-Geisser.

Cohort MII	Temps 0 (N=80)	Temps 1 (N=80)	Temps 2 (N=68)	p cohort MII	CS	p MII vs CS
FP 16S	$8,78 \times 10^8 \pm 1,31 \times 10^9$	$8,15 \times 10^8 \pm 8,97 \times 10^8$	$9,20 \times 10^8 \pm 9,72 \times 10^8$	0,214	$8,69 \times 10^{11} \pm 9,39 \times 10^{10}$	<b>0,0014</b>
EC 16S	$3,67 \times 10^6 \pm 1,10 \times 10^7$	$2,04 \times 10^6 \pm 7,54 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6 \pm 4,49 \times 10^6$	0,094	$1,0 \times 10^6 \pm 1,82$	0,3918
ET 16S	$5,84 \times 10^{11} \pm 5,18 \times 10^{11}$	$5,60 \times 10^{11} \pm 4,69 \times 10^{11}$	$6,38 \times 10^{11} \pm 4,99 \times 10^{11}$	0,11	$5,25 \times 10^8 \pm 4,43 \times 10^8$	<b>&lt;0,001</b>
FEI	$1,68 \pm 0,66$	$1,87 \pm 0,82$	$1,64 \pm 0,55$	0,107	$2,36 \pm 0,78$	<b>0,049</b>

Es va evidenciar en els resultats de la cohort de pacients global, sense estratificar per tipus de malaltia i activitat de la mateixa, que l'abundància relativa de FP, EC i ET i l'índex FEI es van modificar no significativament al llarg del 3 punts temporals dins el mateix ordre ( $10^8$ ,  $10^6$  i  $10^{11}$  respectivament).

#### 4.4.2 Descripció dades microbiològiques desglossada per malaltia (MC/CU).

En aquest apartat es comparen les variables microbiològiques (FP, EC i ET) desglossat per a cada tipus de malaltia (MC/CU) per tal de valorar l'efecte del temps i el tipus de malaltia sobre la diferència entre les mitjanes i analitzar el comportament de les variables microbiològiques. Les mitjanes s'expressen en escala logarítmica en base 10 ( $\text{Log}_{10}$ ) per normalitzar les dades i treballar-les dins d'una altra escala. En aquest punt es va analitzar si l'efecte del temps i del tipus de malaltia influeix sobre la variabilitat dels valors obtinguts en la MI.

En les mitjanes de FP no hi havien diferències en els 3 temps ( $p=0,2$ ). Els pacients amb CU tenien nivells mitjans superior significativament ( $p=0,013$ ) respecte els pacients amb MC. Aquesta troballa indica que hi havia més càrrega relativa poblacional de FP en la CU respecte de la MC.

**Taula 4.23:** Anàlisi de la MI en relació amb el tipus de malaltia i l'evolució temporal. Valors de les mitjanes expressades en escala logarítmica en base 10 ( $\text{Log}_{10}$ ) amb la seva DE corresponent. Eina estadística utilitzada ANOVA mixta de 2 vies. \* Ús de la correcció de Greenhouse-Geisser per dades no esferificades.

		T0	T1	T2	p temps	p-malaltia
FP	MC	7,59 ± 2,03	7,91 ± 1,57	7,75 ± 1,78	0,20	<b>0,013</b>
	CU	8,20 ± 1,57	8,48 ± 0,98	8,76 ± 0,91		
EC	MC	5,32 ± 1,31	5,43 ± 1,16	5,57 ± 1,03	0,072	<b>0,003</b>
	CU	4,80 ± 1,49	4,35 ± 1,34	4,99 ± 1,14		
ET	MC	11,55 ± 0,66	11,52 ± 0,46	11,6 ± 0,48	0,086*	0,883*
	CU	11,38 ± 0,82	11,54 ± 0,61	11,71 ± 0,39		
FEI	MC	0,15 ± 0,2	0,16 ± 0,16	0,14 ± 0,15	0,09	<b>&lt;0'001</b>
	CU	0,25 ± 0,16	0,31 ± 0,17	0,25 ± 0,13		

Els valors globals d'EC van ser significativament més elevats ( $p= 0,003$ ) en la MC respecte de la CU indicant que hi ha més quantitat relativa d'EC en la MC. Tanmateix, no hi havia diferències ( $p=0,072$ ) en les mitjanes d'EC en els 3 punts temporals.

En quant al comportament d'ET s'ha mostrat que no hi havien diferències en les mitjanes dels 3 punt temporals ( $p= 0,086$ ) i malgrat que l'abundància relativa d'ET era superior en la CU respecte a la MC però de manera no significativa ( $p=0,882$ ).

Quan es va descriure la variabilitat de la quantificació dels microorganismes (FP, EC i ET) utilitzant l'índex FEI en els 3 punts temporals, no hi havia diferències entre l'evolució de les mitjanes temporals ( $p=0,09$ ). Si s'analitza el FEI desglossat pel tipus de malaltia, els pacients amb CU presenten nivells significativament ( $p<0,001$ ) més alts del FEI respecte dels pacients amb MC.

En resum, s'ha observat una major abundància relativa de FP en CU, i major abundància d'EC en la MC, de forma significativa.

#### 4.4.3 Descripció dades analítiques i evolució temporal.

En aquest apartat es van desglossar els paràmetres analítics en relació amb l'evolució temporal i per a cada tipus de malaltia, amb l'objectiu d'analitzar si

l'efecte del temps i la malaltia influeix sobre els resultats. Els resultats es descriuen en la taula 4.24.

En descriure el comportament de la PCR al llarg dels temps desglossat per tipus de malaltia es va evidenciar que els valors són diferents entre la MC i la CU, i per a cada punt temporal de forma significativa ( $p=0,018$  per temps i tipus de malaltia). Els valors de la MC i la CU van ser diferents entre temps T0 i T1 ( $p=0,015$ ) i T0 i T2 ( $p=0,029$ ). Les mitjanes de la PCR van ser moderades comparades amb els estàndards de la pràctica clínica.

Els valors de la CP van demostrar que eren diferents de forma significativa en cada mitjana temporal ( $p=0,037$ ). Així, les mitjanes de CP en pacients amb CU són significativament més altes ( $p=0,04$ ) respecte a les mitjanes de MC. La mitjana en T0 per a la MC és superior al punt de tall establert ( $>250$ ) per tant la majoria de pacients tenen malaltia activa. Els valors de la CP decreixien progressivament al llarg del temps tal com es descriu en la figura següent.

**Taula 4.24:** Relació MI amb els paràmetres analítics i l'evolució temporal. Mitjanes expressades en valors amb la unitat de referencia. Eina estadística utilitzada ANOVA mixta 2 vies.

		T0	T1	T2	P temps	P malaltia	P altres
PCR	MC	5,75 ± 6,45	1,1 ± 5,37	1,74 ± 4,89	<b>0,018</b>	<b>0,018</b>	T0-T1: <b>p=0,015</b> T0-T2: <b>p=0,029</b>
	CU	2,03 ± 6,60	4,94 ± 4,65	1,64 ± 4,67			
CP	MC	268,23 ± 3,09	203,86 ± 2,83	200,04 ± 3,02	<b>0,037</b>	<b>0,04</b>	
	CU	176,6 ± 3,45	137,07 ± 3,45	123,65 ± 3,98			
ALB	MC	3,83 ± 3,31	3,97 ± 2,39	4,07 ± 1,07	0,211	0,105	0,27
	CU	4,11 ± 3,32	4,09 ± 3,34	4,07 ± 1,09			
Hb	MC	13,19 ± 1,74	13,38 ± 1,41	13,37 ± 1,35	<b>0,048</b>	0,485	
	CU	13,32 ± 1,49	13,53 ± 1,74	13,80 ± 1,68			

No hi havia diferències significatives en les mitjanes d'Alb entre els 3 punts temporals ( $p=0,211$ ) ni entre el tipus de malaltia ( $p=0,270$ ). Els valors d'Alb per la CU van augmentar progressivament al llarg del temps, mentre que els de MC són estables en el temps.

S'ha evidenciat que els valors d'Hb entre els 3 punts temporals van mostrar diferències significatives ( $p=0,048$ ), però malgrat que els valors d'Hb són discretament superior per la CU no hi havia diferències significatives ( $p=0,485$ ) entre els 2 tipus de malaltia.

#### 4.5 Controls sans (CS):

Es van incloure en total 8 CS procedents de la col·lecció "Control Sans Digestiu", de pacients que no presentaven patologia digestiva, ni patologia no digestiva, ni consum de medicació concomitant que alterés la MI. Per aquest motiu no disposem de tantes dades demogràfiques i analítiques completes com el grup de pacients.

**Taula 4.25A:** Descripció dades demogràfiques CS. Valors mitjans expressats en unitats de referència. Percentatge relatiu entre parèntesis (%).

	Valor CS	Cohort pacients MII	p
Edat (anys $\pm$ DE)	51 $\pm$ 13,41	47,2 $\pm$ 14,75	0,9
Sexe (N (%) Home /Dona)	H: 5 (62,5%) D: 3 (37,5%)	H: 34 (42,5%)	
IMC (Kg/M <sup>2</sup> ) (Ràtio $\pm$ DE)	25,44 $\pm$ 2,63	24,5 $\pm$ 3,79	0,67
Hospital	8 HJT (100%)	CHV 18 (22,4%) HJT 62 (77,6%)	
Tabac	8 No fumadors (100%)	43 (53,8%)	

L'Edat mitjana dels CS (51 anys) és discretament més elevada que la cohort dels pacients MII. Hi ha una predominança del sexe masculí. L'IMC mitjà és de 25,44, discretament superior que la cohort de pacients de MII. La totalitat dels pacients provenen del HJT i tots els pacients són no fumadors. Dels CS, donat que no mostren patologia, únicament vam disposar dels valors de Hb i Alb. Aquests valors són més elevats que la mitjana global dels mateixos valors de la cohort MII global de forma significativa ( $p= 0,04$ ).

En la taula 4.22 es descriuen la quantificació els grups bacterians (FP, EC i ET) en els CS. Es va quantificar la MI mitjançant la mateixa tècnica de qPCR utilitzada amb la MI dels pacients i es va calcular la mitjana i la seva DE. Es va evidenciar que hi ha major quantitat de FP (ordre  $10^{11}$ ) respecte EC (ordre  $10^6$ ).

**Taula 4.25B:** Descripció dades analítiques dels CS. Valors expressats en unitats de referència. Test T Student.

Analítics	Valor	Cohort MII	p
Hb (g/dL)	14,53 ± 1,23	13,39 g/dL	0,04
ALB (g/dL)	4,51 ± 0,24	4,04 g/dL	

El perfil microbiològic dels CS va mostrar uns valors mitjans de FP de l'ordre de  $10^{11}$ , valors més elevats que qualsevol altre valor de FP en els pacients de la cohort MII analitzats (ordre de  $10^8$ ). La quantitat mitjana d'EC dels CS que es va descriure és de ordre  $10^6$ , similar a la dels pacients amb MII que mostren valors més alts de EC dins del mateix ordre ( $10^6$ ). La càrrega d'ET en CS és de l'ordre de  $10^8$ , sensiblement més baixa que la resta de valors d'ET en pacients amb MII (ordre  $10^{11}$ ). El valor mitjà de l'Índex FEI dels CS és de 2,35, sensiblement més elevat que els valors la mitjana del FEI de la CU/MC.

#### 4.6 Correlació entre indicadors clínics i microbiològics.

En aquest punt es va analitzar la relació entre els indicadors clínics que habitualment s'utilitzen en la pràctica clínica per avaluar l'activitat de la MII (veure l'apartat MiM) amb els indicadors microbiològics estudiats en la present tesi (FP, EC i ET) per tal de valorar si existeix dependència entre les variables. Es van analitzar els indicadors analítics (PCR, CP, Hb i Alb), els endoscòpics (SES-CD, Mayo), d'activitat clínica (HBI, SCCAI) i de qualitat de vida (IBD-Q). La correlació, positiva o negativa, entre els indicadors analítics, que han estat validats en estudis previs, i els microbiològics, estudiats en la present tesi, permetrà determinar la relació dels indicadors microbiològics amb els indicadors utilitzats en la valoració de l'activitat clínica de la MII.

Es va calcular el coeficient de correlació de Spearman ( $\rho$ ) i la seva significació per a MII global (MC i CU junts) i desglossat per tipus de malaltia (MC i CU) amb tots els valors en els 3 temps (T0, T1 i T2) en els 80 pacients inclosos per tal de descriure les tendències dels marcadors. En la taula següent es mostra un resum de les correlacions significatives entre els diferents marcadors. En l'annex I s'inclouen totes les taules de les correlacions significatives amb el seu valor de significància corresponent que estan desglossades al llarg del text a continuació.

**Taula 5.26:** Resum de les correlacions significatives entre variables desglossat per malaltia i temps.

	MII GLOBAL			MC			CU		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
PCR	CP EC		CP	CP EC	CP	CP	CP	FP	FP
CP	Hb	Hb	Hb	PCR	Hb	Hb	Hb		
ALB			FP		FP	FP			
Hb		EC	EC				EC		
ÍNDEX ACTI VITAT				HBI PCR HBI CP	HBI CP	HBI CP	PCR SCCAI	CP SCCAI	PCR MAYO SCCAI
ÍNDEX ENDOSCÒPICS				HBI CP	HBI CP	HBI PCR	PCR CP	CP	FEI PCR EC
MARCADORS MICROBIOLÒGICS	ET FP	ET FP	ET FP	ET FP	ET FP EC FP	ET FP	ET FP	ET FP	ET FP
FEI	FP PCR EC	EC FP Hb	EC ET FP Hb	EC FP	EC FP	ALB EC ET FP	EC FP Hb	EC	EC ET FP MAYO

Per MII global en T0, hi havia una correlació significativa entre les variables: PCR i CP (0,581;  $p < 0,000$ ) correlació positiva moderada, PCR i EC (-0,273;  $p = 0,014$ ) correlació negativa mitjana; CP i Hb (-0,353;  $p = 0,001$ ) correlació negativa mitjana i entre ET i FP (0,598;  $p < 0,000$ ) correlació moderada.

En la MII global en T1, es va evidenciar correlació significativa, entre les variables Hb i CP (-0,254;  $p = 0,023$ ) correlació negativa mitjana, Hb i EC (-0,254;  $p = 0,023$ ) correlació negativa mitjana i en ET i FP (0,572;  $p < 0,001$ ) correlació positiva moderada.

En la MII global en T2, es va observar correlació significativa entre les variables PCR i CP (0,287;  $p = 0,012$ ) correlació positiva mitjana, Hb i CP (-0,363;  $p = 0,001$ ) correlació negativa mitjana, Hb i EC (-0,245;  $p = 0,045$ ) correlació negativa mitjana;



Alb i FP (0,293;  $p= 0,02$ ) i els ET i FP (0,498;  $p< 0,001$ ) mostren correlació positiva moderada.

Es va evidenciar correlació significativa per la MC en T0 entre les variables PCR i CP (0,532;  $p<0,001$ ) correlació positiva moderada, PCR i EC (-0,338;  $p =0,023$ ) correlació negativa mitjana i entre ET i FP (0,637,  $p<0,001$ ) correlació positiva moderada.

Es va detectar correlació significativa per la MC en T1, negativa entre la PCR i Hb (-0,337,  $p=0,024$ ), entre la CP i l'Hb (-0,343,  $p=0,021$ ) correlació negativa, entre ET i FP (0,624,  $p<0,001$ ) correlació positiva; i negativa entre EC i FP (-0,319,  $p=0,038$ ).

Per la MC en T2 es va mostrar correlació significativa entre les variables PCR i CP (0,361;  $p<0,021$ ) correlació positiva mitjana, CP i Hb (-0,462;  $p =0,002$ ) correlació negativa moderada, Alb i FP (0,562;  $p<0,001$ ) i entre ET i FP (0,523;  $p<0,001$ ) correlació negativa moderada.

Respecte la CU en T0 es va observar correlació significativa entre les variables PCR i CP (0,592;  $p<0,001$ ) correlació positiva moderada, CP i Hb (-0,340;  $p =0,046$ ) correlació negativa mitjana, Hb i EC (-0,445;  $p=0,007$ ) i entre ET i FP (0,637;  $p<0,001$ ) correlació negativa moderada.

En la CU en T1, es va detectar correlació significativa entre les variables PCR i FP (0,556;  $p<0,001$ ) correlació positiva moderada i entre ET i FP (0,472;  $p=0,004$ ) correlació positiva mitjana.

Per la CU en T2, es va advertir una correlació significativa entre les variables CP i FP (-0,390;  $p=0,03$ ) correlació negativa mitjana i entre ET i FP (0,428;  $p=0,016$ ) correlació positiva mitjana.

De forma global, es va observar una correlació positiva constant entre FP i ET amb valors similars de coeficient  $r$ , indicant que aquest 2 marcadors microbians s'afecten de forma similar en la mostra.

Tal com es mostren els resultats en la taula 5.26 i en el document annex I, es va observar correlació significativa per l'índex FEI per a FP i EC per a tots els temps, ja que el FEI és el resultat del quocient entre FP i EC, i per tant depèn d'ells. L'índex FEI es va correlacionar amb almenys 1 paràmetre d'activitat (analític i/o endoscòpic) en cada temps.

La majoria dels marcadors d'activitat clínica i endoscòpica, van mantenir almenys una correlació amb la CP en punt temporal. Destaca la correlació freqüent entre CP i PCR amb valors de correlació similar. Es va advertir que es manté bona correlació entre el SCCAI i l'índex Mayo, i entre el SES-CD i el HBI per a cada punt temporal. Els marcadors d'activitat endoscòpica i clínica van mostrar bones correlacions entre ells.

La resta dels indicadors van mostrar correlacions significatives poc constants al llarg dels 3 temps i per cada malaltia, és a dir van mostrar una correlació significativa en un temps determinat entre 2 valors però després aquesta correlació no es va tornar a detectar en els altres temps.

#### 4.7 Determinació del FEI com a biomarcador d'activitat i remissió en T0.

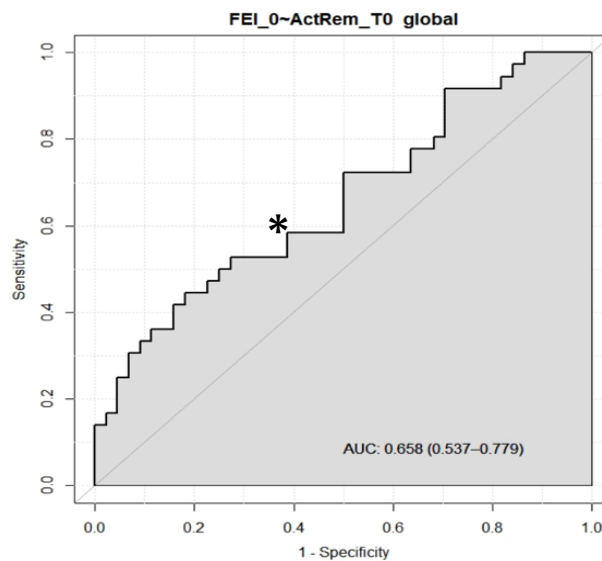
El valor de l'índex FEI s'obté de la relació entre FP i EC (veure fórmula a MiM) i és un dels marcadors a estudi que quantifica de forma simple l'estat d'activitat de la MI. Per valorar la utilitat de l'índex FEI com a possible biomarcador es va calcular la corba ROC, i l'àrea sota la corba (*"Area under the curve, AUC" en anglès*) i el punt de tall (PT) òptim. Tal com s'ha explicat prèviament, a T0 es van classificar els pacients en activitat i remissió en base els valors de la CP i per tant el PT d'activitat/remissió està calculat en relació la CP. La corba ROC i el PT es va calcular pel FEI en T0, T1 i T2 per a MII global, MC i la CU. El valor de la corba ROC ha de ser superior a 0,5 i com més proper a 1 millor utilitat com a marcador.

**Taula 4.27-**. Relació de AUC i els PT per al FEI en temps 0. Relació dels càlculs del AUC i el PT a partir de la corba ROC amb l'IC corresponent. Valors significatius en negreta.

FEI 0		MII GLOBAL	MC	CU
T0	AUC	<b>0,658 (0,537 – 0,779)</b>	0,668 (0,489 – 0,847)	0,598 (0,397 – 0,799)
	PT	<b>1,869 [S=0,44; E= 0,82]</b>	1,514 [S=0,78;E=0,61]	1,771 [S=0,545;E=0,769]
T1	AUC	0,448 (0,305 – 0,592)	0,565 (0,352 – 0,777)	0,493 (0,273 – 0,713)
	PT	1,566 [S=0,500;E=0,569]	1,514 [S=0,778; E=0,556 ]	1,566 [S=0,538,E=0,773]
T2	AUC	0,585 (0,440 – 0,730)	0,645 (0,427 – 0,863)	0,507 (0,285 – 0,729)
	PT	1,787 [S=0,524;E=0,661]	1,651 [S=0,750;E=0,649]	1,566 [S=0,538;E=0,773]

L'única corba ROC que va mostrar un valor AUC superior a 0,5 és en T0 per MII global (0,658 (0,537-0,779)) amb un PT d'1,869 (Sensibilitat de 0,44 i Especificat de 0,82). El PT és el valor més alt de l'escala del gràfic o més distant entre 2 punts. Aquest valor del PT a T0 per MII global és el valor que classifica entre activitat i remissió: valors inferiors s'associen a remissió i valors superiors a activitat de la MII.

Les corbes ROC, tot i que mostren valors de AUC superiors a 0,5, el seu interval de confiança (IC) engloba resultats inferiors a 0,5 i per tant el càlcul del PT és no significatiu. L'interval de valors del PT es situa entre 1,5 i 2. A causa del fet que a T1 i T2, els grups d'activitat i remissió es modifiquen (per exemple, pacients que deixen d'estar en remissió, canvi tractament, etc.), la *n* en T1 i T2 es redueix intragrup per diversificació i es perd poder estadístic per determinar-ne l'AUC i el PT.

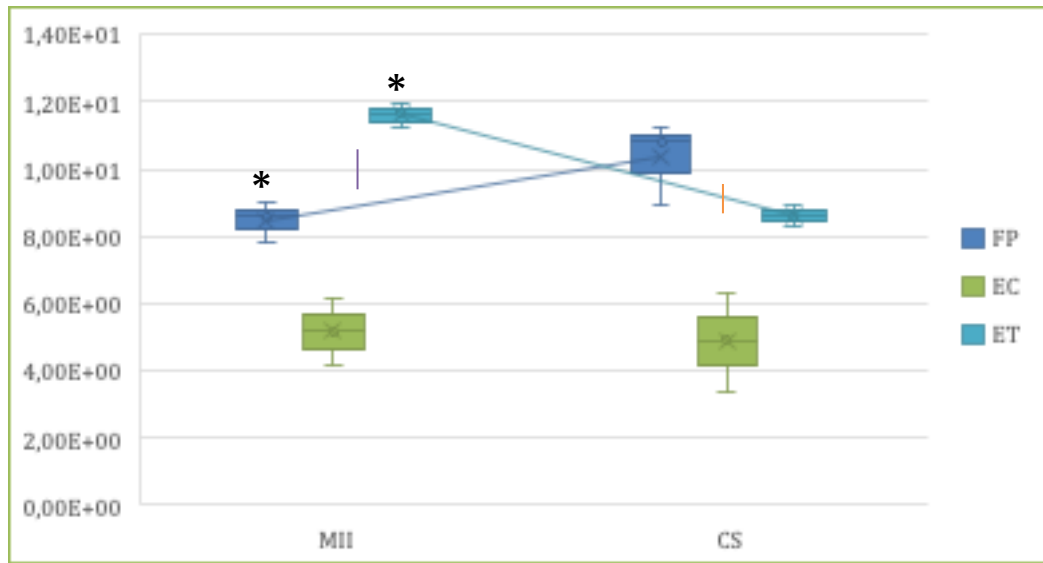


**Figura 4.14:** Representació gràfica de la AUC pel FEI en T0 per MII global. Únic AUC superior a 0,5 i PT significatiu. \* Punt de tall (PT) calculat : 1.869.

