



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

**"EVALUACIÓN DE CAMBIOS EN LA MICROBIOTA INTESTINAL EN
PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN TRAS TRATAMIENTO
CON ANTI-TNF ALFA"**

Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas

TESIS DOCTORAL REALIZADA POR:

D.^a Laura Sanchis Artero

Director: Prof. Dr. Ernesto Cortés Castell

Codirector: Prof. Dr. Xavier Cortés Rizo

San Juan de Alicante, 2021

La presente memoria de tesis doctoral, con el título “EVALUACIÓN DE CAMBIOS EN LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN TRAS TRATAMIENTO CON ANTI-TNF ALFA” y presentada por D^a Laura Sanchis Atero, está basada en los artículos cuya primera firmante es la autora y con los índices de calidad que se expresan en cada uno de los dos artículos:

1. **Sanchis-Artero L**, Martínez-Blanch JF, Manresa-Vera S, Cortés-Castell E, Rodríguez-Morales J, Cortés-Rizo X. Evaluation of Changes in Gut Microbiota in Patients with Crohn's Disease after Anti-Tnf α Treatment: Prospective Multicenter Observational Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Jul 15;17(14):5120. doi: 10.3390/ijerph17145120. PMID: 32679874; PMCID: PMC7399935.

Indicadores de calidad:

FI=2.468

Ranking JCR 2019: 105/265, Q2 en Environmental Sciences; 58/193, Q2 en Public Environmental and Occupational Sciences y 22/328, T1, Q1 en Environment/ecology.

2. **Sanchis-Artero L**, Martínez-Blanch JF, Manresa-Vera S, Cortés-Castell E, Valls-Gandia M, Iborra M, Paredes-Arquiola JM, Boscá-Watts M, Huguet JM, Gil-Borrás F, Rodríguez-Morales J, Cortés-Rizo X. Evaluation of changes in intestinal microbiota in Crohn's disease patients after anti-TNF alpha treatment. *Sci Rep* 11, 10016 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88823-2>

Indicadores de calidad:

FI=3.998

Ranking JCR 2019: 17/71, Q1 en Multidisciplinary Sciences; 5/65, D1, Q1 en Multidisciplinary.



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA, CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS

D. Ernesto Cortés Castell, director y D. Xavier Cortés Rizo, codirector, de la tesis doctoral titulada "EVALUACIÓN DE CAMBIOS EN LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN TRAS TRATAMIENTO CON ANTI-TNF ALFA"

CERTIFICAN:

Que Dña. Laura Sanchis Artero, ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado "EVALUACIÓN DE CAMBIOS EN LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN TRAS TRATAMIENTO CON ANTI-TNF ALFA" conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos en Sant Joan d'Alacant, a 10 de mayo de dos mil veintiuno.

Fdo. D. Ernesto Cortés Castell
Director de tesis

Fdo. D. Xavier Cortés Rizo
Codirector de tesis



D. Vicente Francisco Gil Guillén, Coordinador del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

AUTORIZA:

La presentación y defensa como tesis doctoral del trabajo "EVALUACIÓN DE CAMBIOS EN LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN TRAS TRATAMIENTO CON ANTI-TNF ALFA" realizado por Dña. Laura Sanchis Artero bajo la dirección del Dr. D. Ernesto Cortés Castell y la codirección del Dr. D. Xavier Cortés Rizo. De acuerdo a la información recibida sobre las evaluaciones previas realizadas en cumplimiento de la normativa general vigente y la propia de la Universidad Miguel Hernández y según lo certificado por las personas que han realizado la tutoría y dirección, la tesis cumple los requisitos para proceder a su defensa pública.

En Sant Joan d' Alacant, a diez de mayo de 2021

Firmado: Prof. Vicente Francisco Gil Guillén
Coordinador del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas



Contenido

ABREVIATURAS:	3
RESUMEN	5
0. RESUMEN	7
0. SUMMARY	9
1. INTRODUCCIÓN	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	12
1.1.1. <i>CONCEPTOS BÁSICOS</i>	12
1.1.2. <i>EPIDEMIOLOGÍA DE EII</i>	14
1.1.3. <i>PATOGENIA ENFERMEDAD DE CROHN</i>	16
1.1.4. <i>TRATAMIENTO EN ENFERMEDAD DE CROHN (EC)</i>	18
1.2 MICROBIOTA INTESTINAL	21
2. RESUMEN DE LAS PUBLICACIONES PRESENTADAS	37
2. 1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	39
2.2. OBJETIVOS	41
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	41
2.3.2. PACIENTES	43
2.3.3. DATOS CLÍNICOS Y DE LABORATORIO	44
2.3.4. MEDIDAS DE RESPUESTA CLÍNICA-BIOLÓGICA	45
2.3.5. RECOLECCIÓN HECES PARA ANÁLISIS MICROBIOTA.....	46
2.3.6. SECUENCIACIÓN Y BIOINFORMÁTICA.....	46
2.3.7. BÚSQUEDA Y EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES POTENCIALES.....	48
2.3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	50
2.3.8.1. BIOINFORMÁTICA	50
2.3.9. ASPECTO ÉTICOS.....	51
2.4. RESULTADOS	51
2.5. DISCUSIÓN	67
2.5.1. REPERCUSIONES PARA LA PRÁCTICA CLÍNICA Y LA INVESTIGACIÓN	68
2.5.2. VENTAJAS Y LIMITACIONES.....	69
2.6. CONCLUSIONES	71
3. BIBLIOGRAFÍA	73
3. BIBLIOGRAFÍA	75
4. PUBLICACIONES TESIS	88

Abreviaturas:

- AGCC: ácidos grasos de cadena corta
- CF: calprotectina fecal.
- ddPCR: droplet digital PCR
- EC: enfermedad de Crohn
- EII: enfermedad inflamatoria intestinal
- ET: enterotipo
- F/E: Faecalibacterium prausnitzii/Escherichia coli
- IBP: inhibidor de la bomba de protones.
- IC: intervalo de confianza
- IHB: índice Harvey-Bradshaw
- NGS: Next-Generation Sequencing
- PCR: proteína C reactiva.
- RM: resonancia magnética.
- RNA: ácido ribonucleico
- STAMP: Statistical Analysis of Metagenomic Profiles.
- TC: tomografía computerizada
- TNF: factor de necrosis tumoral

RESUMEN

0. RESUMEN

Objetivo: La disbiosis intestinal es clave para el origen y desarrollo de la enfermedad de Crohn (EC). El tratamiento anti-TNF ha cambiado el pronóstico de la EC, consiguiendo la curación de la mucosa, desconociéndose si ésta se correlaciona con cambios en la composición de la microbiota. Se plantea evaluar los cambios en la microbiota en la EC pre y tras seis meses con anti-TNF, comparándolos con sujetos sanos, además de calcular el ratio *Faecalibacterium prausnitzii*/*Escherichia coli* (F/E) como indicador de respuesta terapéutica y evaluando si estos cambios se producen hacia la recuperación de la microbiota normal.

Métodos: Estudio observacional prospectivo multicéntrico, en 27 pacientes con EC que iniciaron tratamiento con anti-TNF y 16 individuos sanos. Se determinó actividad inflamatoria mediante índice de Harvey-Bradshaw (IHB), proteína C reactiva y calprotectina fecal (CF) al inicio, tres y seis meses, clasificando a los pacientes en respondedores y no respondedores. Se evaluó la microbiota fecal y su evolución antes y tras seis meses de tratamiento anti-TNF, mediante secuenciación genómica masiva analizando la composición bacteriana y la diversidad alfa y beta, además del ratio F/E por PCR digital.

Resultados: En la cohorte con EC se observa pérdida de géneros pertenecientes a la clase Clostridia, productores de ácidos grasos de cadena corta y aumento del filo Proteobacteria ($p < 0.01$), especialmente por el aumento de los géneros *Escherichia*/*Shigella* frente a la cohorte de sanos. Tras el tratamiento anti-TNF aumentó también el filo Proteobacteria en no respondedores frente a respondedores (13/27)

($p < 0.005$), aumentando la clase Clostridia (destacando esta vez el género Faecalibacterium), observándose también el incremento de la diversidad alfa frente a no respondedores ($p < 0.01$), tendiendo hacia la microbiota presente en los sujetos sanos. Existe asociación ($p < 0.001$) en la relación F/E entre respondedores y no respondedores. La relación F/E es el biomarcador de mayor precisión de respuesta a anti-TNF (área bajo la curva 0.87).

Conclusión: El tratamiento con anti-TNF permite la restauración parcial de la microbiota intestinal en respondedores con tendencia hacia la eubiosis frente a no respondedores. La relación *F. prausnitzii*/*E. coli* puede proporcionar un indicador fiable de respuesta a anti-TNF en enfermedad de Crohn.

0. SUMMARY

Objectives: Intestinal dysbiosis is key in the onset and development of Crohn's disease (CD). We evaluated the microbiota changes in CD patients before and after a six-month anti-TNF treatment, comparing these changes with the microbiota of healthy subjects.

Methods: This prospective multicenter observational study involved 27 CD patients initiating anti-TNF treatment and 16 healthy individuals. Inflammatory activity was determined at baseline, 3 and 6 months, classifying patients into responders and non-responders. Fecal microbiota was analyzed by massive genomic sequencing through 16S rRNA amplicon sequencing before and after six months of anti-TNF treatment.

Results: The CD cohort showed a decrease in genera of the class Clostridia, short-chain fatty acid producers, and an increase in the phylum Proteobacteria ($p < 0.01$) versus the healthy cohort. After anti-TNF treatment, the phylum Proteobacteria also increased in non-responders versus responders (13/27) ($p < 0.005$), with the class Clostridia increasing. In addition, alpha diversity increased in responders versus non-responders ($p < 0.01$), tending towards eubiosis. An association was found ($p < 0.001$) in the *F.prausnitzii*/*E.coli* ratio between responders and non-responders. The F/E ratio was the most accurate biomarker of anti-TNF response (area under the curve 0.87).

Conclusion: Thus, anti-TNF treatment allows partial restoration of intestinal microbiota in responders and the *F.prausnitzii*/*E.coli* ratio can provide a reliable indicator of response to anti-TNF in CD.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

1.1.1. CONCEPTOS BÁSICOS

La enfermedad inflamatoria intestinal crónica (EIIC) es un grupo de enfermedades benignas, crónicas y recidivantes que se caracterizan por ser procesos inflamatorios crónicos, con una afectación primordialmente, aunque no exclusiva, del intestino. Las causas de la EII sólo se conocen parcialmente, como determinados factores ambientales relacionados con el desarrollo socioeconómico, estilo de vida y el tabaco. La hipótesis fisiopatológica más aceptada en la actualidad, se postula como que resulta consecuencia de una respuesta inmunológica exagerada y sostenida ante antígenos presentes en la luz intestinal (posiblemente bacterias) en individuos genéticamente susceptibles (Khor, 2011). Esta entidad está constituida principalmente por tres enfermedades clínicas (tabla 1):

– **Enfermedad de Crohn (EC):** definida en la actualidad como “un grupo de trastornos multisistémicos con unos rasgos clínicos y anatomopatológicos específicos caracterizados por inflamación focal, asimétrica, transmural y ocasionalmente granulomatosa que afecta primariamente al tracto gastrointestinal” (Lichtenstein, 2009). Puede afectar a cualquier zona del tracto digestivo, desde la boca hasta el ano, siendo el área más frecuente el ileon. Sus síntomas fundamentales suelen ser diarrea y/o dolor abdominal. Su clasificación debe realizarse en orden a la edad al diagnóstico, a su localización (ileocólica, ileal, cólica, perianal y/o de otras localizaciones), a su patrón

clínico (inflamatorio, estenosante o fistulizante), y a la gravedad (leve, moderada o grave).

– **Colitis ulcerosa (CU):** afecta de forma difusa y continúa con diferente extensión a la mucosa del colon en exclusiva. Su síntoma fundamental es la rectorragia, y puede clasificarse en dependencia de su extensión (proctitis, colitis izquierda y colitis extensa) y de su gravedad: silente, leve, moderada o grave.

– **Colitis indeterminada o no clasificable (CI) (10%):** EII que las características clínicas, anatomopatológicas y endoscópicas no permiten clasificarla de CU ni EC.

Tabla 1: Principales diferencias entre CU y EC:

Colitis ulcerosa	Enfermedad de Crohn
Afecta sólo al colon	Puede afectar a cualquier parte del tubo digestivo, desde boca a ano
Afectación rectal constante	Afectación rectal rara
Afectación continua y simétrica	Afectación segmentaria y asimétrica
Afectación sólo mucosa	Afectación transmural y mesentérica
Estenosis y fístulas raras	Estenosis i fístulas frecuentes
Enfermedad perianal rara	Enfermedad perianal frecuente
Abscesos intraabdominales raros	Abscesos intraabdominales posibles
Endoscopia: Pérdida del patrón vascular, edema, friabilidad, sangrado y úlceras	Endoscòpia: Úlceras confluyentes, serpiginosas, patrón en “empedrado”
Histología: Abscesos de criptas, distorsión arquitectura, deplección de mucina	Histología: Granulomas*, agregados linfoides, fisuras, alteración criptas
Clínica: Emisión de sangre y moco. Diarrea. Tenesmo y urgencia (síndrome rectal)	Clínica: Diarrea crónica Dolor abdominal y fiebre.
Complicaciones: Megacolon tóxico, perforación, cáncer de colon	Complicaciones: Obstrucción y fístulas Cáncer de colon si afectación cólica
Cirugía: [*] sólo en un 20%-30% de casos en colectomía curativa	biopsias endoscópicas Cirugía: recurrencia postquirúrgica

1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE EII

La EII está emergiendo como una epidemia mundial. Existe una asociación clara entre el aumento de la incidencia de la EII y los factores ambientales relacionados con el desarrollo socioeconómico. El estilo de vida en los países desarrollados podría poner en peligro los sistemas naturales de la colonización microbiana del intestino humano, desencadenando una interacción entre patógenos microbianos y el sistema inmunológico que conlleva en pacientes genéticamente predispuestos al desarrollo de la EII (Manichanh, 2012). Así pues, la incidencia ha ido progresivamente en aumento en los países más desarrollados (Estados Unidos, Canadá, Australia, Nueva Zelanda y países del oeste de Europa), caracterizados por un nivel socioeconómico e industrial más avanzado. Más recientemente, las cifras publicadas de incidencia de estos países parecen más estables, dando paso a un claro incremento en la incidencia en países ahora en vías de desarrollo (América del Sur, Asia y África) (Figura 1).

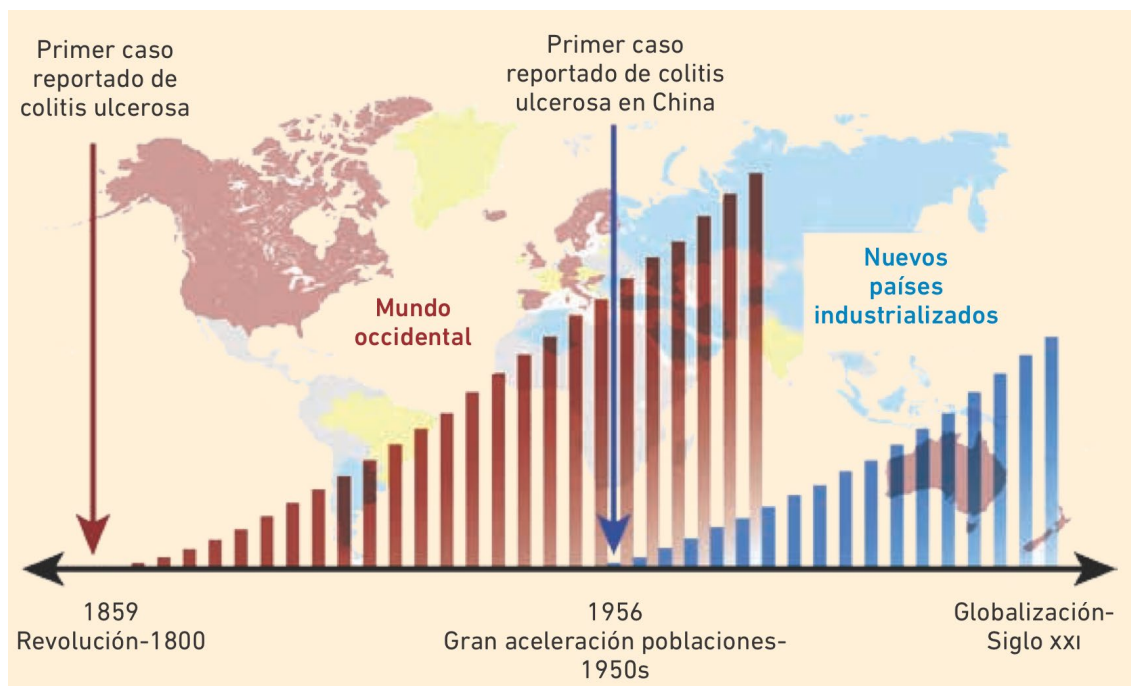


Figura 1. Evolución de incidencia en el mundo: países desarrollados vs en desarrollo (Kaplan, 2017).

Se sabe que la incidencia de la EII varía considerablemente de unas áreas geográficas a otras, de tal manera que la tasa de incidencia de la colitis ulcerosa (CU) oscila entre los 0,5 y los 24,5 casos por 100.000 habitantes y año ($0,5-24,5 \times 10^5$ h/a), mientras que la de la enfermedad de Crohn (EC) lo hace entre los 0,3 y los 20×10^5 h/a (Molodecky, 2012).

España es el país donde se ha publicado un mayor número de estudios prospectivos y poblacionales de incidencia, con cifras similares a las referidas en el resto de los países europeos. Informes procedentes de estudios previos indicaban tasas de incidencia para la enfermedad de Crohn de 3,5-9,5 casos/100.000 habitantes/año. Cifras más altas fueron informadas en Oviedo en los años 2000-2002 (7,5/100.000 habitantes/año para la EC) y en Vigo, dentro del registro EpiCOM (cifras de incidencia de EC de 10,8/100.000). En el último estudio a gran escala sobre epidemiología de la EII promovido desde GETECCU, con la participación de 108 hospitales y un área de referencia de 22.216.018 habitantes, en el año 2017 se diagnosticaron 3.611 nuevos casos de EII (50 % de CU, 46 % de EC y 4 % de CI), lo que sitúa la tasa de incidencia de EII en España en 16 casos por cada 100.000 habitantes/año (7,5 para EC, 8 para CU y 0,5 para CI). Estos datos son ya similares a los obtenidos en el resto de Europa (Chaparro, 2019).

En la Enfermedad de Crohn no hay diferencias entre hombres y mujeres, y se suele presentar entre los 15 y 35 años (algunos estudios han encontrado un segundo pico de diagnóstico alrededor de los 60 años), aunque un porcentaje relevante, entre el 7 y el 20%, se diagnostica en la edad pediátrica. Si la edad de aparición es muy temprana, siempre habrá que tener presente una importante carga genética.

Es necesario resaltar los datos disponibles de la población pediátrica. La incidencia de la EII en este grupo de edad ha sido tradicionalmente baja, y los datos disponibles son escasos. El registro SPIRIT (Martín-de-Carpi, 2013), describe el cambio de patrón de la enfermedad pediátrica en nuestro país. Los autores recogen, de manera retrospectiva, todos los casos diagnosticados de EII, en pacientes menores de 18 años, en 78 centros españoles entre los años 1996 y 2009, y observan un aumento de casi 3 veces en las cifras de incidencia en los últimos 14 años, en especial de la EC.

En definitiva, con los datos disponibles en España parece que existe un aumento de las tasas de incidencia de ambas enfermedades con respecto a décadas previas, siendo la proporción CU/EC cercana a 1. Destacan tasas similares en algunas zonas a las descritas en los países del norte de Europa y un aumento exponencial en la edad pediátrica. La mortalidad en EII parece no diferir de la población general. Por ello, dado que la incidencia excede a la mortalidad, la prevalencia seguirá aumentando y para 2028 se estima que se situará en 1 de 98 (1%). De forma similar, en 2028, el número de pacientes con EII mayores de 40 años superará a toda la población actual con EII, y la mayoría de ellos tendrá más de 50 años (Jones, 2019). Hoy en día, las EII (y por tanto, la EC) constituyen ya un problema de salud mundial, lo que supone un desafío creciente para los sistemas sanitarios.

1.1.3. PATOGENIA ENFERMEDAD DE CROHN

La patogenia de la enfermedad de Crohn no se conoce por completo. No obstante, existen suficientes evidencias para afirmar que es el resultado de la interacción entre la susceptibilidad genética, los factores ambientales y el microbioma intestinal, resultando en una respuesta inmune aberrante acompañada por una función de la barrera epitelial comprometida (Torres, 2016). En este sentido, se ha descrito el incremento de bacterias adherentes en la superficie mucosa de pacientes con EC, lo cual disminuye la capacidad para limitar el contacto directo entre el epitelio y la microbiota y facilita una sobreactivación de la respuesta inmune del huésped (Swidsinski, 2005).

En primer lugar, un 12% de los pacientes diagnosticados presenta una historia familiar de enfermedad de Crohn. Los judíos askenazíes presentan un riesgo entre tres y cuatro veces superior de desarrollar dicha patología con respecto a otras poblaciones no judías, mientras los asiáticos se asocian con un riesgo menor (Moller, 2015). De este modo, la realización de estudios GWAS (Genome-Wide Association Studies) ha permitido la identificación de más de 200 alelos asociados con enfermedad inflamatoria intestinal, de los cuales 37 son específicos de enfermedad de Crohn. El descubrimiento de genes asociados con detección bacteriana, autofagia e inmunidad innata, así como otros relacionados con funciones de células Th17 (*NOD2*, *ATG16L1*, *LRRK2*, *IRGM*, *IL23R*, *HLA*, *STAT3* o *JAK2*) y regulación de la barrera intestinal (*MUC2*), señala a la

homeostasis entre el sistema inmune y las comunidades bacterianas como un factor crucial en la patogenia de la enfermedad de Crohn. Ejemplo de esto, tenemos el gen NOD2, el primer gen identificado asociado a susceptibilidad en el desarrollo de Enfermedad de Crohn (Ogura, 2001), se expresa principalmente en células de Paneth, cuyo papel en la mucosa intestinal es la producción de péptidos antimicrobianos, como las defensinas, que estimulan la respuesta inmune del hospedador tras el reconocimiento de componentes de la pared celular microbiana. Los pacientes con mutaciones en NOD2 muestran niveles más bajos de IL-10, una importante citocina antiinflamatoria, y un aumento de bacterias adherentes a la mucosa intestinal, actinobacterias, proteobacterias y *Enterobacteriaceae*, mientras que disminuyen grupos de *Clostridium* XIVa y IV (Philpott, 2009).

Sin embargo, solamente un 13,1% de la herencia de la enfermedad es explicada mediante variaciones genéticas, destacando la importancia de la epigenética u otros factores ambientales (Matricon, 2010; Mcgovern, 2015). Adicionalmente, la lactancia materna, la vida en granjas o el contacto durante la infancia con animales, han sido identificados como factores ambientales protectores en la enfermedad de Crohn (Ananthakrishnan, 2015). Asimismo, ser fumador, la exposición a antibióticos durante la infancia, una dieta reducida en fibra, un aumento en la ingesta de grasas saturadas u otros nutrientes (como vitamina D, zinc o hierro), se han relacionado con un riesgo superior de desarrollar dicha patología. Sin embargo, diversos autores han resaltado el papel de dichos factores ambientales para, a su vez, ser capaces de modular el microbioma intestinal (Bernstein, 2008; Ananthakrishnan, 2015; Piovani, 2019). Por último, el efecto del estrés en la EII está mediado principalmente por la señalización del factor de liberación de corticotropina (CRF). La señalización de CRF puede actuar en los tejidos periféricos, incluidos el estómago, el páncreas, el intestino delgado y los linfocitos. La activación de la hormona liberadora de corticotropina se ha asociado con la inflamación de la mucosa del colon y el aumento de la permeabilidad intestinal en pacientes con EC o CU, lo que sugiere la implicación del estrés en la fisiopatología de la EII (Rea, 2016). La activación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) inducida por el estrés, las alteraciones en los neurotransmisores y la activación de la función inmune pueden modular la composición y el metabolismo de la microbiota, así como la permeabilidad intestinal, otorgando un papel al estrés en la disfunción de la microbiota intestinal en la fisiopatología de la EII (Ianiro, 2014).

1.1.4. TRATAMIENTO EN ENFERMEDAD DE CROHN (EC)

Las EII: EC y la CU, suelen presentar un curso crónico, recidivante e incapacitante (Peyrin-Biroulet, 2012). Las causas sólo se conocen parcialmente, por ello sigue siendo una enfermedad no curable ni médica ni quirúrgicamente.

Los distintos tratamientos de que se dispone para el manejo de la EII no biológicos (aminosalicilatos, esteroides, antibióticos, pre/probióticos e inmunomoduladores) han tenido como objetivo el control de los síntomas, mejorar la calidad de vida y evitar complicaciones (Lichtenstein, 2004), pero cada vez más se tiende a exigir a los tratamientos que sean capaces de inducir la curación de las lesiones con la esperanza de modificar la historia natural de la enfermedad (Vermeire, 2007). La llegada de los biológicos como los agentes anti-factor de necrosis tumoral α (anti-TNF- α) (infliximab, adalimumab y golimumab) han cambiado drásticamente la forma de tratar la EII y el curso de la enfermedad (menos cirugías, menos hospitalizaciones, mejor calidad de vida, economizador de esteroides, una mayor remisión clínica y las tasas de curación de la mucosa en EC y UC), como la vida de los pacientes (calidad de vida y productividad en el trabajo) (Feagan, 2008).

Hoy en día el tratamiento de la EII se basa en un doble planteamiento: inducción y mantenimiento de la remisión. Mientras el primero tiene por objetivo reducir la actividad inflamatoria del proceso (y, por tanto, la desaparición de los síntomas y la recuperación de la calidad de vida), el segundo pretende fundamentalmente evitar la recidiva clínica y prevenir el desarrollo de complicaciones.

En la enfermedad de Crohn, la introducción precoz del tratamiento con infliximab y azatioprina como inducción (estrategia top-down) se ha demostrado superior en términos de remisión mantenida libre de esteroides, curación mucosa y menor hospitalizaciones respecto a la estrategia convencional de utilizar los fármacos biológicos como segunda línea tras fracaso de los inmunomoduladores (Lémman, 2006; Colombel, 2010).

Cada vez se tiende más a la introducción “precoz” de fármacos inmunosupresores y biológicos con el fin de intentar cambiar el curso natural de la enfermedad. El concepto “EC precoz”, se refiere a pacientes con menos de 18 meses de

evolución de su enfermedad, que nunca se han tratado con agentes biológicos ni inmunomoduladores y con patrón inflamatorio puro y que por tanto son pacientes que presentan un “daño intestinal” potencialmente reparable mediante tratamiento farmacológico (Pariente, 2011). En estos pacientes la estrategia top-down podría modificar el curso natural de la enfermedad.

Toda esta evidencia ha dado lugar a una utilización creciente y más precoz de agentes biológicos en los pacientes con EC, como lo demuestran estudios epidemiológicos (Gisbert, 2014), constituyendo un pilar básico en el manejo de esta enfermedad en la práctica clínica habitual. Utilizados tanto para la inducción como para el mantenimiento de estados de remisión, permitiendo el control de los síntomas y una mejora en la calidad de vida, así como cambios en el transcurso natural de la enfermedad con menor número de ingresos y cirugías a partir de su potente acción antiinflamatoria mediante el bloqueo de la citoquina TNF e inducción de apoptosis de células inmunes específicas (Torres, 2016; Monif, 2018; Na, 2019).

1.1.4.1. TERAPIA ANTI-TNF: *Infliximab (Remicade®), Inflectra®, Remsima®) y Adalimumab (Humira®, Hyrimoz®, Imraldi®)*

El infliximab es un anticuerpo monoclonal quimérico recombinante producido por células de mieloma de ratón formado por la región constante de IgG1 humana y regiones variables de ratón, mientras que adalimumab se trata de un anticuerpo monoclonal IgG1 completamente humanizado.

Estos anticuerpos se unen tanto al factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) de membrana como al TNF soluble y bloquean la unión a sus receptores solubles y de membrana. La concentración máxima se alcanza a la hora de la administración con infliximab y a los 5 días con adalimumab y su vida media es aproximadamente 9 días con infliximab y de 14 días con adalimumab.

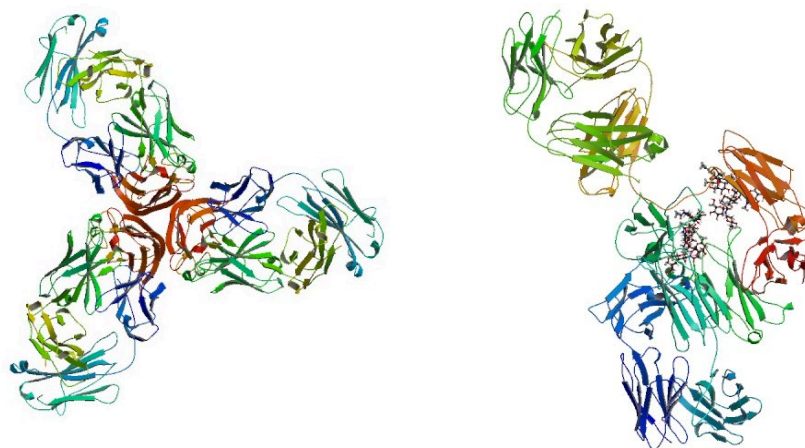


Figura 2. Estructura molecular del Infliximab (izquierda) y Adalimumab (derecha)

El uso de infliximab en la EC se aprobó en Europa en 1999 y de adalimumab en 2003. Desde entonces se han realizado múltiples ensayos clínicos que han ido modificando el tratamiento de estos fármacos en la práctica clínica. En la actualidad están aprobados en la EC luminal y fistulizante tanto en adultos como en población pediátrica y para el tratamiento de la Colitis Ulcerosa.

Su posología varía, infliximab se ajusta al peso del paciente, a razón de 5 mg/kg en perfusión intravenosa, durante un período de 2 horas, en las semanas 0, 2 y 6 al inicio y posteriormente continuación con una perfusión cada 8 semanas; mientras que adalimumab no se ajusta a peso en adultos y la administración es subcutánea, 160 mg en primera dosis, 80 mg en semana 2 y después 40 mg cada 2 semanas.

En la actualidad hay documentados más de 1,8 millones de pacientes con EII que han recibido infliximab, con un rango de seguridad más que aceptable, teniendo en cuenta la eficacia del fármaco en el control de enfermedades con una alta carga de morbilidad, como es la enfermedad de Crohn (Khanna, 2015).

En los ensayos clínicos de ambos fármacos, entre los eventos adversos (EA) significativos, el más frecuente fue la infección del tracto respiratorio. Los EAs más graves asociadas con el uso de bloqueantes del TNF notificadas son reactivación del VHB, insuficiencia cardíaca congestiva, infecciones graves (como septicemia, infecciones oportunistas y tuberculosis), enfermedad del suero (reacciones de hipersensibilidad retardada), reacciones hematológicas, el lupus eritematoso

sistémico/síndrome pseudolúpico, enfermedades desmielinizantes, acontecimientos hepatobiliares, linfomas, linfoma de células T hepatoesplénico (HSTCL), leucemia, carcinoma de células de Merkel, melanoma, neoplasias pediátricas, sarcoidosis/reacción similar a sarcoidosis, abscesos intestinales o perianales (en la enfermedad de Crohn), y reacciones graves a la perfusión en el caso de infliximab (Ficha técnica Remicade ®, 2014, ficha técnica Humira ®, 2015).

