

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

Memòria del Treball de Recerca de tercer cicle del **Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)**, per la línia de recerca: Aspectes terapèutics i fisiopatològics de la malaltia inflamatòria intestinal humana (colitis ulcerosa i malaltia de Crohn).

Convocatòria de Setembre del 2011.

David Busquets Casals

Vist-i-plau
Director del Treball
de Recerca

Vist-i-plau
Director del Treball
de Recerca

Vist-i-plau
Director del Treball
de Recerca

Dr. Miquel Angel Gassull Duró
Investigador col·laborador
Departament Medicina UAB

Dr. Jesús Garcia Gil
Catedràtic de Microbiologia
Departament de Biologia
Universitat de Girona

Dr. Xavier Aldeguer Manté
Cap Servei Digestiu
Hospital Universitari
Dr. Josep Trueta de Girona

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.



Servei Digestiu
Hospital Universitari Doctor Josep Trueta Girona



Departament de Biologia
Àrea de Microbiologia
Grup de Microbiologia Clínica i Malalties Infeccioses

**Estudi de l'efecte del tractament amb
Adalimumab sobre la microbiota
associada a la mucosa intestinal en
pacients amb malaltia de Crohn.**

David Busquets Casals

Girona, Juliol 2011

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

Agraïments

Quan per primera vegada vaig sentir la paraula microbiota intestinal, per un clínic com jo en el que tot el món del laboratori quedava lluny i abstracte, sincerament vaig continuar pensant que no anava amb mi. Per sort, aquesta sensació no va durar molt, i això gràcies a un grup de persones sense les quals introduir-me en aquest camp no hagués fructificat.

Primer m'agradaria agrair tot el suport, supervisió i ajuda de les dues persones sense les quals tot aquest projecte no s'hagués iniciat, no hagués nascut. Va per vosaltres, els meus co-directors Jesús i Xevi, gràcies per la confiança.

Hi ha dues persones més, treballadores tremendes que m'han ajudat molt i molt en entendre les tècniques utilitzades, i sense les quals no s'haguessin aconseguit tots aquests resultats. Són la Tere i la Mireia, les microbiòlogues de la UdG (Universitat de Girona). *Merci* per tot... us en dec una !!!

Finalment, i també molt important, agrair a la meva dona el suport i aquella empenta en certs moments per decidir-me a escriure i a tirar endavant aquest treball de recerca.

Gràcies a totes i tots !!

Index

Resum	7
Introducció.....	9
1. Malaltia inflamatòria intestinal. Generalitats.....	10
1.1 Malaltia de Crohn.....	11
1.1.1 Definició.....	11
1.1.2 Manifestacions	12
1.1.3 Diagnòstic.....	13
1.2 Classificació.....	14
1.3 Factors de risc externs.....	15
1.4 Tractament.....	16
1.4.1 Paper d'Adalimumab en la malaltia de Crohn.....	19
1.5 Malaltia de Crohn i microbiota intestinal.....	24
1.5.1 Microbiota intestinal en pacients sans.....	24
1.5.2 Microbiota intestinal i malaltia inflamatòria intestinal.....	24
1.5.3 La disbiosi a la Malaltia de Crohn.....	27
1.5.4 <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> i Malaltia de Crohn.....	30
1.6 Objectius de l'estudi.....	32
Material i mètodes.....	33
2. Material i mètodes.....	34
2.1 Selecció de pacients.....	34
2.2 Recopilació d'informació i consentiment informat.....	35
2.3 Recollida de mostres.....	35
2.4 Processament de les mostres.....	37
2.5 Anàlisi de la comunitat bacteriana mitjançant PCR-DGGE.....	38
2.6 Quantificació d' <i>Escherichia coli</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> i cèl.lules humanes mitjançant PCR a temps real.....	41
2.7 Anàlisi de dades.....	43

Resultats.....	44
3. Resultats.....	45
3.1 Anàlisi de la comunitat microbiana per PCR-DGGE.....	45
Discussió.....	54
4. Discussió	54
Conclusions.....	67
5 Conclusions.....	68
Bibliografia.....	71

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

Resum

Resum

La malaltia de Crohn és una malaltia inflamatòria intestinal en la qual s'ha observat que la densitat i la diversitat bacteriana difereixen dels subjectes sans. Per tant, s'està preconitzant que els bacteris podrien jugar un paper important en la fisiopatologia de la malaltia.

En els últims anys s'estan emprant tractaments biològics com els anti-TNF de manera alternativa a tractaments ja existents. Entre ells, l'Adalimumab presenta en estudis clínics i en la practica clínica habitual signes d'efectivitat en la recuperació de la mucosa intestinal.