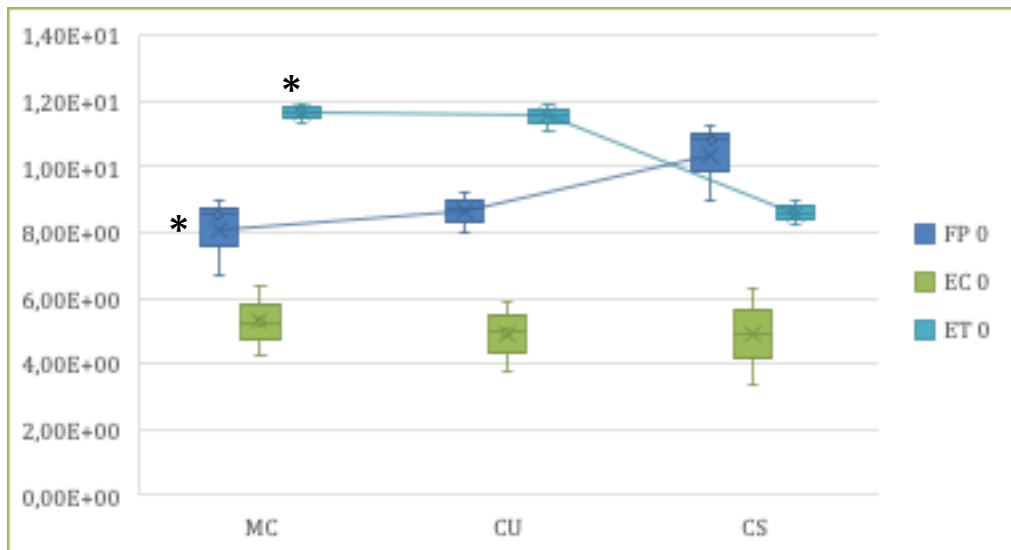
#### 4.8 Comparació de les variables microbiològiques entre pacients amb MII respecte Controls sans (CS) en T0.

En aquest punt es van comparar les variables microbiològiques estudiades (FP, EC i ET) desglossats per a cada malaltia (MC/CU) i es comparen amb els valors dels CS en T0. L'objectiu d'aquest apartat és valorar si a través de la quantificació de FP i EC, hi ha diferències en la MI dels pacients amb MII respecte la dels CS i valorar si

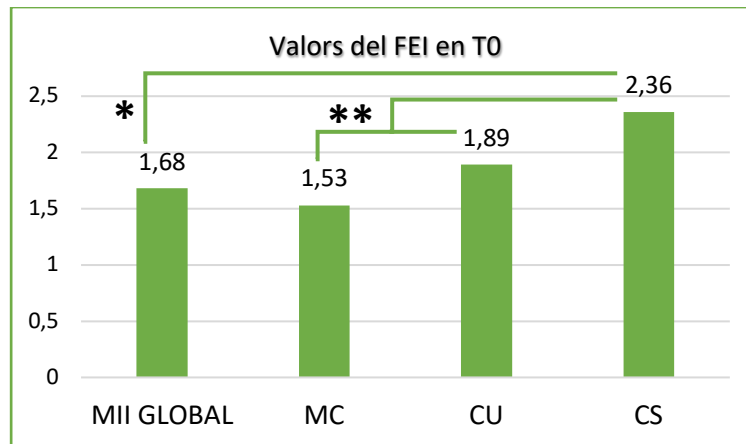
la relació FP i EC permet diferenciar entre pacients amb MII dels CS i entre els 2 tipus de MII. Es va analitzar per MII global i desglossat per tipus de MII.



**Figura 4.15A:** Comparativa variables microbiològiques per MII global respecte dels CS en T0. Valors absoluts (còpies/gr) convertits a logaritme base 10 (Log<sub>10</sub>) per ajustar representació de dades en eix vertical. L'abundància relativa de FP i ET va mostrar diferències significatives entre pacients amb MII i els CS ( $p=0,014$  i  $p<0,0001$  respectivament). Les abundàncies d'EC no van mostrar diferències ( $p=0,3918$ ). En el diagrama de caixa es descriu la mediana, rang interquartil i la DE en línia vertical. \* :  $p<0,05$ . Eina estadística: Test de U de Mann-Whitney.



**Figura 4.15B:** Comparativa variables microbiològiques desglossat per tipus de MII (MC i CU) respecte dels CS en T0. Valors absoluts (còpies/gr) convertits a logaritme base 10 (Log<sub>10</sub>) per ajustar representació de dades en eix vertical.. Les abundàncies de FP i ET van mostrar diferències significatives ( $p=0,002$  i  $p=0,001$  respectivament) entre CS i els 2 tipus de malaltia. EC no va mostrar diferències ( $p=0,221$ ). En el diagrama de caixa es descriu mediana, rang interquartil i la DE en línia vertical \* :  $p<0,05$ . Eina estadística: Test de U de Mann-Whitney.



**Figura 4.15C:** Mediances dels valor del FEI en T0.  $p < 0,05$ . Eina estadística: Test de U de Mann-Whitney. Els valors del FEI van mostrar valors significativament superiors (\*  $p = 0,048$ ) entre els pacients amb MII global (1,68) i els CS (2,36), i desglossat per tipus de malaltia (\*\* $p = 0,0105$ ) respecte dels CS. El valor FEI no té unitats.

Tal com es descriu en les figures 4.15 (A, B i C), els valors de FP en la cohort MII (mediana ordre  $10^8$ ) són inferiors als valors de la mediana de FP en els CS ( $10^{10}$ ) de forma significativa ( $p = 0,0014$ ). Al desglossar per tipus de malaltia s'ha advertit que l'abundància de FP en les 2 malalties també és mantenia amb valors inferiors respecte als CS ( $10^{10}$ ) de forma significativa ( $p = 0,0017$ ).

Hi havia un augment no significatiu ( $p = 0,3918$ ) de l'abundància d'EC en els pacients amb MII (ordre  $10^5$ ) respecte els CS ( $10^4$ ). Els valors més alts d'EC s'han observat en la MC ( $10^5$ ) respecte de la CU ( $10^4$ ), sense diferències significatives ( $p = 0,221$ ) amb els CS ( $10^4$ ).

Es va descriure un augment de l'abundància d'ET en el grup MII (ordre  $10^{11}$ ) respecte dels CS (ordre  $10^8$ ) de forma significativa ( $p = 0,0001$ ). Desglossat per tipus de malaltia, també es va mostrar major abundància d'ET en la CU i la MC ( $10^{11}$ ) comparat amb els CS, de forma significativa ( $p = 0,0001$ ).

Quan es va comparar la MI de la MC respecte la CU s'ha advertit major proporció d'EC en la MC i proporcions similars de FP i ET. Els valors FEI més baixos es van detectar en la MC.

L'índex FEI va ser diferent de forma significativa ( $p = 0,049$ ) entre la MII global i els CS. En relació als valors desglossats per malaltia, s'han detectat valors significativament inferiors ( $p = 0,015$ ) entre els individus analitzats amb la MC, CU i

els CS, on els primers presentaven valors inferiors als diagnosticats per CU (1,55 i 1,89 respectivament) respecte dels CS (2,36). La MI associada a la MII respecte dels CS es va caracteritzar per menor abundància de FP i major d'ET de forma significativa; i també major abundància no significativa d'EC.

#### 4.9 Comparació marcadors analítics i microbiològics segons activitat i remissió per a T0, T1 i T2.

Un dels objectius del present treball va ser valorar els canvis en la quantificació de la disbiosi per valorar l'activitat de la MII a través de la proporcionalitat entre FP i EC. En els punts anteriors vam valorar la capacitat dels paràmetres microbiològics per discriminar entre els CS i els pacient amb MII (i els diferents subtipus de MII) i com aquests varien en funció del tipus de malaltia.

Per tal de valorar la capacitat dels marcadors microbiològics per discriminar entre activitat i remissió, es van analitzar les diferències entre els valors classificats com activitat i remissió i la seva variació en els 3 punts temporal en què s'han recollit les mostres. Tal com s'ha descrit anteriorment, es va definir activitat com la situació clínica amb els valors de CP>250, permeten així la classificació en T0 dels pacients en 2 grups: pacients en Activitat (A) i pacients en Remissió (R) de la MII. Dels pacients que en T0 es van classificar com activitat, en T1 es van classificar en responedors al tractament (CP<250, grup Remissió) i no responedors al tractament (CP>250, grup activitat), i es va procedir de la mateixa faísó en T2.

A partir d'aquesta classificació es van comparar els valors de cada paràmetre classificat com activitat amb els valors en remissió. Aquesta aproximació es va aplicar pel que fa a la MII global i de manera desglossada de MC i CU.

**Taula 4.28:** Evolució clínica dels pacients classificats en Activat i remissió en T0.

		T0 N=80	T1 N=80	T2 N= 76
MII GLOBAL	R	44	58	55
	A	36	22	21
CU	R	13	22	19
	A	22	13	12
MC	R	31	36	33
	A	14	9	8

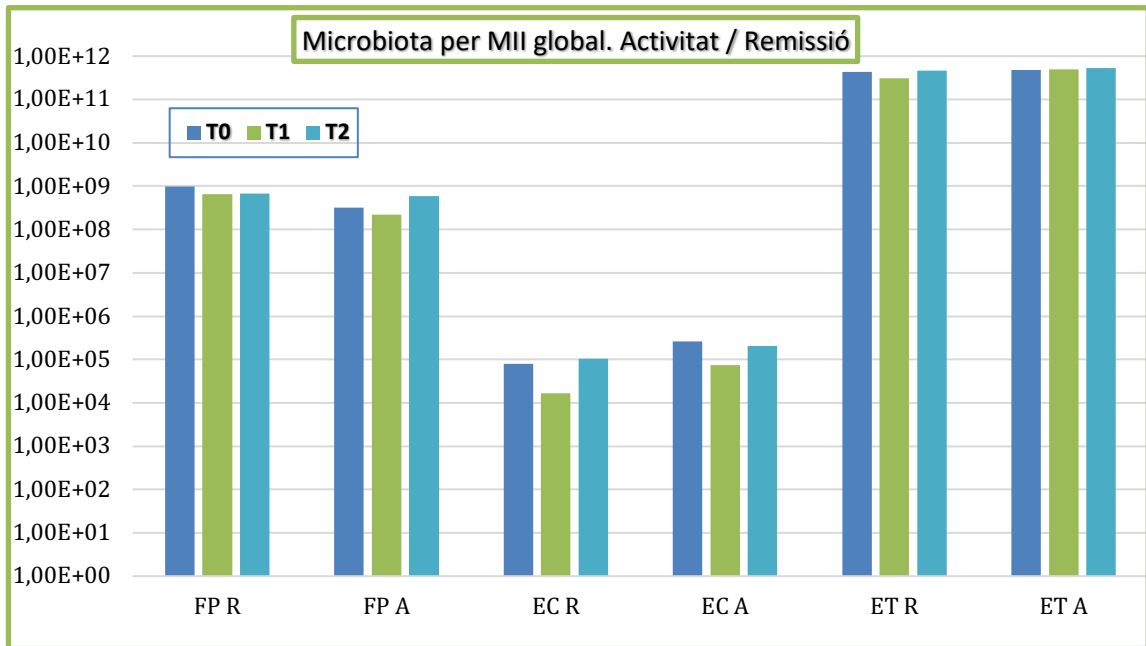
Tal com es pot observar en la taula anterior, els pacients que es van classificar com activitat de la malaltia en T0 van entrar progressivament en remissió en T1 i T2, ja que el nombre de pacients classificats com activitat (no responedors al tractament, CP>250) disminueix progressivament.

S'ha detectat en les figures 4.17B que en temps 0 al desglossar els indicadors per tipus de malaltia i comparar entre els 2 grups que els valors de les medianes de PCR i CP dels grup activitat van ser superiors respecte el grup remissió, tant per les mostres de MII en el seu conjunt global com per desglossat per tipus de MII. Les diferències dels valors de la CP van ser significatives ( $p<0,001$ ) en les 2 malalties i MII global en els 3 temps. Les mitjanes dels valors de la PCR vans mostrar diferències significatives ( $p<0,002$ ) en T0 per a totes les malalties i en el T2 per la MC únicament. Els valors de CP i PCR del grup activitat van ser superiors respecte la remissió compatibles amb el comportament biològic esperat del paràmetre analític.

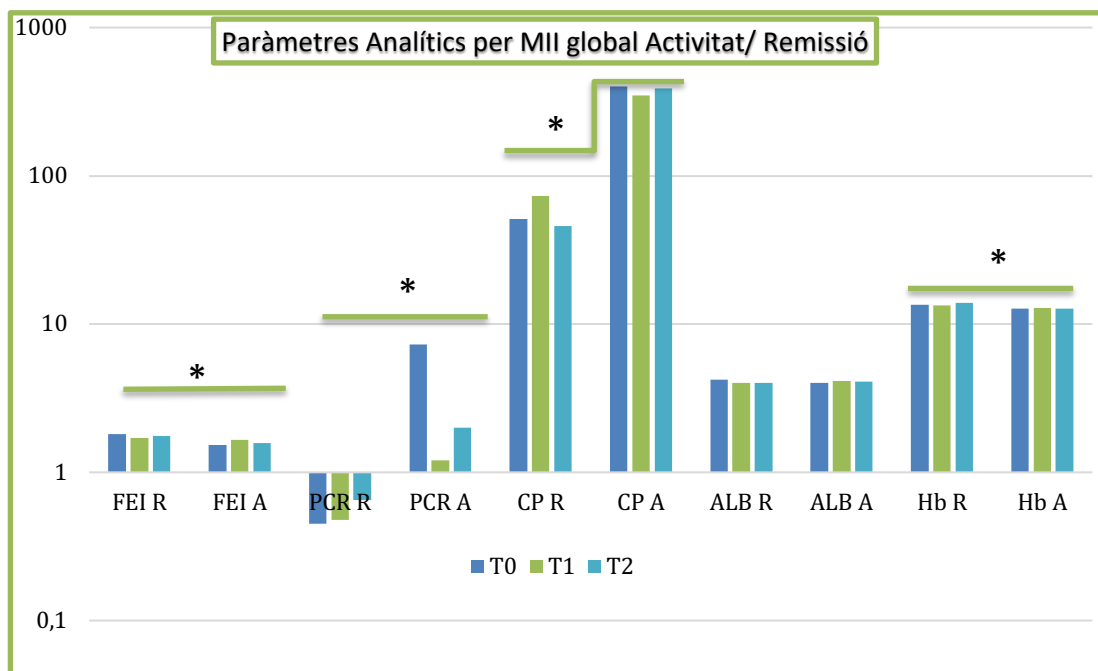
L'Hb va mostrar que els valors d'activitat van ser inferiors als valors classificats com a remissió, amb significació estadística per la MII global en T0,T1 i T2 ( $p=0,0241$ ,  $p=0,047$  i  $p=0,0338$  respectivament); i per la MC en el T0 i T2 ( $p=0,0338$  i  $p=0,030$  respectivament). Els valors d'albumina van presentar molta variabilitat entre l'activitat i la remissió sense diferències significatives estadísticament.

En relació als paràmetres de la MI estudiats (FP, EC i ET), s'ha observat que hi ha un augment de l'abundància relativa de FP en el grup remissió; un augment de l'abundància relativa d'EC i ET en el grup activitat, tant pel conjunt de la MII, com desglossat per la CU i la MC en els 3 punts temporals. Les mitjanes dels bacteris no van mostrar significació estadística entre els valors d'activitat i remissió.

Les medianes de l'índex FEI van ser superior en el grup remissió respecte del grup activitat per les mostres de MII global, CU i MC en tots els temps. La mediana del FEI per malaltia global en T0 va mostrar diferències significatives ( $p=0,0156$ ) entre els 2 grups.

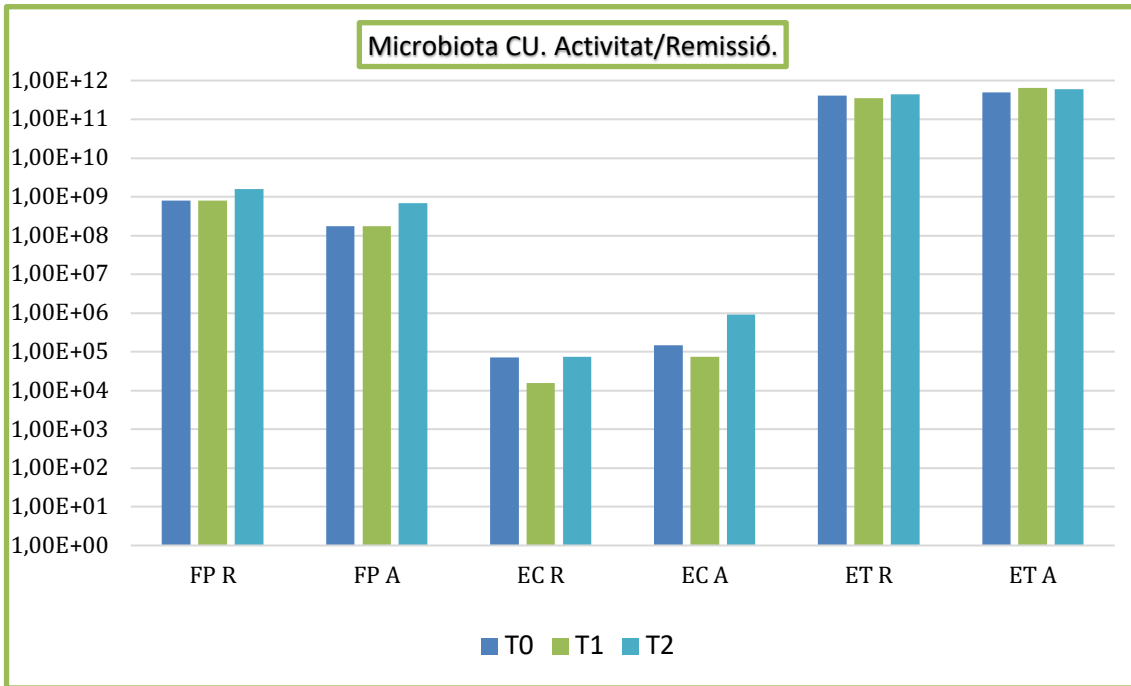


**Figura 16A.** Classificació en activitat i remissió. Descripció de l'evolució temporal de la microbiota per MII global desglossats per activitat i remissió. Dades en escala logarítmica. No s'han detectat diferències significatives.

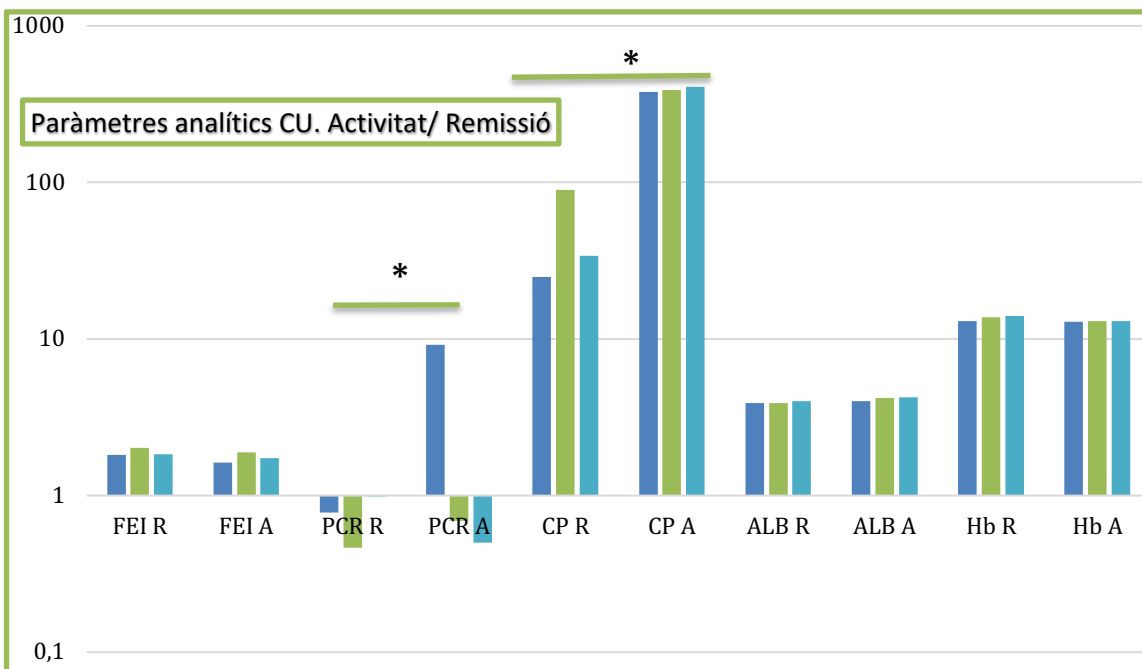


**Figura 16B.** Classificació en activitat i remissió. Descripció de l'evolució temporal dels paràmetres analítics per MII global desglossats per activitat i remissió. Dades en escala logarítmica. Línies horitzontals: diferències significatives en tota una categoria.  $*=p<0,002$ .

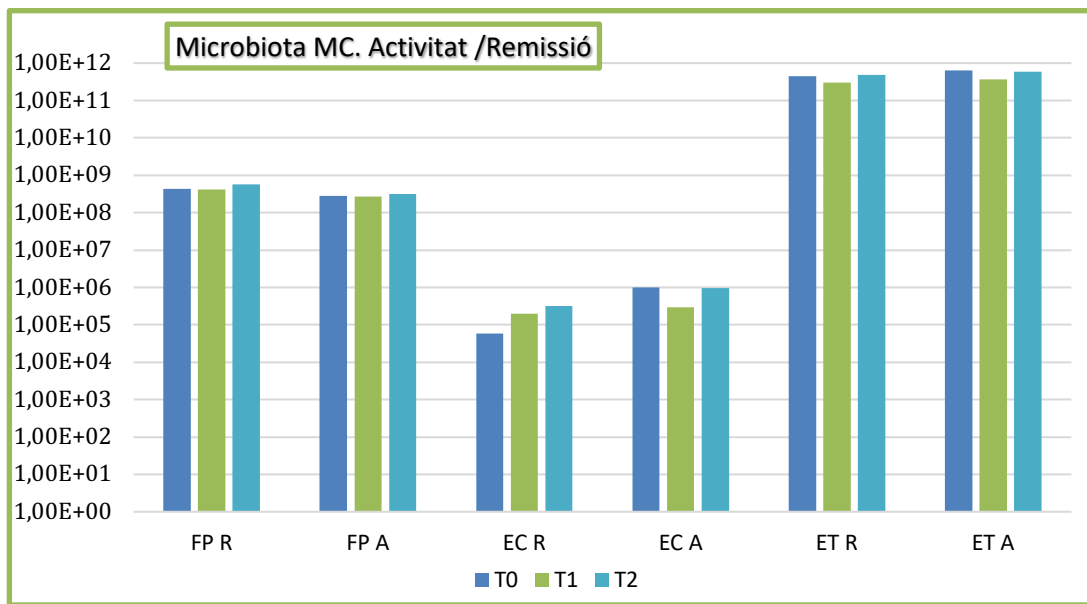




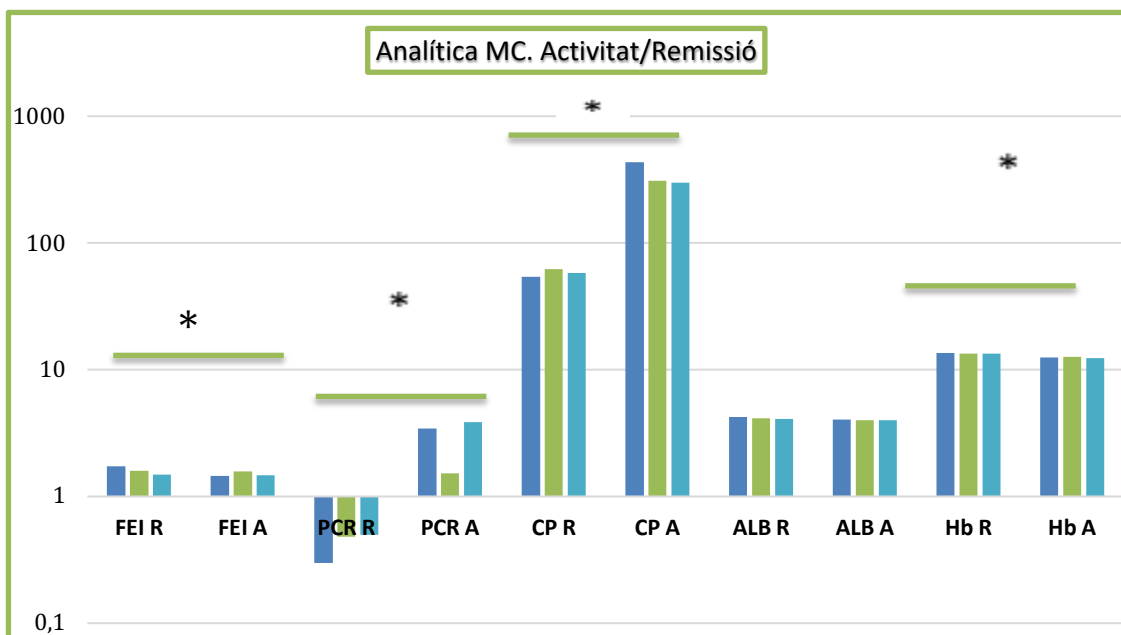
**Figura 17A.** Classificació activitat i remissió. Descripció de l'evolució temporal de la microbiota intestinal associada a la CU desglossada per activitat i remissió. Les figures s'han expressat en escala logarítmica. No s'han detectat diferències significatives.