En el el caso de adalimumab la proporción de pacientes que interrumpió el tratamiento debido a reacciones adversas durante la fase doble ciego y controlada de los ensayos pivotaes fue del 5,9% para los pacientes tratados y 5,4% para el grupo control. Con infliximab, aproximadamente el 3% de los pacientes interrumpió el tratamiento por reacciones relacionadas con la perfusión y todos los pacientes se recuperaron con o sin necesidad de tratamiento. En la experiencia post comercialización, los casos de reacciones anafilácticas, incluido el edema laríngeo/faríngeo y el broncoespasmo severo, y las crisis convulsivas se han asociado con la administración de infliximab.

Las reacciones de hipersensibilidad tardía han sido poco frecuentes. Los signos y síntomas incluyeron mialgia y/o artralgias con fiebre y/o rash, y algunos pacientes experimentaron prurito, edema facial, de la mano o labial, disfagia, urticaria, dolor de garganta y cefalea.

1.2 MICROBIOTA INTESTINAL

1.2.1 DEFINICIONES

La **microbiota** se define como una comunidad de microorganismos vivos los cuales ocupan un lugar particular o hábitat. Incluye bacterias, hongos, arqueas, virus y otros microorganismos. Asimismo, el **microbioma** hace referencia a todo el hábitat, incluidos los microorganismos involucrados (bacterias, arqueas, eucariotas inferiores/superiores y virus), así como al conjunto de sus actividades y genomas (Human Microbiome Project Consortium, 2012; Amon, 2017). Las alteraciones en la composición, diversidad y funciones de la microbiota intestinal se definen de una manera genérica como **disbiosis intestinal**. El concepto de disbiosis implica que un

desequilibrio en el ecosistema microbiano interrumpe la homeostasis inmune (Iebba, 2016).

A nivel técnico, cuando se realiza la estandarización de la microbiota mediante técnicas ómicas con un fragmento de un gen que permite la sofisticación (adscripción taxonómica) de la población bacteriana, se conoce de forma genérica como la **Identificación Taxonómica del Microbioma Bacteriano** (figura 3). Se utiliza el concepto **metagenoma** (Marchesi, 2015) cuando la caracterización de la microbiota se realiza secuenciando todo el contenido de ADN (sin un gen diana), es decir, incluyendo el ADN de protozoos, zooplancton, fitoplancton, bacterias y virus de ADN.

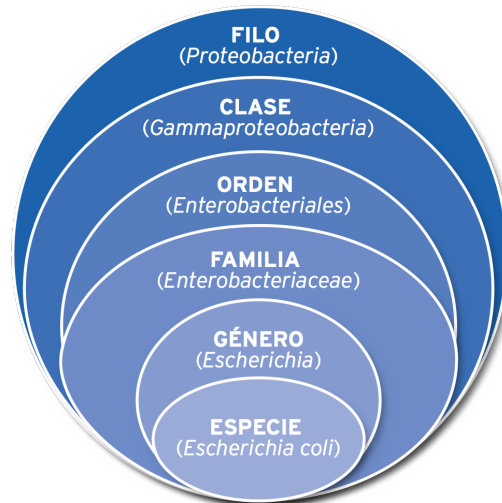


Figura 3. Ejemplo de la categoría taxonómica de Escherichia Coli

1.2.2 COMPOSICIÓN Y ENTEROTIPOS

A partir de los datos obtenidos de la combinación de dos proyectos metagenómicos a gran escala el MetaHIT (*European Metagenomics of the Human Intestinal Tract*) y HMP (*Human Microbiome Project*), enfocados al análisis de la microbiota presente en el intestino humano sano, la microbiota intestinal está compuesta por más de 10^{18} microorganismos diferentes, la gran mayoría son bacterias, con unas 1.100 especies más prevalentes, de las cuales se estima que unas 160 especies

de bacterias son específicas de cada individuo (Qin, 2010). Las especies bacterianas son clasificadas en 12 filos diferentes, de los cuales más del 90% pertenecen a *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*, junto con una elevada biodiversidad, dificultando la caracterización del microbioma intestinal correspondiente a individuos sanos (Arumugam, 2011; Human Microbiome Project Consortium, 2012). *Firmicutes* y *Bacteroidetes* representan más del 90% de la población bacteriana en el colon, donde la densidad bacteriana es mayor. Por otro lado, las *Actinobacteria* y *Proteobacteria* están presentes regularmente, pero en baja abundancia (Tap, 2009; Walter, 2011).

Para complicarlo aún más, se sabe que existe un porcentaje significativo de la microbiota que se modifica ante múltiples circunstancias, como la edad, la alimentación, los antibióticos, el estrés y las enfermedades. Por tanto, no existe una descripción sencilla de dichas estructuras, aunque debido a la evidencia de su importancia, ha generado un elevado interés la identificación de patrones relacionados con los estados de salud y las patologías del ser humano, pudiendo incluso derivar en el desarrollo de diagnósticos y terapias basados en la microbiota, así como sus implicaciones en intervenciones nutricionales o farmacéuticas (Young, 2017). Con este objetivo, se han establecido una serie de patrones reproducibles de variación del microbioma intestinal en adultos sanos, mostrando una serie de agrupaciones características bacterianas conocidas como enterotipos (Arumugam, 2011). Diversos estudios han propuesto la existencia de tres enterotipos de “normalidad”, denominados con respecto al principal taxón, en torno al cual se establece una red de coocurrencia integrada por el resto de microorganismos. En concreto, en el enterotipo 1 (ET B) predomina la representación de *Bacteroides*, el enterotipo 2 (ET P) se caracteriza por la elevada abundancia de *Prevotella* de forma inversamente correlacionada con *Bacteroides*, y el enterotipo 3 (ET F) se distingue por la presencia de *Firmicutes*, destacando el género *Ruminococcus* (Arumugam, 2011; Costea, 2018). Cualquier otra combinación de géneros clave o géneros no descritos por Arumugam y colaboradores, junto con una reducción en biodiversidad se considerará disbiosis (Zuo, 2018). Esta disbiosis, marcada principalmente por una reducción en biodiversidad y abundancias de los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, así como un incremento en *Proteobacteria*, parece un patrón característico de diferentes estados de enfermedad con respecto a individuos sanos (Collins, 2014).

Por otro lado, el microbioma es dinámico y presenta numerosos cambios debidos al desarrollo, edad, género, geografía, origen cultural, factores ambientales (entre ellos la dieta o el uso de antibióticos) y, en especial, como respuesta ante determinadas enfermedades humanas (Ursell, 2012; Amon 2017; Young, 2017). Los cambios más dramáticos en su composición ocurren durante la infancia, donde numerosos estudios indican que el microbioma de recién nacidos varía en función de la edad gestacional, tipo de parto, tipo de lactancia, estado nutricional materno o toma de antibióticos y estos cambios perduran al año del nacimiento (Aagaard, 2012; Avershina, 2014; Jakobsson, 2014). En las primeras etapas de desarrollo, la microbiota es generalmente baja en diversidad y está dominada por dos filos principales, Actinobacteria y Proteobacteria (Bäckhed, 2011; Rodríguez, 2015). Durante el primer año de vida, la diversidad microbiana aumenta y la composición de la microbiota converge hacia un perfil microbiano distintivo similar al del adulto con patrones temporales que son únicos para cada bebé (Palmer, 2007). Alrededor de los 2,5 años de edad, la composición, diversidad y capacidades funcionales de la microbiota infantil se asemejan a las de la microbiota adulta (Koenig, 2011; Rodríguez, 2015). Aunque en la edad adulta la composición de la microbiota intestinal es relativamente estable, todavía está sujeta a perturbaciones por eventos de la vida, como dieta, antibióticos, contaminación, estrés etc., comentados anteriormente (Dethlefsen, 2011). En individuos mayores de 65 años, la comunidad microbiana cambia, con una mayor abundancia de Bacteroidetes y Clostridium del grupo IV, en contraste con los sujetos más jóvenes donde es el grupo XIV el más frecuente (Claesson, 2011). En general, la capacidad de la microbiota para llevar a cabo procesos metabólicos, como la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs, *Short-Chain Fatty Acids*) y vitaminas, se reduce en los ancianos mientras que la actividad proteolítica aumenta (Woodmansey, 2004). Dada la creciente evidencia del papel de los SCFAs como mediadores metabólicos e inmunes clave, se ha postulado que la disminución de los SCFAs puede nutrir el proceso de envejecimiento inflamatorio en el intestino de las personas de edad avanzada (Biagi, 2013) (Figura 4).

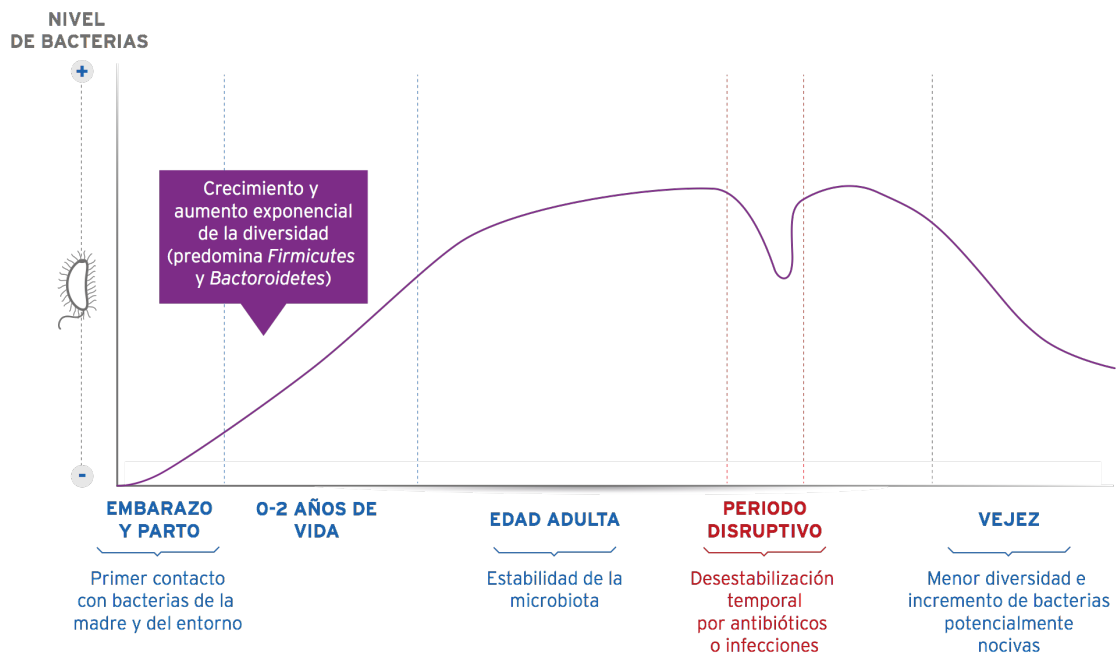


Figura 4. Cambios microbiota a lo largo de la vida.

La dieta tiene un efecto determinante sobre el microbioma intestinal. Se ha demostrado una asociación entre riesgo reducido de EII y una dieta rica en frutas y verduras, y un riesgo elevado de EII entre quienes consumen dietas ricas en grasas animales y azúcares refinados (David 2014; Rios-Covian, 2016). Además, las fibras dietéticas pueden convertirse en SCFA mediante la fermentación de azúcares por bacterias anaerobias en el intestino, permitiendo la regulación de la expresión de genes involucrados en la proliferación, diferenciación y apoptosis de las células epiteliales intestinales, además de influir en la composición de la microbiota intestinal y en la respuesta inflamatoria del huésped (Ungaro, 2014).

A continuación, se detallan los principales filos bacterianos que se encuentran en la microbiota intestinal humana:

El filo *Bacteroidetes* está compuesto por bacterias anaerobias y aerobias, no formadoras de esporas, Gramnegativas. Dentro de este filo, el género *Bacteroides* es uno de los grupos más predominantes en el intestino (Rajilic-Stojanovic, 2014). Estas bacterias son bien conocidas por digerir polisacáridos complejos que son resistentes a las enzimas digestivas del huésped (Thomas, 2011). La degradación de estos

carbohidratos complejos produce la liberación de SCFAs volátiles, como acetato, propionato y butirato, que el huésped reabsorbe como energía. Además, los SCFAs se han implicado en la regulación del crecimiento de las células epiteliales intestinales (Levy, 2015) y en la diferenciación y estimulación del sistema inmune (Smith, 2013), con efecto antiinflamatorio, entre otros procesos biológicos importantes. Aunque el género *Bacteroides* suele ejercer un papel beneficioso para el huésped, determinados miembros de este género, si se diseminan pueden generar un efecto perjudicial. Por ejemplo, *Bacteroides fragilis* se encuentra típicamente en la luz del tracto gastrointestinal inferior y se ha demostrado que tiene efectos beneficiosos, como estimular el desarrollo inmunitario del huésped (Mazmanian, 2006); sin embargo, si atraviesa la mucosa intestinal y penetra en el torrente sanguíneo puede estar implicado en abscesos abdominales y sepsis (Wexler, 2007).

El filo *Firmicutes* está compuesto por bacterias anaerobias obligatorias y facultativas. La mayoría de los miembros son Grampositivos y la mayoría pueden formar endosporas. Estas endosporas son estructuras latentes y no reproductivas a las que la bacteria puede reducirse cuando se encuentra con el estrés ambiental, permitiéndole sobrevivir en condiciones extremas y reactivarse en su estado metabólicamente activo cuando el ambiente se vuelve favorable. La clase *Clostridia* dentro de este filo representa la mayoría de los organismos que residen en el tracto intestinal y han sido implicados en una serie de funciones beneficiosas. Se cree que estas bacterias se encuentran principalmente entre los pliegues de la mucosa para establecer una relación con las células epiteliales intestinales y contribuir a su mantenimiento (Nava, 2011). Las especies dentro de estos grupos son bien conocidas por liberar butirato como producto final de la fermentación, que al igual que los SCFAs producidos por *Bacteroides* spp., promueven la salud epitelial intestinal. Además, los miembros de estos grupos promueven la homeostasis inmune del huésped en el intestino al inducir células T reguladoras del colon (Lopetuso, 2013). Sin embargo, existen otros grupos de la clase *Clostridia*, como son *C. perfringens*, *C. tetani* y *C. difficile*, que actúan como patógenos (Collins, 1994).

El filo *Actinobacteria* está compuesto por bacterias aerobias y anaerobias. Al igual que los *Firmicutes*, este filo también está compuesto de bacterias Grampositivas. Dentro de este filo, *Bifidobacteria* spp. son uno de los principales géneros de bacterias

que residen en el tracto intestinal (Rajilic-Stojanovic, 2014). Se ha considerado que ciertas especies dentro de este género, incluido *B. longum*, tienen efectos probióticos y son comercializados para tal fin en la actualidad. Éstos se han implicado en funciones defensivas mediante la protección que confieren contra otros patógenos a través de diversos procesos que incluyen la exclusión competitiva, la actividad de la hidrolasa de sales biliares, la modulación inmune y su capacidad de adherirse a la capa mucosa o al epitelio intestinal (Buffie, 2013).

El filo *Proteobacteria* abarca una amplia variedad de bacterias Gramnegativas, pero en conjunto suponen una baja proporción en el conjunto de la microbiota intestinal en condiciones de salud. Algunas investigaciones sugieren que la mayor prevalencia de *Proteobacteria* en la comunidad microbiana puede servir como una posible firma diagnóstica de disbiosis y riesgo de enfermedad (Shin, 2015). Específicamente, la familia *Enterobacteriaceae*, contiene patógenos que incluyen *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. que normalmente son de baja abundancia, pero tienen el potencial de sobrecrecimiento y dominación intestinal durante la disbiosis (Taur, 2013).

1.2.3 TÉCNICAS DE ESTUDIO MICROBIOTA

Numerosas tecnologías se han aplicado con el objetivo de examinar varios aspectos del microbioma intestinal. En cuanto a su análisis estructural, diversos métodos pueden ser empleados en la determinación de la estructura correspondiente a comunidades microbianas. Las técnicas de cultivo tradicionales han sido útiles en la determinación de microorganismos persistentes en el intestino, aunque se encuentran limitadas a causa de la elevada proporción de comunidades microbianas, las cuales no pueden ser cultivadas y sus contaminaciones (Ellermann, 2016). No obstante, la capacidad y el coste de la investigación de la microbiota ha mejorado notablemente en los últimos años, debido principalmente a los avances en las tecnologías de secuenciación masiva (sistemas NGS, Next-Generation Sequencing). Dichas técnicas permiten la obtención de información de interés de manera rápida, eficiente e incluso barata, en la mayoría de ocasiones a través de la secuenciación del gen de la subunidad 16S ribosomal de procariontes. De este modo, las nuevas plataformas de Illumina permiten rendimientos de hasta un millón de lecturas correspondientes a amplicones del gen ARNr 16S por cada muestra, dependiendo del multiplexado seleccionado. Entre sus ventajas destaca la obtención de información sobre la presencia y abundancia relativa de

taxones específicos, mientras no permite la distinción de microorganismos vivos y su resolución taxonómica es limitada frecuentemente a nivel de género (Ellermann, 2016; Di Bella, 2013).

Adicionalmente, nuevas técnicas han emergido con la intención de comprender el impacto funcional del microbioma en fenotipos determinados. Por ejemplo, la secuenciación metagenómica presenta un mayor coste con respecto a la secuenciación de ARNr 16S y no identifica aquellos genes activados, al contrario de la metatranscriptómica. Por otro lado, la proteómica y metabolómica establecen moléculas potencialmente responsables del estado fisiológico del hospedador, a pesar de no poder distinguir su origen microbiano o humano. Finalmente, los estudios mediante el empleo de gnotobióticos (animales de microbiota conocida a partir de su obtención de animales libres de microorganismos) facilitan la determinación del impacto funcional de una comunidad microbiana conocida, aunque presentan costes elevados y unas condiciones fisiológicas iniciales distintas a las presentes en animales con un microbioma intestinal normal (Debelius, 2016; Ellermann, 2016).

1.2.4 FUNCIONES EN CONDICIONES NORMALES

Los proyectos metagenómicos centrados en el estudio del microbioma intestinal han permitido estimar tanto la presencia de 3,3 millones de genes codificantes únicos en dichas comunidades microbianas con respecto al genoma humano, como los genes que expresan diferentes metabolitos involucrados en múltiples funciones beneficiosas para nuestro organismo (Arumugam 2011, Human Microbiome Project Consortium, 2012; Methé, 2012).

Las funciones esenciales de la microbiota intestinal en el hospedador se pueden clasificar en metabólicas, defensivas y tróficas (figura 5).

Las funciones metabólicas de la microbiota son múltiples desde catabolismo y bioconversión de moléculas complejas hasta la síntesis de nutrientes elementales, incluyendo vitaminas (sobre todo del grupo B, como folato y vitamina K) y aminoácidos esenciales, que el metabolismo humano es incapaz de producir (Amon, 2017; Young, 2017). Producen la fermentación de carbohidratos complejos vegetales donde las bacterias intestinales producen SCFAs, fuente de energía preferida por los

colonocitos, y, además, presentan un amplio rango de efectos fisiológicos, tales como actividades defensivas, antiinflamatorias o antitumorales (Wong, 2006). Continuando con el metabolismo entre la microbiota intestinal normal y su hospedador, otra actividad estudiada es la conversión de sales y ácidos biliares. Estos compuestos, sintetizados en el hígado y secretados como sales biliares conjugadas, pueden sufrir modificaciones bacterianas para la producción de ácidos biliares secundarios, afectando al metabolismo de lípidos y colesterol. Por ello, se han estudiado como un tratamiento potencial en varios desórdenes metabólicos (Fiorucci, 2015; Whalström, 2016). Asimismo, también se ha relacionado el microbioma con el metabolismo de moléculas pequeñas, pudiendo afectar a la biodisponibilidad de ciertos fármacos orales, por ejemplo, la capacidad de *Eggerthella lenta* para la reducción de digoxina, un glucósido cardiotónico (Haiser, 2013).

Asimismo, el microbioma intestinal también aporta funciones defensivas a través de su protección frente a la colonización de microorganismos potencialmente patogénicos, posiblemente debido a una combinación de actividades metabólicas, efecto barrera, competición directa por nutrientes y efectos inmunes (Lawley, 2013). Un claro ejemplo es la infección por *C. difficile*, bacteria que tras la toma de antibióticos y la alteración importante en el equilibrio de la microbiota, puede adquirir una posición dominante y producir toxinas, generando una enfermedad que puede ser grave, la colitis pseudomembranosa. Finalmente, la microbiota puede modificar respuestas epiteliales y sistémicas, así como el desarrollo y actividad del sistema inmune.

Dentro de las funciones tróficas, cabe destacar el papel de la microbiota en el desarrollo y maduración del sistema inmunitario. Los animales *germ-free* (criados en ambientes completamente estériles, sin contacto con microorganismos ni colonización microbiana de ningún tipo) muestran un desarrollo anormal y atrófico del sistema inmune tanto de mucosas como sistémico. El intestino humano constituye la principal barrera de contacto con el medio externo y, es en él, donde se generan los fenómenos de reconocimiento inmunológico en la primera etapa de la vida cuando el sistema inmunológico se está desarrollando. De este contacto y maduración dependerá que el sistema inmune sea capaz de distinguir entre patógenos potenciales y microbiota saprofita, así como tolerar a múltiples antígenos del medio externo, incluidos los alimentarios. Una microbiota anómala en los primeros años de edad, se relaciona con un

desarrollo inmunológico alterado, poco tolerante y un aumento del riesgo de desarrollo de enfermedades autoinmunes.

Por tanto, se sabe que la microbiota intestinal tiene un papel clave en la digestión, absorción de nutrientes y en la defensa inmunitaria en nuestro organismo, pero cada vez más, se está viendo la influencia de ésta en funciones tan diversas como endocrinas, afectando incluso al funcionamiento del sistema nervioso central. El intestino y el cerebro están conectados a través de un sinfín de vías de comunicación utilizadas por metabolitos bacterianos y transmisores. Así pues, no es de extrañar que incluso trastornos mentales y del desarrollo neurológico, como por ejemplo la depresión, la ansiedad y el autismo, puedan estar relacionados con la disbiosis de la microbiota intestinal (Martin, 2018).

Por todo ello, los estudios citados anteriormente refuerzan la necesidad de una simbiosis precisa entre las comunidades microbianas presentes en el intestino humano y sus correspondientes hospedadores. Sin embargo, cualquier disrupción de dichas relaciones puede presentar efectos potencialmente negativos para ambos, en especial el cuerpo humano, mediante el desarrollo de diversas patologías (Young, 2017).

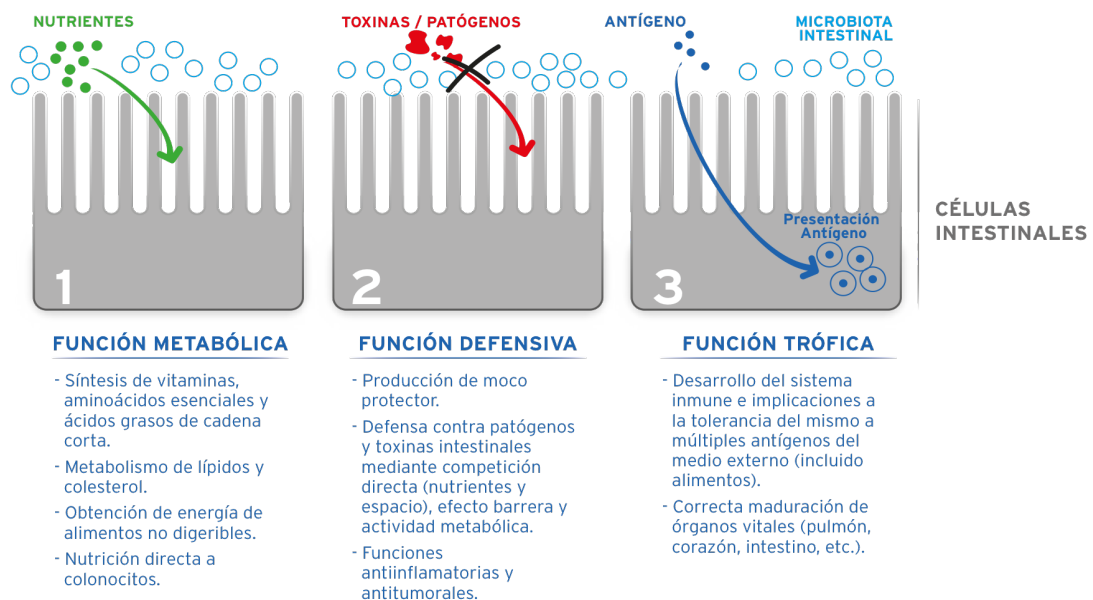


Figura 5. Funciones de la microbiota intestinal en el hospedador

1.2.5 MICROBIOTA INTESTINAL Y ENFERMEDAD

En los últimos años, numerosas evidencias científicas relacionan al microbioma y su potencial metabólico con diversos estados patológicos, originando nuevas estrategias terapéuticas para controlar y regular este ecosistema. Por tanto, el estudio del microbioma es actualmente un campo de rápido avance científico partiendo de la premisa de que una microbiota “sana” es necesaria para alcanzar un estado de salud adecuado (Derovs, 2019). En los últimos años, se ha relacionado la existencia de múltiples enfermedades con la disbiosis intestinal, definida como la pérdida del equilibrio microbiano de la microbiota normal, debido a cambios cuantitativos o cualitativos de su composición, cambios en su funcionamiento o actividades metabólicas, o bien, a cambios en su distribución (Iebba, 2016). Enfermedades tan diferentes como son diabetes, enfermedad cardiovascular, enfermedad hepática, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable, esclerosis múltiple, autismo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica (Tojo, 2014). Todas estas enfermedades tienen características particulares, pero una de las características definitorias comunes es la inflamación crónica, donde la microbiota contribuye con la síntesis de productos proinflamatorios y la alteración en la regulación del sistema inmune (Li, 2016) (Figura 6).

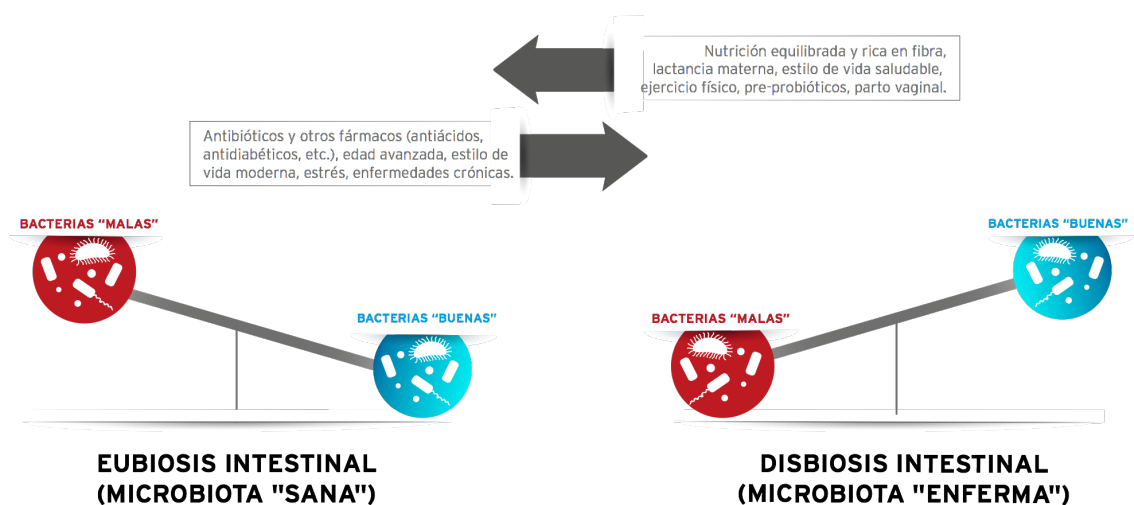


Figura 6. Importancia del equilibrio de la microbiota intestinal.

1.3 MICROBIOTA Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

1.3.1 MICROBIOTA EN ENFERMEDAD DE CROHN

Si existe una enfermedad en la que existe más certeza del papel de la microbiota en el desarrollo/aparición de la misma, es en la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Es verdad, que, a día de hoy, no se ha conseguido identificar definitivamente ningún patógeno específico como desencadenante, pero si conocemos que para que se desarrolle la enfermedad, debe existir una disbiosis o cambio definitivo de la microbiota intestinal “normal”, siendo probablemente éste, el evento definitivo en el desarrollo de la enfermedad de Crohn. Se desconoce a día de hoy si la disbiosis es causa o consecuencia del desarrollo de la EC. Parece que la suma de una predisposición genética y la alteración de la microbiota intestinal son el desencadenante final de un proceso inflamatorio intestinal crónico tipo EII. En concreto, sabemos que la enfermedad se desarrolla, en sujetos genéticamente susceptibles, por una disregulación de la homeostasis entre la microbiota comensal y/o otros elementos ambientales y una respuesta inmune alterada del paciente. Un error en la interpretación del estímulo o en la regulación de la respuesta inmune, que conduce a un desequilibrio entre los factores pro- y anti-inflamatorios, con una perpetuación del proceso inflamatorio (Manichanch, 2012).

Por ello, la microbiota intestinal juega un papel crucial en el desarrollo del sistema inmune y mantenimiento de la barrera epitelial intestinal. En condiciones normales, el sistema inmune intestinal es capaz de regular la microbiota mediante la producción de péptidos antimicrobianos y anticuerpos IgA tras la unión de antígenos a receptores de reconocimiento de patrones (PRR), tales como TLRs (toll- like receptors) y NLRs (NOD-like receptors). Los antígenos microbianos, los cuales estimulan constantemente el sistema inmune intestinal, se encuentran compartimentalizados del hospedador por unas capas de mucosa y una monocapa de células epiteliales intestinales. Dichas células desempeñan una función importante en la regulación de la homeostasis intestinal mediante el mantenimiento de tolerancia hacia bacterias comensales, mientras continúa su capacidad de responder frente a microorganismos patógenos (Foersch, 2013; Tomkovich, 2016). No obstante, en el estado patológico,

caracterizado por el daño en mucosas, dichos microorganismos consiguen penetrar y colonizar la barrera epitelial intestinal, generando los mecanismos proinflamatorios correspondientes, donde destaca la participación de ILCs (innate lymphoid cells). En concreto, el subgrupo ILC3s ha sido relacionado recientemente como la población de ILCs más diversa fenotípicamente, estableciendo redes dinámicas de interacciones con el microbioma, otras células inmunes, epitelio y neuronas entéricas, con el fin de asegurar la regulación de la homeostasis intestinal. Sin embargo, en el contexto de inflamación crónica, las ILC3s adquieren un fenotipo proinflamatorio, contribuyendo al mantenimiento de la enfermedad de Crohn y formando parte del sistema inmune característico de dicha patología, en el que participa tanto su parte innata como adaptativa (Foersch, 2013; Lewis, 2015; Ni, 2017).

Aunque los diferentes estudios metagenómicos centrados en evaluar los cambios en la composición de la microbiota intestinal muestran algunas diferencias, los resultados coinciden en una reducción generalizada de la biodiversidad, así como la disminución de la representación de varios taxones específicos, incluyendo *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, entre individuos con EII y un aumento en la abundancia relativa de *Enterobacteriaceae*, incluida *Escherichia coli*, y *Fusobacterium* (Frank, 2007; Joossens, 2011) (tabla 2).

Composición de la microbiota en enfermedad de Crohn comparado con sujetos sanos
Descenso de la diversidad alfa
Descenso de <i>Bacteroides</i> y <i>Firmicutes</i>
Descenso de <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
Descenso de <i>Clostridia</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i>
Presencia de <i>Fusobacterium</i>
Presencia de <i>Escherichia coli</i> adherente/invasiva
Aumento de <i>Gammaproteobacteria</i>
Función de la microbiota en enfermedad de Crohn comparado con sujetos sanos
Descenso de SCFA: butirato, propionato, acetato
Descenso de la biosíntesis de aminoácidos
Aumento de la auxotrofia
Aumento del transporte de sulfato
Aumento del estrés oxidativo
Aumento del transporte de aminoácidos
Aumento de la secreción de toxinas

SCFA: ácidos grasos de cadena corta.