Aquest estudi pretén avaluar si el control de l'activitat inflamatòria amb aquesta molècula en pacients amb malaltia de Crohn, produeix canvis qualitius en la microbiota intestinal, i si aquests canvis evolucionen cap a una recuperació del patró bacterià "normal" de les persones sanes.

Els resultats obtinguts després de l'anàlisi de la composició bacteriana de la mucosa intestinal de pacients amb Malaltia de Crohn tractats amb Adalimumab, són esperançadors ja que apunten a una recuperació del patró normal a través de la recuperació d'espècies pròpies de persones sanes i la desaparició d'aquelles més prevalents en malalts de Crohn. Aquesta "regressió" de la mucosa intestinal cap a una posició pròpia de mucoses sanes s'ha de confirmar amb un major número de pacients analitzats i a més llarg terme.

Introducció

1. MALALTIA INFLAMATÒRIA INTESTINAL. Generalitats.

El terme de “Malaltia Inflammatory Intestinal” (MII) crònica, inclou una àmplia varietat de presentacions i manifestacions clíniques, de la que la principal característica és la inflamació crònica del tub digestiu en diferents localitzacions. Actualment el concepte de MII engloba tres entitats: la Malaltia de Crohn (MC), la colitis ulcerosa (CU) i la colitis indeterminada (CI).

La cronicitat en el curs clínic de la MII consisteix en alternar períodes de inactivitat o quiescència que s'identifiquen amb les fases de remissió, amb períodes d'activitat clínica de diferent intensitat que s'anomenen brots o recidives¹.

Actualment l'etiologia de la MII és desconeguda. La teoria etiopatogènica més acceptada és la desregulació de la resposta immune de l'hoste enfront a la flora bacteriana resident i a altres antigens intraluminals en subjectes susceptibles genèticament².

La MC, la CU i la colitis indeterminada (CI), són tres entitats que malgrat ser diferents entre sí, tenen característiques comuns que en moltes ocasions fan difícil diferenciar-les. Per realitzar el diagnòstic diferencial entre MC i CU és necessari recolzar-se en les característiques clíniques, endoscòpiques, radiològiques, histològiques, serològiques i en l'evolució temporal de la malaltia.

1.1 MALALTIA DE CROHN:

1.1.1 Definició

La incidència de la MC en quasi tots els estudis en els països occidentals s'estima de 3.9-7 persones per 100000 habitants/any, menor que la descrita per la CU.

La MC és un tipus de MII que pot afectar qualsevol zona del tracte digestiu, des de la boca fins a l'anús. Les àrees que presenten la malaltia amb major freqüència són l'ili terminal i el cec, però pot afectar únicament al recte i inclús, encara que rarament, manifestar-se aïlladament a la orofaringe.

Amb freqüència la MC no afecta al recte, aspecte diferenciador amb la CU. No obstant, convé recordar que fins el 60% dels pacients amb MC amb afectació còlica presenten malaltia rectal, fonamentalment quan s'associa a malaltia fistulosa perianal³.

La MC presenta habitualment una inflamació segmentària el que significa que existeixen àrees d'intestí preservades de la malaltia entre els segments d'intestí afectats, i que tenen una longitud variable. A més, aquesta inflamació és asimètrica al llarg de la circumferència del tracte digestiu i de les diferents localitzacions de la malaltia.

Una característica diferencial de la MC és la seva afectació transmural, és a dir, la inflamació afecta a tot el gruix de la paret intestinal, des de la mucosa fins la vessant de la serosa que recobreix l'intestí. L'afectació transmural pot tenir com a complicació l'aparició de fístules, abscessos i estenosis.

La característica histològica clau a la MC és la troballa de granulomes no caseïficans a l'estudi microscòpic, malgrat és important recordar que els granulomes no són patognòmics de la MC. Altres troballes histològiques menys específiques de la MC són la presència de distorsió de la cripta de forma discontinua i la presència de inflamació discontinua sempre i quan la malaltia no hagi estat tractada prèviament⁴.

Típicament la MC cursa de forma intermitent, en brots, amb períodes silents seguits de períodes asimptomàtics. No s'han trobat diferències entre sexes.

1.1.2 Manifestacions

Els símptomes clàssics de presentació de la MC són la diarrea, el dolor abdominal i la pèrdua de pes. Malgrat això, aquesta triada clàssica només es presenta en el 25% dels casos en el moment del diagnòstic. L'emissió de sang amb les femtes és més habitual en l'afectació colònica, si bé en aquests casos la rectorràgia és menys freqüent que en la CU. Altres símptomes com el tenesme rectal, la urgència i la incontinència anal també són més freqüents en la CU.