**Figura 17B.** Classificació activitat i remissió. Descripció de l'evolució temporal dels paràmetres analítics i el FEI desglossada per activitat i remissió en la CU. Les figures s'han expressat en escala logarítmica. Línies horitzontals: diferències significatives en la categoria.  $*=p < 0,003$ .



**Figura 18A.** Classificació activitat i remissió. Descripció de l'evolució temporal de la microbiota intestinal associada a la MC, desglossada per activitat i remissió. Les figures s'han expressat en escala logarítmica. No s'han detectat diferències significatives.



**Figura 18B.** Classificació activitat i remissió. Descripció de l'evolució temporal dels paràmetres analítics i el FEI desglossada per activitat i remissió en la MC. Les figures s'han expressat en escala logarítmica. Línies horitzontals: diferències significatives en tota una categòrica.  $*=p<0,002$ .

Per valorar com es modifiquen els bacteris per l'activitat de la malaltia, un cop descrites les diferències del comportament entre activitat i remissió, es van

comparar en T0 amb els valors dels CS i com es modificaven respectes dels mateixos.

**Taula 4.29:** Comparativa dels valors dels bacteris classificats en activitat i remissió amb els controls sans en T0. Test estadístic no paramètric de Kruskal-Wallis. Valors en unitats de referència i còpia/gram. \*: Test de Bonferroni detectada diferència entre els 3 subgrups (activitat, Remissió i CS). \*\*:Test de Bonferroni detecta que el grup de CS és diferent del grup Remissió.

TO		CS N= 8			CU (N: R13, A22)				MC (N=R31, A14)			
		Q1	ME	Q3	Q1	ME	Q3	p	Q1	ME	Q3	p
FP	R	9,25 × 10 <sup>8</sup>	6,47 × 10 <sup>11</sup>	1,77 × 10 <sup>11</sup>	4,22 × 10 <sup>7</sup>	7,88 × 10 <sup>8</sup>	1,69 × 10 <sup>9</sup>	0,015*	6,50 × 10 <sup>5</sup>	4,26 × 10 <sup>8</sup>	1,06 × 10 <sup>9</sup>	0,0043*
	A				1,55 × 10 <sup>8</sup>	1,76 × 10 <sup>8</sup>	1,92 × 10 <sup>9</sup>		1,42 × 10 <sup>8</sup>	2,79 × 10 <sup>8</sup>	7,18 × 10 <sup>8</sup>	
EC	R	2,50 × 10 <sup>3</sup>	7,93 × 10 <sup>4</sup>	2,13 × 10 <sup>6</sup>	4,18 × 10 <sup>4</sup>	7,18 × 10 <sup>4</sup>	4,44 × 10 <sup>5</sup>	0,8568	1,56 × 10 <sup>4</sup>	5,93 × 10 <sup>5</sup>	2,69 × 10 <sup>6</sup>	0,4622
	A				3,93 × 10 <sup>3</sup>	1,46 × 10 <sup>5</sup>	8,45 × 10 <sup>5</sup>		2,24 × 10 <sup>4</sup>	9,90 × 10 <sup>5</sup>	1,54 × 10 <sup>6</sup>	
ET	R	1,82 × 10 <sup>8</sup>	5,25 × 10 <sup>8</sup>	8,92 × 10 <sup>8</sup>	3,15 × 10 <sup>11</sup>	4,10 × 10 <sup>11</sup>	8,49 × 10 <sup>11</sup>	0,0001*	1,51 × 10 <sup>11</sup>	4,53 × 10 <sup>11</sup>	1,00 × 10 <sup>12</sup>	<0,0001*
	A				9,39 × 10 <sup>10</sup>	4,88 × 10 <sup>11</sup>	8,97 × 10 <sup>11</sup>		2,28 × 10 <sup>11</sup>	6,34 × 10 <sup>11</sup>	8,21 × 10 <sup>11</sup>	
FEO	R	1,78	2,16	2,79	1,26	1,82	1,72	0,0351**	1,19	1,54	1,84	0,0124*
	A				1,4	1,63	2,58		1,13	1,52	1,96	

A T0 s'han comparat els valors dels bacteris calculats de la MC i la CU amb els valors dels CS, desglossats en activitat i remissió, per analitzar si els valors en activitat de les 2 malalties són diferents dels CS. No s'ha fet el càlcul per MII global, i només en el T0.

Tal com es descriu en la taula anterior, les medianes de FP, ET i l'índex FEI (per la MC) van presentar diferències significatives amb els CS, indicant que les medianes d'aquest grups bacterians en les 2 malalties s'afecten de manera diferent respecte dels CS.

Els valors de l'índex FEI en la CU, les diferències es van objectivar entre el grup remissió i els CS aplicant el test de Bonferroni. Els valors d'EC dels pacients amb MII no mostren diferències entre activitat i remissió respecte dels CS.

#### 4.10 Descripció concordança dels indicadors microbiològics amb la CP per discriminar Activitat de la remissió.

En els punts anteriors vam valorar la capacitat dels paràmetres microbiològics per discriminar entre CS i els diferents subtipus de MII i com aquests varien en funció del l'activitat de la pròpia malaltia al llarg de l'evolució temporal (punt anterior).

Un cop es van analitzar la capacitat dels bacteris per discriminar entre activitat a remissió es va calcular el valor de la concordança en T0 amb la CP que ha estat el marcador que s'ha utilitzat per discriminar entre activitat i remissió. La concordança s'ha calculat utilitzant el coeficient de correlació intraclase (ICC) i la significació estadística mitjançant l'anàlisi de la variança entre classes (ANOVA). La concordança valora si les variables que es comparen mesuren igual un determinat valor en activitat o en remissió. S'ha calculat comparant la CP amb PCR, Hb, ET, FP, EC, FEI, SES-CD, HBI, SCCAI, Mayo.

**Taula 4.30:** Concordança dels diferents indicadors amb la CP en T0.

VALOR	Estadístic	CLASSIFICACIÓ	MC (coeficient/p )	CU (coeficient/p )
CP / PCR	CONCORDANÇA	REM	0,4 / 0,419	0,29 / 0,462
		ACT	0,403 / 0,49	0,327 / 0,59
	SPEARMAN	REM	0,1 / 0,614	-0,183 / 0,569
		ACT	0,402 / 0,109	<b>0,416 / 0,048</b>
CP / SCCAI	CONCORDANÇA	REM		-0,53 / 0,568
		ACT		0,256 / 0,114
	SPEARMAN	REM		-0,155 / 0,631
		ACT		<b>0,523 / 0,001</b>
CP / MAYO	CONCORDANÇA	REM		0,114 / 0,385
		ACT		<b>0,422 / 0,025</b>
	SPEARMAN	REM		0,155 / 0,714
		ACT		0,311 / 0,170

S'ha detectat que hi ha correlació positiva significativa en T0 entre la CP i la PCR, entre CP i el SCCAI, és a dir es modifiquen de la mateixa manera en la nostra cohort. S'ha descrit concordança significativa entre la CP i l'índex de Mayo endoscòpic per a mesurar l'activitat de la malaltia.

#### **4.11 Descripció de l'aplicabilitat dels marcadors microbiològics en diferents escenaris clínics.**

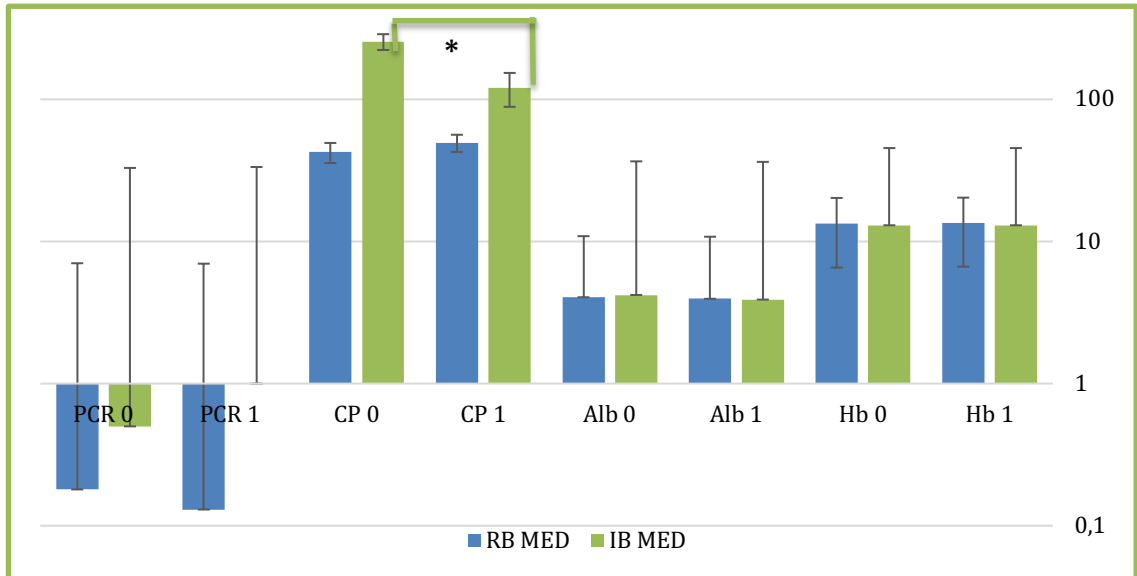
Tal com s'ha explicat anteriorment en l'apartat MiM un dels objectius és la valoració de la resposta de la MI en relació amb l'activitat de la MII en un escenari clínic més pràctic. Es van estudiar els canvis de 2 subgrups de pacients dins de la cohort estudiada en 2 temps:

- Subgrup Retirada Biològic (RB): Pacient en remissió profunda (RP) (endoscòpica, analítica i clínica) per més de 6 mesos. Mostra previ a retirar el tractament biològic (T0) i posteriorment cada 3 mesos. Aquesta estudi va valorar els canvis en la MI dels pacients en (RP), i l'existència d'un canvi del patró microbiològic associat a la remissió. N= 8.
- Subgrup Inici Biològic (IB): Pacients amb MII activa, naïf a un tractament biològic que presenten un brot lleu/moderat que requereix iniciar tractament amb fàrmac biològic. Mostra en T0 i als 3 mesos (T1) valorant la resposta. Aquest grup va analitzar l'efecte del control del grau d'activitat sobre els canvis en la MI. Es van incloure pacients que si havien rebut PDN, dosi màxima 10 mg N= 19.

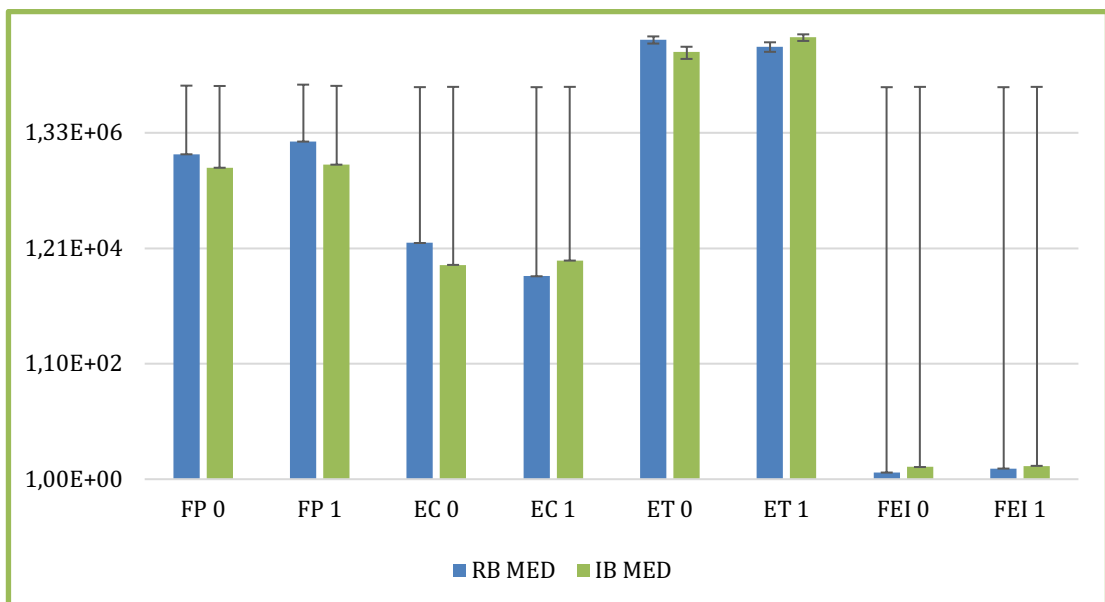
Els pacients que se'ls retira el tractament biològic (RB) són pacients que estan en remissió clínica perllongada i teòricament la seva MI, en termes de FP i EC, hauria de ser propera a valors dels CS, situació similar a la RP. Set pacients van mantenir paràmetres de remissió en T1.

El grup IB, són pacients que a T0 presenten un brot amb símptomes de la MII (el contrari que el grup RB) i per tant la MI pot presentar una aproximació de canvis que s'associen a l'activitat intensa de la MII; i si hi ha resposta clínica, es va valorar si la MI va recuperar valors propers a l'estat basal dels CS. En les mostres del grup IB en T1, 13 pacients van respondre i 6 pacients no van respondre al tractament.

No s'ha calculat la diferència en T1 en funció de la resposta al fàrmac, a causa d'un nombre de pacient reduït i pèrdua de poder estadístic.



**Figura 4.19A:** Descripció dels paràmetres analítics del grup Inici Biològic (IB) i Retirada Biològic (RB) entre els 2 punts temporals (T0 i T1). Eix vertical en escala logarítmica per optimitzar la representació gràfica. Barres verticals indiquen DE. Mediane expressades en unitats de referència. Eina estadística Test de Wilcoxon per a valors no paramètrics. El valor \* ( $p < 0,03$ ) valora diferències significatives entre la mostra T0 i la mostra T1 per la CP del subgrup IB. Resta de valors no significatius.



**Figura 4.19B:** Descripció comportament dels marcadors microbiològics del grup Inici Biològic (IB) i Retirada Biològic (RB) entre els 2 punts temporals. Eix vertical escala logarítmica. Barres verticals: DE. Mediane expressades en còpies/gram. Eina estadística Test de Wilcoxon per mediane no paramètriques. No s'observen diferències significatives.

S'ha observat una disminució significativa pel valor de la CP amb els valors del subgrup IB entre el punt temporal T0 (*Naïf* biològic, activitat clínica) i T1 (inici tractament biològic). S'ha evidenciat que els resultats dels marcadors analítics d'activitat, mostraven medianes de CP més elevades en el grup IB comparat amb el grup RB. Els valors de PCR van mostrar medianes més altes en T1 que T0, no significatives. En relació les dades del grup RB, les medianes de la PCR i la CP van resultar baixes des del punt de vista clínic. La resta de indicadors analítics no van mostrar diferències significatives.

En relació als resultats dels bacteris descrits en la figura anterior, van mostrar que l'abundància relativa de FP i ET del subgrup RB van ser superiors respecte del grup IB però no significativament. L'abundància d'EC es van mantenir sense canvis.

Utilitzant l'índex FEI es mostra com aquest va augmentar en T1, en els 2 grups; i en el grup IB mostra valors superiors respecte del RB de forma no significativa en cap dels dos grups.

## 5-. Discussió

L'estudi està dirigit a valorar si la determinació de la microbiota intestinal (MI) és útil per discriminar entre la MII i els CS, i monitorar l'activitat de la Malaltia Inflamatòria Intestinal (MII) en la pràctica clínica habitual a través de mostres fecals i comparar-ho amb els marcadors clínics habituals i els controls sans (CS). Els marcadors microbiològics, els quals s'ha focalitzat l'estudi de la valoració dels canvis en l'ecosistema intestinal de la MII, són *Faecalibacterium prausnitzii* (FP), *Escherichia coli* (EC) i Eubacteris totals (ET), que s'han escollit basant-nos en estudis previs del nostre grup (Martinez-Medina *et al.*, 2014; Lopez-Siles, Tesi 2015); a partir dels quals s'ha calculat un índex entre FP i EC anomenat índex FEI que facilita la interpretació i el càlcul dels canvis en al MI.

Els pacients inclosos han format part d'una cohort que prové d'una col·lecció de pacients amb MII, recollits prospectivament. Per tal de tenir un enfocament més proper a la pràctica clínica amb molts pacients heterogenis, s'han inclòs pacients en diferents situacions clíniques (activitat i remissió clínica, definida per CP>250) i diferents tractaments (retirada i inici del fàrmac biològic).

Per homogeneïtzar resultats, s'han exclòs els pacients amb malaltia severa. Aquest grup de pacients presenten un ecosistema de la MI molt alterat i particular, que és molt divergent respecte dels CS i, tal com s'ha descrit en diversos estudis, és diferent respecte de la malaltia moderada a lleu i dels pacients que responen a CE (Michail *et al.* 2012; Schirmer *et al.* 2019; Kedia *et al.* 2020). Actualment manquen estudis que facin una descripció de la MI associada a la CU greu o refractària.

Tal com s'ha dissenyat l'estudi de la present tesi, els pacients amb malaltia severa (definida per HBI>16, SCCAI>9 o la valoració del clínica del pacient pel metge responsable) s'ha considerat que poden representar un possible biaix dels resultats i per tant no s'han inclòs en l'estudi (Michail *et al.* 2012; Kedia *et al.* 2020). Els criteris d'inclusió/exclusió dels pacients es poden valorar en l'apartat de MiM.

S'han inclòs 80 pacients amb MII (MC i CU) i 8 CS; i d'aquests, 35 pacients amb CU i 45 amb MC distribuïts com es pot copsar en la taula 4.18. La distribució dels grups ha estat diferents de forma significativa.



## 5.1 Característiques demogràfiques globals dels pacients.

Tal com s'ha descrit en la taula 4.19 de l'apartat resultats, l'edat de la mitjana dels pacients inclosos en la cohort MII a estudi, ha estat de 47,21 anys per MII global i per MC i CU (44,71 i 50,43 anys respectivament) en T0. Com demostren sèries epidemiològiques de la MII, aquesta es sol diagnosticar a una edat jove (aproximadament 80% abans dels 40 anys) amb un pic bimodal (Freeman *et al.* 2014; Mañosa *et al.* 2015). Malgrat això, a partir de dades recents sembla que el pic d'incidència en majors de 60 anys (edat avançada) està augmentant en els darrers anys degut a l'allargament de l'esperança de vida i la millora de les tècniques diagnòstiques. No s'ha estratificat l'anàlisi per edat degut al nombre baix de pacients majors de 60 anys.

En analitzar l'edat al diagnòstic (36,43 anys per a la MII global), on l'edat de la MC ha estat inferior respecte a la CU (32,78 anys vs 41,11 anys respectivament) de forma significativa ( $p=0.014$ ); així com que el temps d'evolució (14,19 anys i 9,56 anys respectivament). Aquesta troballa es podria interpretar que la MC es diagnostica en edat més jove que la CU però dades de sèries recents d'adults i pediàtriques (Olén *et al.* 2014; Nóbrega *et al.*, 2018) indiquen que la MC és més difícil de diagnosticar sobretot si té afectació exclusiva a l'intestí prim o al tracte digestiu alt, amb un retard diagnòstic notable respecte de la CU. Els resultats en la present tesi, simplement són un biaix propi de la nostra cohort a estudi.

No hi ha evidències que indiquin una major incidència o prevalença de la MII segons el sexe (Jones *et al.* 2019), i en la nostra cohort hi havia major prevalença de sexe femení no significativa (MII global 57,5% ( $p=0,067$ ) i per a la MC 64,4% i la CU 48,6%).

Degut a les característiques de gestió del sistema sanitari català (*pe.*, àrea d'influència poblacional) i a la pròpia idiosincràsia dels hospitals participants a l'estudi (HJT i CHV), hi ha hagut una major inclusió de pacients de l'HJT.

En la nostra cohort s'ha descrit un 15% de fumadors actius (10% MC i 5% CU), la majoria no fumadors (53,8%). La prevalença de tabaquisme actual a escala mundial s'estima al voltant del 17,8% (Casetta *et al.* 2017). Les taxes de prevalença de tabaquisme de la nostra cohort són similars a les taxes a escala mundial. El tabaquisme té un diferent comportament entre MC i CU (Gajendran *et al.* 2018).

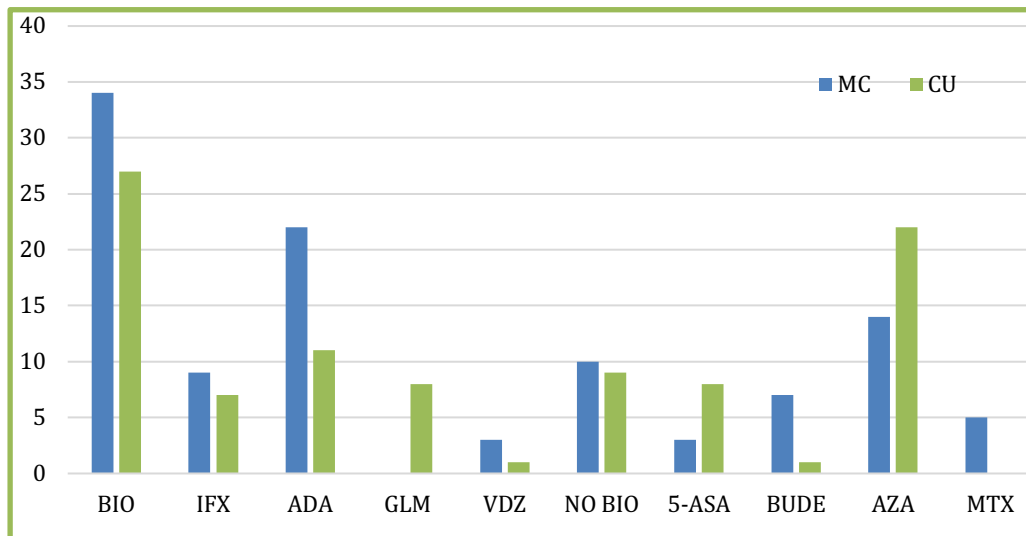
L'IMC mitjà de la cohort ha estat dins el rang de normalitat, malgrat que la mitjana ha estat lleugerament inferior, no significativament, en la MC en front la CU. Aquest fet podria explicar-se per què la MC extensa ileal, s'associa a malnutrició (Ananthakrishnan *et al.* 2018), i és FdR per mala evolució de la malaltia (Torres *et al.* 2017; Mentella *et al.* 2019) (veure introducció). La mida reduïda de la mostra (45 pacients amb MC) no permet treure conclusions.

Únicament un 16.3% dels pacients han tingut antecedents de cirurgia menor ambulatoria. No s'han inclòs pacients amb IQ de resecció intestinal perquè quan l'anatomia del tub intestinal es veu compromesa, la MI s'altera per múltiples factors com ara ús d'antibiòtics, alteració de la motilitat digestiva, alteració barrera anatòmica, alteració estructural. Darrerament s'han descrit casos de desenvolupament d'una MII després d'una cirurgia bariàtrica (Cañete *et al.* 2018). No s'ha d'oblidar que s'ha descrit l'apendicectomia com un possible FdR per MC i dubtosament protector per la CU (Piovani *et al.* 2019). Per tant l'estudi de la MI en pacients post resecció intestinal ha de ser individualitzada i calen més estudis al respecte per a treure'n conclusions (Lopez-Siles *et al.* 2014; Guyton *et al.* 2017).

#### 5.1.1 Característiques clíniques dels pacients en relació a la malaltia.

La distribució de l'ús dels fàrmacs biològics en la nostra cohort ha estat consistent amb la descrita la literatura mèdica (Yu H *et al.* 2018). Analitzant les dades de la taula 4.19, s'ha observat que la majoria dels pacients (N= 61; 76,25%) estan en tractament (TTM) amb biològics en T0 ( $p=0,008$ ). Vuit pacients (10,3%) en tractament biològic estaven en remissió profunda (RP) i 19 pacients sense tractament biològic eren naïf. La figura 5.20 ha descrit el resum de tractaments desglossat per malaltia.