Tabla 2. Composición y función de microbiota de microbiota en enfermedad de Crohn (Kostic, 2014)

Así pues, se ha documentado la existencia de un cambio o transición de la microbiota intestinal de “saprofita” a una microbiota con predominio de bacterias “patógenas” en la EII (Kaur, 2011). Así, existe evidencia acerca de un incremento significativo de las concentraciones de *E coli*, incluyendo las variantes patogénicas, en pacientes con EC con afectación ileal (Erickson, 2012). La mucosa ileal inflamada de pacientes con EC presenta una producción aumentada de $TNF\alpha$, cuando se compara con íleon normal, inducida por un aumento significativo de estas bacterias que estimulan la producción de TNF. Por otro lado, en la microbiota comensal existen numerosas bacterias que inhiben la liberación de TNF y otras citoquinas pro-inflamatorias, por ejemplo, bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), induciendo un potente efecto anti-inflamatorio en la mucosa intestinal. Diversos autores defienden que en la enfermedad de Crohn existe una reducción de estas bacterias productoras de AGCC como *Faecalobacterium prausnitzii*, al igual que una reducción en biodiversidad. Por el contrario, existe un incremento en filo *Proteobacterias* como *Escherichia coli* característico de pacientes con esta enfermedad respecto a individuos sanos (Collins, 2014; Lopez-Siles, 2014; Zuo, 2018). Además, *E coli* ECOR-26, se ha relacionado con la EC, induciendo un incremento en la liberación de TNF y un estímulo de la liberación de IL-10 (Da Silva, 215)

Hipótesis actuales a favor de una mayor liberación de $TNF\alpha$ inducida por una disbiosis intestinal abogan por que la recuperación de una microbiota menos patógena en la mucosa intestinal (menos inductora de liberación de TNF y otras citoquinas pro-inflamatorias) podría conducir a un mejor control de la enfermedad (Borruel, 2002).

1.3.2 TRATAMIENTO ENFERMEDAD CROHN CON ANTI-TNF Y MICROBIOTA INTESTINAL

A día de hoy la terapia anti-TNF es uno de los pilares terapéuticos en el manejo de la EC, pero con dichos fármacos, únicamente tratamos la consecuencia de la enfermedad y no la posible causa. Aproximadamente una cuarta parte de los pacientes

con EC serán no respondedores primarios a los agentes anti-TNF y una tercera parte de los respondedores presentarán pérdida de la misma en un futuro (Rajca, 2014). Por ello, para conseguir una mejor eficacia de la terapia se hace imprescindible estudiar el porqué estos pacientes no presentan una respuesta óptima.

Como hemos citado anteriormente, existe un incremento en filo *Proteobacterias* como *Escherichia coli* característico de pacientes con enfermedad de Crohn respecto a individuos sanos, que tras este tratamiento con anti-TNF se ha observado una disminución de abundancia de esta especie (Lopez-Siles, 2014). En esta línea, un estudio ha determinado la existencia de determinados perfiles microbianos específicos que se correlacionan con la recidiva de la enfermedad tras haber alcanzado la remisión con tratamiento con infliximab (Rajca, 2014), también se ha visto en varios estudios como la mayor abundancia de bacterias productoras de AGCC predijo la efectividad a infliximab (Magnusson, 2016; Zhou, 2018) y en otro se asoció esta mayor abundancia de bacterias productoras de AGCCs a una respuesta mantenida a este tratamiento (Wang, 2017).

2. RESUMEN DE LAS PUBLICACIONES PRESENTADAS

2. 1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El microbioma consiste en una estructura altamente compleja, involucrando miles de microorganismos pertenecientes a clasificaciones taxonómicas muy distintas y, por consecuencia, millones de relaciones entre ellos, suponiendo su estudio un gran desafío (Methé, 2012). Gracias a los avances en las tecnologías de secuenciación masiva se puede obtener de forma rápida y eficiente información sobre el genoma bacteriano a través de la secuenciación de regiones del gen de la subunidad 16S del RNA ribosomal de procariotas (Klindworth, 2013).

Actualmente el papel de la microbiota intestinal bacteriana ha sido descrito como factor clave en la patofisiología de la Enfermedad de Crohn (EC). Diversos estudios describen la disminución en biodiversidad y en la cantidad de los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* como *Faecalibacterium prausnitzii* (bacteria productora de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)), así como, un incremento en el filo *Proteobacteria* como la especie *Escherichia coli*, característico de pacientes con esta enfermedad respecto a individuos sanos (Collins, 2014; López-Siles, 2014; Zuo, 2018).

A día de hoy la terapia anti-TNF es uno de los pilares terapéuticos en el manejo de la EC, pero con ellos, únicamente tratamos la consecuencia y no la posible causa de la enfermedad. Aproximadamente una cuarta parte de los pacientes serán no respondedores primarios a los agentes anti-TNF y una tercera parte de los respondedores presentarán pérdida de respuesta con los años (Rajca, 2014). Para

mejorar la eficacia de estos fármacos se hace imprescindible estudiar el por qué estos pacientes no presentan una respuesta óptima.

Tradicionalmente, la monitorización de la actividad inflamatoria y la prognosis en pacientes con EC ha estado limitada al control de los síntomas clínicos (por ejemplo, mediante índice Harvey-Bradshaw) junto técnicas de laboratorio e imagen (principalmente la endoscopia y resonancia magnética), no exentas de numerosas limitaciones e inconvenientes. Entre ellas, los sistemas de puntuación clínicos son altamente subjetivos y pueden ser confundidos en esta patología caracterizada por periodos alternantes de exacerbación y remisión (Harvey, 1980; Peyrin-Biroulet, 2014). La ileocolonoscopia con biopsias es a día de hoy el gold estándar para el diagnóstico y evaluación de la actividad inflamatoria, con el gran inconveniente que se trata de un procedimiento invasivo (Rogler, 2013) y que no siempre se consigue alcanzar el área enferma. En un intento de búsqueda de marcadores no invasivos se ha introducido la calprotectina fecal, una proteína procedente de la migración de neutrófilos a la mucosa intestinal como rasgo indirecto de inflamación intestinal, permitiendo una monitorización más objetiva que índices clínicos, aunque con baja especificidad y bajo valor predictivo positivo en función de punto de corte escogido (Roseth, 2004; Sipponen, 2008).

En este sentido, se ha visto en varios estudios como la mayor abundancia de especies productoras de AGCC predijo la efectividad a infliximab (fármaco anti-TNF) (Zhou, 2018; Magnusson, 2016), en otros se asoció esta mayor abundancia de AGCC a una respuesta mantenida a este fármaco (Wang, 2017) y una disminución de abundancia de *Escherichia coli* tras tratamiento con el mismo (Busquets, 2015). Por último, un estudio ha determinado la existencia de determinados perfiles microbianos específicos que se correlacionan con la recidiva de la enfermedad tras haber alcanzado la remisión con infliximab (Rajca, 2014).

Así pues, un mayor conocimiento de la composición de la microbiota intestinal bacteriana en estos pacientes, como por ejemplo, la persistencia de una proporción significativa de determinadas bacterias “patógenas” o una baja biodiversidad bacteriana, permitiría determinar la función de la microbiota intestinal en la respuesta terapéutica y establecer biomarcadores de respuesta y recidiva, así como determinar la necesidad o no de restablecer una situación de normobiosis intestinal en estos pacientes. Además, se

pueden encontrar diferentes perfiles de microbiota intestinal, que permitan predecir la respuesta a diferentes líneas terapéuticas y por tanto ser más eficientes desde el inicio.

Por todo ello, en este estudio planteamos la hipótesis de que los cambios en la composición de la microbiota intestinal en pacientes con enfermedad de Crohn respondedores a fármacos anti-TNF tiende hacia una microbiota similar a los controles sanos frente aquellos no respondedores, además de establecer la relación *F. prausnitzii*/*E. coli* (F/E) como biomarcador de respuesta a dicho tratamiento en enfermedad de Crohn a través de la microbiota intestinal como herramienta alternativa no invasiva para predecir respuesta al mismo.

2.2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es evaluar los cambios en la microbiota en la enfermedad de Crohn, pre y tras seis meses con anti-TNF, comparándolos con sujetos sanos, además de calcular el ratio *Faecalibacterium prausnitzii*/*Escherichia coli* (F/E) como indicador de respuesta terapéutica y evaluando si estos cambios se producen hacia la recuperación de la microbiota normal.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio prospectivo, observacional y multicéntrico en el que se incluyeron pacientes con enfermedad de Crohn (EC) que precisaron para el control de su enfermedad inflamatoria intestinal de la prescripción de tratamiento con anti-TNF. El tratamiento con anti-TNF se inició bajo prescripción médica según figura en ficha técnica y el MAISE de la Agencia Valenciana de Salud, y por tanto su administración

fue bajo práctica clínica habitual y no promovida por este estudio, en ningún caso. Se recogieron muestras fecales para análisis microbiota intestinal, previo a la exposición del fármaco anti-TNF y tras 6 meses del inicio de dicha medicación. Se controlaron a estos pacientes de forma prospectiva, por su médico responsable, bajo práctica clínica habitual, durante los primeros 6 meses de inicio del tratamiento anti-TNF, reflejando la existencia de actividad inflamatoria y la obtención de no respuesta o remisión clínica a los 3 meses y al final del seguimiento del estudio.

Se registraron los datos de la existencia de actividad inflamatoria clínica (mediante el cálculo de índice de Harvey-Bradshaw), biológica mediante datos analíticos de laboratorio destacando hemograma, albúmina, proteína C-reactiva y calprotectina fecal previo a la exposición del anti-TNF, a los tres y seis meses del tratamiento, así como coprocultivos y parásitos en heces para descartar infección concomitante, todo ello durante el seguimiento y en cualquier momento ante cambios clínicos del paciente según práctica clínica habitual. Se registraron los tratamientos para la enfermedad en el momento de la inclusión y cualquier modificación de los mismos durante la duración del estudio. Además, siempre que estuviese disponible se recogieron datos de actividad radiológica y endoscópica empleados en la práctica clínica para evaluar la actividad de la enfermedad, hasta 12 semanas previas a la inclusión del paciente y durante el estudio. De este modo, con estos datos obtenidos, cada paciente fue clasificado como respondedor y no respondedor.

A los pacientes se les facilitó un cuestionario para cumplimentar el registro dietético de los tres días previos a recogida de heces a la inclusión para reproducirlo a los seis meses en segunda recogida y minimizar sesgo de dieta. De la misma forma, los pacientes cumplimentaron encuesta validada de adherencia a la dieta mediterránea a la inclusión y seis meses para valorar cambios significativos en sus hábitos alimentarios.

Un esquema de las distintas fases de la recogida de datos se muestran en la Figura 7.

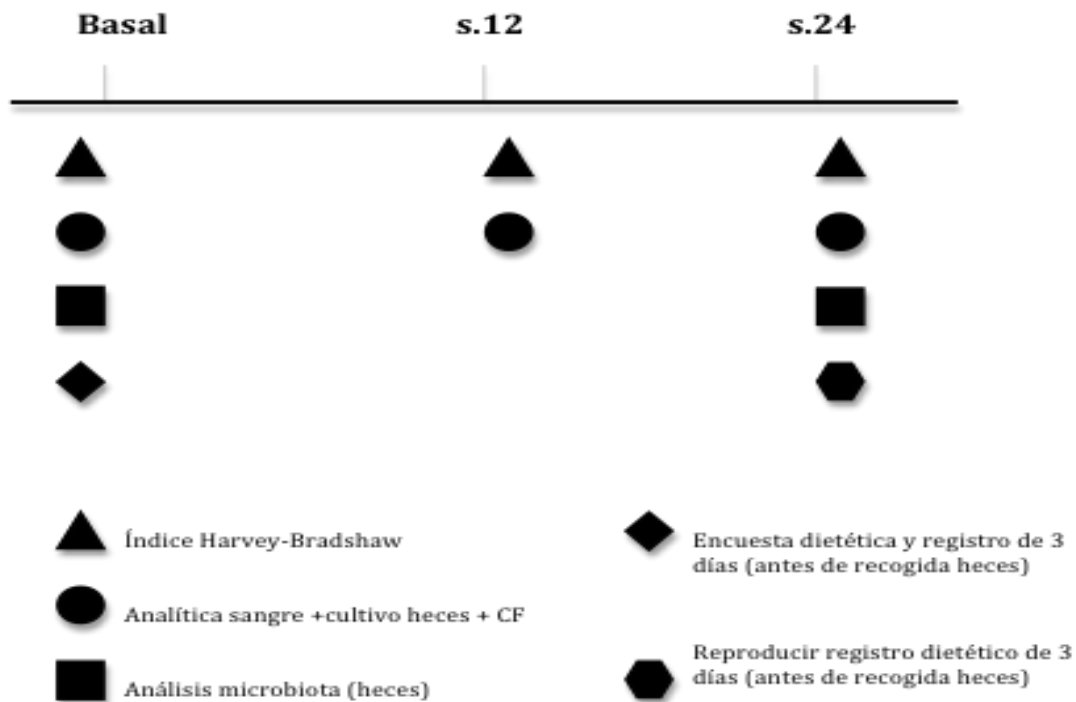


Figura 7. Diseño general del estudio.

2.3.2. PACIENTES

Los pacientes fueron reclutados de forma consecutiva desde ocho hospitales de la Comunidad Valenciana. El tratamiento con anti-TNF se inició bajo prescripción médica según práctica clínica habitual y figura en ficha técnica y por tanto su administración no fue promovida por este estudio. Los pacientes firmaron el consentimiento informado previo a inclusión.

Los criterios inclusión fueron: todos los pacientes fueron adultos (≥ 18 años de edad) con diagnóstico de enfermedad de Crohn con curso clínico de la enfermedad moderada o grave que precisó de tratamiento anti-TNF y cuya indicación para dicho tratamiento fue la actividad inflamatoria intestinal.

Se excluyeron del estudio a todos los sujetos que habían tomado antibióticos, probióticos y/o IBPs 4 semanas previas a la inclusión del estudio; paciente con hepatitis crónica por VHC e infección crónica por VIH; indicación de anti-TNF por otra causa

diferente al control de su enfermedad luminal (por ejemplo: artropatía enteropática, enfermedad perianal, prevención de recurrencia....); pacientes con intervención quirúrgica previa de íleon o colon; y tratamiento previo con anti-TNF en las 24 semanas previas a la introducción al estudio.

2.3.2.1. Grupo control

Se incluyeron individuos sanos miembros de la familia (hermanos del paciente) que compartían mismo estilo de vida y hábitos alimentarios. A los cuales se les hizo anamnesis completa descartando cualquier patología, toma de fármacos de forma crónica y antibioterapia/IBPs/probióticos en últimas 4 semanas previa a la recogida de heces para análisis microbiota intestinal.

2.3.3. DATOS CLÍNICOS Y DE LABORATORIO

Se recogieron en el cuaderno de recogida de datos las siguientes variables clínicas, demográficas y de pruebas complementarias:

o Características epidemiológicas: edad, sexo, hábito tabáquico e índice de masa corporal (IMC).

o Características clínicas: fecha diagnóstico y patrón de la enfermedad, clasificación de Montreal, índice de actividad, presencia de manifestaciones extraintestinales, historia farmacológica, medicación concomitante, efectos adversos, presencia/ausencia de respuesta global inicial y final, y decisiones clínicas derivadas de ésta.

o Datos de anti-TNF: indicación, tipo, fecha inicio, pauta de inducción, pauta de mantenimiento y especificar si uso de anti-TNF previo a 24 semanas antes de la inclusión y motivo retirada.

o Exploraciones complementarias de cada paciente (a la inclusión, 3 meses y a los 6 meses):

- Analítica de sangre: hemograma, VSG, PCR, fibrinógeno, ferritina, índice de saturación de transferrina (IST), proteínas totales, albúmina, urea, creatinina, GOT, GPT, GGT, FA, colesterol y triglicéridos.

- Calprotectina fecal.
- Coprocultivo, parásitos y toxina Clostridium difficile en heces.
- Si se dispone de prueba radiológica mediante entero-RMN con índice MaRIA y/o endoscópica calculando el SES-CD. Si está disponible previo al tratamiento (al menos 12 semanas previas a la inclusión) o 6 meses tras el mismo.

o Recogida heces para análisis de la microbiota (a la inclusión y los 6 meses de tratamiento).

- Registro dietético de los 3 días previos a la recogida muestra fecal para análisis microbiota. A los pacientes se les facilita un cuestionario ordenado por días donde deben anotar alimentos y bebidas ingeridas, especificando características, cantidad y marcas de productos envasados.
- Registro adherencia a la dieta mediterránea. Al mismo tiempo, los pacientes deben cumplimentar encuesta validada de adherencia a la dieta mediterránea (Martínez-González, 2015) clasificando dicha adherencia como baja (0-6 puntos), media (7-10 puntos) y alta (11-14 puntos).

2.3.4. MEDIDAS DE RESPUESTA CLÍNICA-BIOLÓGICA

Se define la respuesta clínica-biológica al tratamiento anti-TNF:

o Remisión clínica: I. Harvey-Bradshaw [IHB] ≤ 4 .

o Enfermedad clínica activa: IHB > 4 .

o Respuesta clínica: si desciende por encima de 3 puntos el índice de Harvey-Bradshaw.

o Recidiva: incremento de la actividad evaluada por la clínica, los hallazgos de laboratorio, la radiología o la endoscopia que motive un cambio en el tratamiento del paciente para el control de su enfermedad o un IHB >4 .

o Remisión biológica: Proteína C reactiva [PCR] <5 mg/L y calprotectina fecal [CF] <250 $\mu\text{g/g}$.

o Enfermedad biológica activa: [PCR] ≥ 5 mg/L y [CF] ≥ 250 $\mu\text{g/g}$.

o Respuesta global: la evaluación de la respuesta clínica se ha establecido de forma subjetiva por su médico responsable según parámetros clínicos y analíticos, clasificando a los pacientes como no respondedores y respondedores:

- Respondedores: Remisión clínica (IHB ≤ 4) + remisión biológica (Proteína C reactiva [PCR] < 5 mg/L y calprotectina fecal [CF] < 250 $\mu\text{g/g}$).
- No respondedores: Enfermedad clínica activa (IHB > 4) + enfermedad biológica activa ([PCR] ≥ 5 mg/L y/o [CF] ≥ 250 $\mu\text{g/g}$)

2.3.5. RECOLECCIÓN HECES PARA ANÁLISIS MICROBIOTA

Se recogieron muestras fecales para análisis de microbiota intestinal, previo a la exposición del fármaco anti-TNF y tras 6 meses del inicio de dicha medicación. Las muestras fueron recogidas por los propios pacientes y se congelaron tras su recolección (por el paciente en su congelador) hasta ser entregadas en el laboratorio del hospital de origen, donde se almacenaron a -20°C . Posteriormente, se centralizaron las muestras.

A todos los sujetos se les facilitó un cuestionario de registro dietético de los tres días previos a recogida de heces a la inclusión que reprodujeron a los seis meses, con el fin de minimizar el sesgo de la dieta.

2.3.6. SECUENCIACIÓN Y BIOINFORMÁTICA

A partir de 200 mg de heces se obtuvo el DNA utilizando el kit QIAamp PowerFecal Pro (QIAGEN), mediante lisis mecánica y enzimática. A continuación se amplificó la región V3 y V4 de la subunidad 16S del rRNA (Klindworth, 2013) y se realizó la secuenciación siguiendo el protocolo “Library Illumina 15044223 B protocol” y la plataforma MiSeq (ILLUMINA) configuración 2x 300 bp (ADM-Lifesequencing S.L., Valencia). Los datos de secuenciación se procesaron siguiendo el protocolo Microbiome bioinformatics con QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) versión 2019.4 (Bolyen, 2019). Las secuencias sin procesar se analizaron utilizando DADA2 (Divisive Amplicon Denoising Algorithm) (Callahan, 2016) y agrupados en Amplicon Sequence Variants (ASVs) (Callahan, 2017), seguido de su normalización mediante PICRUST2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) (Douglas, 2019). Todas las variantes de la secuencia de amplicones

(ASV) se alinearon con mafft (Kato, 2002) (mediante alineación q2) y se utilizaron para construir una filogenia con fasttree2 (Price, 2010) (mediante q2-phylogeny). Métricas de diversidad alfa (características observadas y diversidad filogenética de Faith (Faith 1992)), métricas de diversidad beta (UniFrac ponderado (Lozupone,2007), UniFrac no ponderado (Lozupone, 2005), distancia de Jaccard y disimilitud de Bray-Curtis) , y el análisis de coordenadas de principio (PCoA) se estimaron utilizando la diversidad q2 después de que las muestras se enrarecieran al recuento mínimo de características (valor de 2311,6) observado en todos ellos durante los análisis de diversidad alfa y beta. La taxonomía se asignó a los ASV utilizando el clasificador de características q2 (Bokulich, 2018) clasificador de taxonomía de Bayes naïve classify-sklearn en diferentes niveles, contra la base de datos de referencia de genes de ARNr SILVA 16s (v132, conjunto NR99) (Quast, 2013) (Figura 8).

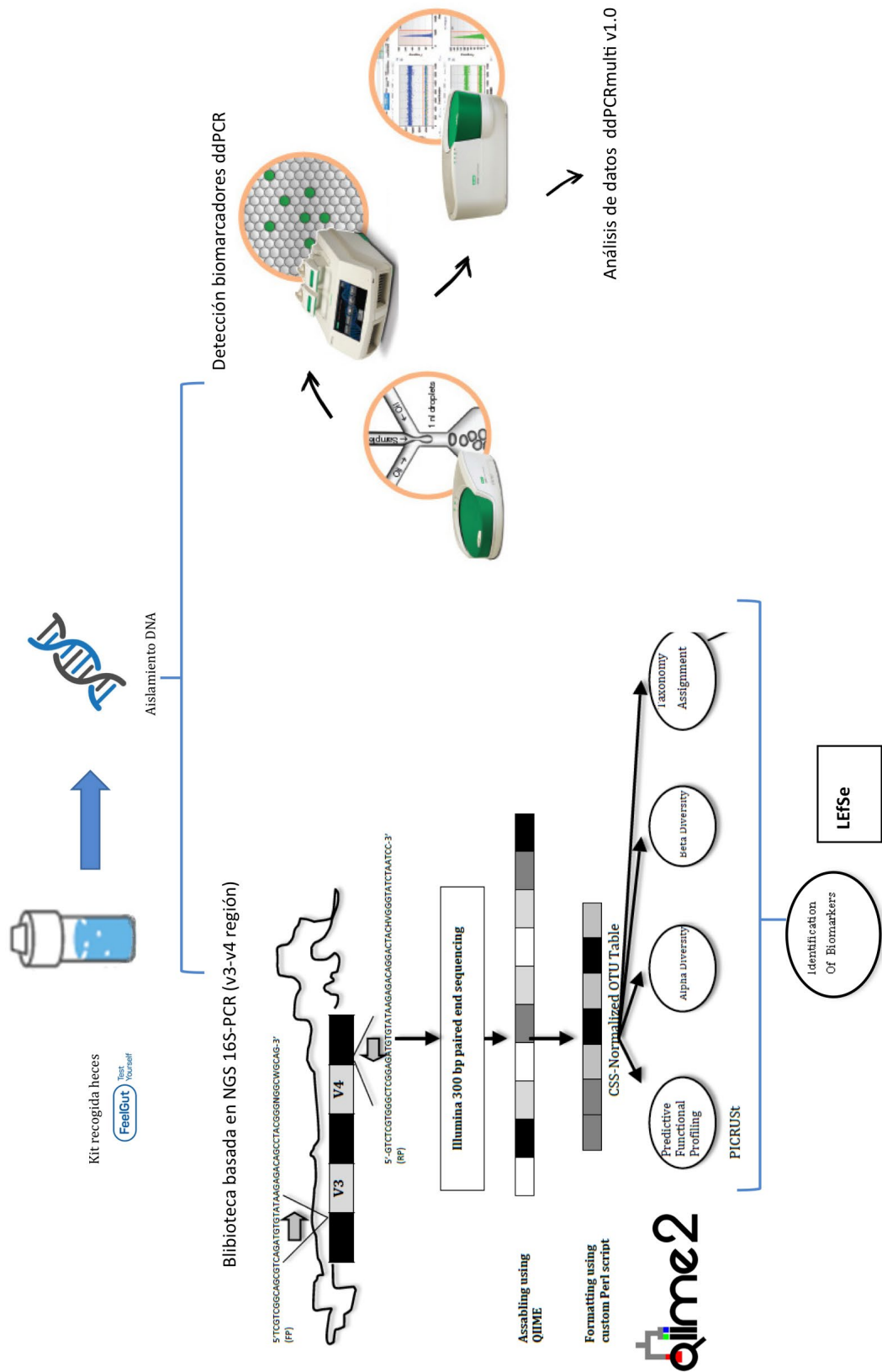


Figura 8. Esquema secuenciación y bioinformática

2.3.7. BÚSQUEDA Y EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES POTENCIALES

Con el fin de identificar potenciales biomarcadores no invasivos a partir de la caracterización del microbioma intestinal en diversos estados de la enfermedad de Crohn, se ha empleado LEfSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size) (Segata, 2011), algoritmo diseñado para el descubrimiento de biomarcadores metagenómicos a través de la comparación de clases, ensayos de consistencia biológica y estimación de tamaños de efecto.

Además se ha estudiado la cuantificación absoluta de las especies *Faecalibacterium prausnitzii*, *Escherichia coli*, y el total de bacterias presentes en una muestra determinada a través del gen ARNr 16S (Hamdelsman, 2004), todo ello con un volumen mínimo y en una única reacción, utilizando el sistema QX200 Digital Droplet PCR (Bio-Rad Laboratories), mediante el protocolo del kit ddPCR Multiplex Supermix (BIORAD). Para ello, se han seleccionado los cebadores y sondas adecuados para la realización de una PCR triples (Tabla 3) (Huijsdens, 2002; Furet, 2009; López-Siles, 2014; Rajca, 2014) junto con la optimización de sus concentraciones y programas térmicos (Huijsdens, 2002; Furet, 2009; López-Siles, 2014; Dobnik, 2016; Postel, 2018). Se empleó el program QuantaSoft versión 1.7.4 para la exportación de los datos de amplitudes registradas. El análisis del ratio F/E se normalizó utilizando la siguiente ecuación ($[\log_{10} (\text{copias}/\mu\text{L } F. \text{ prausnitzii}) - \log_{10} (\text{copias}/\mu\text{L } E. \text{ coli})] / [\log_{10} (\text{copias}/\mu\text{L ARNr 16S})]$) (Kuypers, 2012)

Tabla 3. Cebadores y sondas de ddPCR.

Diana	Cebadores y sonda	Secuencias 5'-3'
<i>F. prausnitzii</i>	Fpra_428_F	TGTAAACTCCTGTTGTTGAGGAAGATAA
	Fpra_583_R	GCGCTCCCTTTACACCCA
	Fpra_493_PR	/56FAM/CAAGGAAGT/ZEN/GACGGCTAACTACGTGCCAG/3IABkFQ/
<i>E. coli</i>	Ecoli_395_F	CATGCCGCGTGTATGAAGAA
	Ecoli_490_R	CGGGTAACGTCAATGAGCAAA
	Ecoli_437_PR	/56FAM/TATTAACTT/ZEN/TACTCCCTTCTCCCCGCTGAA/3IABkFQ/
Bacteria	F_Bact_1369	CGGTGAATACGTTCCCGG
	R_Prok_1492	TACGGCTACCTTGTTACGACTT
	P_TM_1389F	/5HEX/CTTGTACAC/ZEN/ACCGCCCGTC/3IABkFQ/

2.3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Al tratarse de un estudio observacional, no intervencionista, pueden existir factores de confusión entre la asignación del tratamiento y los resultados, en los análisis comparativos de la tasa de respuesta e incluirse muestras de pacientes que no representen las prácticas clínicas en el mundo real. En consecuencia, todos los análisis de este estudio se considerarán de naturaleza exploratoria.

El análisis estadístico se realiza con el programa informático SPSS v.26.0.

Las características de la población (incluidas características demográficas, afecciones médicas, duración de la enfermedad, tipos de tratamiento utilizados al comienzo del estudio y resto de variables recogidas en el cuaderno de recogida de datos) y todos los principales criterios de valoración principales y secundarios se han resumido indicando la media, la desviación estándar, el valor mínimo, el valor máximo, la mediana, el percentil 25 y 75 y el intervalo de confianza (IC) del 95% de la media para variables continuas, y las frecuencias absolutas y relativas, con un IC del 95% de la proporción para los datos categóricos. En el análisis bivariante se ha recurrido al test de chi cuadrado para determinar diferencias en proporciones y la t de student para datos apareados antes y después de la administración de anti-TNF.

2.3.8.1. Bioinformática

Los análisis estadísticos realizados para la determinación de diferencias significativas entre los grupos establecidos, así como sus representaciones gráficas, se han realizado mediante el software GraphPad Prism versión 8.2.0 y STAMP (Statistical Analysis of Metagenomic Profiles) (Parks, 2014).

El estudio de las curvas ROC (valores AUC) (Grund, 2010), se realizó mediante el programa estadístico IBM SPSS Statistics 26.0. En las curvas ROC de cada uno de los posibles indicadores asociados al éxito del tratamiento con anti-TNF se han calculado los valores de corte de mayor sensibilidad y especificidad mediante el índice de Youden (sensibilidad + especificidad-1). En el análisis bivariado se realizó la

corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, estableciendo el nivel de significancia en $p < 0.0125$.

Finalmente, el análisis estadístico para la obtención de los valores de concentración necesarios para el cálculo del ratio F/E a través de la técnica ddPCR se ha realizado mediante una adaptación de ddPCRmulti, una aplicación semiautomática basada en R versión 3.6. (Dobnik, 2016) .

2.3.9. ASPECTO ÉTICOS

El estudio ha sido clasificado por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios como “Estudio Postautorización de seguimiento prospectivo” en 5 de febrero del 2015. Y posteriormente aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital de Sagunto en 22 de Julio del 2015 (FXC-TNF-2015-01) y refrendado por los comités de ética locales de todos los centros participantes. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los pacientes y de los participantes del estudio.

El estudio se adhiere a las directrices europeas sobre la protección de sujetos humanos en una investigación y declaración de Helsinki y recomendaciones de la Red Europea de centros de Farmacoepidemiología y Farmacovigilancia.

2.4. RESULTADOS

2.4.1 Características clínico-demográficas de los pacientes

Se evaluaron un total de 43 sujetos divididos en una cohorte de 27 pacientes con enfermedad de Crohn (15 hombres), con una edad media de 34.6 ± 15 años (Tabla 4) que precisaban para el control de su enfermedad la prescripción de tratamiento con anti-TNF; y un grupo de 16 individuos sanos (8 hombres) con edad media de 29.3 ± 7.2 años, miembros familiares de los EC, que compartían mismo estilo de vida, hábitos

alimentarios y características epidemiológicas similares, sin diferencias significativas respecto a las principales variables clínico-epidemiológicas analizadas.

Las tasas de pérdidas han sido inferiores a lo esperado, solo un 7% (3/44), uno de ellos requirió en semana 12 intervención quirúrgica, y otros dos que no han finalizado el seguimiento y recogida de muestras biológicas en semana 24 por discontinuación voluntaria por parte del paciente.

En cuanto a las variables clínico-demográficas de la muestra estudiada (tabla 4), destaca el patrón inflamatorio de la enfermedad (58,8%) y la situación de basal de los pacientes con actividad moderada/grave tanto clínica (50%), endoscópica (87%) como por imagen (75%).