En un estudi recent (Yu H *et al.* 2018) d'una cohort dels EUA va descriure un ús global de fàrmacs biològics en la MC i la CU de 43.8% i 16.2% respectivament. Els fàrmacs antiTNF (IFX i ADA) són els més utilitzats sobretot amb l'aparició dels seus respectius biosimilars. En la pràctica clínica l'ús de biològics ha augmentat els darrers anys de forma significativa en els països desenvolupats, malgrat encara hi ha de forma global més pacients sense tractament biològic (Doherty *et al.* 2018; Yu H *et al.* 2018).



**Figura 5.20:** Resum de la distribució dels fàrmacs desglossat per malaltia en T0. Freqüències en nombres absoluts.

Pel que fa a l'ús d'IMM únicament s'han inclòs si aquests anaven en tractament combinat amb un fàrmac biològic. Els estudis clàssics (Roblin *et al.* 2017) han demostrat que l'associació d'IFX i AZA assolia taxes més altes de control de l'activitat de la MII comparat amb IFX en monoteràpia i en reduïa la formació d'Ac. Anti TNF. S'han inclòs pacients en tractament amb IMM (AZA o MTX) per tal d'obtenir una cohort de pacients més propera a la pràctica clínica real, però no s'han analitzat els resultats comparant els tractaments perquè el present estudi no té com a objectiu valorar la MI associada als IMM. La baixa utilització del MTX en la nostra cohort reflecteix l'ús minoritari del MTX en la pràctica clínica, 7% globalment (Mantzari *et al.* 2017). A causa que no s'utilitza el MTX en la CU, s'observen diferències significatives ( $p=0,002$ ) entre l'ús de MTX i AZA.

La classificació de Montreal de la MC respecte a l'edat de debut ha mostrat percentatges similars als que hi ha en les sèries publicades, on el grup A2 és el grup més freqüent (Freeman *et al.* 2014). Pel que fa a localització, la major part dels pacients mostren afectació còlica (20%) o ileocòlica (43%) i aproximadament una tercera part és ileal distal pura (37%). Aquestes proporcions han estat similars a les descrites en estudis poblacionals (Satsangi *et al.* 2006). En la present tesi per tal d'analitzar la MI, proposem que el factor més important per la variabilitat d'expressió de la MI és el grau d'activitat de la MII i no pas la localització, malgrat que un estudi recent (Lopez-Siles *et al.* 2018) mostra que els filotips (I i II) de FP

s'associaven a una localització i edat de debut diferent en la MC. En la present tesi no s'han quantificat els filotips de FP i per tant pot ser un estudi complementari a realitzar en un futur.

L'extensió de la CU i la gravetat han mostrat percentatges de distribució relatius similars als de les sèries publicades on únicament un 17.1% dels pacients (6/35) presentaven proctitis (Ungaro *et al.* 2017). El fet d'incloure pacients amb proctitis llarga (més de 5cm d'extensió distal) pot induir a pensar que si només hi ha afectació distal en forma de proctitis, les mostres fecals utilitzades per analitzar la MI poden ser poc representatives del grau d'alteració de la MI. En un estudi de pacients pediàtrics amb CU (proctitis i colitis extensa) es van comparar mostres de biòpsies rectals amb mostres fecals de pacients, i s'obté que la proporció de bacteris analitzats és totalment comparable entre els 2 tipus de mostres (rectal i fecal), fet que recolza l'ús de mostres fecals en la present tesi (Schirmer *et al.* 2018).

## 5.2 Dades paràmetres analítics globals.

Tal com s'explica en la introducció i en l'apartat MiM els marcadors analítics que s'han analitzat en el present estudi per valorar l'estat i activitat de la MII són la Proteïna C Reactiva (PCR), la Calprotectina fecal (CP), l'Albúmina (Alb) i l'Hemoglobina (Hb); que són els paràmetres que s'han comparat amb els microbiològics. La descripció de l'evolució de les mitjanes en relació amb el temps es poden observar en la taula 4.24 S'han descrit els resultats en l'apartat 4.2 desglossats per tipus de MC /CU, i en funció de la classificació en Activitat/Remissió en T0, en la figura 4.9 i taula 4.18.

-PCR: Els valors mitjans de la PCR disminueixen progressivament de forma significativa ( $p < 0,001$ ) i respecte al temps de mostreig (T0-T1 i T1-T2,  $p < 0,001$  i  $p = 0,011$  respectivament).

-CP: Les mitjanes decreixen al llarg dels 3 temps significativament ( $p = 0,045$ ).

-Alb i Hb: Els valors mitjans estan dins el rang de la normalitat i no mostren diferències significatives (Alb  $p = 0,28$  i Hb  $p = 0,058$ ).

La disminució progressiva significativa de la PCR en el temps, ha indicat que els pacients milloren clínicament de forma global (valors mitjans inferiors a 5 mg/dL).

La PCR és un bon indicador d'activitat en la MII, i en la pràctica clínica els valors alts s'associen a major activitat de la MII; i per tant els nostres resultats són totalment plausibles amb el descrit en estudis previs (Chang *et al.* 2015; Menees *et al.* 2015; Mosli *et al.* 2015).

La disminució significativa global dels valors de la CP i el fet que les mitjanes han estat inferiors a 250 (PT utilitzat en la present tesi) ha indicat una tendència a la remissió global dels pacients en concordança amb les troballes descrites en la PCR. Aquestes troballes han estat plausibles amb el descrit en la literatura (Mosli *et al.* 2015; Heida *et al.* 2017; Rokkas *et al.* 2018), que descriuen que valors alts de CP s'associen a l'activitat clínica i endoscòpica (mucosa) i valors baixos a la remissió.

L'Alb té una baixa utilitat discutida com a indicador en la MII i es sol relacionar amb estat nutricional. S'ha interpretat que els canvis en l'activitat de la MII no es tradueixin en canvis significatius en els valors d'Alb perquè és indicador d'activitat dèbil. Aquestes troballes són concordants amb la literatura (Xu *et al.* 2019).

Els pacients amb MII activa solen presentar anèmia de causa multifactorial i per tant valors baixos d'Hb (anèmia) s'associa a malaltia activa però quan s'han analitzat les dades de la present tesi, no s'han detectat canvis significatius en l'Hb.

Un estudi recent de pacients amb debut de MII, va correlacionar marcadors serològics amb l'activitat de la MII, va mostrar que els valors de la PCR per classificar en activitat o remissió; són més útils en la MC que en la CU (MC  $p < 0,001$ ; i CU  $p = 0,043$ ). Respecte la Hb, el mateix estudi mostra va ser un bon indicador per classificar malaltia activa respecte d'inactiva en la MC ( $p = 0,047$ ) i no en la CU ( $p = 0,416$ ) (Xu *et al.* 2019). Les dades de la present tesi en relació a la PCR són plausibles amb el descrit en l'estudi anterior de Xu *et al.*; però no amb les dades que s'han obtingut de la Hb.

### **5.3 Anàlisi de la utilitat dels índex d'activitat clínics i endoscòpics.**

Un dels objectius de la present tesi és valorar la correlació dels índexs microbiològics amb els d'activitat. Per tal de valorar la utilitat dels paràmetres microbiològics en relació a la capacitat per monitorar la MII, s'han comparat amb els índexs d'activitat clínica i endoscòpica utilitzats habitualment en l'avaluació de

la MII. S'han recollit les dades d'índexs endoscòpics (SES-CD per la MC i índex Mayo endoscòpic per la CU) i clínics (HBI per MC i SCCAI per CU)

Definir activitat i remissió en la MII és important per tal descriure els pacients d'una forma homogènia però la definició és complexa degut a múltiples factors. Sembla que és fàcil identificar pacients molt greus o en remissió, sent el gruix de pacients que es situen en la zona intermèdia els que presenten major dificultat per la classificació. És per aquest motiu que actualment existeixen nombrosos índexs d'activitat de la MII, alguns fins i tot equivalents entre ells. En la literatura no hi ha consens sobre la definició estàndard de severitat de la malaltia en els índexs més utilitzats i està ben establert que hi ha una discordança entre símptomes clínics i activitat inflamatòria (Peyrin-Biroulet *et al.* 2016). La majoria d'índexs clínics d'activitat no es correlacionen bé per tal de predir la remissió endoscòpica (Falvey *et al.* 2015). Els índexs endoscòpics es correlacionen millor que els clínics amb l'activitat de la MII però resulten insuficients per si mateixos.

Per definir activitat, s'ha optat per utilitzar el valor de CP>250 µg/g per tal de comparar-ho amb els índexs d'activitat clínica i endoscòpica ja que és un paràmetre objectiu, reproduïble i fàcil d'analitzar (Manceau *et al.* 2017). Diferents estudis han utilitzat aquest PT per definir activitat, sol o bé combinat amb altres paràmetres com la PCR. Segons les dades d'una metanàlisi recent (Rokkas *et al.* 2018), la CP es correlaciona amb l'activitat endoscòpica en la MII (per la CU S 87,3% i E 77,1% AUC 0,91; i per la MC S 82,4% i E 72,1%; AUC 0,84). La definició d'activitat de la malaltia a través de biomarcadors, és un punt calent en la literatura mèdica on no hi ha establert un consens estandaritzat (Siegel *et al.* 2018).

La curació mucosa (CM) s'ha postulat com un dels objectius per assolir la remissió profunda (RP) i predir el risc de recaiguda (Ardizzone *et al.* 2011; Cholapranee *et al.* 2017) però requereix endoscòpia i histologia. En relació la darrera, en el moment actual hi ha una certa discussió sobre els seu significat, sobretot si s'hi inclou la curació histològica (Iacucci *et al.* 2016). Per aquest motiu no s'ha inclòs la CM com a objectiu per se en la present tesi, sinó la resposta clínica.

- HBI (N= 38 per T0 i T1; N=31 per T2): L'anàlisi estadística ha mostrat que no hi ha diferències (p=0,79) entre els valors de HBI per classificar activitat i remissió. En una revisió (Falvey *et al.* 2015) s'ha descrit que l'índex HBI no té

capacitat per se per distingir de MC activa a inactiva, troballa similar a la que s'ha detectat en la present tesi.

- SCCAI: S'ha decidit utilitzar el valor  $\leq 2$  per definir remissió per preparar l'anàlisi estadística. Probablement la mostra reduïda de pacients amb CU expliqui que no s'han detectat diferències significatives entre els 3 temps per classificar pacients en activitat i remissió en la nostra cohort, malgrat que probablement el SCCAI és més fàcil de calcular i treballar que el HBI (Irani *et al.* 2018; Mohammed *et al.* 2018;).
- SES-CD: Per analitzar la capacitat per discriminar activitat i remissió s'ha considerat remissió quan l'índex puntuava  $\leq 2$ . No s'han descrit diferències significatives en els valors en els 3 temps ( $p= 0,935$ ) per classificar pacients en activitat o remissió. Això es pot interpretar en què probablement no tenim suficient potència estadística per trobar diferències donada la mida mostral reduïda. (N=45).
- Índex de Mayo endoscòpic: El sub-score endoscòpic de Mayo considera remissió si la puntuació és 0 i és equivalent al SES-CD de la MC. No s'han detectat diferències entre els valors classificats com activitat o remissió en els 3 temps utilitzant aquest índex ( $p=0,116$ ), probablement degut a la falta de potència estadística per detectar diferències significatives per la mida mostral reduïda. Tal com s'ha descrit en la figura 4.13, hi ha un nombre elevat no significatiu de pacients amb afectació endoscòpica greu en contrast amb les dades del SCCAI (CU), o bé del SES-CD (MC); els quals s'han classificat la majoria de pacients en remissió. Estudis recents mostren que els índexs endoscòpics en la CU es correlacionen amb l'activitat i l'afectació histologia de la malaltia ( $r=0,92$ , 95% IC,  $p < 0,001$ ) (Irani *et al.* 2017), o bé altres índexs com el UCEIS es correlacionen amb la CP i el TSOF ( $r=0,68$  ( $p < 0,001$ ) i  $r=0,64$  ( $p < 0,001$ ) respectivament) (Ryu *et al.* 2019)
- IBD-Q: L'activitat cínica de la malaltia és un marcador important de discapacitat i baixa QdV (Bansal *et al.* 2015). En la literatura es descriuen valors de IBD-Q més baixos en la MC respecte de la CU, indicant que la MC pot ser un FdR de baixa QdV per si mateix (Marinelli *et al.* 2019). Les dades de la taula 4.21A i 4.21B, han evidenciat diferències significatives ( $p < 0,0012$ ) entre els pacients

classificats en activitat i remissió, tant per CU com per MC, on s'ha observat que els grups d'activitat mostren valors més baixos de IBD-Q indicant que l'activitat de la MII disminueix la QdV dels pacients. Aquesta troballa és plausible en el descrit en la literatura mèdica actual on l'ús del IBD-Q està àmpliament establert i té bona correlació amb el CDAI (Gower-Rousseau *et al.* 2107; Marinelli *et al.* 2019).

En resum, l'anàlisi de la utilitat dels marcadors clínics per classificar entre l'activitat i la remissió han mostrat resultats heterogenis no significatius, sobretot si es compara amb la classificació en T0 utilitzant la CP>250. Les diferències en la classificació de la QdV utilitzant l'IBD-Q han indicat que la qualitat de vida es pot relacionar amb l'activitat de la malaltia en la nostra cohort.

#### 5.4 Anàlisi dades microbiològiques

En aquest punt s'ha analitzat el comportament dels 3 grups de microbiològics estudiats (FP, EC i ET) al llarg del temps en la cohort d'estudi.

##### 5.4.1- Anàlisi de les dades microbiològiques globals.

Tal com es descriu en el taula 4.22 no s'han detectat diferències significatives en les mitjanes de FP, EC, ET i FEI ( $p=0,214$ ) en els 3 temps pel conjunt global de la MII. S'ha advertit que l'abundància relativa poblacional de FP (ordre  $10^8$ ) ha estat superior a EC ( $10^5$ ) i inferior a ET ( $10^{11}$ ). La major abundància relativa de FP respecte a l'EC, és compatible amb la distribució dels ecosistemes intestinals que descrita en estudis previs del nostre grup (Martínez-Medina *et al.* 2007,2009; Lopez-Siles, Tesi 2015).

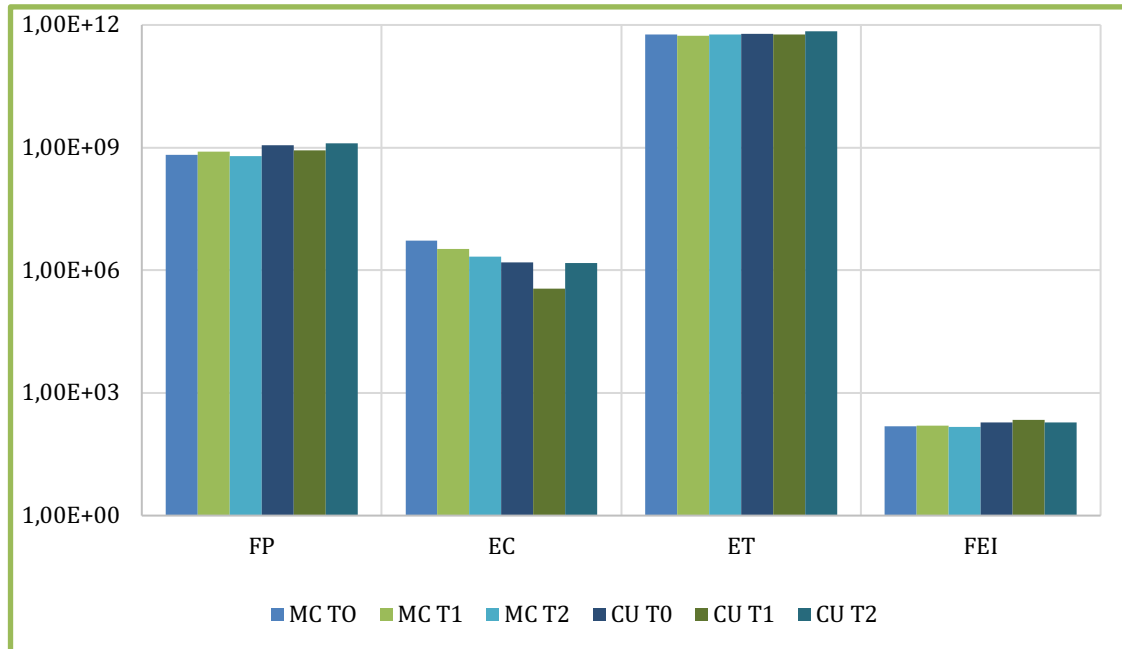
L'índex FEI per a totes les malalties s'ha mantingut en proporcions similars en tots els temps sense diferències significatives ( $p= 0,107$ ), ja que depenen dels valors de FP i EC i aquests no han presentat diferències significatives.

##### 5.4.2-. Descripció de l'evolució de les mitjanes microbiològiques desglossat per malaltia (MC/CU) a cada temps.

En la figura següent s'han mostrat els resultats de la població bacteriana desglossat per malaltia (MC/CU) i els seus valors en els 3 punts temporals.



S'ha descrit que els valors de FP són inferiors de forma significativa ( $p=0,0013$ ), en la MC respecte dels de la CU evidenciant una abundància relativa poblacional superior de FP en la CU, per tant el tipus de malaltia influeix en els nivells mitjans de FP.



**Figura 5.21:** Evolució esquemàtica de les mitjanes dels microorganismes desglossats per malaltia i per temps. Valors absoluts expressats en mitjana logarítmica ( $\text{Log}_{10}$ ).

No obstant, les mitjanes dels diferents grups microbians s'ha pogut interpretar "microbiològicament", és a dir en relació les dades presents en la literatura, la situació clínica del pacient, i l'evidència present en estudis previs del nostre grup (Lopez-Siles, tesi 2015). Per exemple, s'ha descrit que l'abundància relativa de FP es redueix en diferents malalties intestinals, sobretot en la MII activa on n'és troballa característica (Sokol *et al.* 2009; Lopez-Siles, tesi 2015). S'ha proposat el FP com un bacteri amb un potencial efecte "protector" en l'ecosistema intestinal (Zhou *et al.* 2018; Leylabadlo *et al.* 2020). L'efecte beneficiós del FP s'ha associat al fet que és un dels principals productors de butirat que es detecta al llarg del TGI i l'associació a la millora de l'estat de salut digestiva pels efectes propis antiinflamatoris del butirat (Duncan *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2020). El butirat té un rol important en el manteniment de la fisiologia intestinal i té efecte antiinflamatori en front el CCR i la MII (Lopez-Siles *et al.*, 2017; Pittayanon *et al.*, 2020). En aquest sentit s'ha interpretat que els pacients amb MC en tenir disminuïda l'abundància

relativa de FP es relaciona amb un estat d'inflamació més actiu respecte de la CU (Marchesi *et al.*, 2016; Nishida *et al.*, 2018). En una metanàlisi recent (Pittayanon *et al.*, 2020) va concloure que una troballa freqüent, en un nombre important d'estudis, va ser una reducció de FP comparat amb els CS en la MC activa. Aquesta troballa indica que el FP és un bacteri altament representatiu de disbiosi en la MI. No s'ha fet una anàlisi dels filotips de FP (filotip I i filotip II), tal com s'ha descrit en resultats d'estudis previs del nostre grup, amb la voluntat de fer un estudi complementari dels resultats de la present tesi en un futur, més orientat en la pràctica clínica.

L'abundància relativa d'EC ha estat significativament superior ( $p=0,003$ ) en la MC respecte de la CU en la nostra cohort. No s'han detectat diferències entre els 3 punts temporals. Les dades d'EC són molt interessants, ja que són plausibles amb les troballes descrites en estudis previs (Miquel *et al.*, 2013; Lopez-Siles, tesi 2015; Siniagina *et al.*, 2019; Pittayanon *et al.*, 2020).

En una metanàlisi recent (Pittayanon *et al.*, 2020) va descriure una major abundància d'EC en la MC i la CU, sobretot activa, degut a l'alteració del ecosistema intestinal per diversos factors: reducció dels bacteris anaeròbics estrictes, la inflamació de la mucosa i un augment de la motilitat gastrointestinal que facilita l'expansió de bactèries facultatives com EC. En aquests mateix estudi es va mostrar que alguns articles, descriuen una major quantitat d'EC en la MC respecte de la CU però es va tractar d'una troballa inconsistent. Es va descriure també una associació entre l'augment de l'abundància relativa d'EC i brots de la MII (Camprubí-Font *et al.*, 2019; Pittayanon *et al.*, 2020).

Determinades soques d'EC associades a la MII (AIEC per exemple) poden actuar en l'etiopatogènia de la malaltia com a promotor persistent dels processos inflamatoris intestinals (Camprubí-Font *et al.*, 2019). El possible paper d'algunes soques d'EC en el manteniment de l'homeòstasi de la MI s'explica perquè té capacitat de reducció dels nitrats no fermentables a fermentables (nitrat reductasa i òxid nítric reductasa) que és un benefici nutricional que només disposen determinats bacteris. En la MII activa, durant la resposta inflamatòria, es produeixen alts nivells de nitrats no fermentables que són el substrat generador del sobrecreixement de les EC comensals, alterant la disbiosi (Mirsepasi-Lauridsen

*et al.*, 2019). Per aquest motiu s'explica que es redueix la diversitat bacteriana intestinal i augmenta el sobrecreixement de bacteris potencialment perjudicials alterant el balanç simbiòtic habitual (Mirsepasi-Lauridsen *et al.*, 2019).

Tots els valors del FEI han mostrat diferències significatives en els 3 temps. Com hem dit, per tal de trobar un biomarcador que representi el comportament de la comunitat bacteriana s'ha postulat el FEI, que relaciona 2 dels bacteris més representatius del ecosistema de la MI (Lopez-Siles, tesi 2015). Les mitjanes del FEI han mostrat diferències significatives ( $p < 0,001$ ) entre els 2 tipus de malaltia. No s'han detectat diferències significatives entre les mitjanes del 3 punts temporals indicant que les mitjanes són similars i indiquen certa estabilitat de la població bacteriana. Aquestes troballes han estat importants, doncs demostren que el grau d'alteració de l'ecosistema de la MI és diferent entre les 2 malalties i depèn del tipus de malaltia, i es pot discriminar entre els 2 tipus de MII mitjançant el càlcul del FEI. Un estudi recent (Amoedo, tesi 2020) va mostrar que els valors del FEI van variar entre diferents entitats digestives com el SII, la MII o el CCR respecte dels CS. En relació amb els objectius de la tesi, aquest és el primer pas per estudiar la capacitat del FEI com a biomarcadors. En els següents apartats s'analitzarà en detall la seva utilitat.

Els valors d'ET han estat discretament superiors en la CU respecte de la MC de forma no significativa ( $p = 0,284$ ). Els ET representen de forma indirecta la càrrega bacteriana total (més quantitat de bacteris en nombres absoluts i per gram) però no la diversitat microbiana (Nishida *et al.*, 2018). En una metanàlisi recent (Pittayanon *et al.*, 2020) que va revisar 5 estudis, aquest no van mostrar diferències en la quantitat ET en la MII respecte dels CS. En el que si hi ha consens en la literatura és que la diversitat microbiana es perd en la MII activa (Halfvarson *et al.*, 2017).

Es va descriure (Franzoza *et al.*, 2019) una alteració "funcional" de la MI que consisteix que durant episodis d'activitat de la MII s'altera l'equilibri del ecosistema intestinal i posteriorment es recupera quan es disminueix l'activitat de la MII. Aquests canvis temporals (o funcionals) de la MI durant episodis de remissió i activitat poden servir per monitorar l'activitat de la MII. Per altra banda la MII

afecta segments del TGI amb major concentració bacteriana (Mirsepasi-Lauridsen *et al.*, 2019).

En analitzar les dades en conjunt de ET i FP i EC, i tenint en compte el rol de FP i EC descrit prèviament, s'ha pogut relacionar l'activitat de la malaltia amb els canvis en les abundàncies relatives. Tanmateix al treballar únicament amb 3 grups bacterians, tot i ser molts representatiu de la magnitud d'alteració de la MI, són insuficients per valorar el conjunt de la diversitat microbiana de forma aïllada (Marchesi *et al.*, 2016; Nishida *et al.*, 2018; Franzosa *et al.*, 2019).

En resum, existeix major abundància d'EC en la MC respecte de la CU. El FP mostra major abundància en la CU respecte de la MC (comportament invers), fet que es pot interpretar amb un grau menor d'inflamació per activitat de la pròpia MII. Els valors d'ET no varien significativament entre les 2 malalties. D'aquí se'n deriva que els valors FEI poden discriminar entre MC i CU en la nostra cohort i podria obrir la porta a l'ús per a discriminar la colitis indeterminada però caldria un estudi específic en un futur.

5.4.3.-Anàlisi de l'evolució dels valors analítics desglossats per malaltia i temps.

PCR:

Els valors de la PCR han mostrat diferències significatives en cada punt temporal i per al tipus malaltia ( $p=0.018$  tots dos valors). S'ha interpretat que els valors de PCR són diferents pel tipus de malaltia i per cada punt temporal. A més si es comparen les diferències entre T0-T1 i T0-T2 aquestes també han estat significatives. Tal com s'ha comentat en apartats anteriors, la PCR és un dels marcadors d'activitat més utilitzats en la pràctica clínica i en nombrosos estudis. Pel que fa a T2, els valors de PCR per les 2 malalties són més baixos indicant que al llarg del tres temps, hi va haver una millora de l'activitat de la malaltia mesurada a través de la PCR (Sollelis *et al.*, 2019).

Calprotectina (CP):

Els valors absoluts de les mitjanes de la CP han mostrat diferències significatives en relació amb el temps ( $p=0,037$ ) i el tipus de malaltia ( $p=0,04$ ). Aquestes dades han mostrat que els valors de la PCR es modifiquen com a conseqüència de l'activitat de la MII i per tant ha estat un biomarcador útil per valorar-ne l'activitat.

Com bé s'ha comentat prèviament la CP és un dels marcadors d'activitat de la malaltia més utilitzats juntament amb la PCR (Mumolo *et al.*, 2018). No hi ha consens clar en la literatura sobre quin marcador (PCR o CP) és millor per avaluar l'activitat de la malaltia, o bé si s'han d'utilitzar de forma combinada. Els valors de CP han estat més alts en la MC en tots els temps respecte de la CU indicant, que aplicant el criteri de la CP, la mostra de pacients amb MC tindrien una major activitat de la malaltia. Els valors de CP han disminuït progressivament en les dos malalties indicant una millora en l'activitat de la cohort. Aquestes troballes són similars al detectat prèviament amb els valors de la PCR i el descrit prèviament amb el comportament dels marcadors bacterians.

#### Albúmina:

Els valors d'Alb no han mostrat diferències significatives ni per tipus de malaltia ni per punt temporal. El valor de l'albúmina com a biomarcador d'activitat és molt limitat tal com s'ha comentat prèviament (Ghoneima *et al.*, 2019).

#### Hemoglobina (Hb):

Els valors d' Hb han mostrat diferències significatives en els 3 punts temporals ( $p=0,048$ ) però que no entre els tipus de malaltia. S'ha interpretat que la variabilitat de les mitjanes d'Hb en els 3 punts temporals s'ha vinculat a l'efecte de l'activitat inflamatòria de la malaltia i per tant l'Hb és un bon indicador d'activitat de la MII. Les mitjanes s'han afectat de la mateixa manera entre les 2 malalties ja que no han presentat diferències entre la MC i la CU per tant és un indicador d'activitat útil tant per CU com per MC. La presència d'anèmia de malalties cròniques o anèmia malabsortiva s'ha associat a MII activa (Murawska *et al.*, 2016).

En resum, les mitjanes de la PCR i la CP han mostrat que són útils com a biomarcadors d'activitat per al seguiment i per diferenciar entre les 2 entitas. Les mitjanes de l'Hb han variat en els 3 temps, indicant un possible rol com biomarcador d'activitat de forma global per les 2 malalties, i s'hauria de valorar la seva utilitat amb una mostra de pacients superior.

### **5.5 Anàlisi dels resultats de CS.**

Per estudiar la MI dels pacients amb MII s'han inclòs un grup de 8 CS per valorar com varien els resultats dels pacients amb MII de la present tesi respecte les

persones sanes (sense patologia digestiva) i com els resultats de la MI es desvien respecte dels CS.

En total s'han inclòs 8 CS, les característiques es poden trobar a les taules 4.25 i 25B comparada amb les mitjanes de la cohort MII. No hi han diferències significatives ( $p=0,101$ ) a causa de la  $n$  petita del grup CS. Degut a la naturalesa pròpia del grup CS (sans i sense patologia digestiva) únicament hem disposat de valors analítics d'Alb (4,51 g/dL) i Hb (14,53 g/dL) que han estat significativament més elevats ( $p=0,04$ ) respecte dels pacients amb MII. El fet de no tenir patologia digestiva en els CS justifica que els valors d'Alb i Hb siguin superiors respecte dels pacients amb MII.

Tal com s'ha descrit en la taula 4.22. Els CS han presentat valors de FP( $10^{11}$ ) superiors significativament en comparació als grups de pacients ( $10^8$ ), mostrant així el seu paper recuperador i protector en front a patologies intestinals (Zhou et al, 2018).

Els valors d'EC dels CS ( $10^6$ ) no han mostrat diferències significatives respecte dels pacients amb MII ( $10^6$ ). S'ha relacionat una major abundància relativa d'EC amb la MII (Palmela *et al.*, 2018; Camprubí-Font *et al.*, 2019; Mirsepasi-Lauridsen *et al.*, 2019; Pittayanon *et al.*, 2020), en canvi no s'han reproduït aquest resultat en la present tesi.

La càrrega d'ET en els CS ha estat de l'ordre de  $10^8$ , significativament més baixa que la resta de valors d'ET en pacients amb MII (ordre  $10^{11}$ ). Tal com s'ha descrit prèviament, els resultats d'una metanàlisi recent (Pittayanon *et al.*, 2020) no van trobar diferències entre els valors d'ET malgrat la inconsistència entre els diferents estudis.

Els valors de l'Índex FEI dels CS han estat de 2,36, significativament ( $p=0,049$ ) més elevats que els valors en la CU o la MC. El comportament del valor FEI que es va descriure en treballs previs del nostre grup (Lopez-Siles, Tesi 2015) van mostrar que els valors baixos s'associen a major disbiosi ja que la proporció de FP i EC és molt similar. Per tant, considerant les dades de l'índex FEI dels CS i que aquest mostra un comportament diferent entre la MC i la CU, podem concloure que el valor

del FEI es modifica amb els canvis en el medi intestinal i és un potencial bon biomarcador (Lopetuso *et al.*, 2018).

En resum, la MI dels CS presenta una major quantitat de FP, menor quantitat d'EC (per la majoria de casos) i una menor quantitat d'ET, respecte dels pacients amb MII. El valor FEI mitjà dels CS és de 2,36.

### **5.6 Anàlisi de les correlacions marcadors analítics i microbiològics.**

El càlcul de la correlació entre els paràmetres analítics de la MII (PCR, CP, Hb i Alb), d'activitat clínica (HBI i SCCAI) i endoscòpics (SES-CD i Índex Mayo) amb els paràmetres microbiològics (FP, EC, ET, i l'índex FEI) estudiats; ha permès saber el grau de dependència entre les diferents variables estudiades, i per tant si es poden utilitzar per a estudiar la MI. S'han analitzat els resultats desglossats per tipus de malaltia amb l'objectiu de correlacionar els valors entre les 2 entitats.

En la taula 4.26 i annex I es descriu el resum de les correlacions. A continuació es desglossen les correlacions significatives per a cada temps. Únicament es discuteixen les correlacions que no es repeteixen i són rellevants per el present estudi. En general tots els marcadors microbiològics s'han correlacionat amb un marcador d'activitat.

Els resultats presentats en aquesta tesi han mostrat una correlació positiva significativa entre la CP i PCR amb valors del coeficient de correlació similars entre els diferents temps i el tipus de malaltia; indicant que els 2 valors es van afectar de forma similar en la cohort. Aquesta correlació és important perquè aquests paràmetres són utilitzats majoritàriament en pràctica clínica per valorar l'activitat i han estat validats en múltiples estudis (Sandborn *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2015; Mosli *et al.*, 2015; Peyrin-Biroulet *et al.*, 2016; Tandon *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2019).

L'Hb ha mostrat correlació negativa moderada amb la CP i la PCR amb el coeficient de correlació similar entre els diferents temps i tipus de malaltia. S'ha interpretat que les condicions de la mostra han afectat les 2 variables de forma inversa. La correlació d'Hb amb la PCR i la CP suggereix un possible rol de l'Hb com a biomarcador d'activitat, més important del que s'havia descrit prèviament la literatura però potser insuficient per utilitzar-lo aïlladament (Chang *et al.*, 2015; Murawska *et al.*, 2016). Una revisió recent (Tandon *et al.*, 2019) no va detectar

correlació entre valors d'Hb i l'activitat de la MII; però si que va detectar correlació entre valors de CP i l'activitat en el mateix estudi. Un estudi (Ghoneima *et al.*, 2019) ha detectat resultats similars en relació a la Hb, però associats a complicacions sèptiques post cirurgia de la MC.

L'Índex HBI s'ha correlacionat moderadament amb CP i PCR indicant que capacitat com a marcador d'activitat, tal com es descriu en la literatura (Vermeire *etal*, 2010).

L'índex SESCD s'ha correlacionat amb el HBI i la CP amb valors de coeficient de correlació similars. Aquesta troballa ha suggerit que aquests paràmetres es poden utilitzar proporcionalment per valorar l'activitat de la MC tal com s'utilitzen habitualment en la pràctica clínica (Zittan *et al.*, 2017). Segons dades d'un altre estudi, la combinació de endoscòpia i la CP és un bon indicador d'activitat de la MC (Schoepfer *et al.*, 2010).

La correlació moderada entre l'Índex Mayo, SCCAI, la PCR i la CP amb valors del coeficient de correlació similar entre els diferents paràmetres, ha indicat que els 2 índexs (endoscòpic i clínic) són bons marcadors d'activitat en la CU perquè es modifiquen de forma similar per les condicions del medi i alhora es correlacionen amb 2 marcadors d'activitat. Aquestes dades coincideixen amb el descrit en la literatura prèviament (Walsh *et al.*, 2019).

L'índex endoscòpic de Mayo s'ha correlacionat positivament amb la PCR i el FEI; i negativament amb els valors d'EC, destacant que l'índex de Mayo ha estat l'únic biomarcador que ha mostrat correlació directa amb els marcadors microbiològics estudiats. Per tant, la quantificació d'EC o el FEI s'ha relacionat amb l'activitat endoscòpica en la CU. La correlació del FEI i els valors d'EC amb l'índex de Mayo han indicat que els marcadors microbiològics es poden utilitzar per valorar l'activitat endoscòpica de la CU i actualment és dels pocs índex microbiològics descrits en la literatura que s'han relacionat amb l'activitat endoscòpica, indicant la potencial aplicabilitat futura pel seguiment de la MII a través dels índex microbiològics en mostres fecals.

L'abundància relativa d'EC s'ha correlacionat negativament amb la PCR i Hb. Aquest valor de correlació ha indicat que en els canvis del medi intestinal, els nivells de la PCR han estat inversament proporcional als nivells d'EC. Els estudis



previs han suggerit que en la MC activa s'ha relacionat amb un augment de l'abundància relativa d'EC (Mirsepasi-Lauridsen *et al.*, 2019) i amb nivells elevats de PCR (Chang *et al.*, 2015), i per tant la correlació detectada en el nostre estudi no és plausible amb el comportament descrit prèviament en la literatura. Probablement caldria un estudi addicional amb una mida mostral superior i enfocat en analitzar el comportament específic d'EC i PCR en la MII. Respecte la correlació Hb i EC, en la malaltia activa és esperable que els valors d'Hb decreixin i els valors d'EC augmenten. Aquesta troballa és plausible amb el descrit en la literatura en relació la MII activa (Palmela *et al.*, 2018; Mirsepasi-Lauridsen *et al.*, 2019; Camprubí-Font *et al.*, 2019). Els canvis en l'abundància relativa d'EC poden ser un bon indicador d'activitat de la MII però probablement insuficient per utilitzar-lo aïlladament.

El FP ha mostrat correlació positiva amb la PCR i negativa amb la CP. En relació a la CP, les dades són plausibles amb els descrits en estudis previs (Lopes-Siles *et al.*, 2016,2017; Mumolo *et al.*, 2018) ja que els valors baixos de CP s'associen a la MII amb poca activitat i una major abundància de FP s'ha associat amb un efecte protector en l'hoste i per tant menys activitat de la MII. Per altra banda la correlació entre PCR i FP no s'ha relacionat amb les dades prèviament descrites en altres estudis, ja que l'elevació dels valors de la PCR s'han associat a un augment de l'activitat de la malaltia i l'augment de l'abundància relativa de FP es relaciona amb l'efecte contrari (Sokol *et al.*, 2009; Miquel *et al.*, 2014).

Entre EC i FP s'ha descrit una correlació negativa moderada en un punt temporal. S'ha interpretat que la modificació de les condicions del medi per l'activitat de la malaltia han afectat de manera inversa al FP i l'EC, indicant que desenvolupen rols diferents en la MI de la MC que és on s'ha detectat la correlació. Aquesta relació és el càlcul de la fórmula de l'índex FEI. Com s'ha descrit prèviament, una major abundància relativa d'EC s'associa a malaltia activa i disbiosi (Mirsepasi-Lauridsen *et al.* 2019). Tanmateix, el que no s'ha descrit en la literatura (Palmela *et al.*, 2018) i en les publicacions prèvies del nostre grup (Martínez-medina *et al.* 2014; Lopes-Siles tesi 2015,2018) es si una menor abundància relativa d'EC s'associa necessàriament a un estat menys alterat de la MI; i la disminució de l'abundància

de FP a major disbiosi. Aquesta troballa és important perquè dóna suport a un dels objectius de la tesi que la MI és modulada per efecte de l'activitat de la MII.

En analitzar el comportament d'ET com un biomarcador, sense tenir en compte que és un paràmetre molt inespecífic (quantitat total d'eubacteris), es pot plantejar a partir de les correlacions entre FP i ET que un augment de la població bacteriana (ET) pot tenir un efecte similar a l'augment de la abundància relativa del FP en termes d'homeòstasi intestinal. No obstant, les dades publicades (Pittayanon *et al.*, 2020), metanàlisi que recull 5 estudis on es quantifica els ET, que aquests no són concloents respecte els canvis en el medi induïts per l'activitat de la malaltia. Calen més estudis dirigits a estudiar el comportament d'ET en una població.

L'índex FEI ha mostrat correlació positiva amb la PCR, FP, ET, Hb i l'índex de Mayo i negativa amb l'EC. L'índex FEI s'ha correlacionat amb la PCR i l'Hb, paràmetres analítics d'activitat. La correlació amb la PCR ha indicat que la quantificació de l'índex FEI s'afecta per les condicions del medi igual que la PCR, indicant que pot tenir una utilitat similar a la PCR. L'índex FEI s'ha correlacionat amb EC i FP perquè el seu càlcul és la divisió dels 2 valors. L'Índex FEI en cada punt temporal i per a cada malaltia ha mostrat correlació amb almenys un marcador d'activitat (PCR, CP i/o Hb) indicant la seva utilitat per al seguiment de l'activitat de la MII.

En relació amb la MC, s'han descrit correlacions entre els marcadors microbiològics i d'activitat, però no de forma consistent entre cada marcador. L'Hb i la CP han mostrat bons nivells de correlació en tots els punts temporals en la MC.

En relació amb la CU, l'abundància d'EC s'ha correlacionat amb bastants paràmetres d'activitat de la CU, indicant que possiblement l'EC tingui un rol més important que el FP en la MI de la CU..

No obstant, la utilitat dels marcadors microbians i analítics es veu limitada perquè els paràmetres analítics no s'han correlacionat de forma constant amb els mateixos marcadors microbiològics degut a que cada punt temporal i cada malaltia són situacions diferents i és complicat detectar correlacions significatives amb la mostra reduïda de pacients de la nostra cohort. Aquest fet indica que s'ha de, o bé utilitzar una combinació de diferents marcadors en forma de plataforma/ algoritme; o bé quantificar més grups bacterians; o bé ampliar la mida mostral per

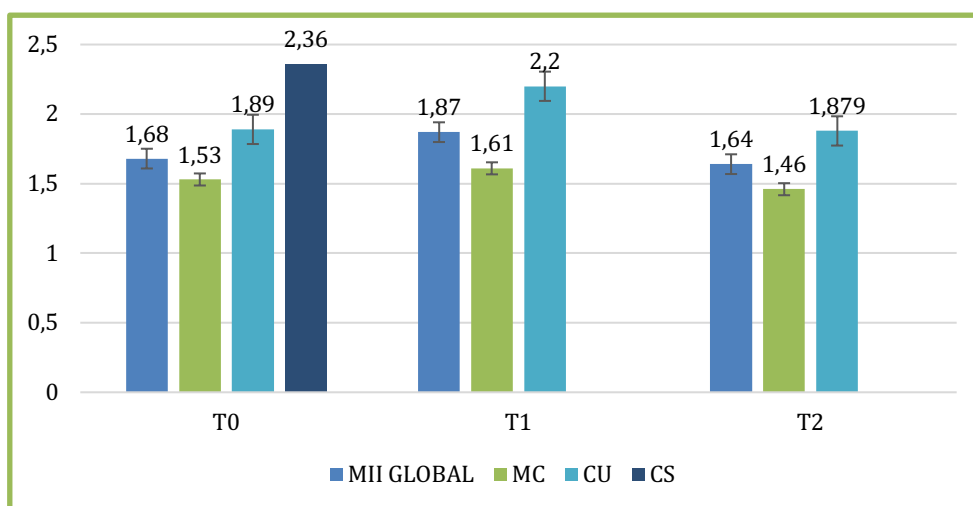
tal de detectar un nombre major i constant de correlacions entre marcadors microbiològics.

### 5.7 Determinació del FEI com a biomarcador d'activitat i remissió en T0

En l'estudi de la utilitat de l'índex FEI com a biomarcador per classificar entre els subtipus de MII i CS, i monitorar l'activitat de la MII s'ha determinat el punt de tall (PT) i l'AUC que permet classificar entre l'activitat i la remissió. Aquest punt de tall s'ha calculat en relació a la CP que ha estat el marcador que s'ha utilitzat per classificar l'activitat.

En la taula 4.27 es poden veure la relació dels diferents PT calculats. L'únic PT i AUC significativa ( $AUC > 0,5$ ) és per a la MII global en T0 (AUC de 0,658 (IC 0,537-0,779) i el PT 1,869 (S 0,44/E 0,82)). Donat que el PT s'ha calculat per MII global es pot extrapolar per utilitzar-lo en la CU i la MC.

Els valors inferiors al PT, propers a 1, s'han relacionat amb un augment de la disbiosi i per tant amb major activitat de la MII. Els valors superiors al PT s'han relacionat amb una millora de la disbiosi i la recuperació de l'estat basal de la MI i en termes dels resultats, una disminució de l'activitat de la malaltia.



**Figura 5.22:** Relació de valors mitjans índex FEI. Dades de mitjanes quocient FEI (sense unitats) per MII global, MC, CU i CS amb la DE corresponent en T0, T1 i T2.

Analitzant les dades de la figura següent, en aplicar el PT per MII global calculat prèviament en T0, s'ha observat que el FEI mitjà per MII global i MC s'ha situat per

sota el PT, indicant major disbiosi i per tant més activitat de la malaltia, que és la que provoca l'alteració de la MI, i pot servir per monitorar l'activitat de la MII. Les mitjanes del FEI per CU i CS en T0 s'han situat per sobre del PT, indicant menor disbiosi de la mostra. Per tant, en l'anàlisi de les mitjanes del FEI en T0 s'ha evidenciat que de forma basal existeix una major alteració de la MI en la MC respecte de la CU expressat a través de l'índex FEI.

En comparar els valor del FEI amb la PCR i la CP, que han mostrat prèviament diferències significatives entre els 2 tipus de malaltia i cada punt temporal, s'ha descrit un comportament similar al FEI a l'hora de descriure l'estat d'activitat de la cohort. S'ha descrit que els valors del FEI es modifiquen per tipus de malaltia i per punt temporal, ja que cada mostra s'ha recollit en un temps diferent, amb una situació clínica desiguals i per tant les mostres han representat variabilitat en la MI que s'expressa a través de l'índex FEI. La correlació amb l'índex endoscòpic de Mayo juntament amb les correlacions detectades en el punt anterior, ha mostrat que l'índex FEI és un bon indicador per monitorar els canvis de la MI induïts per l'activitat de la MII, un dels objectius de la tesi.

### **5.8.- Anàlisi de la comparació de les variables microbiològiques de cohort MII respecte dels CS en T0.**

En aquest punt s'han analitzat les variables microbiològiques (FP,EC,ET i l'índex FEI) de la cohort MII i s'han comparat amb els valors dels CS, amb l'objectiu de valorar com divergeix la MI en la MII respecte dels CS i la variabilitat de la MI en funció del tipus de MII i l'activitat, un dels objectius de la tesi. Es calculen els valors en T0 únicament. En la descripció dels resultats de les figures 4.15A, 4.15B i 4.15C, dels patrons de la MI (CS i MII (MC/CU)) s'han detectat diferències significatives entre FP, ET i FEI indicant que es tracta de 3 poblacions diferents entre elles. Aquesta troballa ha indicat que es pot diferenciar entre pacients amb MII i CS mitjançant únicament la relació de 2 grups bacterians.

Analitzant els resultats de la figura 4.15A s'ha interpretat que la MI associada a la MII global es caracteritza per menor abundància de FP i major quantitat d'ET respecte dels CS de forma significativa ( $p < 0,02$  en tots 2 casos). S'ha descrit una major abundància no significativa d'EC. En analitzar la figura 4.15B, es descriu que

els 2 perfils de la MI desglossat per malaltia (MC i CU) respecte dels CS, i s'ha mostrat una major abundància significativa ( $p=0,002$ ) de FP en la CU respecte de la MC (malgrat el mateix ordre  $10^8$ ). Aquesta troballa suggereix que pot existir una menor disbiosi en la CU de la nostra cohort, i s'ha relacionat amb l'anàlisi del punt anterior, aplicant el PT del FEI (1,869) sobre la mitjana del FEI en la CU en T0.

En la figura 4.15C, valors del FEI han estat superiors en el grup CS respecte del grup MII. El valor del FEI detectat dels CS està en remissió per tenir un FEI superior al PT. Les medianes dels valors de l'índex FEI han mostrat diferències significatives ( $p=0,049$ ), amb valors més baixos en la MII, on la MC ha presentat els valors més baixos respecte dels CS, indicant que la MII ha presentat una major disbiosi respecte dels CS, que és l'esperable des d'un punt de vista teòric. Aquesta disbiosi és causada per l'efecte de la MII sobre el medi intestinal. El FEI permet quantificar de forma senzilla la disbiosi segons els paràmetres descrits en la present tesi. Aquesta troballa mostra que el FEI ha evidenciat un comportament diferent entre la MII i els CS, és una eina útil per a monitorar la MII i diferenciar entre els CS.

En una metanàlisi recent, es va descriure una reducció significativa en l'abundància de FP en la MII, més marcada en la MC que la CU, comparat amb els CS (Pittayanon *et al.*, 2020). Donat l'efecte beneficiós d'una major abundància de FP en l'ecosistema intestinal, és lògic detectar valors més alts de FP en els CS respecte dels pacients amb MII. Aquests tenen major disbiosi per l'efecte de la malaltia sobre la MI. Aquesta troballa és plausible amb el descrit en la literatura perquè demostra que l'augment de l'abundància relativa de FP en una comunitat bacteriana s'associa a menor disbiosi i menys alteració de la MI, l'esperable en els CS sense patologia digestiva (Sokol *et al.*, 2009; Lopes-Siles *et al.*, 2015,2017; Franzonza *et al.*, 2019).

Desglossat per MII, els valors d'EC mostren una abundància relativa superior no significativa en la MC (mediana ordre  $10^5$ ), respecte de la CU i els CS (mediana ordre  $10^4$ ). Els valors de la mediana d'EC més baixos s'han descrit en el grup CS. L'augment de l'abundància relativa d'EC està descrit que s'associa a un augment de la disbiosi i l'activitat (Martínez-Medina *et al.*, 2014; Lopez-Siles, tesi 2015; Palmela *et al.*, 2018; Camprubí-Font *et al.*, 2019; Mirsepasi-Lauridsen *et al.*, 2019).

Respecte al grup ET, s'ha mostrat major quantitat significativa ( $p= 0,0001$ ) en la cohort de MII ( $10^{11}$ ) respecte dels CS ( $10^8$ ), indicant una major població bacteriana absoluta en el grup de pacients amb MII respecte dels CS. La quantitat d'ET és lleugerament superior en la MC respecte de la CU dins el mateix ordre  $10^{11}$  significativament ( $p= 0,0001$ ). La menor quantitat d'ET en els CS es pot justificar perquè en estat de salut i homeòstasi intestinal (sense patologia digestiva) tota la MI es troba sense estrès metabòlic i per tant la comunitat és relativament estable i constant. En canvi en la malaltia, la situació és de estrès ecològic, hi haurà doncs grups bacterians més abundants respecte dels CS per a compensar les mancances del medi (metabolisme, potencial redox, nutrients, etc.) i per això s'ha descrit una major abundància d'ET en els pacients amb MII. A més la biodiversitat d'espècies inferior en la disbiosi, és deguda a un augment de l'abundància de bacteris oportunistes (Manichan *et al.*, 2012) dada que no s'ha analitzat en la present tesi.