Tabla 4: Variables clínico-demográficas de los pacientes (n total=27)

Variables	n (%)
Hombres	15 (55,9)
Edad media (años)	34,6±15,0
Extensión de la enfermedad:	
Íleon	12 (44,1)
Íleo-cólico	11 (41,2)
Colon	3 (11,8)
TGI alto	1 (2,9)
Patrón de la enfermedad:	
Inflamatorio	16 (58,8)
Estenosante	9 (32,4)
Fistulizante	2 (8,8)
Enfermedad perianal asociada	6 (20,6)
Tabaco:	
Fumadores	13 (50)
Ex-fumadores	2 (5,8)
Nunca fumadores	12 (44,1)
Manifestaciones extraintestinales asociadas	5 (17,6)
Anti-TNF	
- IFX	15 (55,9)
- ADA	12 (44,1)
Indicación Anti-TNF:	
- Fracaso IS	6 (20,6)
- Corticodependencia	4 (14,7)

- Brote actividad	9 (32,4)
- Enfermedad fistulizante	2 (5,9)
- Estrategia “top-down”	6 (20,6)
Tratamientos previo inicio anti-TNF	
- 5-ASA	15 (55,9)
- Azatioprina	18 (67,6)
- Corticoesteroides	17 (64,7)
- Metotrexato	2 (5,9)
Tratamiento concomitante con anti-TNF	
- 5-ASA	6 (20,6)
- Azatioprina	15 (55,9)
- Corticoesteroides en la inducción	12 (44,1)
- Metotrexato	1 (2,9)
Situación clínica basal (Índice Harvey-Bradshaw)	
- Actividad moderada/grave (≥ 8 puntos)	13 (50)
Endoscopia basal	18 (67,6)
Actividad moderada/grave	16 (87)
Prueba imagen basal	16 (58,8)
Actividad moderada/grave	12 (75)

2.4.2 Evaluación clínica y respuesta clínica al anti-TNF

La mayoría de los pacientes incluidos presentan una mejoría clínica tras inicio de tratamiento con anti-TNF en el momento de la inclusión del estudio. Con mejoría del índice actividad clínico más utilizado en la práctica clínica en la enfermedad de Crohn, el Índice de Harvey-Bradshaw (IHB), (figura 8) quedando en remisión clínica (IHB <5) el 91.2% de los pacientes en semana 12, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,05$) (figura 9) y el 85.3% de los pacientes en semana 24. Cuando la variable analizada fué la respuesta clínica al tratamiento según el médico responsable (dividida en respuesta, respuesta parcial o remisión clínica), las tasas de remisión alcanzadas están en torno al 80%, tanto en semana 12 como en semana 24 (figura 10). Sólo el 2.9% de los pacientes no respondieron inicialmente al tratamiento anti-TNF en la semana 12, y ello implicó una modificación de tratamiento en tres de ellos, uno se intensificó el tratamiento, en otro se añadió tratamiento con corticoesteroides y el último se decidió realizar intervención quirúrgicamente por patrón estenosante, que obligó a la salida del estudio. Por lo que respecta a la semana 24, el 5,9% no respondieron al tratamiento con anti-TNF, tres son los que precisaron modificación del tratamiento previo a semana 12 y otro

precisó modificación de la pauta terapéutica con intensificación de la misma y en el otro paciente se optó por cambiar a otro anti-TNF.

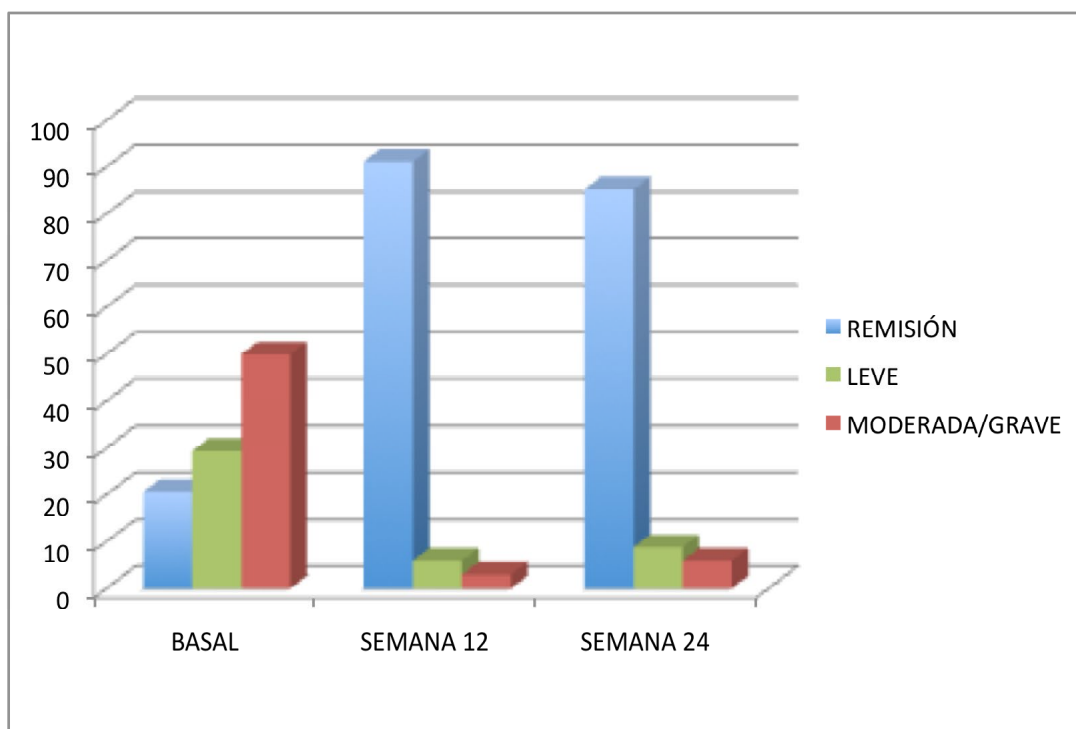


Figura 8. Actividad clínica según índice de Harvey a lo largo del estudio.

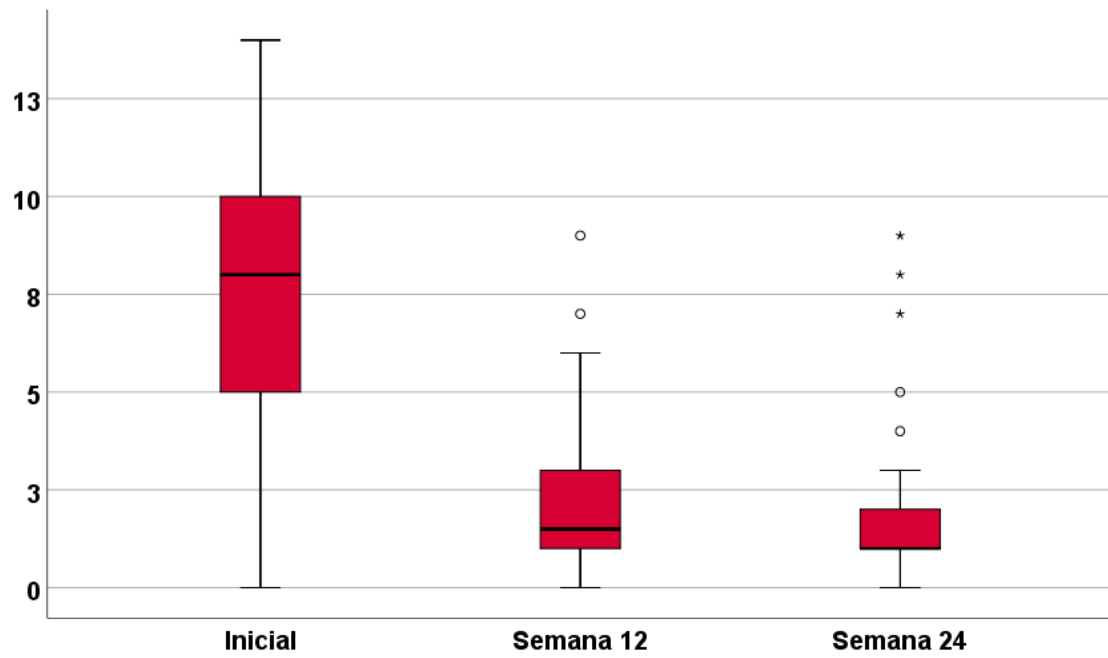


Figura 9. Evolución del índice de Harvey durante el periodo de seguimiento en los pacientes analizados.

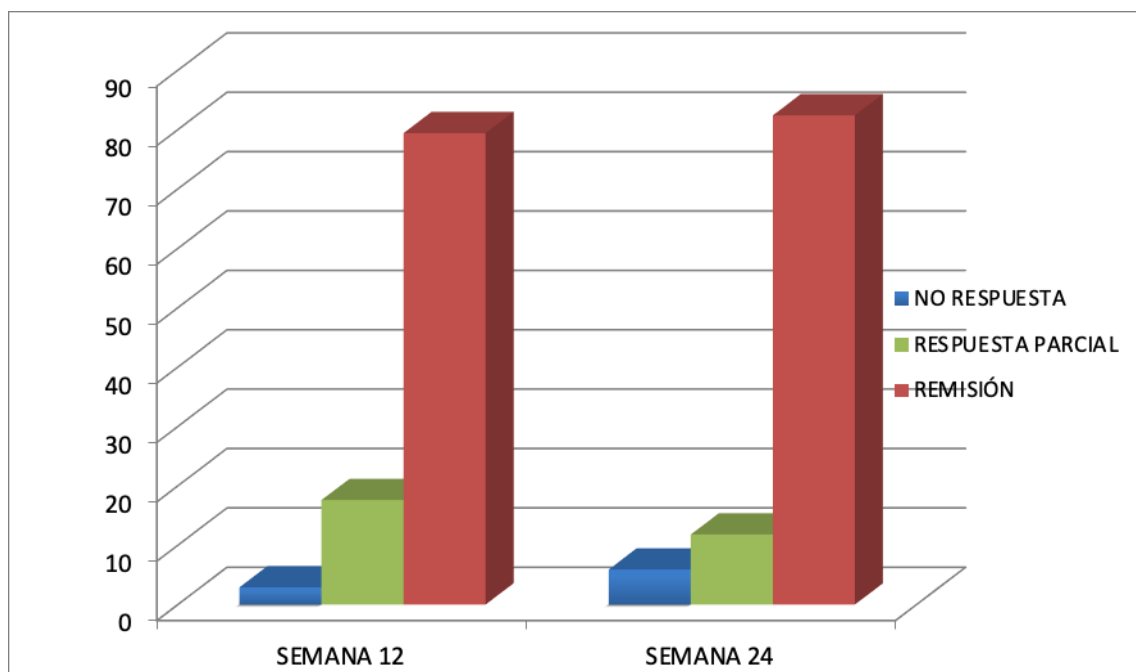


Figura 10. Respuesta clínica (según valoración clínica) inicial y final tras tratamiento con anti-TNF.

2.4.3 Respuesta biológica

En cuanto a la respuesta biológica (definida por mejoría de parámetros bioquímicos en sangre y heces), se aprecia en la tabla 5 una clara mejoría de parámetros analíticos de sangre como los reactantes de fase aguda y la calprotectina fecal, alcanzando significación estadística en la semana 12 ($p < 0,001$) (figura 11).

Tabla 5. Parámetros analíticos durante periodo de seguimiento.

VARIABLE	Semana 0	Semana 12	P	Semana 24	P
Hemoglobina (g/dL)	13,7±1,8	14,1±1,4	0,116	14,2±1,5	0,096
Plaquetas (× 10 ⁹ /L)	317±86	272±66	0,007	260±71	0,370
Leucocitos (× 10 ⁹ /L)	9,0±2,7	7,4±2,6	0,003	7,3±2,17	0,722
Albúmina (g/dL)	4,2±0,6	4,4±0,5	0,027	4,5±0,4	0,582
VSG (mm/h)	20,9±12,6	14,7±7,4	0,074	11,2±6,6	0,317
PCR (mg/L)	25,6±44,9	6,6±14,9	0,026	11,2±6,6	0,554
Fibrinógeno (mg/dL)	475±90	364±68	0,010	341±40	0,553
Ferritina (ng/mL)	99±63	126±63	0,246	107±89	0,261
IST (%)	19,6±10,2	31,8±13,5	<0,001	30,9±15,3	0,552
Calprotectina fecal (mg/g)	1105±1070	176±343	<0,001	180±349	0,118

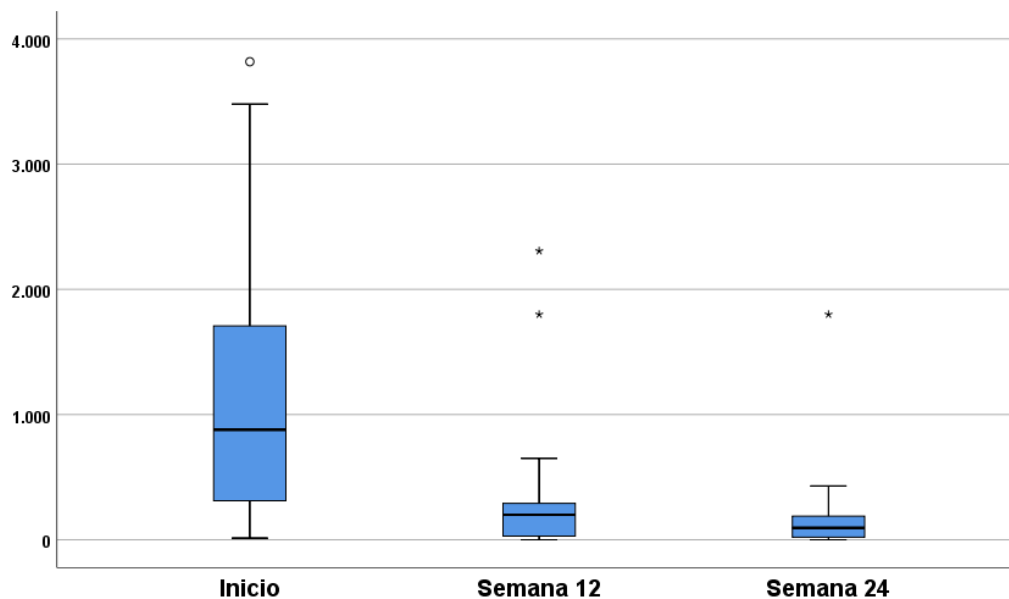


Figura 11. Evolución de la calprotectina en heces de los pacientes durante el seguimiento hasta las 24 semanas desde el inicio del tratamiento.

2.4.4 Dieta y microbiota

Dado que hay evidencia clínica de modificaciones significativas de la microbiota intestinal en base a la dieta del paciente, se recogió el modelo de alimentación que seguían los pacientes, en base a una encuesta validada de adherencia a la dieta mediterránea (<http://www.predimed.es>), antes y al final del estudio, además los pacientes hicieron un registro de la dieta previo a la recogida de heces inicial que repitieron en la recogida posterior (semana 24) con intención de mitigar posibles modificaciones de la microbiota influenciada por la dieta. Tras analizar la adherencia a la dieta mediterránea de los pacientes finalizados, se objetivó que los pacientes tenían baja adherencia a este tipo de dieta con una puntuación inicial de $6,1 \pm 1,8$ y a las 24 semanas su seguimiento es prácticamente igual, con una puntuación de $6,5 \pm 2,0$ ($p=0,113$), por lo que consideramos que la dieta no va a tener una repercusión sobre la microbiota debido a cambios en la alimentación.

2.4.5 La microbiota intestinal en pacientes con enfermedad de Crohn.

Como ya hemos mencionado anteriormente, de los 43 sujetos incluidos en el estudio, 27 de ellos fueron pacientes con enfermedad de Crohn (EC) y 16 controles sanos.

A partir de los datos obtenidos respecto a la diversidad alfa (índice de Shannon y Chao1) y beta (índice de Bray-Curtis) permite establecer una disminución estadísticamente significativa en la riqueza y la diversidad de comunidades microbianas en pacientes con EC respecto a controles sanos (figura 12: a, b, c).

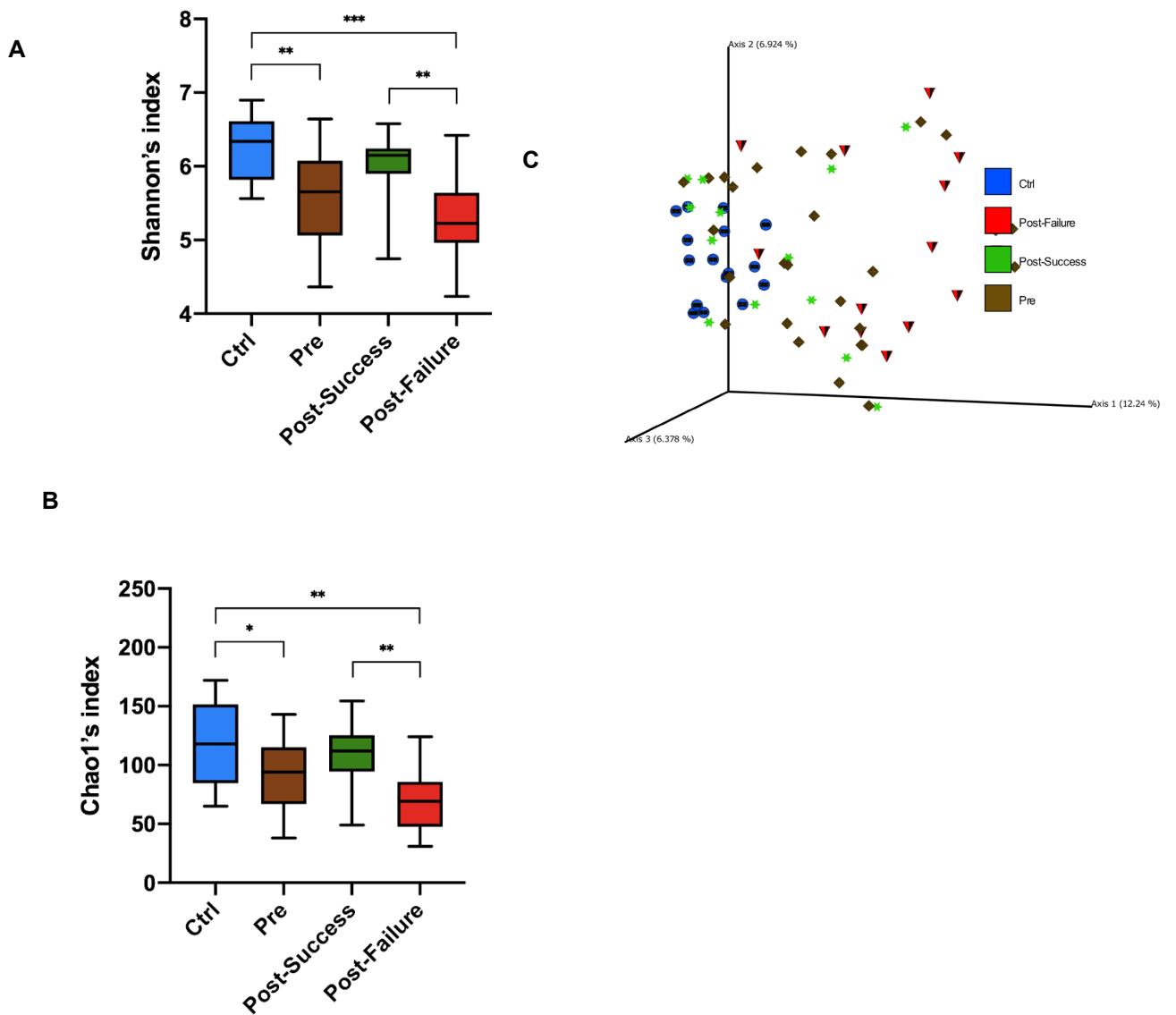


Figura 12. Representación gráfica de la diversidad alfa y beta. (A) Box-plot correspondiente al índice de Shannon (diversidad alfa). (B) Box-plot correspondiente al índice de Chao1 (diversidad alfa). (C) PCoA correspondiente al índice de disimilitud de Bray-Curtis (diversidad beta). Análisis estadístico mediante el test de Kruskal-Wallis con corrección de comparaciones múltiples de Benjamini-Hochberg. Los asteriscos hacen referencia al p-valor corregido, donde * p-valor < 0.05, ** p-valor < 0.01 y *** p-valor < 0.001

Por otro lado, un primer análisis taxonómico a nivel de filo indica un aumento significativo de Proteobacteria, Actinobacteria y Fusobacteria en EC con respecto a individuos sanos (p -valor < 0.05) (Figura 13).

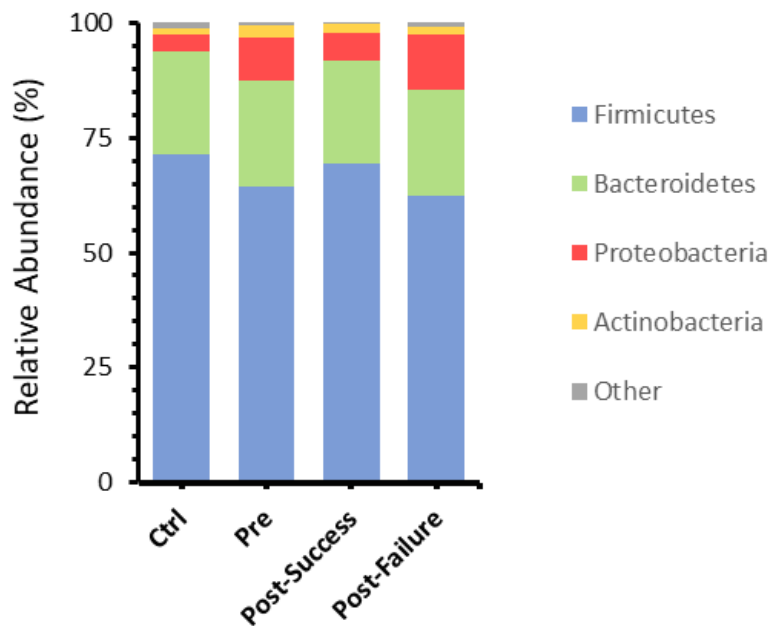


Figura 13 | Gráfica de barras que muestra los valores medios de abundancia de ASV a nivel de filo en los cuatro grupos diferentes estudiados: individuos sanos (control), pacientes con enfermedad de Crohn antes del tratamiento (t0) y pacientes después del tratamiento (t1; a su vez, clasificados en respondedores y no respondedores). La leyenda “otro” hace referencia a todos los filos con una representación inicial inferior a 2 % de lecturas, incluyendo Euryarchaeota, Actinobacteria, Cyanobacteria, Elusimicrobia, Epsilonbacteraeota, Fusobacteria, Lentisphaerae, Patescibacteria, Tenericutes y Verrucomicrobia.

Avanzando en el estudio taxonómico, a nivel de familia el grupo pretratamiento se caracteriza de forma significativa por una menor representación de Ruminococcaceae y Christensenellaceae (p -valor < 0.01), y un incremento en numerosas familias bacterianas, destacando Enterobacteriaceae, Erysipelotrichaceae y Bifidobacteriaceae (p -valor < 0.05) (Figura 14).

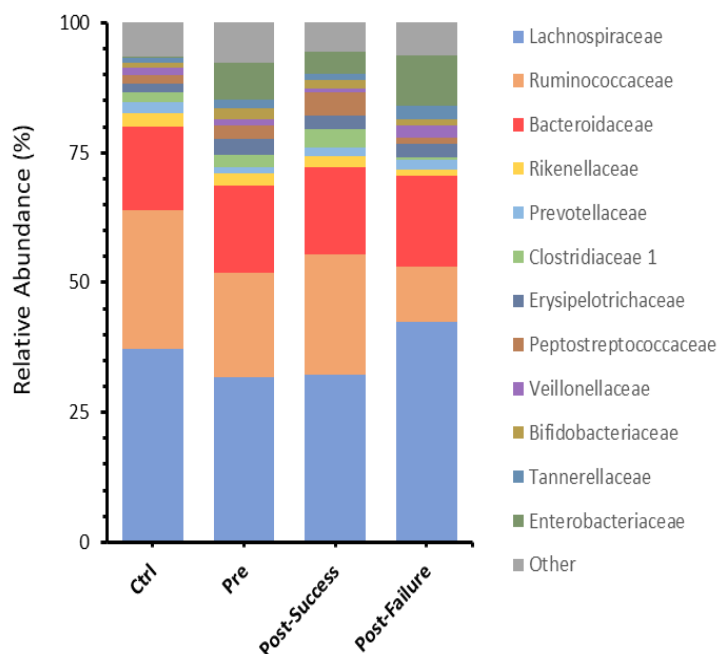


Figura 14 | **Gráfica de barras que muestra los valores medios de abundancia de ASV a nivel de familia en los cuatro grupos diferentes estudiados:** individuos sanos (control), pacientes con enfermedad de Crohn antes del tratamiento (t0) y pacientes después del tratamiento (t1; a su vez, clasificados en respondedores y no respondedores).

En cuanto a nivel de género, los análisis realizados muestran diferencias estadísticamente significativas relacionadas con la concentración de un elevado número de géneros bacterianos. Entre ellos, destaca la disminución de *Ruminococcus*, *Agathobacter*, *Dorea* y *Fusicatenibacter* en EC, así como el aumento del género *Blautia*, *Escherichia/Shigella*, *Bifidobacterium* y *Lachnoclostridium* con respecto al grupo control. En último lugar, a nivel de especie, *Bacteroides plebeius*, *Alistipes obesi*, *Gabonia massiliensis* y *Faecalibacterium prausnitzii* muestran una menor representación en la microbiota de EC en comparación a controles sanos (Figura 15).

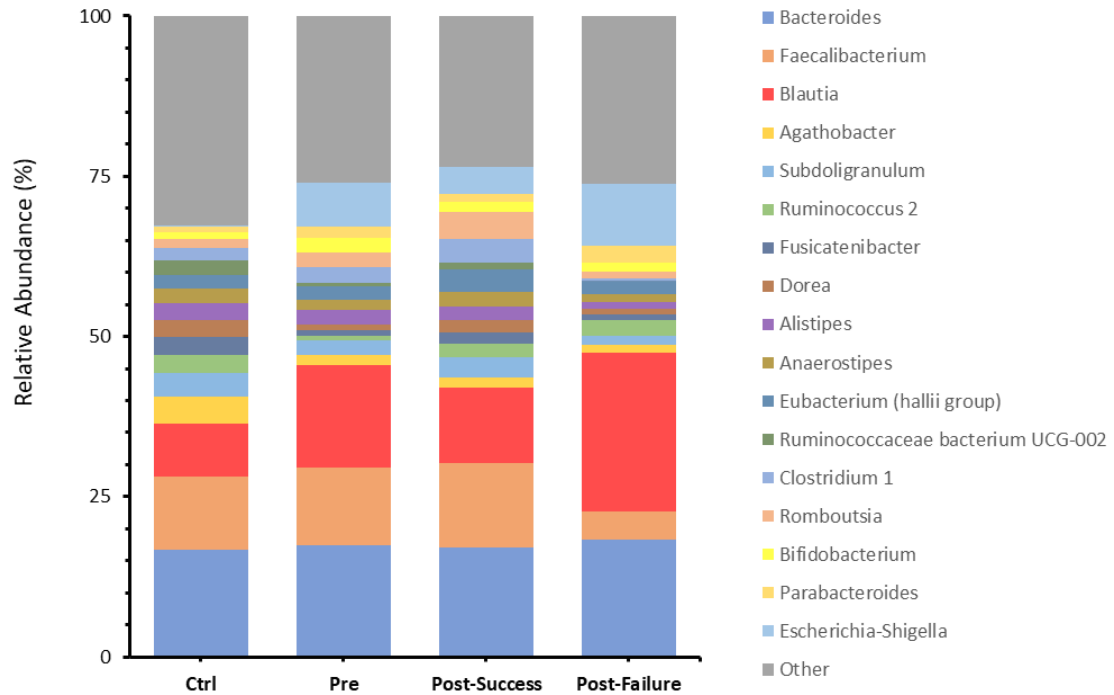


Figura 15 Gráfica de barras que muestra los valores medios de abundancia de ASV a nivel de género en los cuatro grupos diferentes estudiados: individuos sanos (control), pacientes con enfermedad de Crohn antes del tratamiento (t0) y pacientes después del tratamiento (t1; a su vez, clasificados en respondedores y no respondedores). -respondedores).

2.4.6 Restauración parcial de la microbiota intestinal en pacientes respondedores al tratamiento anti-TNF

Los pacientes incluidos con enfermedad de Crohn fueron clasificados como respondedores (n=13) y no respondedores (n=14) tras evaluación clínica-analítica a las 24 semanas de iniciado tratamiento con anti-TNF como se ha descrito anteriormente. Los estudios bioestadísticos acerca de la diversidad alfa y beta indican diferencias significativas entre el grupo de pacientes no respondedores con respecto al control, mientras que no se observan diferencias significativas entre los pacientes respondedores y el grupo control (Figura 12: a, b, c).

En estudio taxonómico, aumenta significativamente la concentración de géneros como *Escherichia/Shigella* y disminuye la de *Faecalibacterium* y *Agathobacter* en el grupo de pacientes no respondedores en comparación con individuos sanos, mientras que los respondedores destaca la importancia de la elevada restauración en bacterias pertenecientes a una clase determinante como Clostridia debido a sus funciones metabólicas antiinflamatorias; mientras aquellos miembros del orden Enterobacteriales, especialmente el género *Escherichia/Shigella*, no logran la disminución deseada en concentración, pero mostrando todavía diferencias significativas entre la microbiota de pacientes respondedores y el grupo control. Por último, el nivel taxonómico de especie presenta mayores representaciones significativas de *Bacteroides plebeius*, *Alistipes obesi* y *Faecalibacterium prausnitzii* en individuos sanos con respecto a ambos grupos de pacientes (Figura 16).

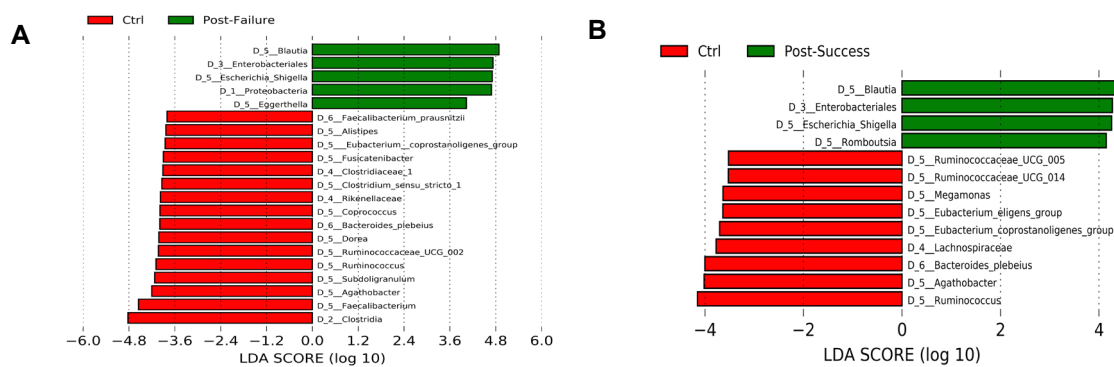


Figura 16. **Diferencias en la abundancia de taxones entre (A) no respondedores y (B) respondedores, en comparación con individuos sanos.** La búsqueda de taxones diferenciales se realizó mediante LEfSe (prueba de Kruskal-Wallis entre clases, valor $p < 0.05$; umbral para taxones discriminativos, puntaje LDA logarítmico > 3.5).

2.4.7 Géneros diferenciales en pacientes respondedores y no respondedores

Los estudios bioestadísticos acerca de la diversidad alfa y beta indican diferencias significativas entre el grupo de pacientes no respondedores y los pacientes respondedores (Figura 12: a, b, c).