Les dades en relació amb el comportament de la quantitat d'ET són heterogènies en la literatura. En una metanàlisi recent (Pittayanon *et al.*, 2020), van mostrar dades inconsistentes en relació els estudis que van quantificar els ET. Es postula que aquesta la alteració de la diversitat d'espècies es relaciona amb els canvis entre els diferents enterotips/patotips d'EC (Nishida *et al.*, 2018; Palmela *et al.*, 2018).

En els CS la quantitat de ET ha estat inferior a l'abundància relativa de FP. Això s'ha justificat en el fet que cada grup de microorganismes s'amplifica amb uns encebadors determinats, que tenen una S i E concreta, i cada microorganisme s'ha analitzat de manera independent i per tant cada valor determinat té els seus propi llinar de detecció i eficàcia i no s'han intercalibrat els resultats entre els diferents encebadors.

A manera de resum, s'ha descrit que les medianes microbianes de la MII han estat diferents respecte dels CS indicant que la MI té condicions del medi diferents. Els valors del FEI han mostrat major disbiosi significativa en la MII respecte dels CS, demostrant la capacitat del FEI per quantificar de forma senzilla la disbiosi, i diferenciar la MII dels CS. La MI associada a la MII respecte CS, ha presentat significativament menor abundància de FP i major abundància d'ET, i valors

inferiors del FEI. En la MC s'ha detectat menys quantitat de FP, major abundància d'EC i un lleuger increment d'ET significativament respecte de la CU i els CS.

### **5.9 Anàlisi de la utilitat dels marcadors analítics i microbiològics per discriminar entre activitat i remissió.**

Un dels objectius de la tesi és valorar la capacitat dels marcadors microbiològics per a discriminar entre l'activitat i la remissió en la MII comparat amb els marcadors analítics. Una de les hipòtesis de la tesi és que la MI s'altera per l'activitat de la MII i per tant la quantificació de la disbiosi pot ser un bon biomarcador de la MII.

S'han comparat els paràmetres microbiològics i analítics classificats segons l'activitat de la malaltia (veure 4.9 resultats) per valorar la capacitat dels indicadors microbiològics de modificar-se amb l'activitat de la malaltia. S'han classificat els resultats en 2 grups d'activitat (grupA), definit per CP superior de 250; i remissió (grup Rem) definit per  $CP < 250$ . En T1 els pacients que s'han classificat en el grup activitat, s'han reclassificat segons la resposta al tractament en activitat (persistència de la  $CP > 250$ ) o bé que mantenen la remissió (grup remissió  $CP < 250$ ), i en T2 s'ha seguit el mateix procediment en els pacient que estaven en classificat en activitat prèviament en T1.

En la taula 4.28 s'ha desglossat l'evolució dels pacient classificat en activitat i remissió al llarg dels 3 punts temporals. S'ha evidenciat que al llarg dels 3 temps els pacients que han presentat activitat disminueixen progressivament (36 en T0 a 21 en T2). Aquesta dada ha estat en concordança amb l'anàlisi dels paràmetres analítics, endoscòpics i clínics que han indicat una millora progressiva de l'activitat de la malaltia al llarg dels 3 punts temporals.

Els valors de PCR, CP han mostrat valors superiors en el grup activitat respecte el grup remissió pel conjunt de la MII global, CU i MC. Els valors més elevats del grup activitat són plausibles des del punt de vista del comportament biològic de la variable, la PCR i CP s'eleva en la malaltia activa. Els valors de la CP han mostrat diferències significatives en els 3 temps, i és l'esperable doncs és el paràmetre que s'ha utilitzat per classificar entre Act i Rem en tots els punts d'anàlisi. La PCR ha mostrat diferències significatives en T0 per a MII global i CU i MC i únicament en

T2 per a la MC. Aquestes troballes han recolzat la utilització de la CP i la PCR en la nostra cohort per distingir entre l'activitat i la remissió tal com es realitza habitualment en la pràctica clínica (Menees *et al.*, 2015).

Estudis recents (Chang *et al.*, 2015; Menees *et al.*, 2015; Mumolo *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2019), sobre la utilitat dels biomarcadors per valorar l'activitat de la MII, suggereixen que la interpretació dels valors de CP i PCR depèn de diversos factors com el context clínic del pacient, els PT establerts (variables en funció del laboratori), tipus de test utilitzat i la probabilitat pretest de desenvolupar una MII. Dos estudis (D'Haens *et al.*, 2012; Colombel *et al.*, 2018) han determinat un PT de la combinació de la CP i la PCR que permetia discriminar pacients en activitat clínica, sent una combinació útil i no invasiva. Les dades presentades en la present tesi sobre els valors de CP i PCR han estat plausibles amb els resultats descrits en els estudis anteriors.

La utilitat de l'Hb com a biomarcador d'activitat és controvertida en la literatura (Sollelis *et al.*, 2019), però en la nostra cohort ha mostrat diferències significatives sobretot en la MC fet que podria indicar que l'Hb té més utilitat per monitorar la malaltia en la MC que la CU (Chang *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2019).

El comportament dels paràmetres de la MI estudiats (FP, EC i ET) han descrit un augment de l'abundància relativa de FP en el grup remissió, un augment de l'abundància relativa d'EC i ET en el grup activitat, per a MII global, CU i MC en els 3 punts temporals. Malgrat que les diferències entre la MI classificada com activitat i la remissió no han mostrat significança estadística, el comportament descrit dels bacteris estudiats en la cohort ha estat totalment compatible amb l'esperable i el descrit en la literatura actual. Estudis previs del nostre grup (Martínez-Medina *et al.*, 2009; Lopez-Siles *et al.*, 2015,2018) han descrit que l'augment de FP s'associava a menor disbiosi i amb menor activitat de la MII, i que l'augment de l'abundància relativa d'EC s'ha associat a major disbiosi com a conseqüència de l'activitat de la malaltia, troballa descrita en treballs d'altres grups (Palmela *et al.* 2018; Mirsepasi-Lauridsen *et al.* 2019). Analitzant els marcadors microbiològics s'ha detectat un comportament diferent entre MII global, CU i MC, indicant que la MC i la CU són malalties diferents.



La interpretació del comportament dels ET en la disbiosi de la MII és controvertit tal com s'ha descrit prèviament (Pittayanon *et al.*, 2020). Des d'una visió de comportament de l'ecologia de l'ecosistema, pensem que en la malaltia activa proliferen grups bacterians oportunistes i ho justifiquem que per compensar les mancances del medi s'augmenta la quantitat d'ET, tal com s'explica anteriorment en el punt 5.8. En capítols anteriors s'ha observat un augment d'ET en els pacients amb MII respecte dels CS, dades compatibles amb el descrit en el grup activitat.

En la mateixa metanàlisi descrita prèviament (Pittayanon *et al.*, 2020), es va descriure que els marcadors microbians van mostrar resultats neutres en la MII inactiva (o en remissió); i un augment o disminució de grups bacterians concrets en la MII activa al realitzar la comparació amb els CS; malgrat que els resultats de la metanàlisi van ser inconsistents entre els estudis per l'heterogeneïtat de la recollida de mostres, localització i mètodes d'amplificació bacteriana.

Probablement amb una mida mostral superior s'haurien trobat diferències significatives doncs les tendències que s'han observat en els 2 bacteris estudiats i els ET, han estat totalment plausibles amb el descrit en la literatura. Una limitació de la present tesi ha estat que només s'han estudiat 2 grups bacterians i donat el nombre de bacteris presents en la MI potser ha estat una aproximació massa restrictiva i cal realitzar una aproximació ampliant el nombre de bacteris que es quantifiquen per tal de que les tendències detectades mostrin diferències significatives.

Les medianes de l'índex FEI han estat superiors en el grup remissió respecte del grup activitat per les mostres de MII global, CU i MC en tots els temps. Les medianes de l'índex FEI es comporten diferents en l'activitat i la remissió. Aquesta troballa ha demostrat que el FEI ha estat un biomarcador d'activitat doncs s'han detectat diferències significatives ( $p=0,0156$ ) per MII global en T0. L'índex FEI ha tingut capacitat per discriminar l'activitat en T0 demostrant els objectius plantejats en la present tesi. A més s'ha calculat un PT per aquest mateix valor (MII global en T0). La població bacteriana del grup activitat ha estat diferent del grup remissió, indicant que són 2 poblacions diferents en l'ecosistema dels bacteris en la MII.

Analitzant els resultats dels marcadors microbiològics per separat, aquests han estat insuficients de manera aïllada per valorar l'activitat de la malaltia, i els

resultats han plantejat que la combinació del FEI amb la CP podrien ser més útils pel monitoratge de la MII.

Els resultats de la taula 4.29 han comparat els valors de FP, EC, ET i FEI per CU i MC desglossat per activitat i remissió amb els CS per tal de valorar com els valors d'activitat divergeixen dels CS (patró de referència). S'ha observat que les medianes d'activitat i remissió per FP, ET i FEI mostren diferències significatives respecte dels CS; indicant que en la MII, ecosistema intestinal associat a l'activitat, el FP, l'índex FEI i els ET s'han comportat diferent respecte l'ecosistema dels CS. Aquesta troballa ha indicat que aquests tres paràmetres han estat útils per valorar l'estat de l'ecosistema i la influència de la MII sobre el mateix; i per tant els canvis en la MI són útils per monitorar l'activitat de la MII. Aquestes troballes són plausibles amb els descrit en estudi previs (Palmela *et al.* 2018; Lopez Siles tesi 2015,2020).

A manera de resum, els 3 marcadors microbiològics a estudi en la present tesi, aquests s'han modificat segons les condicions del medi lligades a l'activitat o a la remissió de forma no significativa. La CP té capacitat per discriminar entre A i R. Probablement la PCR i l'Hb mostren que tenen tendència per aquesta capacitat però no de forma consistent en tots els 3 temps. La quantificació de l'índex FEI té la capacitat per discriminar entre activitat i remissió per MII global en T0.

### **5.10 Anàlisi concordança dels indicadors microbiològics amb la CP per discriminar Activitat de la remissió.**

L'anàlisi de la concordança ha valorat la capacitat dels marcadors microbiològics per discriminar entre activitat i remissió en relació la variable de referència (la CP), és a dir, la capacitat de les variables per mesurar de forma similar el mateix paràmetre. La concordança amb la CP s'ha calculat per PCR, Hb, ET, FP, EC, FEI, SES-CD, HBI, SCCAI, Mayo en el T0.

S'ha detectat correlació positiva significativa entre la CP i la PCR, i entre CP i SCCAI indicant que en el grup activitat aquestes 2 variables s'han comportat similar, fet plausible ja que la PCR i el SCCAI son bons marcadors d'activitat àmpliament utilitzats en pràctica clínica (Peyrin-Biroulet *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2019). Únicament s'ha detectat concordança significativa entre la CP i l'índex de Mayo, per

tant aquest índex endoscòpic ha tingut una capacitat similar a la CP per mesurar activitat de la CU en la nostra cohort. Tal com s'ha dit prèviament, l'endoscòpia és un mètode molt efectiu per valorar l'activitat de la MII (Sollelis *et al.*, 2019) perquè valora de forma directa l'activitat de la malaltia sobre la mucosa intestinal, no obstant això, és un procediment invasiu i s'han de valorar mètodes alternatius per valorar l'activitat de la MII (Spiceland *et al.*, 2018) com ara la MI.

### **5.11 Anàlisi de l'aplicabilitat dels marcadors microbiològics en diferents escenaris clínics.**

Prèviament a la present tesi per tal de demostrar les hipòtesis i els objectius plantejats sobre els marcadors microbiològics i la MII, s'han descrit el comportament de les variables microbiològiques, analítiques i els índex d'activitat i endoscòpics per tipus de malaltia i punt temporals (veure resultats apartat 4.2, 4.3 i 4.4). S'han determinat els valors de correlació entre les variables (4.6

), s'ha calculat la utilitat del FEI com a biomarcador (4.7), s'han comparat les variables microbiològiques amb els CS sense patologia digestiva (4.8) i s'ha estudiat el comportament de les variables segons activitat i remissió (4.9) i la concordança amb dels marcadors microbiològics (4.10).

En aquest punt s'ha analitzat el comportament dels marcadors microbiològics en dos escenaris molt concrets que han representat un perfil de pacients de comportament oposat teòric per valorar-ne l'aplicabilitat en dos situacions properes a la pràctica clínica:

- Pacients els quals se'ls retira el tractament biològic (RB) (Sí Tractament biològic en T0, No tractament biològic en T1. Pacients que han presentat remissió profunda (RP). S'ha analitzat la MI associada a la RP.
- Pacients naïfs a biològic amb malaltia activa moderada que se'ls inicia un tractament biològic (IB) per no resposta (No tractament biològic T0, sí tractament biològic T1). Aquest grup ha mostrat activitat moderada de la malaltia en T0 i ha permès valorar els efectes en el medi intestinal d'introduir un tractament per controlar l'activitat de la MII.

A causa del baix nombre de pacients dels 2 grups (8 grup RB i 19 grup IB) s'han analitzat els resultats sense desglossar per subtipus de MII. S'han analitzat els

canvis en la MI per l'efecte del tractament biològic perquè actualment són els tractaments més potents que disposem per tractar la MII, en termes d'eficàcia clínica i cost/benefici (a excepció del trasplantament autòleg de cèl·lules mare).

*Grup RB (n=8):*

S'ha mostrat que les medianes de la PCR i la CP han estat discretament més altes en T0 respecte de T1 de forma no significativa. Els valors baixos de PCR i CP <50, s'han postular com valors amb baix VPP i associat a remissió clínica (Heida *et al.*, 2017); indicant que l'activitat clínica del pacient no es va alterar per l'efecte de retirar el tractament, mantenint la remissió clínica i probablement la RP, tot i que no es'ha assolit la significació estadística degut a la mostra reduïda de pacients. Els valors de l'Alb i Hb han mostrat diferències entre T0-T1, i els valors han estat els esperats en la remissió, dins el rang de normalitat.

Tal com es descriu en les figures 4.19A i 19B, l'abundància relativa de FP del subgrup RB ha estat discretament més alta respecte del grup IB i s'ha detectat un discret augment de l'abundància relativa de FP de T0 a T1 per RB i IB, de forma no significativa. Els canvis de l'abundància relativa d'EC i ET de T0 a T1 s'han comportat de forma inversa entre el grup RB i IB no significativament. Existeix poca diferència en nombres absoluts entre els valors de FP pels 2 grups. Aquests canvis no significatius descrits entre els 2 bacteris i ET s'ha interpretat com que la MI no s'ha modificat ni influït pel fet d'haver retirat el tractament biològic mantenint la RP. La mostra reduïda de pacients ha fet perdre poder estadístic per detectar diferències significatives entre els 2 grups i únicament podem descriure que les tendències mostrades. S'ha mostrat un augment no significatiu de l'índex FEI de T0 a T1, indicant una millora de la disbiosi de la mostra.

La interpretació de les dades analítiques i microbiològiques ha mostrat congruència en relació amb el manteniment de la RP. La MI associada a RP ha presentat un interval de valors de FP de l'ordre de  $10^8$ , d'EC de l'ordre de  $10^5$  i ET de l'ordre de  $10^{11}$ .

*Grup IB (N=19):*

En la figura 4.19A es mostra que les medianes de la CP disminuint significativament de T0 a T1 ( $p=0,024$ ) suggerint una resposta al tractament biològic introduït (Mosli

*et al.*, 2015; Manceau *et al.*, 2017; Mumolo *et al.*, 2018). Els valors de la mediana de la PCR han estat superiors en T1 que T0 de forma no significativa, amb valors absoluts baixos malgrat presentar un brot de la malaltia. Aquest fet podria justificar el motiu pel qual no s'han detectat diferències significatives. Tanmateix a nivell de la pràctica clínica, la CP s'ha postulat com un marcador amb millor correlació amb l'endoscòpia i l'activitat de la MII sobretot pel seguiment de la MII (Schoepfer *et al.*, 2010).

L'augment discret no significatiu de l'abundància relativa de FP en T1 ha estat plausible amb el descrit per la CP en un altre estudi (Busquets *et al.*, 2015), perquè si existeix resposta clínica al tractament biològic iniciat s'espera una recuperació de la disbiosi present expressat a través d'un augment de l'abundància relativa de FP (Zhou *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2020).

Les medianes d'EC i ET han mostrat un augment no significatiu de l'abundància relativa de T0 a T1. S'hauria d'haver evidenciat una millora de la disbiosi expressat en forma de disminució de l'abundància d'EC en iniciar el tractament biològic. L'augment EC s'ha relacionat amb les recaigudes i activitat de la MII (Mirsepasi-Lauridsen *et al.*, 2019). En punts anteriors s'ha justificat que un augment dels valors d'ET s'associa a un augment de la disbiosi de la mostra des del punt de vista de funcionament del ecosistema, malgrat les dades inconsistentes al respecte en una metanàlisi recent (Pittayanon *et al.*, 2020).

La majoria de pacients d'aquest grup (13/19) han respòs al ttm en T1. No hi havien diferències significatives en les medianes dels canvis dels microorganismes estudiats, probablement degut a la mostra reduïda de pacients del grup.

De forma global, no s'han detectat diferències significatives entre les medianes dels microorganismes dels 2 grups però la tendència descrita suggereix que el perfil de disbiosi disminueix en el grup IB i es un perfil similar de la MI en el grup RB (i es manté la RP) indicant que es manté la remissió. En IB, la introducció d'un tractament més potent s'ha traduït en canvis de la MI no significatius. La quantificació de la MI pot ser un bon biomarcador per a quantificar els canvis en la MI en relació amb el seguiment de la MII.

A manera de reflexió final de la discussió, la descripció de signatures bacterianes associades amb situació clínica és una tendència creixent en la literatura mèdica recent a mesura que hi ha una descripció més acurada de la microbiota en aquestes malalties. En la pràctica clínica l'estudi de la MI associada a la MII és complex degut a la gran heterogeneïtat clínica dels pacients amb MII i de la resposta als diferents tractaments, les interaccions amb factors genètics i ambientals i la resposta immune de l'hoste enfront de la MI. La descripció de tendències no significatives ens aporta informació respecte l'estructura de la MI. El microbioma en la MII és molt volàtil a mitjà-llarg termini i únicament la MI associada a CS mostrava certa estabilitat temporal (Halfvarson *et al.*, 2017).

Una troballa destacable en la present tesi és la correlació positiva entre l'Índex endoscòpic de Mayo i el FEI. L'endoscòpia és un de les eines més útils per el monitoratge de l'activitat de la MII amb ampli consens dins la comunitat mèdica. Per tant aquesta troballa és molt important doncs indica l'aplicabilitat dels indicadors microbiològics pel monitoratge de la MII.

En la present tesi únicament s'han quantificat 2 grups microbians i els ET malgrat aquesta limitació s'han aconseguit descriure patrons de la MI diferents entre la MC, CU i els CS, diferents correlacions entre marcadors microbiològics, un PT per aplicar-lo com biomarcador i canvis en la MI en relació a l'activitat.

Els ET han mostrat un comportament inconsistent entre els diferents apartats, però probablement en la MII activa augmenti el nombre d'ET. Una major abundància relativa de FP s'ha relacionat amb menor disbiosi, i una major abundància d'EC en major disbiosi. Aquest resultat es van descriure en la Tesi de Lopez-Siles (*Ecophysiology and phylogeny of Faecalibacterium prausnitzii in healthy and diseased gut. Application in Inflammatory Bowel Disease diagnostics, Universitat de Girona. PhD project, 2015*) i la present tesi ha continuat els resultats que s'hi van presentar. El present estudi ha anat més enllà en la continuïtat del projecte inicial, i ha aglutinat la recerca prèvia que s'ha fet en el nostre grup sobre biomarcadors d'activitat de la MI, amb l'objectiu de monitorar els canvis de la MI en la MII i correlacionar amb un valor concret (l'índex FEI i CP) amb els paràmetres analítics, d'activitat clínica i endoscòpia per aplicar-ho a la pràctica clínica real a través del

càlcul del punt de tall del FEI (1,869) entre activitat i remissió que la present tesi ha permès determinar.

## **6-. Aplicabilitat futura i limitacions de l'estudi:**

En la present tesi es va mostrar que el FEI té potencial aplicabilitat com a biomarcador. Utilitzar de forma aïllada el FEI, o altres signatures microbiològiques, pel diagnòstic i seguiment de la MII probablement no tenen prou potència i caldria la combinació amb altres indicadors com ara la CP, PCR o l'endoscòpia per augmentar-ne la capacitat discriminativa.

La presa de decisions clíniques en la MII hauria de combinar els marcadors microbiològics intestinals amb altres indicadors d'activitat de la MII. Aquesta combinació permetria desenvolupar un algoritme de presa de decisions clíniques, que estratificaria els pacients en relació amb l'activitat. El desenvolupament de l'algoritme no es va realitzar donat que no ha estat un dels objectius de la tesi deixant l'opció de fer un altre estudi dirigit en aquest objectiu posteriorment.

Els estudis futurs sobre la MI en les diferents malalties digestives haurien d'enfocar-se en l'anàlisi de les funcions bacterianes, en les quals podrien aportar informació addicional sobre les possibles associacions de la MI amb les malalties. Aquest fet podria conduir a una millora terapèutica dirigida específicament al microbioma intestinal (com per exemple el cas del trasplantament fecal)

Per altra banda, s'haurien d'estandarditzar els mètodes d'estudi de la MI entre els diferents centres per tal de facilitar la reproducció de les anàlisis, ja que en les descripcions de la literatura mèdica es descriu molta heterogeneïtat entre les dades i els mètodes dels diferents estudis .

Entre les opcions de futur en el camp de l'anàlisi de la MI, i per estandarditzar els procediments entre els diferents laboratoris, existeix la opció de les eines de seqüenciació massiva per a observar i descifrar la MI com alternativa per a guanyar una visió global del conjunt de microorganismes i els canvis en el medi.

Un anàlisi que no s'ha fet en el present estudi seria analitzar la MI en relació a l'ús de diferents medicaments per aprofundir en l'efecte que pot tenir cada medicament en la MI. En el present estudi s'ha assumit, que l'efecte sobre la MI és igual entre l'ús dels diferents medicaments, i malgrat que hi ha dades en la literatura on s'han descrit l'efecte dels medicaments en la modul·lació de la MI, no



hi han dades comparant diferents classes de medicaments respecte els canvis en la MI.

Les limitacions de l'estudi són que no s'ha discriminat per localització de la MII, una mida mostral reduïda, únicament s'han quantificat 2 grups microbians i la quantitat d'ET, i s'ha considerat tots els tractaments biològics igual d'efectius.

La quantificació dels grups microbians fets en la present tesi doctoral s'ha realitzat mitjançant qPCR amb encebadors diferents entre FP, EC i ET; que, per tant, mostren diferent eficàcia i especificitat a l'hora d'amplificar la diana. Aquesta imitació és extrapolable a molts dels estudis actuals existents en a literatura mèdica.

Els paràmetres analítics, clínics i endoscòpics depenen directament de l'estat d'activitat de la malaltia, però les variacions en l'ecosistema de la MI no només depèn de l'activitat de la malaltia, si no també d'altres factors que no es poden tenir controlats en cada moment (dieta, tabac, antibiòtics; i d'altres factors no necessàriament coneguts com consum de carn, etc.) i aquest fet limita l'estudi de la MI.

## 7-. Conclusions:

1. Els 2 grups bacterians quantificats mostren un comportament diferents entre els associats a la malaltia inflamatòria intestinal respecte dels controls sans i mostra un patró disbiòtic en relació a les dades bibliogràfiques existents.
2. La relació quantitativa de *F. prausnitzii* i *E.coli* (Índex FEI) és un bon indicador de la disbiosi de la microbiota intestinal en la malaltia inflamatòria intestinal.
3. Els indicadors analítics i l'IBD-Q mostren diferències entre les diferents situacions clíniques i els tipus de malaltia.
4. L'índex FEI es modifica en relació amb canvis en el medi associats a l'activitat de la malaltia inflamatòria intestinal.
  - a) La quantificació de *F. prausnitzii* i *E. coli* permet distingir entre el subtipus de malaltia inflamatòria intestinal (malaltia de Crohn i colitis ulcerosa) i els controls sans.
  - b) Els marcadors microbiològics estan correlacionats amb els marcadors analítics establerts (CP, PCR) i amb els índexs clínics i endoscòpics (Índex de Mayo).
  - c) S'estableix un punt de tall pel FEI per al conjunt de les 2 malalties per tal de discriminar l'activitat, demostrant la utilitat com a biomarcador.
5. La quantificació bacteriana combinada amb altres paràmetres analítics pot ser útil per al seguiment de la MII en la pràctica clínica.