El microbioma intestinal en pacientes no respondedores a anti-TNF destaca por la elevada concentración de bacterias pertenecientes al filo Proteobacteria, concretamente al orden Enterobacteriales y especialmente el género *Escherichia/Shigella*. Sin embargo, en el grupo de respondedores a dicha terapia presenta una mayor representación significativa el filo Bacteroidetes y Firmicutes, de éste último predominan aquellas pertenecientes a la clase Clostridia, destacando los géneros *Faecalibacterium*, *Romboutsia*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Roseburia*, *Anaerostipes* o *Lachnospira*, todos ellos con una puntuación logarítmica superior a 3.5 (Figura 17).

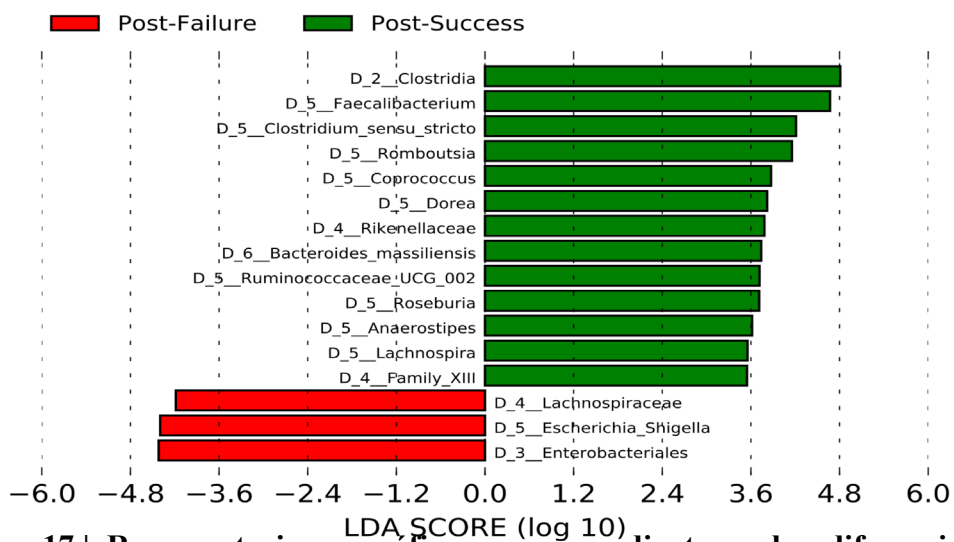


Figura 17. Representaciones gráficas correspondientes a las diferencias en la abundancia de taxones determinada entre pacientes respondedores y no respondedores. Taxones de mayor efecto diferencial entre ambas microbiotas estudiadas. La búsqueda de taxones diferenciales se ha realizado mediante LefSe (test Kruskal-Wallis entre clases, p-valor < 0.05; umbral de taxones discriminativos, LDA score logarítmico > 3.5).

2.4.8 La microbiota intestinal como un biomarcador de respuesta terapéutica a través de la ratio *Faecalibacterium prausnitzii* /*Escherichia coli* (F/E)

Los resultados obtenidos posibilitan la elección de dos especies concretas, *Faecalibacterium prausnitzii* y *Escherichia coli*, como las principales representantes de dos géneros fuertemente ligados a eubiosis/disbiosis intestinal en el contexto de la actividad inflamatoria en la enfermedad de Crohn y, por tanto, su ratio (F/E) podría ser un marcador de respuesta terapéutica.

La implementación de la técnica ddPCR ha permitido evaluar el ratio F/E, obteniendo resultados estadísticamente significativos entre los grupos control y pretratamiento, control y pacientes no respondedores y, sobre todo, pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento anti-TNF estudiado. Además, destacar que no hay diferencias significativas entre grupo control y respondedores al anti-TNF (Figura 18).

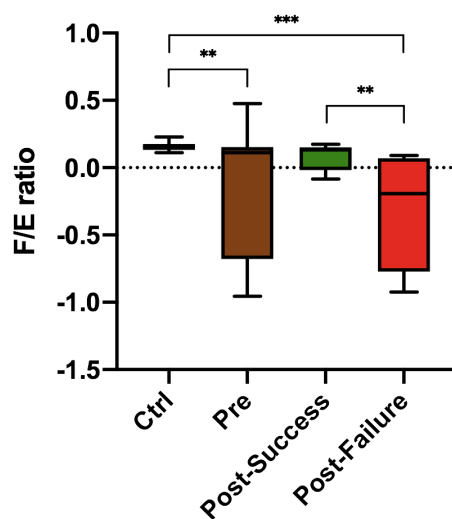


Figura 18| Representación del ratio F/E. Análisis estadístico mediante el test de Kruskal-Wallis con corrección de comparaciones múltiples de Benjamini-Hochberg. Los asteriscos hacen referencia al p-valor corregido, donde * p-valor < 0.05, ** p-valor < 0.01 y *** p-valor < 0.001.

Finalmente, se ha realizado un análisis de curva ROC (Receiver Operating Characteristic) (Grund, 2010), con un valor para el área bajo la curva (AUC) obtenida para el ratio F/E igual a 0.874 (IC 95%: 0.741-1.000; $p < 0.001$), siendo superior al de otros biomarcadores actualmente utilizados en la monitorización de pacientes de la enfermedad de Crohn en la práctica clínica habitual, tales como la calprotectina fecal con AUC=0.816 (IC 95%: 0.642-0.989; $p=0.005$) y el índice de Harvey-Bradshaw con AUC=0.615 (IC 95%: 0.400-0.831; $p=0.385$) (Figura 19), u otros posibles indicadores como el Índice de disbiosis microbiana (índice MD) con AUC = 0,692 (IC del 95%: 0,349-0,836, $p = 0,385$), log [Escherichia coli] con AUC = 0,602 (IC del 95%: 0,383-0,820; $p = 0,369$) y log [Faecalibacterium prausnitzii] con AUC = 0,824 (IC del 95%: 0,668-0,981; $p = 0,004$). Los puntos de corte calculados mediante el índice de Youden de máxima sensibilidad y especificidad han sido para la relación F / E $< 0,037$ (índice de Youden = 0,495; sensibilidad = 0,923 y especificidad = 0,429) y para FC = 100,5 $\mu\text{g} / \text{g}$ (índice de Youden = 0,709; sensibilidad = 0,923 y especificidad = 0,786).

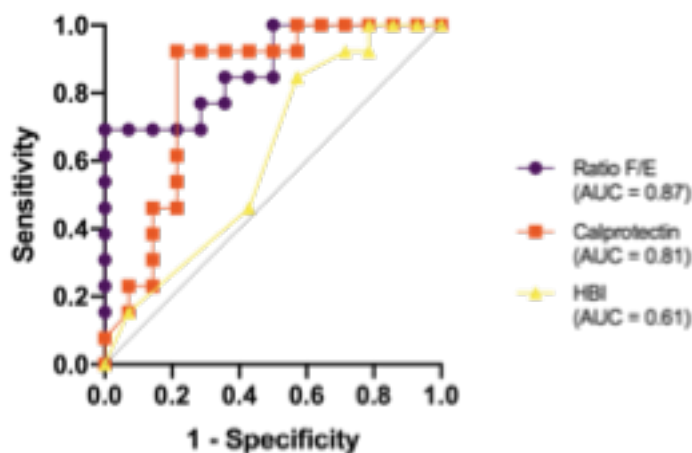


Figura 19 | Representación de la curva ROC para la evaluación del potencial del ratio F/E como biomarcador de respuesta terapéutica. El valor del área bajo la curva (AUC) es igual a 0.87.

2.5. DISCUSIÓN

En este estudio, coincidiendo con lo descrito en la literatura, demostramos que la enfermedad de Crohn se caracteriza por una disbiosis, a diferencia de lo que ocurre en sujetos sanos, en cuanto a baja biodiversidad alfa y beta (Manichanh, 2006; Hofer, 2014; Ren, 2014; Pascal, 2017) y por la marcada reducción de bacterias pertenecientes a la clase *Clostridia*, principalmente géneros productores de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), con propiedades antiinflamatorias; en cambio, se produce un incremento en la representación de bacterias del filo *Proteobacteria*, principalmente del género *Escherichia/Shigella* (proinflamatorias). Sin embargo, también se ha determinado una mayor concentración del género *Blautia* en pacientes, mientras que otros estudios respaldan su disminución en la EC (Ananthakrishnan, 2017; Yilmaz, 2019).

En cuanto a los cambios observados tras tratamiento anti-TNF, terapia que ha demostrado alto porcentaje de remisión en pacientes con EC, vemos como aquellos pacientes respondedores presentan una restauración parcial del microbioma característico de individuos sanos, es decir, presenta una tendencia hacia la eubiosis, con un importante aumento de bacterias pertenecientes a clase *Clostridia*, con funciones metabólicas antiinflamatorias. Sin embargo, aquellos miembros del orden Enterobacteriales, especialmente el género *Escherichia/Shigella* (proinflamatorias), aunque disminuyen de forma significativa en los respondedores respecto el basal, no se alcanza la significación comparada con los controles sanos, por ello hablamos de restauración parcial (Shaw, 2016; Busquets, 2017).

En el estudio de la microbiota diferencial en pacientes respondedores y no respondedores a anti-TNF nos ha permitido establecer dos especies bacterianas, *Faecalibacterium prausnitzii* y *Escherichia coli* como las que presentan mejores características para ser utilizadas como biomarcadores de respuesta terapéutica (Collins, 2014; López-Siles, 2014; Magnusson, 2016; Wang, 2017; Zhou, 2018), dada la elevada concentración de género *Escherichia/Shigella* en pacientes no respondedores y una mayor representación del género *Faecalibacterium* en respondedores a dicha terapia. Con todo ello, se calculó la ratio F/E, ya descrita en otro estudio como marcador de disbiosis (Busquets, 2015), mediante su cuantificación absoluta por ddPCR, observando diferencias significativas entre pacientes respondedores y no respondedores;

en cambio no existen diferencias significativas entre pacientes respondedores y controles sanos. Así pues, supone esto un resultado prometedor en la búsqueda de métodos rápidos de análisis como biomarcador de respuesta terapéutica.

En este punto, los resultados obtenidos refuerzan la importancia del papel del microbioma intestinal, en especial la pérdida de capacidad de pacientes de EC para la regulación de la inflamación y reparación de epitelios, destacando su recuperación parcial en pacientes respondedores tras el aumento en la abundancia de determinados géneros productores de AGCC como *Faecalibacterium*. Dichos ácidos grasos, producidos mediante la fermentación bacteriana de carbohidratos no digeribles, constituyen una fuente de energía de colonocitos, además de su influencia en la determinación del ambiente intestinal, influenciando el tránsito, captación de nutrientes, pH y equilibrio microbiano. De este modo, también presentan importantes propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias, principalmente a través del control de la homeostasis de células Treg. Por ejemplo, la secreción de metabolitos de *Faecalibacterium prausnitzii* puede bloquear la activación de NF- κ B y la producción de IL-8, afectando a la cascada inflamatoria (Cao, 2014; Lopez-Siles, 2014; Galazzo, 2019).

2.5.1. Repercusiones para la práctica clínica y la investigación

Los análisis estadísticos realizados muestran resultados prometedores con respecto al potencial de la ratio F/E como biomarcador de respuesta terapéutica basado en la relación entre el microbioma intestinal y la EC siendo superior a otros biomarcadores actualmente utilizados en la monitorización de esta enfermedad en la práctica clínica habitual, tales como la calprotectina fecal y el índice de Harvey-Bradshaw. Su uso en solitario o incluso mediante la combinación de diversos biomarcadores podría ser un nuevo objetivo terapéutico en esta enfermedad, aunque precisa de estudios posteriores para su validación e introducción en la práctica clínica. Nuevos estudios clínicos podrían proporcionar más evidencia sobre su posible uso como biomarcador no invasivo de respuesta a anti-TNF en EC, permitiendo decidir sobre las terapias en el manejo de EC, modificando tratamientos en función si se consigue o no alcanzar una microbiota similar a la de sujetos sanos y de esta forma cambiar el curso de la enfermedad partiendo de la patogenia de la misma como es la disbiosis y no como se

ha hecho hasta ahora a través de la consecuencia de la misma, como es la cascada inflamatoria mediante determinaciones como calprotectina fecal o la realización de técnicas invasivas como la endoscopia. Pudiendo establecerse como un biomarcador “precoz” de respuesta en pacientes con enfermedad de Crohn tras tratamiento con anti-TNF, permitiendo predecir la respuesta terapéutica desde el inicio y con ello cambiar el manejo clínico de estos pacientes, disminuyendo las tasas de morbilidad de los mismos y siendo más eficientes.

Por último, podría ser punto de partida para el estudio de futuros ensayos clínicos que permitan no solo a estas terapias anti-TNF sino a todas las involucradas en el manejo de la EC, determinar que tratamiento en base a su microbiota puede ser más efectivo y disponer de una nueva herramienta no invasiva para predecir la respuesta clínica al mismo.

2.5.2. Ventajas y limitaciones

Entre las ventajas, a parte de las implicaciones en la práctica clínica descritas anteriormente estableciéndose como futura nueva herramienta no invasiva implicada en la decisión terapéutica, cabe destacar que, al tratarse de un estudio longitudinal, el paciente es analizado antes y tras la exposición al tratamiento anti-TNF, los datos estarán pareados por lo que disminuye el efecto de la gran variabilidad existente de la microbiota intestinal. Otra ventaja respecto a otros estudios, es que la inclusión de individuos sanos se ha realizado entre familiares de los pacientes, con dietas absolutamente semejantes y por tanto perfectamente comparables. Conocemos que la composición de la microbiota varía por múltiples factores externos destacando la dieta, se ha observado que con intervenciones dietéticas de tres días ya podrían causar un cambio de enterotipo (Wu, 2011; Kovatcheva-Datchary, 2015). Sin embargo, después de unos diez días, los enterotipos parecían estables en un estudio (Wu, 2011), lo que sugiere una tendencia a recuperar el estado original. No obstante, decidimos añadir al protocolo un registro dietético de tres días previo a la recogida de heces para análisis microbiota y reproducir esta dieta previa a la segunda determinación tras seis meses de tratamiento con anti-TNF para minimizar aún más cambios significativos inducidos por la dieta. Esto último, no está contemplado en los estudios publicados hasta el momento.

Además, otra medida para objetivar si se producen cambios significativos en el comportamiento de la alimentación de los pacientes durante los seis meses del estudio, se realizó a través de un cuestionario validado de adherencia a la dieta mediterránea a la inclusión y finalización del estudio. Dado que las perturbaciones a largo plazo tienen un efecto más profundo, con una modulación de la dieta durante un año que tiene un fuerte impacto en la relación *Bacteroidetes / Firmicutes* (Wu, 2011; Ley, 2006), lo que puede conducir a cambios de enterotipo.

Entre las limitaciones tenemos que, al tratarse de un estudio observacional, no intervencionista, pueden existir factores de confusión entre la asignación del tratamiento y los resultados, en los análisis comparativos de la tasa de respuesta e incluirse muestras de pacientes que no representen las prácticas clínicas en el mundo real. Como, por ejemplo, la inclusión de pacientes heterogéneos con respecto a sus tratamientos anteriores a anti-TNF. Otra limitación está en el número reducido de pacientes incluidos por el costo inherente de la técnica que no ha permitido incluir el mismo número de sujetos sanos que pacientes. Además, aunque se trata de un estudio multicéntrico, el número de pacientes que se incorporan al tratamiento anti-TNF y que cumplen todos los criterios de inclusión y exclusión es limitado, más aún el número de consanguíneos que conviven con el paciente y con una dieta similar al que se usa como control. Cabe destacar, sin embargo, que nuestro tamaño muestral para el grupo de pacientes con EC fue similar al publicado hasta la fecha en estudios con un diseño similar (Estevinho, 2020) y que los resultados permiten que este número de pacientes responda a los objetivos planteados.

2.6. CONCLUSIONES

0. La Enfermedad de Crohn se caracteriza por una disbiosis, con reducción de bacterias de la clase *Clostridia*, principalmente géneros relacionados con la capacidad de producción de AGCC.
1. La terapia basada en anti-TNF restaura parcialmente en los pacientes respondedores el microbioma intestinal hacia la microbiota de los individuos sanos.
2. La ratio F/E, como biomarcador no invasivo, permite diferenciar entre pacientes respondedores y no respondedores, con buenos niveles de sensibilidad y especificidad frente a otros biomarcadores actualmente empleados en la práctica clínica.

3. BIBLIOGRAFÍA

3. BIBLIOGRAFÍA

- Aagaard K, Riehle K, Ma J, Segata N, Mistretta T-A, Coarfa C, et al. A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PLoS ONE*. 2012;7:e36466.
- Amon P, Sanderson I. What is the microbiome? *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*. 2017;102: 258–261.
- Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2015; 12: 205–217.
- Ananthakrishnan AN, Luo C, Yajnik V, Khalili H, Garber JJ, Stevens BW, Cleland T, Xavier RJ. Gut Microbiome Function Predicts Response to Anti-integrin Biologic Therapy in Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Host and Microbe*. 2017; 21: 603-610.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011; 473: 174–180.
- Avershina E, Storrø O, Øien T, Johnsen R, Pope P, Rudi K. Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children. *FEMS Microbiol Ecol*. 2014;87:280–90.
- Baker S, Rosh J. The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn’s disease. *Cell Host and Microbe*. 2014; 15: 382–392.
- Bäckhed F. Programming of host metabolism by the gut microbiota. *Ann Nutr Metab*. 2011;58 Suppl 2:44–52.
- Bernstein CN, Shanahan F. Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut*. 2008; 57: 1185–1191.
- Biagi E, Candela M, Turrone S, Garagnani P, Franceschi C, Brigidi P. Ageing and gut microbes: perspectives for health maintenance and longevity. *Pharmacol Res*. 2013;69:11–20.

- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*. 2019; 37: 852–857.
- Bokulich N, et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*. 2018; 17;6(1):90.
- Borrueal N, Carol M, Casellas F, Antolín M, de Lara F, Espín E, Naval J, Guarner F, Malagelada JR. Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut*. 2002 Nov;51(5):659-64.
- Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:790–801.
- Busquets D, Mas-de-Xaxars T, Lopez-Siles M, et al. Anti-tumour necrosis factor treatment with adalimumab induces changes in the microbiota of Crohn's Disease. *J Crohn's Colitis*. 2015; 9(10): 899-906.
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016; 13(7):581–3.
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J*. 2017; 11(12):2639–43.
- Cao Y, Shen J, Ran ZH. Association between *Faecalibacterium prausnitzii* reduction and inflammatory bowel disease: a meta-analysis and systematic review of the literature. *Gastroenterology Research and Practice* 2014;2014: 872725.
- Chaparro M, Barreiro de Acosta M, Benítez JM, Cabriada JL, Casanova MJ, Ceballos D, 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;12:1756284819847034.

- Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108 Suppl 1:4586–91.
- Collins MD, Lawson PA, Willems A, Cordoba JJ, Fernandez-Garayzabal J, Garcia P, et al. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:812–26.
- Collins SM. A role for the gut microbiota in IBS. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2014; 11: 497–505.
- Colombel JF, Sandborn WJ, Reinisch W, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Rachmilewitz D et al. Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2010; 15;362(15):1383-95.
- Costea PI, Hildebrand F, Arumugam M, Bäckhed F, Blaser MJ, Bushman FD, et al. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat Microbiol* 2018;3:8–16.
- Da Silva AC , Gomes F, Yukie L, Rodrigues J. *Escherichia coli* del paciente con enfermedad de Crohn muestra características de virulencia de patotipos enteroinvasivos (EIEC), enterohemorrágicos (EHEC) y enteroagregativos (EAEC). *Gut Pathog*. 2015; 7 (1): 2.
- David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014;505:559-563.
- Debelius J, Song S, Vazquez-Baeza Y, Zech Xu Z, Gonzalez A, Knight R. Tiny microbes, enormous impacts: what matters in gut microbiome studies? *Genome Biol*. 2016; 17: 217.
- Derovs A, Laivacuma S, Krumina A. Targeting Microbiota: What Do We Know about It at Present? *Medicina*. 2019;10:55.
- Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108 Suppl 1(Suppl 1):4554– 4561.
- Di Bella J, Bao Y, Gloor G, Burton J, Reid G. High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *Journal of Microbiological Methods*. 2013; 95: 401–414.

- Dobnik D, Štebih D, Blejec A, Morisset D, Žel J. Multiplex quantification of four DNA targets in one reaction with Bio-Rad droplet digital PCR system for GMO detection. *Scientific Reports*. 2016; 6: 1–9.
- Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld J, Yurgel SN, Brown JR, Taylor CM, Huttenhower C, Langille MG (2019) PICRUST2: An improved and extensible approach for metagenome inference.
- Ellermann M, Carr JS, Fodor AA, Arthur JC, Carroll IM. *Characterizing and Functionally Defining the Gut Microbiota: Methodology and Implications*. Elsevier Inc. 2016.
- Erickson AR, Cantarel BL, Lamendella R, Darzi Y. Integrated metagenomics/metaproteomics reveals human host-microbiota signatures of Crohn's disease. *PloSOne*. 2012; 7: e49138
- Estevinho MM, Rocha C, Correia L, Lago P, Ministro P, Portela F, Trindade E, Afonso J, Peyrin-Biroulet L, Magro F, GEDII (Portuguese IBD Group). Features of Fecal and Colon Microbiomes Associate With Responses to Biologic Therapies for Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020 May;18(5):1054-1069.
- Faith DP. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biol Conserv*. 1992; 61:1–10
- Feagan B, Sandborn W, Mittmann U, Bar S, D'Haens B. Omega-3 Free Fatty Acids for the Maintenance of Remission in Crohn Disease. *JAMA*. 2008;299(14):1690-7.
- Fiorucci S, Distrutti E. Bile Acid-Activated Receptors, Intestinal Microbiota, and the Treatment of Metabolic Disorders. *Trends in Molecular Medicine*. 2015; 21: 702–714.
- Fitzgerald CB., et al. Comparative analysis of *Faecalibacterium prausnitzii* genomes shows a high level of genome plasticity and warrants separation into new species-level taxa. *BMC Genomics*. 2018; 19:931.
- Foersch S, Waldner MJ, Neurath MF. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases*. 2013; 31: 317–320.
- FrankDN,StAmandAL,FeldmanRA,BoedekerEC,HarpazN,PaceNR.Molecular-phylogeneticcharacterizationof microbial community imbalances in human

- inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:13780-13785.
- Furet J-P, Firmesse O, Gourmelon M, Bridonneau C, Tap J, Mondot S, Dore J, Corthier G. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiology Ecology*. 2009; 68: 351–362.
 - Galazzo G, Tedjo DI, Wintjens DSJ, Savelkoul PHM, Masclee AAM, Bodelier AGL, Pierik MJ, Jonkers DMAE, Penders J. Faecal Microbiota Dynamics and their Relation to Disease Course in Crohn's Disease. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2019; 13(10): 1273–128.
 - Grund B, Sabin C. Analysis of Biomarker Data: logs, odds ratios and ROC curves. *Current Opinion HIV AIDS*. 2010; 5: 473–479.
 - Haiser H, Gootenberg D, Chatman K, Sirasani G, Balskus E, Turnbaugh P (2013) Predicting and manipulating cardiac drug inactivation by the human gut bacterium *eggerthella lenta*. *Science*. 2013: 341: 295–298.
 - Hamdelsman, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2005;68:669-85.
 - Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet* 1980; 315:514.
 - Hofer U. Microbiome: Bacterial imbalance in Crohn's disease. *Nature Reviews Microbiology*. 2014; 12: 312–313.
 - Huijsdens XW, Linskens RK, Mak M, Meuwissen SG, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Quantification of Bacteria Adherent to Gastrointestinal Mucosa by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40: 4423–4427.
 - Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207–214.
 - Ianiro G, Bibbo S, Scaldaferrì F, Gasbarrini A, Cammarota G. Faecal microbiota transplantation in inflammatory bowel disease: beyond the excitement. *Medicine (Baltimore)* 2014;93:e97.
 - Iebba V., et al. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. *New Microbiol*. 2016; 39: 1-12.

- Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut*. 2014;63:559–66.
- Jones GR, Lyons M, Plevris N, Jenkinson PW, Bisset C, Burgess C, et al. IBD prevalence in Lothian, Scotland, derived by capture-recapture methodology. *Gut*. 2019;68(11):1953-60. doi: 10.1136/gutjnl-2019-318936.
- Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, Vandamme P, et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* 2011;60:631-637.
- Kaplan GG, Ng SC. Understanding and preventing the global increase of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2017;152:313-21.
- Katoh K et al. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jul 15;30(14):3059-66.
- Kaur N, Chen CC, Luther J, Kao JY. Intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*. 2011; 2: 211-216.
- Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2011; 15;474(7351):307-17.
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*. 2013; 41: 1–11.
- Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108 Suppl 1:4578–85.
- Kovatcheva-Datchary P, et al. Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell Metab*. 2015; 22:971–982.
- Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology* 2014;146:1489-1499.
- Kuypers J, Jerome KR. Applications of Digital PCR for Clinical Microbiology. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017; 55: 1621–1628.

- Lawley TD, Walker AW. Intestinal colonization resistance. *Immunology*. 2013; 203; 138: 1–11.
- Lémann M, Mary J-Y, Duclos B et al. Infliximab plus azathioprine for steroid-dependent Crohn's disease patients: a randomized placebo-controlled trial *Gastroenterology*. 2006;130(4):1054-61.
- Levy M, Thaiss CA, Zeevi D, Dohnalová L, Zilberman-Schapira G, Mahdi JA, et al. Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell* 2015;163:1428–43.
- Lewis JD, Chen EZ, Baldassano RN, Otley AR, Griffiths AM, Lee D, Bittinger K, Bailey A, Friedman ES, Hoffmann C, et al. Inflammation, Antibiotics, and Diet as Environmental Stressors of the Gut Microbiome in Pediatric Crohn's Disease. *Cell Host and Microbe*. 2015; 18: 489–500.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006; 444:1022–3.
- Li D, Wang P, Wang P, Hu X, Chen F. The gut microbiota: A treasure for human health. *Biotechnol Adv* 2016;34:1210–24.
- Lichtenstein GR, Feagan BG, Cohen RD, Salzberg BA, Diamond RH, Chen DM et al. Serious infections and mortality in association with therapies for Crohn's disease: TREAT registry . *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4(5):621-30.
- Lopetuso LR, Scaldaferri F, Petito V, Gasbarrini A. Commensal Clostridia: Leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathog*. 2013;5:23.
- Lopez-Siles M, Martinez-Medina M, Busquets D, Sabat-Mir M, Duncan SH, Flint HJ, Aldeguer X, Garcia-Gil LJ. Mucosa-associated *Faecalibacterium prausnitzii* and *Escherichia coli* co-abundance can distinguish Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease phenotypes.. *Int J Med Microbiol*. 2014 May; 304(3- 4):464-75.
- Lopez-Siles M., et al. *Faecalibacterium prausnitzii*: from microbiology to diagnostics and prognostics. *ISME J*. 2017; 11:841-52.
- Lozupone C, et al. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* . 2005; 71(12):8228-35.
- Lozupone C, et al. Global patterns in bacterial Diversity. *PNAS*. 2007; 104 (27) 11436-11440.

- Magnusson MK, Strid H, Sapnara M, et al. Anti-TNF therapy response in patients with ulcerative colitis is associated with colonic antimicrobial peptide expression and microbiota composition. *J Crohn's Colitis*. 2016; 10(8):943-952.
- Manichanch C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, Nalin R, Jarrin C, Chardon P, Marteau P, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*. 2006; 55: 205–211.
- Manichanch C, Borrueal N, Casellas F, Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nature reviews gastroenterology and hepatology*. 2012; 9: 599-608.
- Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. 2015;30;3:31.
- Martin CR, Osadchiy V, Kalani A, Mayer EA. The Brain-Gut-Microbiome Axis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2018;12:133-148.
- Martín-de-Carpi J, Rodríguez A, Ramos E, Jiménez S, Martínez-Gómez MJ, Medina E; SPIRIT-IBD Working Group of Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica. Increasing incidence of pediatric inflammatory bowel disease in Spain (1996-2009): the SPIRIT Registry. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19(1):73-80.
- Matricon J, Barnich N, Ardid D. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*.2010; 491: 119–124.
- Mazmanian SK, Kasper DL. The love-hate relationship between bacterial polysaccharides and the host immune system. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:849–858.
- MCGovern D, Kugathasan S, Cho JH. Genetics of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2015; 149: 1163–1176.
- Methé BA, Nelson KE, Pop M, Creasy HH, Giglio MG, Huttenhower C, Gevers D, Petrosino JF, Abubucker S, Badger JH, et al. A framework for human microbiome research. *Nature*. 2012; 486: 215–221.
- Moller F, Andersen V, Wohlfahrt J, Jess T. Familial risk of inflammatory bowel disease: a population-based cohort study 1977-2011. *The American Journal of Gastroenterology*. 2015; 110: 564– 571.

- Monif GRG. Understanding Therapeutic Concepts in Crohn's Disease. *Clinical Medicine Insights: Gastroenterology*. 2018; 11: 1–3.
- Na S-Y, Moon W. Perspectives on Current and Novel Treatments for Inflammatory Bowel Disease. *Gut Liver*. 2019; 13(6): 604–616.
- Nava GM, Friedrichsen HJ, Stappenbeck TS. Spatial organization of intestinal microbiota in the mouse ascending colon. *ISME J*. 2011;5:627– 638.
- Ni J, Wu GD, Albenberg L, Tomov VT. Gut microbiota and IBD: Causation or correlation? *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2017; 14: 573–584.
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, et al. A frame shift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-606.
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007;5:e177.
- Pariente B, Cosnes J, Danese S, Sandborn WJ et al. Development of the Crohn's disease digestive damage score, the Lémann score. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(6):1415-22.
- Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P, Beiko RG. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*. 2014; 30: 3123–3124.
- Pascal V, Pozuelo M, Borrueal N, Casellas F, Campos D, Santiago A, Martinez X, Varela E, Sarrabayrouse G, Machiels K, et al. A microbial signature for Crohn's disease. *Gut*. 2017; 66: 813– 822.
- Peyrin-Biroulet L, Cieza A, Sandborn WJ, Coenen M, Chowers Y, Hibi T et al. Development of the first disability index for inflammatory bowel disease based on the international classification of functioning, disability and health. *Gut* 2012; 61(2):241-7.
- Philpott DJ, Girardin SE. Crohn's disease associated Nod2 mutants reduce IL10 transcription. *Nat Immunol* 2009;10:455-457.
- Piovani D, Danese S, Peyrin-Biroulet L, Nikolopoulos GK, Lytras T, Bonovas S. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: an Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology*. 2019; 2019 Sep;157(3):647-659
- Postel M, Roosen A, Laurent-Puig P, Taly V, Wang-Renault SF. Droplet-based digital PCR and next generation sequencing for monitoring circulating tumor

- DNA: a cancer diagnostic perspective. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2018;18: 7–17.
- Price M, et al. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. [PLoS One](#). 2010; 5(3): e9490.
 - Qin J, Li R, Raes J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010; 464: 59-65.
 - Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41(Data- base issue):D590–6. Epub 2012/11/30.
 - Rajca S, Grondin V, Louis E et al. Alterations in the intestinal microbiome (dysbiosis) as a predictor of relapse after infliximab withdrawal in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2014; 20(6):978-86.
 - Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev*. 2014;38:996– 1047.
 - ReaK, DinanTG, CryanJF. The microbiome: A key regulator of stress and neuroinflammation. *Neurobiol Stress* 2016;4:23-33.
 - Ren B, Schwager E, Knights D, Song SJ, Yassour M, Haberman Y, Walters T,
 - Rios-Covian D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de Los Reyes-Gavilan CG, Salazar N. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Front Microbiol* 2016;7:185.
 - Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis*. 2015;26:26050.
 - Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology* 2011; 24: 12(6): R60.
 - Shaw KA, Bertha M, Hofmekler T, Chopra P, Vatanen T, Srivatsa A, Prince J, Kumar A, Sauer C, Zwick ME, et al. Dysbiosis, inflammation, and response to treatment: a longitudinal study of pediatric subjects with newly diagnosed inflammatory bowel disease. *Genome Medicine*. 2016; 8: 1–13.
 - Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol*. 2015;33:496–503.

- Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 2013;341:569–73.
- Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 2005;43:3380-3389.
- Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet J-P, et al. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol* 2009;11:2574–84.
- Taur Y, Pamer EG. The intestinal microbiota and susceptibility to infection in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis.* 2013;26:332–337.
- Thomas F, Hehemann J-H, Rebuffet E, Czjzek M, Michel G. Environmental and gut bacteroidetes: the food connection. *Front Microbiol* 2011;2:93.
- Tojo R, Suárez A, Clemente MG, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A, Gueimonde M, et al. Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J Gastroenterol* 2014;20:15163– 76.
- Tomkovich S, Jobin C (2016) Microbiota and host immune responses: A love-hate relationship. *Immunology.* 2016; 147: 1–10
- Torres J, Mehandru S, Colombel J-F, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. *The Lancet.* 2016; 6736: 31711–1.
- Ungaro R, Bernstein CN, Geary R, Hviid A, Kolho KL, Kronman MP, Shaw S, et al. Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2014;109:1728-1738.
- Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the Human Microbiome. *Nutrition Reviews.* 2012;70: 1–12.
- Vermeire S, van Assche G, Rutgeerts P. Review article: Altering the natural history of Crohn's disease--evidence for and against current therapies. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25(1):3-12.
- Wahlström A, Sayin SI, Marschall HU, Bäckhed F. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metabolis.* 2016; 24: 41–50.
- Walter J, Ley R. The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. *Annu Rev Microbiol.* 2011;65:411–429.

- Wang Y, Gao X, Ghazlane A, et al. Characteristics of faecal microbiota in paediatric Crohn's disease and their dynamic changes during infliximab therapy. *J Crohn's Colitis*. 2017; 1:1-10.
- Wexler H. Bacteroides: The good, the bad, and the nittygritty. *Clin Microbiol Rev*. 2007;4:593–621.
- Wong J, de Souza R, Kendall C, Emam A, Jenkins D. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2006; 40: 235–243.
- Woodmansey EJ, McMurdo MET, Macfarlane GT, Macfarlane S. Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic- treated elderly subjects. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70:6113–22.
- Wu GD, et al. Linking long-t dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011; 334:105–8.
- Yilmaz B, Juillerat P, Øyås O, Ramon C, Bravo FD, Franc Y, Fournier N, Michetti P, Mueller C, Geuking M, et al. Microbial network disturbances in relapsing refractory Crohn's disease. *Nature Medicine*. 2019; 25: 701–701.
- Young VB. The role of the microbiome in human health and disease: An introduction for clinicians. *BMJ (Online)*. 2017: 356.
- Zhou Y, Xu ZZ, He Y, et al. Gut Microbiota Offers Universal Biomarkers across Ethnicity in Inflammatory Bowel Disease Diagnosis and Infliximab Response Prediction. *mSystems*. 2018; 3(1):1-14.
- Zuo T, Ng SC. The Gut Microbiota in the Pathogenesis and Therapeutics of Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in microbiology*. 2018; 9: 2247.

4. PUBLICACIONES TESIS



Project Report

Evaluation of Changes in Gut Microbiota in Patients with Crohn's Disease after Anti-Tnf α Treatment: Prospective Multicenter Observational Study

Laura Sanchis-Artero ¹, Juan Francisco Martínez-Blanch ^{2,*}, Sergio Manresa-Vera ²,
Ernesto Cortés-Castell ³, Josefa Rodríguez-Morales ¹ and Xavier Cortés-Rizo ¹

¹ Inflammatory Bowel Disease Unit, Department of Digestive Diseases, Hospital of Sagunto, Av. Ramón y Cajal s/n, 46520 Sagunto, Valencia, Spain; laurasanchisartero@gmail.com (L.S.-A.); prmorales06@yahoo.es (J.R.-M.); xacori@gmail.com (X.C.-R.)

² Genomics Laboratory, ADM-Lifesequencing, Parque Científico Universidad de Valencia, Catedrático Agustín Escardino Benlloch, 9, Edificio 2, 46980 Paterna, Valencia, Spain; sergiomanre@gmail.com

³ Department of Pharmacology, Pediatrics and Organic Chemistry Miguel Hernández University, Carretera de Valencia—Alicante S/N, 03550 San Juan de Alicante, Alicante, Spain; ernesto.cortes@umh.es

* Correspondence: juan.martinezblanch@adm.com

Received: 4 June 2020; Accepted: 10 July 2020; Published: 15 July 2020



Abstract: *Background:* Crohn's disease is believed to result from the interaction between genetic susceptibility, environmental factors and gut microbiota, leading to an aberrant immune response. The objectives of this study are to evaluate the qualitative and quantitative changes in the microbiota of patients with Crohn's disease after six months of anti-tumor-necrosis factor (anti-TNF α) (infliximab or adalimumab) treatment and to determine whether these changes lead to the recovery of normal microbiota when compared to a control group of healthy subjects. In addition, we will evaluate the potential role of the *Faecalibacterium prausnitzii*/*Escherichia coli* and *Faecalibacterium prausnitzii*/*Clostridium coccooides* ratios as indicators of therapeutic response to anti-TNF α drugs. *Methods/Design:* This prospective multicenter observational study will comprise a total of 88 subjects: 44 patients with Crohn's disease scheduled to start anti-TNF α treatment as described in the drug specifications to control the disease and 44 healthy individuals who share the same lifestyle and eating habits. The presence of inflammatory activity will be determined by the Harvey-Bradshaw index, analytical parameters in blood, including C-reactive protein, and fecal calprotectin levels at commencement of the study, at three months and at six months, allowing the classification of patients into responders and non-responders. Microbiota composition and the quantitative relationship between *Faecalibacterium prausnitzii* and *Escherichia coli* and between *Faecalibacterium prausnitzii* and *Clostridium coccooides* group as indicators of dysbiosis will be studied at inclusion and six months after initiation of treatment using ultra sequencing with Illumina technology and comparative bioinformatics analysis for the former relationship, and digital droplet PCR using stool samples for the latter. Upon inclusion, patients will complete a survey of dietary intake for the three days prior to stool collection, which will be repeated six months later in a second collection to minimize dietary bias. *Discussion:* In this study, massive sequencing, a reliable new tool, will be applied to identify early biomarkers of response to anti-TNF treatment in patients with Crohn's disease to improve clinical management of these patients, reduce morbidity rates and improve efficiency.

Keywords: gut microbiota; anti-TNF α ; Crohn's disease; *Faecalibacterium prausnitzii*; *Escherichia coli* and *Clostridium coccooides* group

1. Background

Gut microbiota is defined as the total number of living microorganisms (bacteria, fungi, archaea, viruses and others) present in the intestine. The gut microbiome is a taxonomic characterization of microbial diversity including the set of genomes and, via genes, their physicochemical capabilities [1,2]. In healthy individuals, the gut bacterial microbiota is composed of more than 10^{18} different microorganisms. The vast majority of these are bacteria, with some 1100 more prevalent species; of these an estimated 160 species of bacteria are specific to each individual [3].

The microbiome, therefore, is a highly complex structure, involving thousands of microorganisms belonging to very different taxonomic classifications and, consequently, millions of associations between them, making its study a great challenge [4]. Through advances in bioinformatics, in 2003 the human genome was decoded, a milestone in science. Since then, much attention has been focused on deciphering this extensive network of microbes, the microbiota, also known as the second human genome, or as another organ. These microbes coexist with us and have a larger total number of genes than the human genome. In short, there is no simple description of these structures. However, due to their importance, considerable interest has been generated in the identification of patterns associated with human health and disease states which may even lead to the development of microbiota-based diagnostics and therapies as well as having implications for nutritional or pharmaceutical interventions [2]. To this end, reproducible patterns of gut microbiome variation have been observed in healthy adults, determining the existence of three major microbiota communities, based on the predominance or absence of species of the key genera [5]. Any other combination of key genera or genera not described by Arumugam et al. [5], together with a reduction in biodiversity, is considered dysbiosis [6,7]. Numerous technologies have been applied with the aim of examining the gut microbiota, which has resulted in the capacity and cost of microbiota research being significantly reduced in recent years, mainly due to advances in massive sequencing technologies such as next-generation sequencing. These techniques allow information of interest to be obtained quickly and efficiently by sequencing regions of the prokaryotic 16S ribosomal RNA gene [8].

In inflammatory bowel disease (IBD), the role of the microbiota in disease development and onset is very clear. While it is true that to date no specific pathogen has been conclusively identified as a trigger, we do know that, for the disease to develop, dysbiosis or a definitive change in the intestinal microbiota must occur and is likely to be the defining event in the development of Crohn's disease (CD). In IBD, it has been documented that the gut microbiota bacterial composition transitions from saprophytic to predominantly pathogenic [9]. Indeed, there is evidence of a significant increase in *Escherichia coli* concentrations, including pathogenic variants, in CD patients with ileal involvement [10]. It is unknown at present whether dysbiosis is a cause or a consequence of the development of CD. It appears that the combination of a genetic predisposition and an alteration in gut microbiota are the final triggers of a chronic IBD-type inflammatory process. Specifically, we know that the disease develops in genetically susceptible individuals through dysregulation of homeostasis between commensal microbiota and/or other environmental elements and an altered immune response in the patient. An error in the interpretation of the stimulus or in the regulation of the immune response leads to an imbalance between pro- and anti-inflammatory factors, perpetuating the inflammatory process [11].

The gut microbiota play a crucial role in the development of the immune system and maintenance of the intestinal epithelial barrier. Inflamed ileal mucosa in CD patients shows increased production of tumor necrosis factor- α (TNF α), compared to normal ileum, induced by a dysbiosis in the gut microbiota, with a significant increase in bacteria that stimulate TNF production. Numerous bacteria in the commensal microbiota inhibit the release of TNF and other pro-inflammatory cytokines, e.g., bacteria that produce short-chain fatty acids (SCFA), inducing a potent anti-inflammatory effect in the intestinal mucosa. In contrast, other types of bacteria, such as *Escherichia coli* ECOR-26, which have been linked to CD, induce increased TNF release and stimulation of IL-10 release [12]. Current hypotheses in favor of a higher release of TNF α induced by intestinal dysbiosis support the idea that

restoration of a less pathogenic microbe in the intestinal mucosa (inducing a reduced release of TNF and other pro-inflammatory cytokines) could lead to better disease control [13].

Today, anti-TNF therapy is one of the therapeutic pillars in the management of CD, but these drugs only treat the consequences of the disease and not the possible cause. Approximately one quarter of CD patients will be primary non-responders to anti-TNF agents, and one third of responders will experience a loss of response over time [14]. To improve treatment effectiveness, it is essential to study why these patients do not have an optimal response.

Traditionally, the prognosis and monitoring of treatments in patients with CD have been limited to the control of clinical symptoms (e.g., through the Harvey-Bradshaw Index [HBI]: see Table 1) accompanied by imaging techniques (primarily endoscopy and magnetic resonance imaging). However, these tools for assessing disease activity have many drawbacks and limitations. Among them, clinical scoring systems are highly subjective and can be misleading in this disease, characterized by alternating periods of exacerbation and remission [15,16]. Ileo-colonoscopy with biopsies is the current gold standard for the diagnosis and evaluation of inflammatory activity, with the great disadvantage that it is an invasive procedure [17] and that it is not always possible to reach the diseased area. In an attempt to identify non-invasive markers, fecal calprotectin (FC), a protein originating from the migration of neutrophils to the intestinal mucosa, was introduced as an indirect trait of intestinal inflammation, allowing more objective monitoring than clinical indices, although with low specificity and low positive predictive value depending on the chosen cut-off point [18,19].

Table 1. Harvey-Bradshaw Index (HBI).

General Well-Being (Previous Day)	0 (Very Well)	1 (Slightly Below Par)	2 (Poor)	3 (Very Poor)	4 (Terrible)
Abdominal pain	0 (none)	1 (mild)	2 (moderate)	3 (severe)	
Number of liquid or soft stools per day (previous day)					
Complications (score 1 per item)	Arthritis/ arthralgia	Iritis/ uveitis	Erythema nodosum/ aphthous ulcers/Pyoderma gangrenosum	Anal fissure new fistula/ abscess	
Abdominal mass	0 (none)	1 (dubious)	2 (definite)	3 (definite + tender)	

Remission \leq 4 points; mild disease 5–6 points; moderate disease 6–12 points; severe disease $>$ 12 points.

Currently, the role of bacterial gut microbiota is described as a key factor in the development of CD. Various authors defend the reduction in biodiversity and abundance of the phyla *Bacteroidetes* and *Firmicutes* such as *Faecalibacterium prausnitzii* (SCFA-producing bacteria), as well as an increase in the phylum *Proteobacteria* such as *Escherichia coli*, characteristic of patients with this disease compared to healthy individuals [6,7,20]; a decrease in abundance of this species has even been observed after anti-TNF treatment [20]. In this line, one study has identified certain specific microbial profiles that correlate with the recurrence of disease after achieving remission with infliximab treatment [14]. Several studies have also shown that the greater abundance of SCFA-producing bacteria predicted the effectiveness of infliximab [21,22] and another study associated the greater abundance of SCFA with a sustained response to this treatment [23].

A greater understanding of the composition of the bacterial gut microbiota in CD patients, such as the persistence of a significant proportion of certain pathogenic bacteria or low bacterial biodiversity, would make it possible to determine the role of gut microbiota in therapeutic responses and to establish biomarkers of response and relapse, as well as to determine whether it is necessary to restore intestinal normo-biosis in these patients. In addition, different gut microbiota profiles can be found, which enable us to predict the response to different therapeutic lines, thus being more efficient from the outset.

Accordingly, this study has been designed to analyze biomarkers of response to anti-TNF treatment in CD through gut microbiota as an alternative non-invasive tool for predicting treatment response.

2. Methods

2.1. Ethics, Consent and Permission

The final protocol was approved by the Sagunto Hospital Clinical Research Ethics Committee, in accordance with applicable national and local laws and requirements. The study was classified by the Spanish Agency for Medicine and Health Products as a prospective follow-up post-authorization study.

The study adheres to the European guidelines for the protection of human research subjects, the Declaration of Helsinki and the recommendations of the European Network of Centres for Pharmacoepidemiology and Pharmacovigilance. Approval was obtained from all local ethics committees at all participating centers. Prior to inclusion, each patient will receive a detailed report on the nature, scope and possible consequences of the study from a physician and then will provide written informed consent. No action specifically required for the study will be taken without the valid consent of the patient.

2.2. Investigators

This multicenter study in the Valencian Community (Spain) includes eight academic medical centers. The patients will be recruited by the respective participating centers of the Public Health System of the Valencian Community, in which there are approximately 15,000 patients with IBD [24]. All the researchers will be gastroenterologists with experience in the follow-up and treatment of patients with CD. The centers participating in the study will have a total load of 3600 patients with CD, 10–15% of whom will be candidates for biological treatment according to estimated data from each center.

2.3. Study Objectives

The main objective of this study is to evaluate the modification of the gut microbiota in CD patients prior to and six months after anti-TNF therapy (infliximab or adalimumab). The secondary objectives are to evaluate the association between the changes in microbiota and the clinical, biological and endoscopic response of the patients; to correlate the normalization of the gut microbiota with the response to anti-TNF treatment; to determine the level of biodiversity of the fecal microbiota at the inclusion and completion of the study in each participant; to evaluate the potential role of the *Faecalibacterium prausnitzii*/*Escherichia coli* and *Faecalibacterium prausnitzii*/*Clostridium coccooides* ratios as an indicator of therapeutic response; and finally, to describe the clinical, biological and epidemiological characteristics of the patients included in the study prior to and six months after anti-TNF treatment.

2.4. Primary Study Variable

Normalization of gut microbiota after treatment: percentage of patients with dysbiosis of the gut microbiota before the introduction of anti-TNF therapy whose microbiota is normalized after six months of treatment. Dysbiosis is defined as a gut microbiota pattern different from the established patterns of normality according to Arumugam et al. [5]: enterotype 1 (ET B) predominantly contains *Bacteroides*, enterotype 2 (ET P) is characterized by the high abundance of *Prevotella* inversely correlated with *Bacteroides*, and enterotype 3 (ET F) can be distinguished by the presence of *Firmicutes*, highlighting the genus *Ruminococcus*.

2.5. Secondary Study Variables

Percentage of patients with dysbiosis at inclusion (after initiation of anti-TNF treatment) and at study completion, measured as dichotomous qualitative variables.

Levels of biodiversity of the fecal microbiota for the microbiome analyzed are defined as follows: low biodiversity is a total of five or fewer species, medium biodiversity is a total of between 6 and 10 species, and high biodiversity is a total of 11 or more species present.

Determine the increase in biodiversity pre- and post-anti-TNF treatment, defining an improvement as an increase in the number of species greater than or equal to five with respect to baseline.

Determine the relationship between *Faecalibacterium prausnitzii*/*Escherichia coli* and *Faecalibacterium prausnitzii*/*Clostridium coccooides* pre- and post-anti-TNF treatment.

Associate the presence and type of modifications in the gut microbiota after anti-TNF treatment with the clinical and biological response of the patient during the study.

Definitions:

- Clinical remission: HBI ≤ 4 (Table 1)
- Clinically active disease: HBI > 4
- Clinical response: when the HBI falls by three or more points.
- Relapse: increased activity assessed by clinical, laboratory, radiology or endoscopic findings leading to a change in treatment to control the disease or an HBI > 4 .
- Biological remission: C-reactive protein (CRP) < 5 mg/L and (FC) < 250 $\mu\text{g/g}$.
- Active biological disease: CRP ≥ 5 mg/L and FC ≥ 250 $\mu\text{g/g}$.
- Overall response: the evaluation of clinical response will be established subjectively by the responsible physician according to clinical and analytical parameters, classifying patients as non-responders, responders without remission and responders in remission.

Clinical, demographic and complementary test variables included in the study protocol (Table 2):

- Epidemiological characteristics: age, sex, smoking habits and body mass index.
- Clinical characteristics: date of diagnosis and disease pattern, Montreal classification, activity index, presence of extra-intestinal manifestations, pharmacological history, concomitant medication, adverse effects, presence/absence of initial and final overall response, and clinical decisions derived from this response.
- Anti-TNF treatment data: indication, type, start date, induction pattern, maintenance pattern, specify whether anti-TNF drugs were used prior to 24 weeks before inclusion and reason for discontinuation.
- Complementary examinations for each patient:
 - Laboratory tests: complete blood count, erythrocyte sedimentation rate, CRP, fibrinogen, ferritin, transferrin saturation index, total proteins, albumin, urea, creatinine, GOT/AST (Aspartate Aminotransferase), GPT/ALT (Alanine Aminotransferase), GGT (Gamma-glutamyl transpeptidase), ALP (Alkaline Phosphatase), cholesterol and triglycerides
 - FC
 - Stool culture, parasites and *Clostridium difficile* toxin in feces
 - Stool collection for microbiota analysis
 - Radiological (ultrasound/computerized tomography/magnetic resonance imaging) and/or endoscopic testing if available prior to treatment (at least 12 weeks prior to inclusion) or 6 months after treatment.
 - 72-h dietary record prior to stool sample collection for microbiota analysis. Patients will be provided with a daily survey in which they must record food and beverage intake, specifying characteristics, quantity and brands of packaged products.
 - Record of adherence to the Mediterranean diet. Together with the dietary record, the patients will also complete a validated survey of adherence to the Mediterranean diet [25] classifying this adherence as low (0–6 points), moderate (7–10 points) or high (11–14 points).

Table 2. Summary of variables to be collected during the study.

Study Variables
Primary: Normalization of gut microbiota (after anti-TNF treatment) (yes/no)
Secondary variables:
A. Gut microbiota
- Initial dysbiosis (yes/no)
- Final dysbiosis (yes/no)
- Initial biodiversity level (low/medium/high)
- Final biodiversity level (low/medium/high)
- Increase in biodiversity (yes/no)
- Initial <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> / <i>Escherichia coli</i>
- Final <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> / <i>Escherichia coli</i>
- Initial <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> / <i>Clostridium coccoides</i> group
- Final <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> / <i>Clostridium coccoides</i> group
B. Clinical-biological parameters:
- Initial Harvey-Bradshaw Index
- Final Harvey-Bradshaw Index
- Initial C-reactive protein (mg/l)
- Final C-reactive protein (mg/l)
- Initial fecal calprotectin ($\mu\text{g/g}$)
- Final fecal calprotectin ($\mu\text{g/g}$)
C. Epidemiological data
- Age (years)
- Sex (male/female)
- Time from diagnosis to anti-TNF treatment (months)
- Body Mass Index (kg/m^2)
- Smoking habit (yes/no)
- 72-h dietary record
- Adherence to Mediterranean diet

2.6. Study Design

This prospective, observational, multicenter study will include patients with CD who require anti-TNF therapy to control IBD. Anti-TNF (infliximab or adalimumab) treatment will be initiated under medical prescription according to the drug data sheet and the MAISE (drugs with a high health or economic impact) of the Valencian Health Agency. Administration of treatment will be performed in routine clinical practice and will not be promoted by this study. Fecal samples will be collected for gut microbiota analysis prior to exposure to the anti-TNF drug and six months after commencement of treatment. The patients will be monitored prospectively by their responsible physician during routine clinical practice during the first six months of anti-TNF treatment, recording the presence of inflammatory activity and whether there was no response, partial response or clinical remission at three months and at the end of the study follow-up.

Data to be recorded will include the presence of inflammatory activity (through calculation of the HBI), laboratory analytical data (complete blood count, general biochemistry, CRP) and the FC value prior to and three and six months after anti-TNF drug exposure, as well as treatments at the time of inclusion and any treatment changes throughout the duration of the study. The patient will be instructed to avoid taking probiotics and antibiotics during the study period. However, if antibiotics have to be taken, the patient must contact the study coordinator. In all cases, the second stool sample for mass sequencing will be performed after four weeks without treatment with probiotics/antibiotics, maintaining the same dietary conditions to avoid variability.

Whenever available, radiological and endoscopic activity data used in clinical practice to assess disease activity will be collected when performed, up to 12 weeks prior to patient inclusion and during the study.

Patients who undergo surgical resection within the study period will remain included but will be classified as non-responders to anti-TNF. Prior to surgery, clinical evaluation will be performed and blood and stool samples collected for fecal microbiota analysis, identical to the last determination at week 24 performed per protocol.

The patients will be provided with a 72-h dietary survey designed to record their dietary intake three days prior to stool collection at inclusion, repeated at six months to minimize bias concerning diet. Similarly, patients must complete a validated survey of adherence to the Mediterranean diet at inclusion and at six months to assess significant changes in their eating habits. An outline of the different data collection phases is shown in Figure 1.

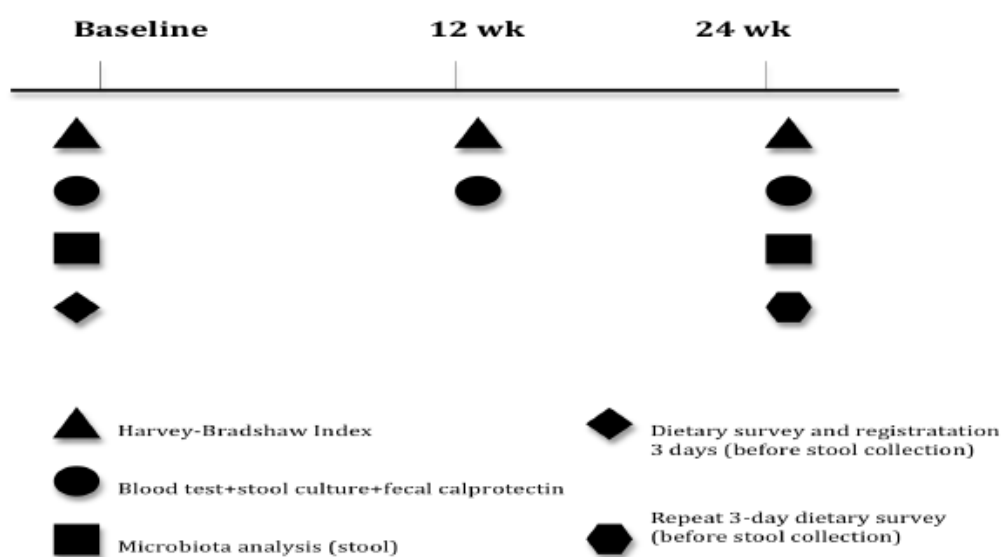


Figure 1. Overall study design.

2.7. Inclusion Criteria

All the patients must be adults (aged ≥ 18 years) diagnosed with CD with a clinical course of moderate-severe disease requiring anti-TNF treatment, in whom the indication for such treatment was inflammatory bowel activity.

2.8. Exclusion Criteria

Excluded from the study will be all patients who had taken antibiotics, probiotics, or proton pump inhibitors four weeks prior to the start of the study and stool collection; patients with chronic hepatitis C virus and chronic HIV infection; indication for anti-TNF treatment for reasons other than control of their luminal disease (e.g., enteropathic arthropathy, perianal disease, or prevention of recurrence); patients with previous ileum or colon surgery; and patients who will have received previous anti-TNF treatment in the 24 weeks prior to the start of the study.

2.9. Sample Size Considerations

Few studies have evaluated the variability in gut microbiota after anti-TNF therapy in adult patients with IBD [14,21–23,26–30]. However, from the results obtained it is not possible to determine the exact percentage of expected variability. Accepting an alpha risk of 0.05 and a beta risk of 0.2 in a bilateral contrast, 44 subjects will be required assuming that the initial proportion of events is 0.95 (degree of dysbiosis in the population at the start of the study) and 0.70 at the end. A loss to follow-up rate of 10% has been estimated.

2.10. Planning of the Sample Collection

The participating centers will be responsible for taking samples and determining conventional analytical and fecal data (complete blood count, stool samples, parasitology, FC, etc.) within routine clinical practice. The specific samples for the analysis of microbiota to be conducted externally will be collected by the patients themselves. The samples must be frozen after collection (by the patient in his or her freezer) until they are delivered to the laboratory of the hospital of origin, where they will be stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The samples will subsequently be centralized.

2.11. Sequencing and Bioinformatics

The samples will be coded and the bacterial microbiota present will be analyzed using capture of the v3-v4 region of the 16S rRNA subunit [8], ultra-sequencing with Library Illumina 15044223 B protocol (ILLUMINA) comparative bioinformatics analysis. From 200 mg of stool, DNA will be obtained through a combination of mechanical and enzymatic lysis, and purified using the PowerFecal Pro DNA isolation (Qiagen) protocol with modifications. The DNA will be processed and prepared for sequencing. The sequences obtained will be filtered by parameters of quality (threshold value Q20) and length (sequences greater than 250 nucleotides). This strategy avoids erroneous ascriptions that generate an incorrect distribution of taxa. The minimum number of readings per sample will be 5000 and the mean length greater than 400 nt. A rarefaction analysis will be performed on the sample sequences to assess saturation for microbial biodiversity. Subsequently, the analysis of taxonomic identification at different taxonomic levels will be performed using the Microbiome bioinformatics with QIIME 2 2019.4 protocol [31] (Figure 2).

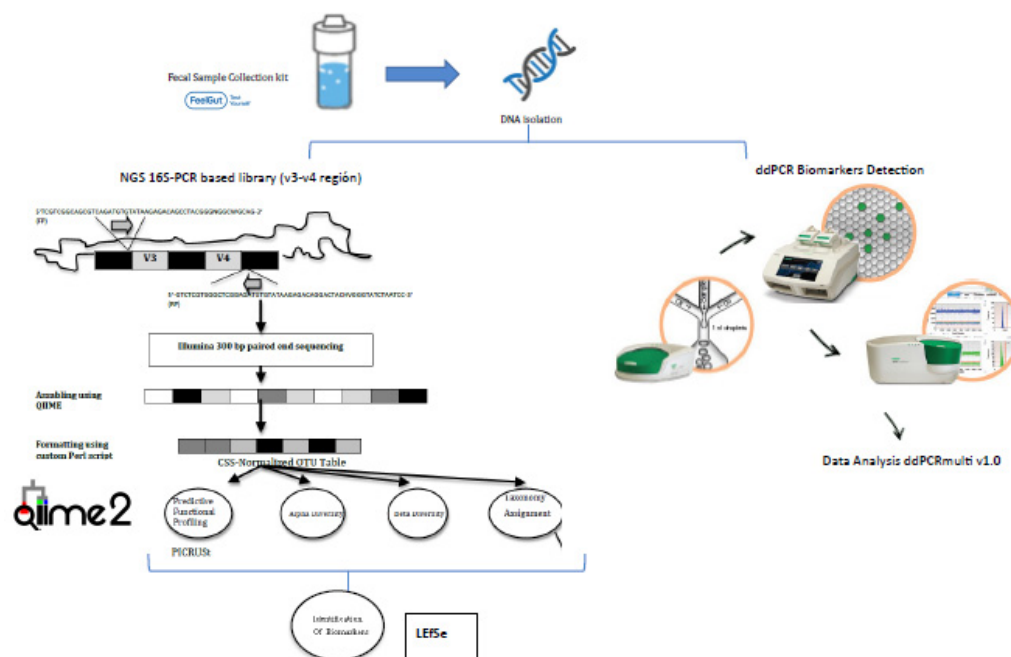


Figure 2. Sequencing and bioinformatics scheme.

2.12. Identification and Evaluation of Potential Biomarkers

To identify potential non-invasive biomarkers from the characterization of the intestinal microbiome in various stages of CD, we will use LEfSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size), an algorithm designed for the discovery of metagenomic biomarkers through class comparison, biological consistency testing and effect size estimation [32].

Due to the need to develop a rapid method of analysis such as the ratios of *Faecalibacterium prausnitzii*/*Escherichia coli* and *Faecalibacterium prausnitzii*/*Clostridium coccoides* group,

a triplex digital droplet PCR will be implemented to allow the absolute quantification of the *Faecalibacterium prausnitzii*, *Escherichia coli* and *Clostridium coccooides* species, as well as the total number of bacteria present in a given sample through the 16S rRNA gene, all with a minimum volume and in a single reaction. Therefore, the appropriate primers and probes have been selected to perform this digital droplet PCR (Table 3), as well as to optimize the different concentrations and hybridization temperatures, based on numerous relevant studies [20,33–36].

Table 3. Primers and probes used in digital droplet PCR [20,35,36].

Target	Primers and Probe	Sequences 5'-3'	Reference
<i>F. prausnitzii</i>	Fpra_428_F	TGTAAACTCCTGTTGTTGAGGAAGATAA	[20]
	Fpra_583_R	GCGCTCCCTTACACCCA	
	Fpra_493_PR	FAM/CAAGGAAGTGACGGCTAACTACGTGCCAG/IABkFQ	
<i>E. coli</i>	Ecoli_395_F	CATGCCGCGTGTATGAAGAA	[35]
	Ecoli_490_R	CGGGTAACGTCAATGAGCAAA	
	Ecoli_437_PR	FAM/TATTAACCTTACTCCCTTCCCTCCCGCTGAA/IABkFQ	
<i>C. coccooides</i>	F_Ccoc_07	GACGCCGCGTGAAGGA	[36]
	R_Ccoc_14	AGCCCCAGCCTTTCACAT	
	P_Erec_482	VIC/CGGTACCTGACTAAGAAG/IABkFQ	
Bacteria	F_Bact_1369	CGGTGAATACGTTCCCGG	[36]
	R_Prok_1492	TACGGCTACCTTGTTACGACTT	
	P_TM_1389F	FAM/CTTGACACACCGCCCGTC/IABkFQ	

2.13. Anti-TNF Dosage and Safety Evaluation

Anti-TNFs are monoclonal antibodies that neutralize pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor (TNF) involved in the inflammatory cascade of CD and other immune-mediated diseases. The anti-TNFs used are infliximab and adalimumab by indication for induction of remission in patients with moderate-severe CD. The administered doses of anti-TNFs are those listed in the data sheet, both at induction and maintenance doses. Infliximab dose regimen for adult patients with CD 5 mg/kg is given as an IV induction regimen at 0, 2, and 6 weeks followed by a maintenance regimen of 5 mg/kg IV every 8 weeks thereafter; treatment with 10 mg/kg IV may be considered for patients who respond and then lose their response. Adalimumab dose regimen for adult patients with CD is 160 mg initially on Day 1 (given in one day or split over two consecutive days), followed by 80 mg two weeks later (Day 15). Two weeks later (Day 29) they begin a maintenance dose of 40 mg every other week. During the prospective follow-up, according to usual clinical practice, the gastroenterologist responsible will modify or maintain a maintenance pattern according to the response to the drug by means of clinical (HBI) and analytical (fecal C-reactive protein and calprotectin) variables, which will be recorded in each patient's data collection notebook.