**8-. Bibliografia :**

- Aarbakke J., *et al.*, 'Thiopurine biology and pharmacology', in Trends in Pharmacological Sciences, pp. 3–7. (1997)
- Abreu MT, *et al.*, Diagnosis of colitis: making the initial diagnosis. Clin Gastroenterol Hepatol. 2007; 5:295–301. [PubMed: 17368227]
- Adamina M; *et al.*, European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO], ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: Surgical Treatment, *Journal of Crohn's and Colitis*, Volume 14, Issue 2, February 2020, Pages 155–168,
- Ahmed S., *et al.*, Mucosa-associated bacterial diversity in relation to human terminal ileum and colonic biopsy samples. Appl Environ Microbiol, 2007. 73(22): p. 7435-42.
- Allison J, *et al.* Natural history of severe ulcerative colitis in a community-based health plan. Clin Gastroenterol Hepatol 2008; 6:999.
- Amoedo Cibeira J., Signatures bacterianes com a eines de diagnòstic diferencial i monitoratge de les malalties inflamatòries intestinals. Tesi Doctoral Universitat de Girona; 2020
- Ananthakrishnan AN, *et al.* Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018 ;15(1):39-49.
- Ananthakrishnan AN, *et al.* Sleep duration affects risk for ulcerative colitis: a prospective cohort study. Clin Gastroenterol Hepatol 2014; 12:1879.
- Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12(4):205-217. doi: 10.1038/nrgastro.2015.34
- Andersson RE, *et al.*, Appendectomy and protection against ulcerative colitis. N Engl J Med 2001; 344:808.
- Archer S., *et al.*, Butyrate inhibits colon carcinoma cell growth through two distinct pathways. Surgery, 1998. 124(2): p. 248-53.
- Ardizzone S., *et al.* Mucosal healing predicts late outcomes after the first course of corticosteroids for newly diagnosed ulcerative colitis. Clin Gastroenterol Hepatol 2011; 9:483.
- Arumugam M, *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome [published correction appears in Nature. 2011 Jun 30;474(7353):666]
- Bäckhed F, *et al.* Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. Cell Host Microbe. 2015 May 13;17(5):690-703..
- Bansal D, *et al.* Role of patient-reported outcomes and other efficacy endpoints in the drug approval process in Europe (2008-2012). J Epidemiol Glob Health. 2015 Dec;5(4):385-95.
- Barcenilla A., *et al.*, Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. Appl. Environ. Microbiol., 2000. 66(4): p. 1654-61.
- Barclay, Andrew R. *et al.* Systematic Review: The Role of Breastfeeding in the Development of Pediatric Inflammatory Bowel Disease. 2009, The Journal of Pediatrics, Volume 155, Issue 3, 421 - 426.
- Barré A, *et al.* Review article: predictors of response to vedolizumab and ustekinumab in inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther. 2018 Apr;47(7):896-905.
- Bartosch S., *et al.*, Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. Appl Environ Microbiol, 2004. 70(6): p. 3575-81.

- Bemelman, W; *et al.* on behalf of the European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO] and the European Society of Colo-Proctology [ESCP], ECCO-ESCP Consensus on Surgery for Crohn's Disease, *Journal of Crohn's and Colitis*, Volume 12, Issue 1, January 2018, Pages 1–16,
- Bernstein CN, *et al.* Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut*. 2008 Sep;57(9):1185-91.
- Best WR. *et al.* Predicting the Crohn's disease activity index from the Harvey- Bradshaw index. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:304–310.
- Bewtra M, *et al.* Crohn's disease and ulcerative colitis are associated with elevated standardized mortality ratios: a meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19:599.
- Bianchi F, *et al.* In vitro modulation of human gut microbiota composition and metabolites by *Bifidobacterium longum* BB-46 and a citric pectin. *Food Res Int*. 2019Jun;120:595-602.
- Billioud, V.*et al.* . 'Loss of response and need for adalimumab dose intensification in Crohn's disease: A systematic review', *American Journal of Gastroenterology*.
- Blackwell, J, *et al.* The impact of smoking and smoking cessation on disease outcomes in ulcerative colitis: a nationwide population-based study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2019; 50: 556– 567.
- Blaut M, *et al.* The Intestinal Microbiota in Metabolic Disease. *Nutrients*. 2016;8(4):202. Published 2016 Apr 6.
- Bouter KE, *et al.* Role of the Gut Microbiome in the Pathogenesis of Obesity and Obesity-Related Metabolic Dysfunction. *Gastroenterology*. 2014 May;152(7):1671-1678. 2017
- Brazil JC, *et al.* The role of polymorphonuclear leukocyte trafficking in the perpetuation of inflammation during inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19:1556.
- Brown,M; *et al.* Gut Microbiota Regulation of T Cells During Inflammation and Autoimmunity. *Annual Review of Immunology* 2019 37:1, 599-624 .
- Busquets, D.; *et al.* "Anti-tumour Necrosis Factor Treatment with Adalimumab Induces Changes in the Microbiota of Crohn's Disease." *Journal of Crohn's and Colitis* 9 (2015): 899-906.
- Camprubi-Font C, *et al.* Genetic and Phenotypic Features to Screen for Putative Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2019;10:108. Published 2019 Feb 21.
- Cañete F, *et al.* Review article: the relationship between obesity, bariatric surgery, and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018;48(8):807-816.
- Casetta B, *et al.* Association Between Cigarette Smoking Prevalence and Income Level: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nicotine Tob Res*. 2017;19(12):1401-1407.
- Cato E.P., *et al.*, *Fusobacterium prausnitzii* (Hauduroy *et al.*) Moore and Holdeman: Emended Description and Designation of Neotype Strain. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1974. 24(2): p. 225-229
- Chaaró-Benallal, D. *et al.* 'Evolution of the incidence of inflammatory bowel disease in southern Spain', *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*. 2017.
- Chang S, *et al.* Disease monitoring in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2015 Oct 28;21(40):11246-59.
- Chaparro M; *et al.* EpidemIBD study group of GETECCU. EpidemIBD: rationale and design of a large-scale epidemiological study of inflammatory bowel disease in Spain. *Therap Adv Gastroenterol*. 2019 May 21;12:1756284819847034.
- Chassard, C., *et al.*, Assessment of metabolic diversity within the intestinal microbiota from healthy humans using combined molecular and cultural approaches. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008. 66(3): p. 496-504.
- Chen B, *et al.* Prevalence and predictors of small intestinal bacterial overgrowth in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol*. 2018 Jul;53(7):807-818.

## 8-. BIBLIOGRAFIA

- Chen J, *et al.*, Microbiome, inflammation and colorectal cancer. *Semin Immunol.* 2017 Aug;32:43-53. doi: 10.1016/j.smim.2017.09.006. Epub 2017 Oct 2. Review. PubMed PMID: 28982615.
- Chen J. *et al.* Contribution of the intestinal microbiota to human health: from birth to 100 years of age. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013 ; 358 : 323-346.
- Cholapranee A, *et al.* Systematic review with meta-analysis: comparative efficacy of biologics for induction and maintenance of mucosal healing in Crohn's disease and ulcerative colitis controlled trials. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017 May;45(10):1291-1302.
- Colombel JF, *et al.* Effect of tight control management on Crohn's disease (CALM): a multicentre, randomised, controlled phase 3 trial. *Lancet* 2018; 390: 2779-2789
- Cosnes, J. *et al.* (2001) 'Smoking cessation and the course of Crohn's disease: An intervention study', *Gastroenterology*.
- Costea PI, *al.* Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition [published correction appears in *Nat Microbiol.* 2018 Feb 13;]. *Nat Microbiol.* 2018;3(1):8–16.
- Cotillard, A., *et al.* Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*, 500, 585 2013.
- D'Haens G, *et al.* Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18: 2218-2224.
- Daperno M, *et al.* Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc.* 2004 Oct;60(4):505-12..
- Darfeuille-Michaud, A. (2002) 'Adherent-invasive Escherichia coli: A putative new E. coli pathotype associated with Crohn's disease', *International Journal of Medical Microbiology.* Elsevier GmbH, pp 185–193.
- Darfeuille-Michaud, A. *et al.* (2004) 'High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease', *Gastroenterology.* W.B. Saunders, 127(2), pp. 412–421.
- de Jong MJ, *et al.* Patient-reported outcome measures for use in clinical trials and clinical practice in inflammatory bowel diseases: A systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2018;16:648–663.
- de Lange KM, *et al.* Understanding inflammatory bowel disease via immunogenetics. *J Autoimmun.* 2015 Nov;64:91-100.
- De Vos M, *et al.* Consecutive fecal calprotectin measurements to predict relapse in patients with ulcerative colitis receiving infliximab maintenance therapy. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19: 2111-2117
- Diaz Heijtz R. Fetal, neonatal, and infant microbiome: Perturbations and subsequent effects on brain development and behavior. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2016 Dec;21(6):410-417.
- Doherty G, *et al.* European Crohn's and Colitis Organisation Topical Review on Treatment Withdrawal ['Exit Strategies'] in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis.* 2018 Jan 5;12(1):17-31.
- Dominguez-Bello MG, *et al.* Role of the microbiome in human development. *Gut.* 2019 Jun;68(6):1108-1114.
- Dong TS, *et al.*, Influence of Early Life, Diet, and the Environment on the Microbiome. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2018;17(2):231–242.
- Dorrington, AM; *et al.* The Historical Role and Contemporary Use of Corticosteroids in Inflammatory Bowel Disease, *Journal of Crohn's and Colitis*, Volume 14, Issue 9, September 2020, Pages 1316–1329,
- Duncan, S.H. *et al.*, Probiotics and prebiotics and health in ageing populations. *Maturitas*, 2013. 75(1): p. 44-50.

- Duncan, S.H, *et al.*, Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* , 2002. 52(Pt 6): p. 2141-6)
- Eckburg PB, *et al.*, Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308(5728):1635–1638.
- Falvey JD, *et al.*, Disease activity assessment in IBD: clinical indices and biomarkers fail to predict endoscopic remission. *Inflamm Bowel Dis*. 2015 Apr;21(4):824-31.
- Fernández-Clotet A *et al.* JAK Inhibition: The Most Promising Agents in the IBD Pipeline? *Curr Pharm Des*. 2019;25(1):32-40.
- Fernández, A. *et al.* 'Incidence and phenotype at diagnosis of inflammatory bowel disease. Results in Spain of the EpiCom study', *Gastroenterología y Hepatología*. 2015
- Fitxa técnica 5-ASA: [http://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/77668/77668\\_ft.pdf](http://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/77668/77668_ft.pdf)
- Fitxa técnica Adalimumab: [https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/103256017/FT\\_103256017.html](https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/103256017/FT_103256017.html)
- Fitxa técnica de l'Azatioprina (Imurel®):  
[https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/50043/FichaTecnica\\_50043.html](https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/50043/FichaTecnica_50043.html)
- Fitxa técnica de la ciclosporina : [https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/60320/60320\\_ft.pdf](https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/60320/60320_ft.pdf).
- Fitxa técnica Metotrexat IM : [https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/76091/76091\\_ft.pdf](https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/76091/76091_ft.pdf)
- Fitxa técnica Vedolizumab : [https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/114923001/FT\\_114923001.html](https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/114923001/FT_114923001.html)
- Fitxa técnica Golimumab: [https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/109546005/FT\\_109546005.html](https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/109546005/FT_109546005.html)
- Fitxa técnica Infliximab: [https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/99116001/FT\\_99116001.html](https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/99116001/FT_99116001.html)
- Fornaro R, *et al.* Post-operative recurrence in Crohn's disease: Critical analysis of potential risk factors.. *Surgeon*. 2015;13:330–47.
- Frank DN, *et al.* Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug 21;104(34):13780-5. Epub 2007 Aug 15.
- Franzosa EA, *et al.* Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol*. 2019 Feb;4(2):293-305. doi: 10.1038/s41564-018-0306-4. Epub 2018 Dec 10.
- Freeman HJ. Natural history and long-term clinical course of Crohn's disease. *World JGastroenterol*.2014;20(1):31–36.
- Furet, J.; *et al.*, Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes*,2009.59(12): p. 3049-57
- Gajendran M, *et al.* A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Dis Mon*. 2018 Feb;64(2):20-57.
- Gasche, C. *et al.* (2000) 'A simple classification of Crohn's disease: Report of the working party for the world congress of gastroenterology, Vienna 1998', *Inflammatory Bowel Diseases*.
- Ghoneima AS, *et al.* High risk of septic complications following surgery for Crohn's disease in patients with preoperative anaemia, hypoalbuminemia and high CRP. *Int J Colorectal Dis*. 2019 Dec;34(12):2185-2188.
- Gill SR, *et al.* Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006;312(5778):1355–1359.
- Gower-Rousseau, *et al.*, "Validation of the Inflammatory Bowel Disease Disability Index in a population-based cohort," *Gut*, vol. 66, no. 4, pp. 588–596, 2017.
- Graf D, *et al.* Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. *Microb Ecol Health Dis*. 2015;26:26164. Published 2015 Feb 4.

## 8-. BIBLIOGRAFIA

- Greenfield SM (1993) 'Review article: the mode of action of the aminosalicylates in inflammatory bowel disease', *Aliment Pharmacol Ther*, 7, pp. 369–383.
- Grosicki GJ, *et al.*, Gut Microbiota Contribute to Age-Related Changes in Skeletal Muscle Size, Composition, and Function: Biological Basis for a Gut-Muscle Axis. *Calcif Tissue Int*. 2017;102(4):433–442.
- Guarner F, *et al.* Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003 Feb 8;361(9356):512-9. Review. PubMed
- Guyatt G, *et al.* A new measure of health status for clinical trials in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1989;96:804–810.
- Guyton K, *et al.* The gut microbiota and gastrointestinal surgery. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(1):43-54.
- Halfvarson J, *et al.* Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol*. 2017 Feb 13;2:17004.
- Hansson G *et al.* 'The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria', *Gut Microbes*, 1(1), pp. 51–54. (2010)
- Harbord M; *et al.* for the European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO], Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 2: Current Management, *Journal of Crohn's and Colitis*, Volume 11, Issue 7, July 2017, Pages 769–784,
- Harvey RF, *et al.* A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet* 1980 Mar 8;1(8167):514. PubMed PMID: 6102236.
- Heida A, *et al.* Clinical Utility of Fecal Calprotectin Monitoring in Asymptomatic Patients with Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. *Inflamm Bowel Dis*. 2017 Jun;23(6):894-902.
- Higuchi LM, *et al.*, A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women. *Am J Gastroenterol* 2012; 107:1399.
- Hillman ET, *et al.*, Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract. *Microbes Environ*. 2017;32(4):300–313.
- Hills RD Jr, *et al.*, Gut Microbiome: Profound Implications for Diet and Disease. *Nutrients*. 2019 Jul 16;11(7). pii: E1613.
- Huijsdens XW, *et al.*, Quantification of Bacteria Adherent to Gastrointestinal Mucosa by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40:4423-4427
- Hviid A, *et al.*, Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood. *Gut* 2011;60:49-54.
- Iacucci M, *et al.* Mucosal Healing -How Deep Is Enough? *Dig Dis*. 2016;34(1-2):160-4. doi: 10.1159/000443133. Epub 2016 Mar 16. PMID: 26982170.
- Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. The Integrative Human Microbiome Project. *Nature*. 2019 May;569(7758):641-648.
- Irani NR, *et al.* Correlation Between Endoscopic and Histological Activity in Ulcerative Colitis Using Validated Indices. *J Crohns Colitis*. 2018 Nov 9;12(10):1151-1157.
- Isaac S, *et al.* Short- and long-term effects of oral vancomycin on the human intestinal microbiota. *J Antimicrob Chemother*. 2016;72(1):128–136.
- Jess T, *et al.* Overall and cause-specific mortality in ulcerative colitis: meta-analysis of population-based inception cohort studies. *Am J Gastroenterol* 2007; 102:609.
- Jones GR, *et al.* IBD prevalence in Lothian, Scotland, derived by capture-recapture methodology. *Gut*. 2019;68(11):1953-1960. doi:10.1136/gutjnl-2019-318936.



- Kaplan GG, *et al.* The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a population-based cohort study in Sweden and Denmark. *Gut*. 2007 Oct;56(10):1387-92. Epub 2007 May 9.
- Kaplan GG. *et al.* The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015 Dec;12(12):720-7. doi: 10.1038/nrgastro.2015.150. Epub 2015 Sep 1.
- Kedia S, *et al.* Gut microbiome diversity in acute severe colitis is distinct from mild to moderate ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2020 Sep 1.
- Khan, M.T, *et al.*, The gut anaerobe *Faecalibacterium prausnitzii* uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic-anoxic interphases. *ISME J*, 2012. 6(8): p. 1578-85.
- Khanna S, *et al.*, The Microbiome in Crohn's Disease: Role in Pathogenesis and Role of Microbiome Replacement Therapies. *Gastroenterol Clin North Am*. 2017. Sep;46(3):481-492
- Koch, R. (1876). "Untersuchungen über Bakterien: V. Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*" [Investigations into bacteria: V. The etiology of anthrax, based on the ontogenesis of *Bacillus anthracis*] (PDF). *Cohns Beiträge zur Biologie der Pflanzen* (in German). 2 (2): 277–310.
- Kovatcheva-Datchary P, *et al.*, Nutrition, the gut microbiome and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2013 Feb;27(1):59-72.
- Kovatcheva-Datchary P, *et al.* Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of Prevotella. *Cell Metab*. 2015 Dec 1;22(6):971-82.
- Lagier JC, *et al.*, Human gut microbiota: repertoire and variations. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:136. Published 2012 Nov 2. doi:10.3389/fcimb.2012.00136
- Lasson A, *et al.*, Pharmacological intervention based on fecal calprotectin levels in patients with ulcerative colitis at high risk of a relapse: A prospective, randomized, controlled study. *United European Gastroenterol J*. 2015 Feb;3(1):72-9.
- Lay C *et al.* Colonic microbiota signatures across five northern european countries. *Appl Environ Microbiol* 2005 ;71:4153-5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16000838>
- Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1989;170:2-6; discussion 16-9.
- Lepage P, *et al.* Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2011 Jul;141(1):227-36.
- Ley RE, *et al.* Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 2008; 320:1647
- Leylabadlo HE, *et al.* The critical role of *Faecalibacterium prausnitzii* in human health: An overview. *Microb Pathog*. 2020 Jun 11;149:104344.
- Liu X, *et al.*, Modulation of Gut Microbiota-Brain Axis by Probiotics, Prebiotics, and Diet. *J Agric Food Chem*. 2015 Sep 16;63(36):7885-95. Epub 2015 Sep 1.
- Lloyd-Price J, G, *et al.* Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project [published correction appears in *Nature*. 2017 Oct 12;:]. *Nature*. 2017;550(7674):61–66.
- Lopetuso LR, *et al.*, Gut Microbiota in Health, Diverticular Disease, Irritable Bowel Syndrome, and Inflammatory Bowel Diseases: Time for Microbial Marker of Gastrointestinal Disorders. *Dig Dis*. 2018;36(1):56-65.
- López Siles, M.; *et al.* "Phylogenetic and phenotypic characterisation of *Faecalibacterium prausnitzii* isolates from the human large intestine." *Journal of Crohn's and Colitis* 5 (2011): S167-.
- López Siles M.; *et al.* "Mucosa-associated *Escherichia coli* and *Faecalibacterium prausnitzii* quantification by real-time PCR and its potential use as complementary diagnostic tool for inflammatory bowel diseases." *Journal of Crohn's and Colitis* 3 (2009): S135-S135.
- López Siles M.; *et al.* "Mucosa-associated *Faecalibacterium prausnitzii* and *Escherichia coli* co-abundance can distinguish Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease phenotypes." *International Journal of Medical Microbiology* 304 (2014): 464-475

## 8-. BIBLIOGRAFIA

- Lopez-Siles M, *et al.* Alterations in the Abundance and Co-occurrence of *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* in the Colonic Mucosa of Inflammatory Bowel Disease Subjects. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018 ;8:281.
- Lopez-Siles M, *et al.*, Evaluation of bacterial biomarkers to aid in challenging inflammatory bowel diseases diagnostics and subtype classification. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2020 May 12;11(3):64-77.
- Lopez-Siles M., *et al.* "Cultured representatives of two major phylogroups of human colonic *Faecalibacterium prausnitzii* can utilize pectin, uronic acids and host-derived substrates for growth." *Applied and Environmental Microbiology* 78 (2012): 420-428.
- Lopez-Siles M., Ecophysiology and phylogeny of *Faecalibacterium prausnitzii* in healthy and diseased gut. Application in Inflammatory Bowel Disease diagnostics. PhD Thesis, Universitat de Girona. 2015.
- Lopez-Siles M; *et al.* "Changes in the Abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* Phylogroups I and II in the Intestinal Mucosa of Inflammatory Bowel Disease and Patients with Colorectal Cancer." *Inflammatory Bowel Diseases* 22 (2016): 28-41.
- Lopez-Siles M; *et al.* "*Faecalibacterium prausnitzii*: from microbiology to diagnostics and prognostics." *ISME Journal* (2017): 841-852
- Lopez-Siles M.; *et al.* "Mucosa-associated *Faecalibacterium prausnitzii* phylotype richness is reduced in patients with inflammatory bowel disease." *Applied and Environmental Microbiology* 81 (2015): 7582-7592.
- Louis, P., *et al.*, Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. *J. Bacteriol.*, 2004. 186(7): p. 2099-106.
- Lynch SV, *et al.*, The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med.* 2016 Dec 15;375(24):2369-2379. Review.
- Maaser C, *et al.* German IBD Study Group and the TRUST&UC study group; German IBD Study Group and TRUST&UC study group. Intestinal ultrasound for monitoring therapeutic response in patients with ulcerative colitis: results from the TRUST&UC study. *Gut.* 2020 Sep;69(9):1629-1636.
- Maaser,C; *et al.* ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications, *Journal of Crohn's and Colitis*, Volume 13, Issue 2, February 2019,
- Magro F; *et al.*, for the European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO], Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders, *Journal of Crohn's and Colitis*, Volume 11, Issue 6, June 2017, Pages 649–670,
- Mahid S., *et al.* (2006) 'Smoking and inflammatory bowel disease: A meta-analysis', Mayo Clinic Proceedings.
- Manceau H, *et al.* Fecal calprotectin in inflammatory bowel diseases: update and perspectives. *Clin Chem Lab Med.* 2017 Mar 1;55(4):474-483.
- Manichanh C, *et al.* The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012 Oct;9(10):599-608. Epub 2012 Aug 21. Review.
- Mañosa M, *et al.*, GETECCU. Phenotype and natural history of elderly onset inflammatory bowel disease: a multicentre, case-control study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2018 Mar;47(5):605-614.
- Mantzaris GJ. Thiopurines and Methotrexate Use in IBD Patients in a Biologic Era. *Curr Treat Options Gastroenterol.* 2017 Mar;15(1):84-104.