To identify any adverse effects associated with the administration of the anti-TNF α drug, a combination of physical examination, recording of vital signs (BP, pulse, temperature), and questionnaires are evaluated after administration (30 min later) and at follow-up visits at weeks 12 and 24. These questionnaires inquire about possible adverse effects related to adverse reactions to infliximab and adalimumab drugs (nausea, headache, dizziness, fever, hives, reactions at the infusion site, nervous system disorders, cardiac arrhythmia or myocardial ischemia, hypertensive or hypotensive events, skin reactions, gastrointestinal disorders, infections, hypersensitivity or anaphylaxis). In addition, patients are asked open-ended questions about their general well-being to request notification of any other adverse effects not listed in the data sheet. In order to assess the causality of adverse effects related to infliximab and adalimumab, the ADR (Adverse Drug Reaction) Naranjo probability scale is applied [37].

Laboratory parameters, including white blood cell count, liver transaminase levels, phosphate levels, and kidney function are studied prior to anti-TNF treatment and at the 12-week and 24-week follow-up (post-anti-TNF).

2.14. Statistical Analysis

As this is an observational non-interventional study, there may be confounding factors between treatment allocation and outcomes in analyses of comparative response rates and samples may be included of patients that do not represent real-world clinical practices. Accordingly, all analyses in this study will be considered to be of an exploratory nature. Statistical analysis will be performed with SPSS v.22 software version 9.2 or later.

Population characteristics (including demographic characteristics, medical conditions, disease duration, types of treatment used at the start of the study and other variables collected in the data collection logbook) and all primary and secondary endpoints will be summarized by indicating the mean, standard deviation, minimum value, maximum value, median, 25th and 75th percentile and 95% confidence interval (CI) of the mean for continuous variables, and the absolute and relative frequencies, with a 95% CI of the proportion for categorical data. In the bivariate analysis, the chi-square test will be used to determine differences in proportions and Student's *t*-test for paired data before and after the administration of anti-TNF treatment.

The statistical analyses conducted throughout this study on bioinformatics data management to determine significant differences between established groups, their corresponding graphs and the study of ROC curves (AUC values) will be performed using GraphPad Prism software version 8.2.0. STAMP (Statistical Analysis of Metagenomic Profiles), another bioinformatics tool based on Python, will also be used. STAMP was specifically designed for statistical processing and creation of plots from large amounts of biological data [38].

3. Discussion

The gut microbiome has a highly complex structure, involving thousands of microorganisms belonging to very different taxonomic classifications with millions of relationships between them, making its study a great challenge. In IBD, no specific pathogen has been definitively identified, but the gut microbiota as a whole has been shown to be pathogenic, contributing to the development of a deregulated inflammatory response in susceptible hosts. Several authors defend the suggestion that there is a reduction in biodiversity and abundance of *Bacteroidetes* and *Firmicutes*, as well as an increase in *Proteobacteria*, characteristic of patients compared to healthy individuals [6,7].

Treatment for CD is selected according to the severity of the disease and the response to previous therapies. Among the drugs used are biological treatments based on TNF α monoclonal antibodies such as infliximab and adalimumab, developed for the induction and maintenance of remission, allowing the control of symptoms and an improvement in the quality of life of responders, as well as changes in the natural course of the disease [38–40]. Nonetheless, although approximately one third of patients do not respond to these inhibitory therapies, we currently do not have a non-invasive biomarker that serves as a tool to predict this response, and invasive methods such as colonoscopy continue to be the gold standard for assessing therapeutic response.

In this prospective observational study, a new tool, massive sequencing of bacterial DNA, will be applied to the study of a clinical problem that affects an important number of patients. This will enable both the identification of early biomarkers of response in patients with CD after anti-TNF treatment as well as the prediction of therapeutic response from the start to thus improve the clinical management of these patients, reduce morbidity rates and increase efficiency. Since this is a longitudinal study, the patients will be analyzed before and after exposure to anti-TNF treatment, and the data will be paired, thereby diminishing the effect of the high variability of gut microbiota.

We know that the composition of the microbiota varies due to multiple external factors, particularly diet, and that a dietary intervention of just three days can cause a change in enterotype [41,42]. Nevertheless, after ten days, the enterotypes stabilized in one study suggesting a tendency to return to the original state [41]. Even so, we added to the protocol a 3-day dietary record prior to stool collection for microbiota analysis and will repeat this dietary record prior to the second assessment after six months of anti-TNF treatment to minimize significant diet-induced changes. An additional

measure to objectively determine whether significant changes in the eating behavior of patients occur during the six months of the study will be undertaken through completion of a validated survey on adherence to the Mediterranean diet, both at inclusion and completion of the study. Given that long-term disturbances have a more profound effect, with a one-year diet modification having a strong impact on the *Bacteroidetes/Firmicutes ratio* [41,43], this may lead to changes in enterotype.

The proposed design takes diet into consideration and is therefore novel with respect to similar studies published to date, which did not evaluate this factor known to modify the composition of the microbiota. This study may provide additional evidence regarding potential non-invasive tools such as biomarkers of the response before and after anti-TNF therapy in CD as a starting point for future clinical trials. These trials could determine the most effective treatment among not only these therapies but all therapies used in the management of CD based on patient microbiota and provide more appropriate, inexpensive and non-invasive tools for predicting clinical response to treatment.

4. Conclusions

Currently, the role of bacterial gut microbiota is described as a key factor in the development of Crohn's disease, we do know that, for the disease to develop, dysbiosis or a definitive change in the intestinal microbiota must occur. This study may provide additional evidence regarding potential non-invasive tools such as microbiota-based biomarkers of the response before and after anti-TNF therapy in Crohn's disease as a starting point for future clinical trials. These trials could determine the most effective treatment among not only these therapies but all therapies used in the management of Crohn's disease based on patient microbiota and provide more appropriate, inexpensive and non-invasive tools for predicting clinical response to treatment, reduce morbidity rates and improve efficiency.

Author Contributions: L.S.-A. participated in the design of the study and drafted the manuscript, revising for important intellectual content, and fully approved the final version for submission. J.F.M.-B. participated in the design of the study, contributed to the statistical analysis plan and was also involved in the drafting of the manuscript. S.M.-V. participated in design of the study related to gut microbiota analysis and contributed to the statistical analysis plan. E.C.-C. participated in the design of the study, contributed to the statistical analysis plan and was also involved in the drafting of the manuscript, revising for important intellectual content, and fully approved the final version for submission. J.R.-M. participated in the design of the study and its coordination. X.C.-R. conceived of the study and was involved in the overall design and helped to draft the manuscript revising for important intellectual content, and fully approved the final version for submission. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors thank Maria Repice and Ian Johnstone for their help with the English version of the text.

Conflicts of Interest: The authors declare that there are no conflicts of interest to disclose.

Abbreviations

CD	Crohn's disease
CI	confidence interval
CRP	C-reactive protein
ET	enterotype
FC	fecal calprotectin
HBI	Harvey-Bradshaw Index
IBD	inflammatory bowel disease
RNA	ribonucleic acid
SCFA	short chain fatty acids
STAMP	Statistical Analysis of Metagenomic Profiles
TNF	Tumor necrosis factor

References

1. Amon, P.; Sanderson, I. What is the microbiome? *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* **2017**, *102*, 258–261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Young, V.B. The role of the microbiome in human health and disease: An introduction for clinicians. *BMJ* **2017**, *356*, j831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Qin, J.; Li, R.; Raes, J.; Arumugam, M.; Burgdorf, K.S.; Manichanh, C.; Nielsen, T.; Pons, N.; Levenez, F.; Yamada, T.; et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **2010**, *464*, 59–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Methé, B.A.; Nelson, K.E.; Pop, M.; Creasy, H.H.; Giglio, M.G.; Huttenhower, C.; Gevers, D.; Petrosino, J.F.; Abubucker, S.; Badger, J.H.; et al. A framework for human microbiome research. *Nature* **2012**, *486*, 215–221. [[CrossRef](#)]
5. Arumugam, M.; Raes, J.; Pelletier, E.; Le Paslier, D.; Yamada, T.; Mende, D.R.; Fernandes, G.R.; Tap, J.; Bruls, T.; Batto, J.M.; et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **2011**, *473*, 174–180. [[CrossRef](#)]
6. Zuo, T.; Ng, S.C. The Gut Microbiota in the Pathogenesis and Therapeutics of Inflammatory Bowel Disease. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2247. [[CrossRef](#)]
7. Collins, S.M. A role for the gut microbiota in IBS. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11*, 497–505. [[CrossRef](#)]
8. Klindworth, A.; Pruesse, E.; Schweer, T.; Peplies, J.; Quast, C.; Horn, M.; Glöckner, F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 1–11. [[CrossRef](#)]
9. Kaur, N.; Chen, C.C.; Luther, J.; Kao, J.Y. Intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* **2011**, *2*, 211–216. [[CrossRef](#)]
10. Erickson, A.R.; Cantarel, B.L.; Lamendella, R.; Darzi, Y. Integrated metagenomics/metaproteomics reveals human host-microbiota signatures of Crohn’s disease. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e49138. [[CrossRef](#)]
11. Manichanh, C.; Borruel, N.; Casellas, F.; Guarner, F. The gut microbiota in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *9*, 599–608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Da Silva, A.C.; Gomes, F.; Sasaki, Y.; Rodrigues, J. Escherichia coli from Crohn’s disease patient displays virulence features of enteroinvasive (EIEC), enterohemorrhagic (EHEC), and enteroaggregative (EAEC) pathotypes. *Gut Pathog.* **2015**, *7*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Borruel, N.; Carol, M.; Casellas, F.; Antolín, M.; De Lara, F.; Espín, E.; Naval, J.; Guarner, F.; Malagelada, J.R. Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn’s disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut* **2002**, *51*, 659–664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Rajca, S.; Grondin, V.; Louis, E.; Vernier-Massouille, G.; Grimaud, J.-C.; Bouhnik, Y.; Laharie, D.; Dupas, J.-L.; Pillant, H.; Picon, L.; et al. Alterations in the intestinal microbiome (dysbiosis) as a predictor of relapse after infliximab withdrawal in Crohn’s disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2014**, *20*, 978–986. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Peyrin-Biroulet, L.; Reinisch, W.; Colombel, J.F.; Mantzaris, G.J.; Kornbluth, A.; Diamond, R.; Rutgeerts, P.; Tang, L.K.; Cornillie, F.J.; Sandborn, W.J. Clinical disease activity, C-reactive protein normalisation and mucosal healing in Crohn’s disease in the SONIC trial. *Gut* **2014**, *63*, 88–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Harvey, R.; Bradshaw, J. A simple index of Crohn’s disease activity. *Lancet* **1980**, *1*, 514. [[CrossRef](#)]
17. Rogler, G.; Vavricka, S.; Schoepfer, A.; Lakatos, P.L. Mucosal healing and deep remission: What does it mean? *World J. Gastroenterol.* **2013**, *19*, 7552–7560. [[CrossRef](#)]
18. Roseth, A.G.; Aadland, E.; Grzyb, K. Normalization of faecal calprotectin: A predictor of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **2004**, *39*, 1017–1020. [[CrossRef](#)]
19. Sipponen, T.; Savilahti, E.; Kolho, K.L.; Nuutinen, H.; Turunen, U.; Färkkilä, M. Crohn’s disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: Correlation with Crohn’s disease activity index and endoscopic findings. *Inflamm. Bowel Dis.* **2008**, *14*, 40–46. [[CrossRef](#)]
20. Lopez-Siles, M.; Martinez-Medina, M.; Busquets, D.; Sabat-Mir, M.; Duncan, S.H.; Flint, H.J.; Aldeguer, X.; Garcia-Gil, L.J. Mucosa-associated Faecalibacterium prausnitzii and Escherichia coli co-abundance can distinguish Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease phenotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 7582–7592. [[CrossRef](#)]

21. Zhou, Y.; Xu, Z.Z.; He, Y.; Yang, Y.; Liu, L.; Lin, Q.; Nie, Y.; Li, M.; Zhi, F.; Liu, S.; et al. Gut Microbiota Offers Universal Biomarkers across Ethnicity in Inflammatory Bowel Disease Diagnosis and Infliximab Response Prediction. *mSystems* **2018**, *3*, 1–14. [[CrossRef](#)]
22. Magnusson, M.K.; Strid, H.; Sapnara, M.; Lasson, A.; Bajor, A.; Ung, K.-A.; Öhman, L. Anti-TNF therapy response in patients with ulcerative colitis is associated with colonic antimicrobial peptide expression and microbiota composition. *J. Crohns Colitis* **2016**, *10*, 943–952. [[CrossRef](#)]
23. Wang, Y.; Gao, X.; Ghozlane, A.; Hu, H.; Li, X.; Xiao, Y.; Li, D.; Yu, G.; Zhang, T. Characteristics of faecal microbiota in paediatric Crohn's disease and their dynamic changes during infliximab therapy. *J. Crohns Colitis* **2017**, *1*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Puig, L.; Ruiz de Morales, J.G.; Dauden, E.; Andreu, J.L.; Cervera, R.; Adán, A.; Marsal, S.; Escobar, C.; Hinojosa, J.; Palau, J.; et al. La prevalencia de diez enfermedades inflamatorias inmunomediadas (IMID) en España. *Rev. Esp. Salud Pública* **2019**, *93*, 25.
25. Martínez-González, M.A.; Salas-Salvadó, J.; Estruch, R.; Corella, D.; Fitó, M.; Ros, E. Predimed Investigators. Benefits of the Mediterranean Diet: Insights from the PREDIMED Study. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **2015**, *58*, 50–60. [[CrossRef](#)]
26. Lewis, J.D.; Chen, E.Z.; Baldassano, R.N.; Otle, A.R.; Griffiths, A.M.; Lee, D.; Bittinger, K.; Bailey, A.; Friedman, E.S.; Hoffmann, C.; et al. Inflammation, Antibiotics, and Diet as Environmental Stressors of the Gut Microbiome in Pediatric Crohn's Disease. *Cell Host Microbe* **2015**, *18*, 489–500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Scaldaferrì, F.; Gerardi, V.; Pecere, S.; Petito, V.; Lopetuso, L.R.; Zambrano, D.; Schiavoni, E.; D'Ambrosio, D.; di Agostini, A.; Laterza, L.; et al. Anti-TNF- α induction regimen modulates gut microbiota molecular composition while inducing clinical response in Crohn's Disease patients: Toward a personalized Medicine. *Gastroenterology* **2015**, *148*, S-852. [[CrossRef](#)]
28. Kolho, K.L.; Korpela, K.; Jaakkola, T.; Pichai, M.V.; Zoetendal, E.G.; Salonen, A.; De Vos, W.M. Fecal microbiota in pediatric inflammatory bowel disease and its relation to inflammation. *Am. J. Gastroenterol.* **2015**, *110*, 921–930. [[CrossRef](#)]
29. Busquets, D.; Mas-de-Xaxars, T.; Lpez-Siles, M.; Martínez-Medina, M.; Bahí, A.; Sàbat, M.; Louvriex, R.; Miquel-Cusachs, J.O.; Garcia-Gil, J.L.; Aldeguer, X. Anti-tumour necrosis factor treatment with adalimumab induces changes in the microbiota of Crohn's Disease. *J. Crohns Colitis* **2015**, *9*, 899–906. [[CrossRef](#)]
30. Ribaldone, D.G.; Caviglia, G.P.; Abdulle, A.; Pellicano, R.; Ditto, M.C.; Morino, M.; Fusaro, E.; Saracco, G.M.; Bugianesi, E.; Astegiano, M. Adalimumab Therapy Improves Intestinal Dysbiosis in Crohn's Disease. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1646. [[CrossRef](#)]
31. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 852–857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Segata, N.; Izard, J.; Waldron, L.; Gevers, D.; Miropolsky, L.; Garrett, W.S.; Huttenhower, C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **2011**, *12*, R60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Dobnik, D.; Štebih, D.; Blejec, A.; Morisset, D.; Žel, J. Multiplex quantification of four DNA targets in one reaction with Bio-Rad droplet digital PCR system for GMO detection. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Postel, M.; Roosen, A.; Laurent-Puig, P.; Taly, V.; Wang-Renault, S.F. Droplet-based digital PCR and next generation sequencing for monitoring circulating tumor DNA: A cancer diagnostic perspective. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2018**, *18*, 7–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Huijsdens, X.W.; Linskens, R.K.; Mak, M.; Meuwissen, S.G.; Vandenbroucke-Grauls, C.M.; Savelkoul, P.H. Quantification of Bacteria Adherent to Gastrointestinal Mucosa by Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 4423–4427. [[CrossRef](#)]
36. Furet, J.P.; Firmesse, O.; Gourmelon, M.; Bridonneau, C.; Tap, J.; Mondot, S.; Dore, J.; Corthier, G. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2009**, *68*, 351–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Naranjo, C.A.; Busto, U.; Sellers, E.M.; Sandor, P.; Ruiz, I.; Roberts, E.A.; Janecek, E.; Domecq, C.; Greenblatt, D.J. A method for estimating the probability of adverse drug reactions. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1981**, *30*, 239–245. [[CrossRef](#)]
38. Parks, D.H.; Tyson, G.W.; Hugenholtz, P.; Beiko, R.G. STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 3123–3124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. Monif, G.R. Understanding Therapeutic Concepts in Crohn's Disease. *Clin. Med. Insights Gastroenterol.* **2018**, *11*, 1–3. [[CrossRef](#)]
40. Na, S.Y.; Moon, W. Perspectives on Current and Novel Treatments for Inflammatory Bowel Disease. *Gut Liver* **2019**, *13*, 604–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Wu, G.D.; Chen, J.; Hoffmann, C.; Bittinger, K.; Chen, Y.-Y.; Keilbaugh, S.A.; Bewtra, M.; Knights, D.; Walters, W.A.; Knight, R.; et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* **2011**, *334*, 105–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Kovatcheva-Datchary, P.; Nilsson, A.; Akrami, R.; Lee, Y.S.; de Vadder, F.; Arora, T.; Hallen, A.; Martens, E.; Björck, I.; Bäckhed, F. Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell Metab.* **2015**, *22*, 971–982. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ley, R.E.; Turnbaugh, P.J.; Klein, S.; Gordon, J.I. Human gut microbes associated with obesity. *Nature* **2006**, *444*, 1022–1023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



OPEN

Evaluation of changes in intestinal microbiota in Crohn's disease patients after anti-TNF alpha treatment

Laura Sanchis-Artero^{1✉}, Juan Francisco Martínez-Blanch^{2,3✉}, Sergio Manresa-Vera², Ernesto Cortés-Castell^{4✉}, Marina Valls-Gandia⁵, Marisa Iborra⁶, Jose Maria Paredes-Arquiola⁷, Maia Boscá-Watts⁸, Jose Maria Huguet⁹, Rafael Gil-Borrás¹⁰, Josefa Rodríguez-Morales¹ & Xavier Cortés-Rizo¹¹

Intestinal dysbiosis is key in the onset and development of Crohn's disease (CD). We evaluated the microbiota changes in CD patients before and after a six-month anti-TNF treatment, comparing these changes with the microbiota of healthy subjects. This prospective multicenter observational study involved 27 CD patients initiating anti-TNF treatment and 16 healthy individuals. Inflammatory activity was determined at baseline, 3 and 6 months, classifying patients into responders and non-responders. Fecal microbiota was analyzed by massive genomic sequencing through 16S rRNA amplicon sequencing before and after six months of anti-TNF treatment. The CD cohort showed a decrease in genera of the class Clostridia, short-chain fatty acid producers, and an increase in the phylum Proteobacteria ($p < 0.01$) versus the healthy cohort. After anti-TNF treatment, the phylum Proteobacteria also increased in non-responders versus responders (13/27) ($p < 0.005$), with the class Clostridia increasing. In addition, alpha diversity increased in responders versus non-responders ($p < 0.01$), tending towards eubiosis. An association was found ($p < 0.001$) in the *F.prausnitzii*/*E.coli* ratio between responders and non-responders. The F/E ratio was the most accurate biomarker of anti-TNF response (area under the curve 0.87). Thus, anti-TNF treatment allows partial restoration of intestinal microbiota in responders and the *F.prausnitzii*/*E.coli* ratio can provide a reliable indicator of response to anti-TNF in CD.

The microbiome consists of a highly complex structure involving thousands of microorganisms belonging to very different taxonomic classifications and consequently millions of relationships between them, making its study a great challenge¹. As a result of advances in massive sequencing technologies, information on the bacterial genome can be obtained quickly and efficiently through the sequencing of regions of the prokaryotic 16S ribosomal RNA gene subunit².

¹Inflammatory Bowel Disease Unit, Department of Digestive Diseases, Sagunto Hospital, Av. Ramón y Cajal S/N, 46520 Sagunto, Valencia, Spain. ²ADM-Lifesequencing S.L., University of Valencia Science Park, Carrer del Catedràtic Agustín Escardino Benlloch 9, Edificio 2, 46980 Paterna, Valencia, Spain. ³Department of preventive medicine, public health, food sciences, toxicology and forensic medicine, Universitat de Valencia, Valencia, Spain. ⁴Department of Pharmacology, Pediatrics and Organic Chemistry, Miguel Hernández University, Carretera de Valencia-Alicante S/N, 03550 San Juan de Alicante, Alicante, Spain. ⁵Inflammatory Bowel Disease Unit, Department of Digestive Diseases, Hospital General de Castellón, Castellón de la Plana, Spain. ⁶Inflammatory Bowel Disease Unit, Department of Digestive Diseases, Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, Valencia, Spain. ⁷Inflammatory Bowel Disease Unit, Department of Digestive Diseases, Hospital Doctor Peset de Valencia, Valencia, Spain. ⁸Inflammatory Bowel Disease Unit, Department of Digestive Diseases, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, Spain. ⁹Inflammatory Bowel Disease Unit, Department of Digestive Diseases, Hospital General de Valencia, Valencia, Spain. ¹⁰Inflammatory Bowel Disease Unit, Department of Digestive Diseases, Hospital Lluís Alcanyis de Xàtiva, Valencia, Spain. ¹¹Department of Medicine, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities, Valencia, Spain. ✉email: laurasanchisartero@gmail.com; Juan.MartinezBlanch@adm.com; ernesto.cortes@umh.es

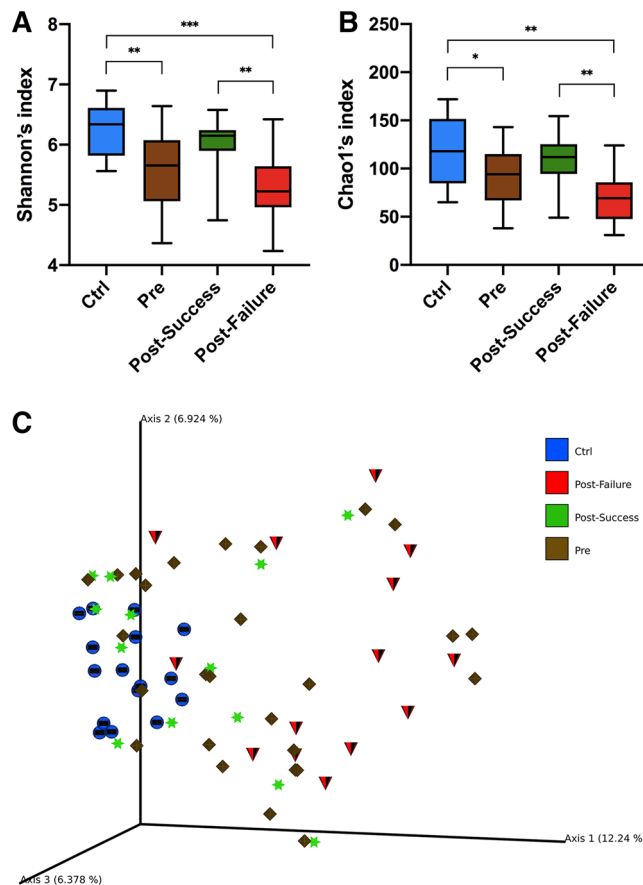


Figure 1. Alpha and beta diversity plots. (A) Box-plot corresponding to the Shannon index (alpha diversity). (B) Box-plot corresponding to the Chao1 index (alpha diversity). (C) Principal coordinates analysis corresponding to the Bray–Curtis dissimilarity index (beta diversity). Statistical analysis using the Kruskal–Wallis test with Benjamini–Hochberg correction for multiple comparisons (false discovery rate). Asterisks refer to the corrected p-value, where *p-value < 0.05, **p-value < 0.01 and ***p-value < 0.001.

The role of intestinal bacterial microbiota has been described as key in the pathophysiology of Crohn's Disease (CD). Studies report a decrease in biodiversity and the number of phyla Bacteroidetes and Firmicutes, such as *Faecalibacterium prausnitzii* (short-chain fatty acid (SCFA)-producing bacteria), as well as an increase in Proteobacteria phyla such as *Escherichia coli* species, characteristic of patients with this disease compared to healthy individuals^{3–5}.

Anti-TNF therapy is nowadays one of the therapeutic pillars in the management of CD, but this treatment can only treat the consequences of the disease, not its possible cause. Approximately one quarter of patients will be primary non-responders to anti-TNF agents and one third of responders will experience loss of response over the years⁶. To improve the efficacy of these drugs it is essential to study why these patients do not have an optimal response. It has been described that anti-TNF treatment implies greater susceptibility to bacterial infection, caused by a loss of response capacity of the immune system^{7–10}.

Monitoring inflammatory activity and prognosis in patients with CD has traditionally been limited to the control of clinical symptoms together with laboratory and imaging techniques, though not without numerous limitations and drawbacks. In this regard, several studies have shown that the greater abundance of SCFA-producing species can predict the effectiveness of infliximab (anti-TNF drug)^{11,12}, while other studies have associated this greater abundance of SCFA with a sustained response to infliximab¹³ and a decrease in abundance of *Escherichia coli* after treatment with this drug¹⁴. Finally, one study has identified certain specific microbial profiles that correlate with disease recurrence after achieving remission with infliximab⁶.

Therefore, in this study we hypothesized that changes in the composition of the intestinal microbiota in CD patients who respond to anti-TNF drugs tend towards a microbiota similar to healthy controls versus non-responders. We also establish the relationship between *Faecalibacterium prausnitzii*/*Escherichia coli* as a biomarker of response to this treatment^{15–17}.

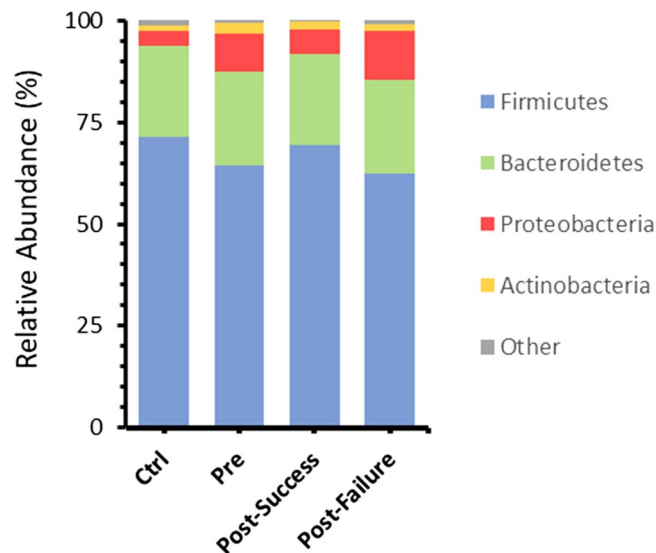


Figure 2. Bar charts showing mean values of ASV abundances at the phylum level in the four different groups studied: healthy individuals (control), Crohn's disease patients pre-treatment (t0) and patients post-treatment (t1; in turn, classified into responders and non-responders).. "Other" refers to all phyla with an initial representation less than 2% of abundances, including Euryarchaeota, Actinobacteria, Cyanobacteria, Elusimicrobia, Epsilonbacteraeota, Fusobacteria, Lentisphaerae, Patescibacteria, Tenericutes and Verrucomicrobia.

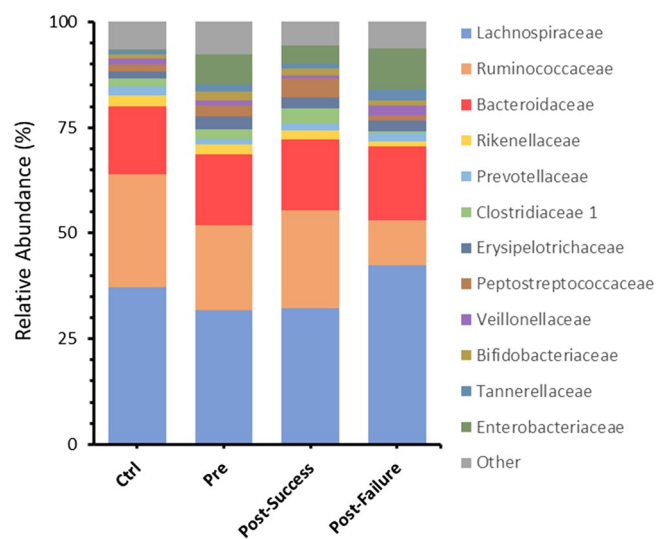


Figure 3. Bar charts showing mean values of ASV abundances at the family level in the four different groups studied: healthy individuals (control), Crohn's disease patients pre-treatment (t0) and patients post-treatment (t1; in turn, classified into responders and non-responders). "Other" refers to all families with an initial representation less than 2% of abundance.

Results

Intestinal microbiome in patients with Crohn's Disease. Of the 43 subjects included in the study, 27 were CD patients and 16 were healthy controls. Based on the data obtained concerning alpha diversity (Shannon and Chao1 index) and beta diversity (Bray–Curtis index), a statistically significant decrease was found in the richness and diversity of microbial communities in CD patients compared to the healthy controls (Fig. 1A–C).

In addition, an initial taxonomic analysis at the phylum level indicated a significant increase in Proteobacteria, Actinobacteria and Fusobacteria in CD patients compared to healthy individuals (p -value < 0.05) (Fig. 2).

Further taxonomic study at the family level indicated the pre-treatment group was significantly characterized by a lower representation of Ruminococcaceae and Christensenellaceae (p -value < 0.01) and an increase in numerous bacterial families, notably Enterobacteriaceae, Erysipelotrichaceae and Bifidobacteriaceae (p -value < 0.05) (Fig. 3).