- Marchesi JR, *et al.* The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*. 2016 Feb;65(2):330-9. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309990. Epub 2015 Sep 2. PMID: 26338727; PMCID: PMC4752653.
- Marín-Fernández, *et al.*, Quality of life in patients with inflammatory bowel diseases,. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2016; 39 (1): 123-131 .
- Marinelli C, *et al.* Factors Influencing Disability and Quality of Life during Treatment: A Cross-Sectional Study on IBD Patients. *Gastroenterol Res Pract.* 2019 Aug 21;2019:5354320. doi: 10.1155/2019/5354320.
- Martinez KB, *et al.*, Western diets, gut dysbiosis, and metabolic diseases: Are they linked?. *Gut Microbes.* 2017;8(2):130–142.
- Martínez-Medina M, *et al.* Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009 Jun;15(6):872-82.
- Martinez-Medina, M. *et al.* 'Escherichia coli in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent invasive Escherichia coli pathogenicity', *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology.* Baishideng Publishing Group Inc., 5(3), p. 213. (2014)
- Martinez-Medina, M. *et al.* (2006) 'Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis', *Inflammatory Bowel Diseases*, 12(12), pp. 1136–1145.
- Martinez-Medina, M. *et al.* (2009) 'Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: New ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease', *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(6), pp. 872–882.
- Martinez-Medina, M., *et al.* "P197 Is *Escherichia Coli* more than a commensal bacterium in the intestinal mucosa of crohn's disease patients?." *Journal of Crohn's and Colitis* 1 (2007): 54-54.
- Martinez-Medina, M.; *et al.* "Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease." *Inflammatory Bowel Diseases* 15 (2009): 872-882.
- Mas-de-Xaxars, T.; *et al.* "A first experimental approach to the effect of Adalimumab treatment on the microbial composition of the intestinal mucosa in Crohn's disease patients." *Journal of Crohn's and Colitis* 3 (2009): S137-S137.
- Mas-de-Xaxars; Teresa "Bacterial DNA sequences associated with the intestinal mucosa of colorectal cancer patients." .Tesi doctoral .UDG 2011.
- Masachs M, [Spanish translation, adaptation, and validation of the 32-item questionnaire on quality of life for inflammatory bowel disease(IBDQ-32)]. *Rev Esp Enferm Dig.* 2007 Sep;99(9):511-9. Spanish.
- McBurney MI, *et al.* Establishing What Constitutes a Healthy Human Gut Microbiome: State of the Science, Regulatory Considerations, and Future Directions. *J Nutr.* 2019 Aug 2.
- Meeker S, *et al.* Protective links between vitamin D, inflammatory bowel disease and colon cancer. *World J Gastroenterol.* 2016 Jan 21;22(3):933-48. doi: 10.3748/wjg.v22.i3.933.
- Menees SB, *et al.* A meta-analysis of the utility of C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, fecal calprotectin, and fecal lactoferrin to exclude inflammatory bowel disease in adults with IBS. *Am J Gastroenterol.* 2015 Mar;110(3):444-54.
- Mentella MC, *et al.* Nutrition, IBD and Gut Microbiota: A Review. *Nutrients.* 2020 Mar 29;12(4):944.
- Mentella MC, *et al.* The Association of Disease Activity, BMI and Phase Angle with Vitamin D Deficiency in Patients with IBD. *Nutrients.* 2019;11(11):2583. Published 2019 Oct 26.
- Michail S, *et al.* Alterations in the gut microbiome of children with severe ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2012 Oct;18(10):1799-808.

## 8-. BIBLIOGRAFIA

- Miquel S, *et al.* Ecology and metabolism of the beneficial intestinal commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii*. *Gut Microbes*. 2014 Mar-Apr;5(2):146-51. Epub 2014 Jan 22.
- Miquel-Cusachs JO; *et al.* Effect of MMX-mesalazine (Mezavant XL<sup>®</sup>) in the microbiological profile of the colon in ulcerative colitis. *Gastroenterology*,148(4),S–453. 2015. Abstract DDW 2015
- Miquel, S., *et al.*, *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol*, 2013. 16(3): p. 255-61.
- Mirsepasi-Lauridsen HC, *et al.* *Escherichia coli* Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel Disease. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Jan 30;32(2):e00060-18.
- Mirsepasi-Lauridsen HC, *et al.* Disease-Specific Enteric Microbiome Dysbiosis in Inflammatory Bowel Disease. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:304. Published 2018 Nov 20.
- MohammedN, *et al.* Endoscopic scoring indices for evaluation of disease activity in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018 Jan 16;1(1):CD011450.
- Mokbel M *et al.* (1998) 'Effect of smoking on the long-term course of ulcerative colitis', *Gastroenterol Clin Biol*, pp. 858–62.
- Moller FT, *et al.* Familial risk of inflammatory bowel disease: a population-based cohort study 1977-2011. *Am J Gastroenterol*.2015 Apr;110(4):564-71.
- Molodecky NA, *et al.* Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012; 142:46–54.e42.
- Mosli MH *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*. 110, 802–819; quiz 820 (2015).
- Mumolo MG, *et al.* From bench to bedside: Fecal calprotectin in inflammatory bowel diseases clinical setting. *World J Gastroenterol*. 2018 Sep 7;24(33):3681-3694.
- Murawska N, *et al.* Anemia of Chronic Disease and Iron Deficiency Anemia in Inflammatory Bowel Diseases: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Inflamm Bowel Dis*. 2016 May;22(5):1198-208.
- Murphy WG *et al.* The sex difference in haemoglobin levels in adults mechanisms,causes, and consequences. *Blood Rev*. 2014 Mar;28(2):41-7. Epub 2014 Jan 22.
- Myreliid P, *et al.* Appendectomy and the Risk of Colectomy in Ulcerative Colitis: A National Cohort Study. *Am J Gastroenterol* 2017; 112:1311.
- Na SY, *et al.* Perspectives on Current and Novel Treatments for Inflammatory. Bowel Disease. *Gut Liver*. 2019 Jun 17.
- Naismith CD, *et al.* A prospective evaluation of the predictive value of faecal calprotectin in quiescent Crohn's disease. *J Crohns Colitis*. 2014. Sep;8(9):1022-9.
- Narula N, *et al.* Systematic Review and Meta-Analysis: Infliximab or Cyclosporine asRescue Therapy in Patients With Severe Ulcerative Colitis Refractory to Steroids. *Am J Gastroenterol*. 2016 Apr;111(4):477-91.
- Nash AK, *et al.* The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome*. 2017 Nov 25;5(1):153.
- Neurath MF, *et al.* Targeting immune cell circuits and trafficking in inflammatory bowel disease. *Nat Immunol*. 2019 Aug;20(8):970-979. Epub 2019 Jun 24. Review.
- Ng SC, *et al.* Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. 2018 Dec 23;390(10114):2769-2778.
- Ni J, *et al.* Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Oct;14(10):573-584. Epub 2017 Jul 19.

- Nishida A, *et al.* Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol.* 2018 Feb;11(1):1-10. Epub 2017 Dec 29.
- Nóbrega VG, *et al.* The onset of clinical manifestations in inflammatory bowel disease patients. *Arg Gastroenterol.* 2018;55(3):290-295.
- Olén O, *et al.* Mortality in adult-onset and elderly-onset IBD: a nationwide register-based cohort study 1964-2014. *Gut.* 2020;69(3):453-461.
- Ordás I, *et al.*, Ulcerative colitis. *Lancet.* 2012 Nov 3;380(9853):1606-19.
- Orel, R. *et al.* 'Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease', *World Journal of Gastroenterology.* WJG Press, pp. 11505–11524. (2014)
- Othman M, *et al.*, Alterations in intestinal microbial flora and human disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24:11.
- Palmela C, *et al.* Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2018 Mar;67(3):574-587
- Parfrey, L.W. *et al.*, Spatial and temporal variability of the human microbiota. *Clin Microbiol Infect.* 2012. 18 Suppl 4: p. 8-11.
- Pariente B, *et al.* Development of the Lémann index to assess digestive tract damage in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2015 Jan;148(1):52-63.e3.
- Pascal V, *et al.* A microbial signature for Crohn's disease. *Gut.* 2017;66(5):813–822. doi:10.1136/gutjnl-2016-313235.
- Peyrin-Biroulet L, *et al.* Defining Disease Severity in Inflammatory Bowel Diseases: Current and Future Directions. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016Mar;14(3):348-354.e17.
- Pickard JM, *et al.*, Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev* 2017; 279:70.
- Piovani D, *et al.* Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology.* 2019;157(3):647-659.e4.
- Pittayanon R, *et al.* Differences in Gut Microbiota in Patients With vs Without Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review. *Gastroenterology.* 2020 Mar;158(4):930-946.e1. 2019.11.294.
- Prusnitz, C., *Der Bacillus mucosus anaerobius.* *Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg Abt. I Orig.* , 1922. 89: p. 126-132.
- Preidis GA, *et al.*, Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomics era. *Gastroenterology.* 2009;136(6):2015–2031.
- Qin *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing, *Nature*, 2010;464(7285):59-65.
- Qiu, X. *et al.* (2013) '*Faecalibacterium prausnitzii* upregulates regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in treating TNBS-induced colitis', *Journal of Crohn's and Colitis*, 7(11).
- Qiu, X., *et al.*, *Faecalibacterium prausnitzii* upregulates regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in treating TNBS-induced colitis. *J Crohns Colitis*, 2013. 7(11): p. e558- 68.
- Ramamoorthy, S. *et al.*, 'Corticosteroids. Mechanisms of Action in Health and Disease', *Rheumatic Disease Clinics of North America.* W.B. Saunders, pp. 15–31. (2016)
- Ramió-Pujol, S, *et al.* A novel distinctive form of identification for differential diagnosis of irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease, and healthy controls. *GastroHep.* 2020; 2: 193– 204.
- Rees T, *et al.*, How the microbiome challenges our concept of self. *PLoS Biol.* 2018;16(2):e2005358.
- Regueiro, M. *et al.* (2007) 'Infliximab dose intensification in Crohn's disease', *Inflammatory Bowel Diseases.* doi: 10.1002/ibd.20177.

## 8-. BIBLIOGRAFIA

- Reyes, A., *et al.* Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. *Nat. Rev. Microbiol.* 10:607–617. 2012.
- Rios-Covian D,*et al.* Interactions between Bifidobacterium and Bacteroides species in cofermentations are affected by carbon sources, including exopolysaccharides produced by bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Dec;79(23):7518-24.
- Roblin X, *et al.* Azathioprine dose reduction in inflammatory bowel disease patients on combination therapy: an open-label, prospective and randomised clinical trial. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017;46(2):142-149.
- Rokkas T, *et al.* Fecal calprotectin in assessing inflammatory bowel disease endoscopic activity: a diagnostic accuracy meta-analysis. *J Gastrointest Liver Dis.* 2018 Sep;27(3):299-306.
- Rubin DT, *et al.* Inflammation is an independent risk factor for colonic neoplasia in patients with ulcerative colitis: a case-control study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11:1601.
- Ryu DG, *et al.*, Clinical implications of fecal calprotectin and fecal immunochemical test on mucosal status in patients with ulcerative colitis. *Medicine (Baltimore).* 2019 Sep;98(36):e17080.
- Sairenji T, *et al.*, An Update on Inflammatory Bowel Disease. *Prim Care.* 2017 Dec;44(4):673-692. Epub 2017 Oct 5.
- Salahudeen MS. *et al.*, A review of current evidence allied to step-up and top-down medication therapy in inflammatory bowel disease. *Drugs Today (Barc).* 2019 Jun;55(6):385-405..
- Salvo-Romero, E. *et al.* (2015) 'Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas', *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas.*
- Samuel S, *et al.* Validation of the ulcerative colitis colonoscopic index of severity and its correlation with disease activity measures. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11:49.
- Sandborn WJ, *et al.* Evaluation of serologic disease markers in a population-based cohort of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7:192. 28.
- Sartor RB. *et al.* Interplay of commensal and pathogenic bacteria, genetic mutations, and immunoregulatory defects in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *J Intern Med.* 2008 Jun;263(6):597-606.
- Satsangi J, *et al.*. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut.* 2006;55(6):749–753.
- Scaldaferri, F. *et al.* (2013) 'Gut Microbial Flora, Prebiotics, and Probiotics in IBD: Their Current Usage and Utility', *BioMed Research International.* Hindawi Limited, 2013, pp. 1–9.
- Scanlan PD, *et al.* Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using *mcrA* gene analysis. *BMC Microbiol.* 2008;8:79. Published 2008 May 20.
- Schirmer M, *et al.* Compositional and Temporal Changes in the Gut Microbiome of Pediatric Ulcerative Colitis Patients Are Linked to Disease Course. *Cell Host Microbe.* 2018 Oct 10;24(4):600-610.e4.
- Schirmer M, *et al.* Microbial genes and pathways in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Microbiol.* 2019 Aug;17(8):497-511.
- Schoepfer AM, *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 Jan;105(1):162-9.
- Schottmueller H. Allgemeinen krankenhaus hamburg-ependorf. *Mitt Grenz Med Chir* 1910 21:450.
- Schroeder KW, *et al.*. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med.* 1987 Dec 24;317(26):1625-9.
- Sender R, *et al.*, Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 2016;14(8):e1002533. Published 2016 Aug 19.

- Short FL, *et al.* Polybacterial human disease: the ills of social networking. *Trends Microbiol.* 2014;22(9):508–516.
- Sica GS, *et al.* Surgery for inflammatory bowel disease in the era of laparoscopy. *World J Gastroenterol* 2013;19:2445-8.
- Siegel CA, *et al.* Development of an index to define overall disease severity in IBD. *Gut.* 2018 Feb;67(2):244-254.
- Silverberg MS, *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):5A–36.
- Siniagina M, *et al.* Cultivated *Escherichia coli* diversity in intestinal microbiota of Crohn's disease patients and healthy individuals: Whole genome data. *Data Brief.* 2019 Dec 5;28:104948.
- Sipponen T, *et al.* Endoscopic evaluation of Crohn's disease activity: comparison of the CDEIS and the SES-CD. *Inflamm Bowel Dis.* 2010 Dec;16(12):2131-6.
- Sokol H, *et al.* Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis.* 2009 Aug;15(8):1183-9.
- Sollelis E, *et al.* Combined evaluation of biomarkers as predictor of maintained remission in Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2019 May 21;25(19):2354-2364.
- Soon IS, *et al.* The relationship between urban environment and the inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol.* 2012;12:51. Published 2012 May 24..
- Spiceland CM, *et al.* Endoscopy in inflammatory bowel disease: Role in diagnosis, management, and treatment. *World J Gastroenterol.* 2018 Sep 21;24(35):4014-4020.
- Sturm A, *et al.* ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 2: IBD scores and general principles and technical aspects, *Journal of Crohn's and Colitis*, Volume 13, Issue 3, March 2019,
- Suau, A., *et al.*, *Fusobacterium prausnitzii* and related species represent a dominant group within the human fecal flora. *Systematic and Applied Microbiology*, 2001. 24(1): p. 139-145.
- Suez J, *et al.* Post-Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired by Probiotics and Improved by Autologous FMT. *Cell.* 2018 Sep 6;174(6):1406-1423.e16..
- Tandon P, *et al.* Noninvasive Methods For Assessing Inflammatory Bowel Disease Activity in Pregnancy: A Systematic Review. *J Clin Gastroenterol.* 2019 Sep;53(8):574-581..
- Tontini GE, *et al.* Differential diagnosis in inflammatory bowel disease colitis: state of the art and future perspectives. *World J Gastroenterol.* 2015 Jan 7;21(1):21-46.
- Torres J, *et al.*, Crohn's disease Review. *Lancet.* 2017 Apr 29;389(10080):1741-1755. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31711-1.
- Torres, J; *et al.* On behalf of the European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO], ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: Medical Treatment, *Journal of Crohn's and Colitis*, Volume 14, Issue 1, January 2020, Pages 4–22,
- Tran V, *et al.* IBD in the Elderly: Management Challenges and Therapeutic Considerations. *Curr Gastroenterol Rep.* 2019;21(11):60. Published 2019 Nov 27. doi:10.1007/s11894-019-0720-7.
- Travis SP, *et al.* Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). *Gut* 2012; 61:535. 29.
- Trikudanathan G, *et al.*, Diagnosis and therapeutic management of extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Drugs.* 2012 Dec 24;72(18):2333-49.
- Tsui JJ, *et al.* Is top-down therapy a more effective alternative to conventional step-up therapy for Crohn's disease? *Ann Gastroenterol.* 2018 Jul-Aug;31(4):413-424.
- Turnbaugh PJ, *et al.* A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 2009;457(7228):480–484.

## 8-. BIBLIOGRAFIA

- Turnbaugh PJ, *et al.*, The human microbiome project. *Nature*. 2007;449(7164):804–810.
- Ungaro R, *et al.*, Ulcerative colitis. *Lancet*. 2017 Apr 29;389(10080):1756-1770.
- Valdovinos MA, *et al.* The Mexican consensus on probiotics in gastroenterology. *Rev Gastroenterol Mex*. 2017 Apr-Jun;82(2):156-178..Epub 2017 Jan 16.
- Veillon A, *et al.* Sur quelques microbes strictment anaerobies et leur role clans la pathologie humaine. *C R Soc Biol (Paris)* 1897; 49:253.
- Vermeire S, *et al.* Correlation between Crohn's disease activity and Harvey-Bradshaw indices in assessing Crohn's disease severity. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010;8:357–363.
- Walmsley RS, *et al.* A simple clinical colitis activity index. *Gut* 1998;43:29–32.
- Walsh A, *et al.* Defining Faecal Calprotectin Thresholds as a Surrogate for Endoscopic and Histological Disease Activity in Ulcerative Colitis-a Prospective Analysis. *J Crohns Colitis*. 2019 Mar 30;13(4):424-430.
- Wang AY, *et al.*, Fecal microbial transplant for the treatment of pediatric inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2016 Dec 21;22(47):10304-10315.
- Wang P, *et al.* Smoking and Inflammatory Bowel Disease: A Comparison of China, India, and the USA. *Dig Dis Sci*. 2018 Oct;63(10):2703-2713.
- Wang, Z.K., *et al.*, 2014. Review article: fungal microbiota and digestive diseases. *Alimen. Pharmacol. Therapeu*. 39:751–766.
- Watt E, *et al.* Extending colonic mucosal microbiome analysis-assessment of colonic lavage as a proxy for endoscopic colonic biopsies. *Microbiome*. 2016;4(1):61. Published 2016 Nov 25.
- Wrzosek, L. *et al.* (2013) 'Bacteroides thetaiotaomicron and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent', *BMC Biology*, 11.
- Wu GD, *et al.* Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science [Internet]*. 2011 Oct 7 [cited 2017 Apr 18];334(6052):105–8.
- Xu M, *et al.* Correlation between Serological Biomarkers and Disease Activity in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Biomed Res Int*. 2019 Dec 25;2019:6517549.
- Yatsunenکو T, *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486(7402):222–227. Published 2012 May 9. doi:10.1038/nature11053
- Yoo BB, *et al.* The Enteric Network: Interactions between the Immune and Nervous Systems of the Gut. *Immunity* 2017; 46:910.
- Yu H, *et al.* Market share and costs of biologic therapies for inflammatory bowel disease in the USA. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018 Feb;47(3):364-370.. Epub 2017 Nov 22.
- Yu YR, *et al.*. Clinical presentation of Crohn's, ulcerative colitis, and indeterminate colitis: Symptoms, extraintestinal manifestations, and disease phenotypes. *Semin Pediatr Surg*. 2017 Dec;26(6):349-355.
- Zhao H, *et al.* Systematic review and meta-analysis of the role of *Faecalibacterium prausnitzii* alteration in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2020 Aug 19.
- Zhou Y, *et al.*, Gut Microbiota Offers Universal Biomarkers across Ethnicity in Inflammatory Bowel Disease Diagnosis and Infliximab Response Prediction. *mSystems*. 2018 Jan 30;3(1):e00188-17.
- Zippi, M. *et al.* (2014) 'Extraintestinal manifestations in a large series of Italian inflammatory bowel disease patients', *World Journal of Gastroenterology*.
- Zittan E, *et al.* Development of the Harvey-Bradshaw Index-pro (HBI-PRO) Score to Assess Endoscopic Disease Activity in Crohn's Disease. *J Crohns Colitis*. 2017 May 1;11(5):543-548.





## 9-. ANNEX I.

**Taula:** Resum de les correlacions significatives entre els diferents indicadors. **4.25A)** Temps T0;**4.25B)** Temps T1 i **4.25C)** Temps T2 per a MII global, MC i CU respectivament. **25A)**

<u>Variables</u>	Variables	Coefficient rho Spearman	Valor P	<u>Variables</u>	Variables	Coefficient rho Spearman	Valor P
<b>MII GLOBAL T0</b>				<b>CU T0</b>			
PCR 0	CP 0	0,581	<0,0001	PCR CU 0	CP CU 0	0,592	<0,001
PCR 0	EC 0	-0,273	0,014	PCR 0	SCCAI 0	0,458	0,006
CP 0	Hb 0	-0,353	0,001	PCR 0	Imayo0	0,417	0,01
ET 0	FP 0	0,598	<0,0001	CP CU 0	Hb CU 0	-0,34	0,046
FEI GL 0	PCR	0,283	0,011	CP 0	SCCAI	0,749	0,0001
FEI GL 0	EC	-0,814	0,0001	CP 0	MAYO	0,482	0,008
FEI GL 0	FP	0,523	0,0001	MAYO	SCCAI	0,445	0,016
				Hb CU 0	EC CU 0	-0,445	0,007
				ET CU 0	FP CU 0	0,637	<0,001
<b>MC T0</b>				FEI CU 0	EC CU 0	-0,776	0,001
PCR MC 0	CP MC 0	0,532	<0,001	FEI CU 0	FP CU 0	0,454	0,006
CP MC 0	SES-CD	0,31	0,049	FEI CU 0	Hb CU 0	0,503	0,002
CP MC0	HB 0	0,62	0,0001				
PCR MC 0	HB 0	0,46	0,002				
PCR MC 0	EC MC 0	-0,338	0,023				
SESCD 0	HB 0	0,623	0,0001				
ET MC 0	FP MC 0	0,637	<0,001				
FEI MC 0	EC MC 0	-0,83	0,0001				
FEI MC 0	FP MC 0	0,51	0,001				

## 25B)

<u>Variables</u>	Variables	Coefficient rho Spearman	Valor P	<u>Variables</u>	Variables	Coefficient rho Spearman	Valor P
<b>MII GLOBAL T1</b>				<b>CU T1</b>			
CP 1	Hb 1	-0,254	0,023	PCR CU 1	FP CU 1	0,556	<0,001
Hb 1	EC 1	-0,254	0,023	CP CU 1	SCCAI 1	0,541	0,002
ET 1	FP 1	0,572	0,001	CP CU1	Imayo0	0,575	0,002
FEI GL 1	Hb GL 1	0,243	0,03	SCCAI 1	Imayo0	0,627	0,001
FEI GL 1	EC GL 1	-0,911	0,0001	ET CU 1	FP CU 1	0,472	0,004
FEI GL 1	FP GL 1	0,516	0,0001	FEI CU 1	EC CU 1	-0,944	0,001
<b>MC T1</b>							
PCR1	Hb1	-0,337	0,024				
CP MC 1	Hb 1	-0,343	0,021				
CP MC 1	SESCD 1	0,346	0,023				
CP MC 1	HB 1	0,437	0,003				
HB 1	SESCD 1	0,693	0,0001				
ET MC 1	FP MC 1	0,624	<0,001				
EC MC 1	FP MC 1	-0,31	0,038				
FEI MC 1	EC MC 1	-0,87	0,0001				
FEI MC 1	FP MC 1	0,654	0,001				

25C)

<u>Variables</u>	<u>Variables</u>	<u>Coefficient rho Spearman</u>	<u>Valor P</u>	<u>Variables</u>	<u>Variables</u>	<u>Coefficient rho Spearman</u>	<u>Valor P</u>
------------------	------------------	---------------------------------	----------------	------------------	------------------	---------------------------------	----------------

**MII GLOBAL T2**

**CU T2**

PCR GL 2	CP GL 2	0,287	0,012	CP CU 2	FP CU 2	-0,39	0,03
CP GL 2	Hb GL 2	-0,363	<0,001	CP CU 2	SCCA1 2	0,615	0,0001
Hb GL 2	EC GL 2	-0,245	0,045	CP CU 2	IMayo2	0,535	0,015
Alb GL 2	FP GL 2	0,293	0,02	PCR CU 2	IMayo2	0,481	0,032
ET GL 2	FP GL 2	0,448	<0,001	Imayo0	SCCA1 2	0,508	0,022
FEI GL 2	FP GL 2	0,559	0,0001	EC CU 2	IMayo2	-0,533	0,019
FEI GL 2	Hb GL 2	0,276	0,024	ET CU 2	FP CU 2	0,428	0,016
FEI GL 2	ET GL 2	0,384	0,001	FEI CU 2	IMayo2	0,488	0,034
FEI GL 2	EC GL 2	-0,862	0,0001	FEI CU 2	EC CU 2	-0,96	0,001
				FEI CU 2	ET CU 2	0,378	0,036
				FEI CU 2	FP CU 2	0,386	0,032

**MC T2**

PCR MC 2	CP MC 2	0,361	0,021
PCR MC 2	SESCD 2	0,413	0,012
CP MC 2	Hb MC 2	-0,462	0,002
CP MC 2	HB 2	0,341	0,036
HB 2	SESCD2	0,578	0,0001
Alb MC 2	FP MC 2	0,563	<0,001
ET MC 2	FP MC 2	0,523	<0,001
FEI MC 2	ALB MC 2	0,401	0,017
FEI MC 2	EC MC 2	-0,716	0,001
FEI MC 2	ET MC 2	0,334	0,043
FEI MC 2	FP MC 2	0,607	0,001