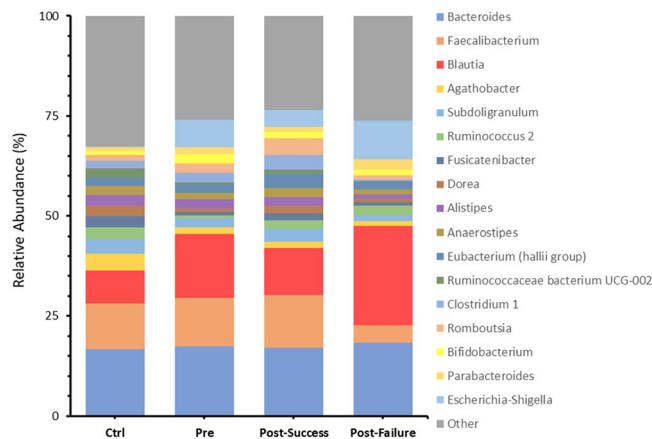


Figure 4. Bar charts showing mean values of ASV abundances at the genus level in the four different groups studied: healthy individuals (control), Crohn's disease patients pre-treatment (t0) and patients post-treatment (t1; in turn, classified into responders and non-responders). "Other" refers to all genera with an initial representation less than 2% of abundance.

At the genus level, the analyses carried out showed statistically significant differences in the concentration of a high number of bacterial genera. Notable among them was the decrease in *Ruminococcus*, *Agathobacter*, *Dorea* and *Fusicateribacter* in CD, as well as the increase in the genus *Blautia*, *Escherichia/Shigella*, *Bifidobacterium* and *Lachnoclostridium* compared to the control group. Finally, at the species level, a lower representation of *Bacteroides plebeius*, *Alistipes obesi*, *Gabonia massiliensis* and *Faecalibacterium prausnitzii* was found in the CD microbiota compared to that of healthy controls (Fig. 4).

Partial restoration of the intestinal microbiome in patients who responded to anti-TNF treatment. The included CD patients were classified as responders (n = 13) and non-responders (n = 14) after clinical and analytical evaluation 24 weeks after initiation of anti-TNF therapy, as described above. Biostatistical studies on alpha and beta diversity showed significant differences between the non-responder group and the control group, while no significant differences were observed between responders and the control group (Fig. 1A–C).

In the taxonomic study, the concentration of genera such as *Escherichia/Shigella* increased significantly, and concentrations of *Faecalibacterium* and *Agathobacter* decreased in the non-responder group compared to healthy individuals. In the responder group, we highlight the importance of the elevated restoration in bacteria belonging to a determinant class such as Clostridia due to their anti-inflammatory metabolic functions; while those members of the order Enterobacteriales, especially the genus *Escherichia/Shigella*, did not achieve the desired decrease in concentration but still showed significant differences between the microbiota of responders and that of the control group. Finally, the taxonomic level of species presented higher significant representations of *Bacteroides plebeius*, *Alistipes obesi* and *Faecalibacterium prausnitzii* in healthy individuals with respect to both groups of patients (Fig. 5A,B).

Differences in genera in responders and non-responders. Biostatistical studies on alpha and beta diversity indicated significant differences between the non-responders and the responders (Fig. 1A–C). The intestinal microbiome in patients who did not respond to anti-TNF was notable for the high concentration of bacteria belonging to the phylum Proteobacteria, specifically the order Enterobacteria and especially the genus *Escherichia/Shigella*. However, in the responder group, the phyla Bacteroidetes and Firmicutes had a greater significant representation; of the latter, those belonging to the class Clostridia predominated, particularly the genera *Faecalibacterium*, *Romboutsia*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Roseburia*, *Anaerostipes* or *Lachnospira*, all of which had a log score above 3.5 (Fig. 6).

The intestinal microbiome as a biomarker of therapeutic response through the *Faecalibacterium prausnitzii*/*Escherichia coli* (F/E) ratio. The results obtained make it possible to choose two specific species, *Faecalibacterium prausnitzii* and *Escherichia coli*, as the main representatives of two genera strongly linked to intestinal eubiosis/dysbiosis in the context of inflammatory activity in CD and therefore the F/E ratio could be a marker of therapeutic response. The implementation of the ddPCR technique made it possible to evaluate the F/E ratio, finding statistically significant results between the control and pre-treatment groups, the controls and non-responders and, above all, between responders and non-responders to the anti-TNF treatment studied. In addition, it should be noted that there were no significant differences between the control group and anti-TNF responders (Fig. 7).

Finally, an ROC (receiver operating characteristic) curve analysis was performed²³, with an area under the curve (AUC) value for the F/E ratio equal to 0.874 (95% CI 0.741–1.000; p = 0.001), which is superior to other biomarkers currently used to monitor patients with CD in routine clinical practice, such as calprotectin fecal

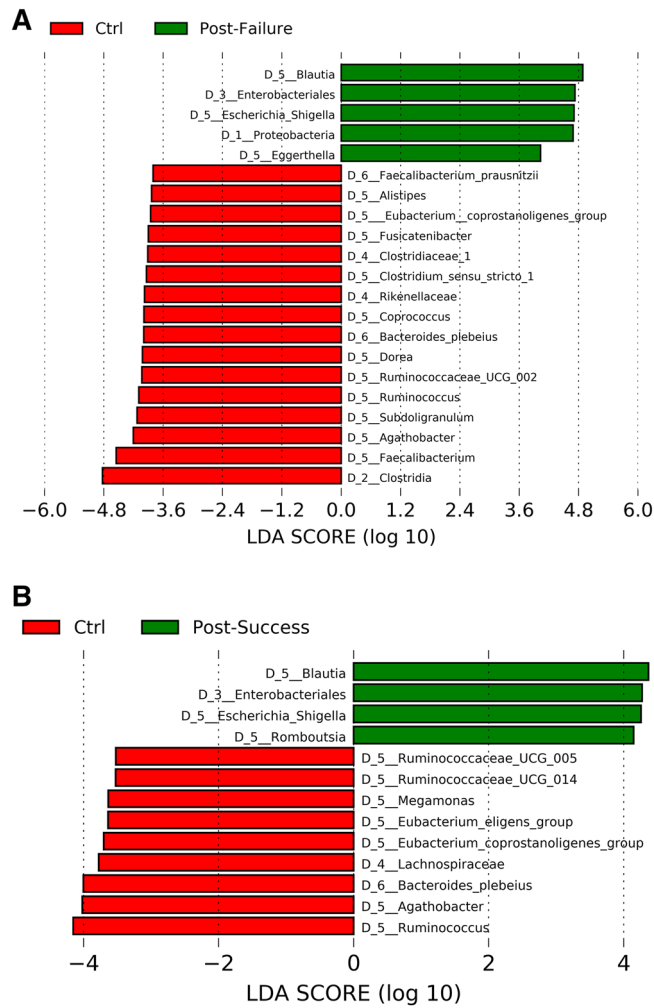


Figure 5. Differences in taxa abundance between (A) non-responders and (B) responders, compared to healthy individuals. The search for differential taxa was performed using LefSe (Kruskal–Wallis test between classes, p-value < 0.05; threshold for discriminative taxa, logarithmic LDA score > 3.5).

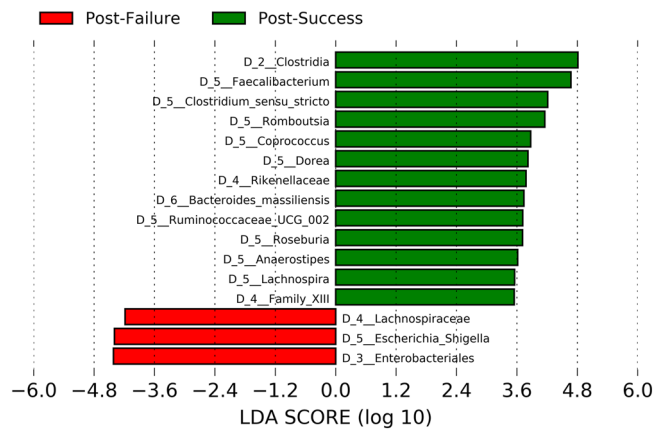


Figure 6. Differences in taxa abundance between responders and non-responders. Taxa with greater differences between the microbiota of both groups. The search for differential taxa was performed using LefSe (Kruskal–Wallis test between classes, p-value < 0.05; threshold for discriminative taxa, logarithmic LDA score > 3.5).

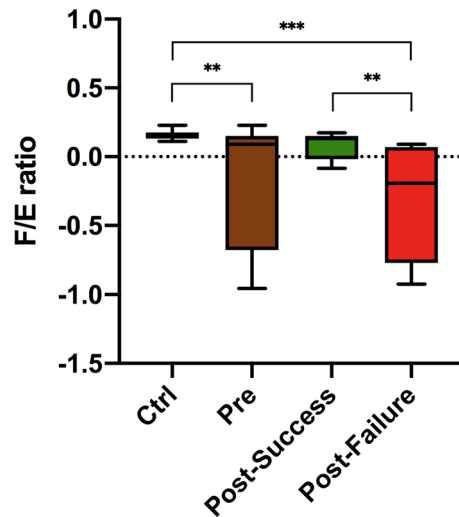


Figure 7. F/E ratio results. Statistical analysis using the Kruskal–Wallis test with Benjamini–Hochberg correction for multiple comparisons (false discovery rate). Asterisks refer to the corrected p-value, where * p-value < 0.05, ** p-value < 0.01 and *** p-value < 0.001.

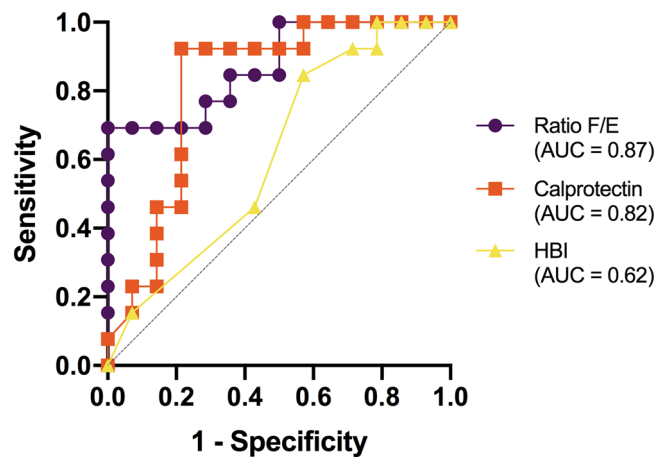


Figure 8. ROC curves for evaluation of the potential of the F/E ratio, calprotectin and HBI as biomarkers of therapeutic response. The value of the area under the curve (AUC) indicates the ability of each set of parameters studied as biomarkers of response in anti-TNF treatments.

(FC) with AUC = 0.816 (95% CI 0.642–0.989; $p = 0.005$), and Harvey-Bradshaw index with AUC = 0.615 (95% CI 0.400–0.831; $p = 0.385$) (Fig. 8), or other possible indicators such as Microbial Dysbiosis Index (MD-index) with AUC = 0.692 (95% CI 0.349–0.836, $p = 0.385$), log[*Escherichia coli*] with AUC = 0.602 (95% CI 0.383–0.820; $p = 0.369$) and log[*Faecalibacterium prausnitzii*] with AUC = 0.824 (95% CI 0.668–0.981; $p = 0.004$).

The cut-off points calculated using the Youden index of maximum sensitivity and specificity have been for the F/E ratio < 0.037 (Youden index = 0.495; sensitivity = 0.923 and specificity = 0.429) and for FC = 100.5 $\mu\text{g/g}$ (Youden index = 0.709; sensitivity = 0.923 and specificity = 0.786).

Materials and methods

Patient cohorts and clinical evaluation. A total of 43 subjects were evaluated, divided into a cohort of 27 CD patients (15 men), with a mean age of 41.4 ± 17.4 years (Table 1) who required anti-TNF treatment to control the disease, and a group of 16 healthy individuals (8 men) with a mean age of 29.3 ± 7.2 years, family members of the CD patients, who shared the same lifestyle, eating habits and similar epidemiological characteristics, with no significant differences with respect to the main clinical and epidemiological variables analyzed.

The patients were recruited from eight hospitals in the Valencian Community. Treatment with anti-TNF was initiated under medical prescription according to routine clinical practice and is listed in the data sheet. Administration of this drug was therefore not promoted by this study. The clinical and demographic variables are given in Table 1.

Variables	N (%); mean \pm SD
Men	19 (55.9)
Age (years)	34.6 \pm 15.0
Extent of disease	
Ileum	15 (44.1)
Ileocolic	14 (41.2)
Colon	4 (11.8)
Upper gastrointestinal tract	1 (2.9)
Pattern of disease	
Inflammatory	20 (58.8)
Stenosing	11 (32.4)
Fistulizing	3 (8.8)
Associated perianal disease	7 (20.6)
Smoking habit	
Smoker	17 (50)
Former smoker	2 (5.8)
Never smoked	15 (44.1)
Associated extra-intestinal manifestations	6 (17.6)
Anti-TNF	
IFX	19 (55.9)
ADA	15 (44.1)
Anti-TNF indication	
Failure of IS	7 (20.6)
Corticosteroid-dependent	5 (14.7)
Flare-up activity	11 (32.4)
Fistulizing disease	2 (5.9)
Top-down strategy	7 (20.6)
Treatments before starting anti-TNF	
5-ASA	19 (55.9)
Azathioprine	23 (67.6)
Corticosteroids	22 (64.7)
Methotrexate	2 (5.9)
Concomitant treatment with anti-TNF	
5-ASA	7 (20.6)
Azathioprine	19 (55.9)
Corticosteroids for induction	15 (44.1)
Methotrexate	1 (2.9)
Baseline clinical status (Harvey-Bradshaw Index)	
Moderate/severe activity (≥ 8 points)	17 (50)
Baseline endoscopy	23 (67.6)
Moderate/severe activity	20 (87)
Baseline MRI enterography	20 (58.8)
Moderate/severe activity	15 (75)

Table 1. Clinical and demographic variables of the patients (total n = 27). *IFX* infliximab, *ADA* adalimumab, *IS* immunosuppressive drugs, *5-ASA* 5-aminosalicylic acid, *MRI* magnetic resonance imaging.

Excluded from the study were all subjects who had taken antibiotics, probiotics and/or PPIs during the 4 weeks prior to study inclusion; patients with chronic HCV hepatitis and chronic HIV infection; indication for anti-TNF other than for control of their luminal disease (e.g. enteropathic arthropathy, perianal disease, prevention of recurrence, etc.); patients with previous ileum or colon surgery; and previous anti-TNF treatment in the 24 weeks prior to commencement of the study.

The study patients were prospectively monitored during the first 6 months of anti-TNF treatment. The presence of inflammatory activity was determined by calculation of the Harvey-Bradshaw index, biological activity by means of laboratory analytical data including complete blood count, albumin, C-reactive protein and fecal calprotectin (FC) prior to anti-TNF exposure and at 3 and 6 months after treatment, as well as stool cultures and parasites in stools to rule out concomitant infection, all during follow-up and whenever clinical changes were seen in the patient, in accordance with routine clinical practice. Thus, with these data, each patient was classified as either a responder or a non-responder.

Stool sample collection. Fecal samples were collected for analysis of intestinal microbiota, prior to exposure to the anti-TNF drug and 6 months after initiation of treatment, and stored in the laboratory of each center at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

All the subjects were given a 3-day dietary intake questionnaire prior to stool collection. The same 3-day diet was followed before the 6-month stool collection, in order to minimize dietary bias.

Sequencing and bioinformatics. DNA was obtained from 200 mg of stool using the QIAamp PowerFecal Pro kit (QIAGEN), through mechanical and enzymatic lysis. The V3 and V4 region of the 16S rRNA subunit² was then amplified and sequencing was performed following the Library Illumina 15044223 B protocol and the MiSeq platform (ILLUMINA) 2×300 bp configuration (ADM-Lifesequencing S.L., Valencia). Sequencing data were processed following the Microbiome bioinformatics protocol with QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) version 2019.4¹⁸. Raw sequences were analyzed using DADA2 (Divisive Amplicon Denoising Algorithm) and clustered into Amplicon Sequence Variants (ASVs)^{19,20}, (via q2-dada2). All amplicon sequence variants (ASVs) were aligned with mafft (Katoh et al. 2002) (via q2-alignment) and used to construct a phylogeny with fasttree2 (Price et al. 2010) (via q2-phylogeny). Alpha-diversity metrics (observed features and Faith's Phylogenetic Diversity (Faith 1992)), beta diversity metrics (weighted UniFrac (Lozupone et al. 2007), unweighted UniFrac (Lozupone et al. 2005), Jaccard distance, and Bray-Curtis dissimilarity), and Principle Coordinate Analysis (PCoA) were estimated using q2-diversity after samples were rarefied to the minimum feature count (value of 2311.6) observed across all of them during alpha and beta diversity analyses. Taxonomy was assigned to ASVs using the q2-feature-classifier (Bokulich et al. 2018a) classify-sklearn naïve Bayes taxonomy classifier at different levels, against the SILVA 16 s rRNA gene reference database (v132, set NR99)²¹.

Search for and evaluation of potential biomarkers. To identify potential non-invasive biomarkers from the characterization of the intestinal microbiome in various stages of CD, LefSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size) was used²². In addition, the absolute quantification of *Faecalibacterium prausnitzii*, *Escherichia coli*, and the total bacteria species present was studied using the QX200 Droplet Digital PCR system (ddPCR; Bio-Rad Laboratories), following the ddPCR Multiplex Supermix (BIORAD) kit protocol^{5,23–26}. For this, the appropriate primers and probes were selected to perform a triplex PCR together with the optimization of their concentrations and thermal programs^{5,23–26}. The QuantaSoft program version 1.7.4 was used to export the recorded amplitude data. The *Faecalibacterium prausnitzii*/*Escherichia coli* (F/E) ratio analysis was normalized using the following equation $([\log_{10}(\text{copies}/\mu\text{L } F. \text{ prausnitzii}) - \log_{10}(\text{copies}/\mu\text{L } E. \text{ coli})] / [\log_{10}(\text{copies}/\mu\text{L } \text{ARNr } 16\text{S})])$ ²⁷.

Statistical analysis. The study of ROC curves (AUC values)²⁸, were carried out using the statistical program IBM SPSS Statistics 26.0. The statistical analysis to obtain the concentration values required for the calculation of the F/E ratio through the ddPCR technique was performed through an adaptation of ddPCRmulti, a semi-automatic application based on R version 3.6²³. In the ROC curves of each of the possible indicators associated with the success of treatment with anti-TNFs, the cut-off values for greater sensitivity and specificity have been calculated using the index Youden (sensitivity + specificity - 1). In the bivariate analysis, the Bonferroni correction for multiple comparisons was made, setting the level of significance at $p < 0.0125$.

Ethical considerations. The study was carried out in strict accordance with the international ethical recommendations for research and clinical trials in humans contained in the Declaration of Helsinki and was classified by the Spanish Agency of Medicines and Healthcare Products as a prospective follow-up post-authorization study on February 12, 2015 (FXC-TNF-2015-01). It was subsequently approved by the Clinical Research Ethics Committee of Sagunto Hospital on July 22, 2015 (FXC-TNF-2015-01) and endorsed by the local ethics committees of all the participating centers. Written informed consent was obtained from the patients and the study participants.

Discussion

This study, in agreement with others, shows that CD is characterized by dysbiosis, i.e. an imbalance in gut bacteria compared to healthy persons, in terms of low alpha and beta biodiversity^{29–32}, and by a marked reduction in bacteria belonging to the class Clostridia, mainly SCFA-producing genera, with anti-inflammatory properties. In contrast, there was an increase in the representation of phylum Proteobacteria, mainly of the genus *Escherichia/Shigella* (pro-inflammatory). However, a higher relative abundance of the genus *Blautia* was also found in patients, while other studies reported its decrease in CD^{33,34}.

Regarding the changes observed after anti-TNF treatment, a therapy that has demonstrated a high remission rate in CD patients, we saw that responders presented a partial restoration of the microbiome characteristic of healthy individuals, that is, they presented a tendency towards eubiosis, with a significant increase in bacteria belonging to the class Clostridia, with anti-inflammatory metabolic functions. However, those members of the order Enterobacteriales, especially the genus *Escherichia/Shigella* (pro-inflammatory), although significantly reduced in the responders compared to baseline, did not reach significance compared to healthy controls. Accordingly, this is considered a partial restoration^{14,35}.

The study of differential microbiota in anti-TNF responders and non-responders enabled us to establish two bacterial species, *Faecalibacterium prausnitzii* and *Escherichia coli*, as those with the most suitable characteristics for use as biomarkers of therapeutic response^{3–5,11,12}, given the high relative abundance of the genus *Escherichia/Shigella* in non-responders and a greater representation of the genus *Faecalibacterium* in responders

	F/E index ≥ 0.037 n (%)	FC ≤ 100.5 $\mu\text{g/g}$ N (%)
Anti-TNF responders (n = 13)	12 (92.3)	12 (92.3)
Anti-TNF non-responders (n = 14)	6 (42.9)	3 (21.4)
P value test Chi square	0.006	<0.001
Sensitivity	92.3%	92.3%
Specificity	57.1%	78.6%
Positive predictive value	66.7%	80.0%
Negative predictive value	88.9%	91.7%

Table 2. True positives, false positives, sensitivity, specificity and predictive values obtained in the sample analyzed using the F/E index and FC.

to this therapy. With all this, we calculated the F/E ratio, previously described in another study, as a marker of dysbiosis¹⁴, through its absolute quantification by ddPCR and found significant differences between responders and non-responders. In contrast, no significant differences were found between responders and healthy controls. This is therefore a promising result in the search for rapid methods of analysis, such as biomarkers of therapeutic response.

The results obtained reinforce the importance of the role of the intestinal microbiome, particularly the loss of capacity in CD patients for inflammation regulation and epithelial repair, highlighting its partial recovery in responding patients after an increase in the abundance of certain SCFA-producing genera such as *Faecalibacterium*. These fatty acids, produced by the bacterial fermentation of non-digestible carbohydrates, constitute a source of colonic energy, in addition to their influence on the determination of the intestinal environment, influencing transit, nutrient uptake, pH and microbial balance. Thus, they also present important immunomodulatory and anti-inflammatory properties, mainly through the control of T-regulatory cell homeostasis. For example, the secretion of metabolites from *Faecalibacterium prausnitzii* can block the activation of NF- κ B and the production of IL-8, affecting the inflammatory cascade^{5,36,37}.

The statistical analyses performed show promising results concerning the potential of the F/E ratio as a biomarker of therapeutic response based on the relationship between the intestinal microbiome and CD. Indeed, it was superior to other biomarkers such as FC and the Harvey-Bradshaw index currently used in monitoring this disease in routine clinical practice. The use of the F/E ratio, either alone or in combination with other biomarkers, could be a new therapeutic objective in this disease, although validation studies are needed prior to its introduction into clinical practice. New clinical studies may provide further evidence of its potential use as a biomarker with non-invasive anti-TNF response samples in CD, allowing decision-making about therapy to manage CD, modifying treatments according to whether or not it is possible to achieve a microbiota similar to that of healthy subjects. In this way, the course of the disease can be changed based on its pathogenesis, i.e. dysbiosis, and not, as has been done up to now, through its consequences such as the inflammatory cascade using measurements such as FC or invasive techniques such as endoscopy.

Thus, with the cut-off points obtained, the number of anti-TNF responders coincides with both parameters (fecal calprotectin and F/E index), whose distribution is presented in Table 2.

Although this cut-off point does not statistically exceed fecal calprotectin, it could be a good predictor of restoration of intestinal microbiota associated with a response to anti-TNF treatment. It could even predict response by determining it before the start of treatment if these values of sensitivity and specificity were maintained when expanding the sample size in the future. In this way, establish which patients to offer anti-TNF and in whom we should look for other alternatives.

Among the strengths, in addition to the implications for clinical practice by establishing the F/E ratio as a novel non-invasive tool in therapeutic decision-making, it should be noted that the healthy individuals included were family members of the patients, with absolutely similar diets and therefore perfectly comparable. Moreover, to further minimize dietary bias, at six months the patients consumed the same diet for the 3 days prior to the first stool collection. This was not done in any of the other studies published to date.

One of the limitations is that as this was an observational, non-interventional study, confounding factors may have been present between treatment allocation and outcomes, in comparative analyses of response rates. In addition, patient samples that do not represent real-world clinical practices may have been included, for example, heterogeneous patients with respect to their previous anti-TNF treatments. Another limitation is the reduced number of patients included due to the inherent cost of the technique, which prevented the inclusion of the same number of healthy subjects as patients. Furthermore, although it is a multicenter study, the number of patients who are incorporated into anti-TNF treatment and who meet all the inclusion and exclusion criteria is limited, even more so the number of blood relatives living with the patient and with a diet similar to that used as a control. It should be noted, however, that our sample size for the CD patient group was similar to that published to date in studies with a similar design³⁸ and that the results allow this number of patients to respond to the objectives set.

Conclusions

CD is characterized by dysbiosis, with reduced class Clostridia bacteria, mainly genera associated with the SCFA production. Anti-TNF therapy in responding patients partially restores the intestinal microbiome to become almost similar to the microbiota of healthy individuals. The F/E ratio, as a non-invasive biomarker, allows

differentiation between responders and non-responders, with good levels of sensitivity and specificity compared to other biomarkers currently used in clinical practice.

Received: 12 July 2020; Accepted: 14 April 2021

Published online: 11 May 2021

References

- Methé, B. A. *et al.* A framework for human microbiome research. *Nature* **486**, 215–221 (2012).
- Klindworth, A. *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* **41**, 1–11 (2013).
- Zuo, T. & Ng, S. C. The Gut microbiota in the pathogenesis and therapeutics of inflammatory bowel disease. *Front. Microbiol.* **9**, 2247 (2018).
- Collins, S. M. A role for the gut microbiota in IBS. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 497–505 (2014).
- Lopez-Siles, M. *et al.* Mucosa-associated Faecalibacterium prausnitzii and Escherichia coli co-abundance can distinguish Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease phenotypes. *Int. J. Med. Microbiol.* **304**, 464–475 (2014).
- Rajca, S. *et al.* Alterations in the intestinal microbiome (dysbiosis) as a predictor of relapse after infliximab withdrawal in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **20**, 978–986 (2014).
- Qasem, A. *et al.* TNF α inhibitors exacerbate Mycobacterium paratuberculosis infection in tissue culture: A rationale for poor response of patients with Crohn's disease to current approved therapy. *BMJ Open Gastroenterol.* **5**, e000216 (2018).
- Qasem, A. *et al.* The alternate effects of anti-TNF α therapeutics and their role in mycobacterial granulomatous infection in Crohn's disease. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **15**, 637–643 (2017).
- Qasem, A. *et al.* Genetic polymorphisms in tumour necrosis factor receptors (TNFRSF1A/1B) illustrate differential treatment response to TNF α inhibitors in patients with Crohn's disease. *BMJ Open Gastroenterol.* **6**(1), e000246 (2019).
- Cao, B. L. *et al.* Systematic review and meta-analysis on the association of tuberculosis in Crohn's disease patients treated with tumor necrosis factor- α inhibitors (Anti-TNF α). *World J. Gastroenterol.* **24**, 2764–2775 (2018).
- Zhou, Y., *et al.* Gut microbiota offers universal biomarkers across ethnicity in inflammatory bowel disease diagnosis and infliximab response prediction. *mSystems.* **3**, 1–14 (2018).
- Magnusson, M. K. *et al.* Anti-TNF therapy response in patients with ulcerative colitis is associated with colonic antimicrobial peptide expression and microbiota composition. *J. Crohn's Colitis.* **10**, 943–952 (2016).
- Wang, Y. *et al.* Characteristics of faecal microbiota in paediatric Crohn's disease and their dynamic changes during infliximab therapy. *J. Crohn's Colitis.* **1**, 1–10 (2017).
- Busquets, D. *et al.* Anti-tumour necrosis factor treatment with adalimumab induces changes in the microbiota of Crohn's Disease. *J. Crohn's Colitis.* **9**, 899–906 (2015).
- Iebba, V. *et al.* Eubiosis and dysbiosis: The two sides of the microbiota. *New Microbiol.* **39**, 1–12 (2016).
- Fitzgerald, C. B. *et al.* Comparative analysis of Faecalibacterium prausnitzii genomes shows a high level of genome plasticity and warrants separation into new species-level taxa. *BMC Genomics* **19**, 931 (2018).
- Lopez-Siles, M. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii: From microbiology to diagnostics and prognostics. *ISME J.* **11**, 841–852 (2017).
- Callahan, B. J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods.* **13**, 581–583 (2016).
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J. & Holmes, S. P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J.* **11**, 2639–2643 (2017).
- Bolyen, E. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **37**, 852–857 (2019).
- Quast, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **41**, D590–D596 (2013).
- Segata, N. *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **12**, R60 (2011).
- Dobnik, D., Štebih, D., Blejec, A., Morisset, D. & Žel, J. Multiplex quantification of four DNA targets in one reaction with Bio-Rad droplet digital PCR system for GMO detection. *Sci. Rep.* **6**, 1–9 (2016).
- Postel, M., Roosen, A., Laurent-Puig, P., Taly, V. & Wang-Renault, S. F. Droplet-based digital PCR and next generation sequencing for monitoring circulating tumor DNA: a cancer diagnostic perspective. *Exp. Rev. Mol. Diagn.* **18**, 7–17 (2018).
- Huijsdens, X. W. *et al.* Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4423–4427 (2002).
- Furet, J. P. *et al.* Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol. Ecol.* **68**, 351–362 (2009).
- Kuypers, J. & Jerome, K. R. Applications of digital PCR for clinical microbiology. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 1621–1628 (2017).
- Grund, B. & Sabin, C. Analysis of Biomarker Data: logs, odds ratios and ROC curves. *Curr. Opin. HIV AIDS.* **5**, 473–479 (2010).
- Ren, B. *et al.* The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe.* **15**, 382–392 (2014).
- Pascal, V. *et al.* A microbial signature for Crohn's disease. *Gut* **66**, 813–822 (2017).
- Manichanh, C. *et al.* Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* **55**, 205–211 (2006).
- Hofer, U. Microbiome: Bacterial imbalance in Crohn's disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 312–313 (2014).
- Yilmaz, B. *et al.* Microbial network disturbances in relapsing refractory Crohn's disease. *Nat. Med.* **25**, 701–701 (2019).
- Ananthakrishnan, A. N. *et al.* Gut microbiome function predicts response to anti-integrin biologic therapy in inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe.* **21**, 603–610 (2017).
- Shaw, K. A. *et al.* Dysbiosis, inflammation, and response to treatment: A longitudinal study of pediatric subjects with newly diagnosed inflammatory bowel disease. *Genome Med.* **8**, 1–13 (2016).
- Cao, Y., Shen, J. & Ran, Z. H. Association between Faecalibacterium prausnitzii reduction and inflammatory bowel disease: A meta-analysis and systematic review of the literature. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2014**, 872725 (2014).
- Galazzo, G. *et al.* Faecal microbiota dynamics and their relation to disease course in Crohn's disease. *J. Crohn's Colitis.* **13**, 1273–12128 (2019).
- Estevinho, M. M. *et al.* Features of fecal and colon microbiomes associate with responses to biologic therapies for inflammatory bowel diseases: A systematic review. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **18**, 1054–1069 (2020).

Acknowledgements

The author's thank Maria Repice for her help with the English version of the manuscript.

Author contributions

L.S.A participated in the design of the study, recruitment, sample collection and writing of the manuscript, reviewed the content, and fully approved the final version for submission. J.F.M.B participated in the design of

the study, performed the sequencing and bioinformatics analysis of the samples collected, and also participated in the writing of the manuscript. S.M.V participated in the design of the study related to intestinal microbiota analysis and contributed to the statistical analysis plan, sequencing and bioinformatics analysis. E.C.C participated in the design of the study, contributed to the statistical analysis plan and also participated in the writing of the manuscript, the review of important intellectual content and fully approved the final version for submission. M.V.G, M.I.C, JM.P.A, M.B.W, JM.H.M and R.G.B contributed to the process of patient inclusion, patient monitoring and data recording. J.R.M participated in the design of the study and its coordination. X.C.R conceived the study and participated in the overall design, contributed to the process of patient inclusion, monitoring and helped write the manuscript by reviewing important intellectual content and fully approved the final version for submission. And all authors have read and approved the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to L.S.-A., J.F.M.-B. or E.C.-C.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021