Hi poden haver també símptomes extraintestinals com ara lesions bucals (aftes, ulceracions), lesions dèrmiques (eritema nodós, pioderma gangrenós), oculars (uveïtis, epiescleritis,...), articulars (sacroileïtis, espondilitis) i/o hepàtiques (colangitis esclerosant primària).

1.1.3 Diagnòstic

Una vegada establerta la sospita diagnòstica basada en una adequada anamnesi i exploració física, són necessàries dades biològiques, morfològiques i histològiques per arribar al diagnòstic.

Els objectius de les exploracions complementàries a realitzar es resumeixen en cinc punts:

- 1) confirmació del diagnòstic de MC
- 2) descartar altres processos per poder arribar al diagnòstic de certesa
- 3) avaluar l'extensió anatòmica de la malaltia
- 4) avaluar l'activitat del brot
- 5) descartar o confirmar l'existència de complicacions de la malaltia.

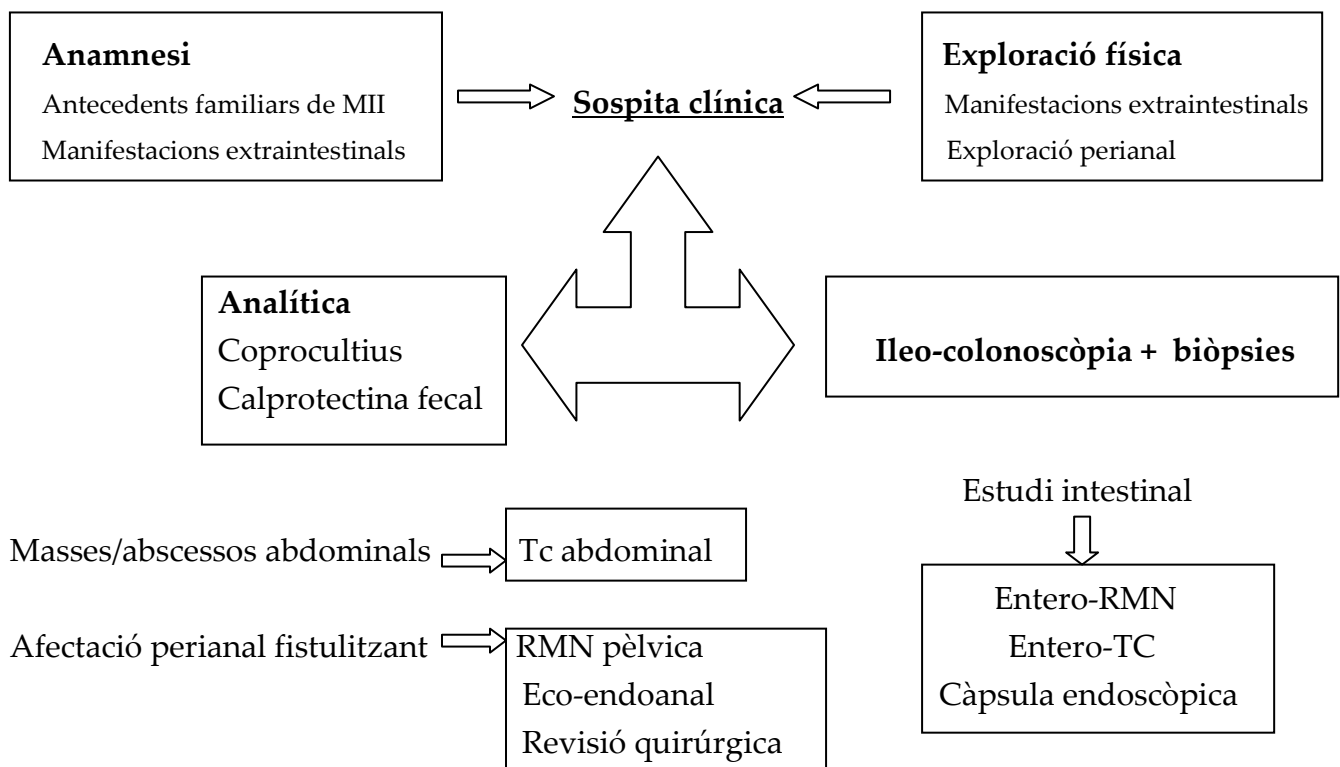


Figura 1: Algoritme diagnòstic en cas sospita de MC

1.2 Classificació

La MC és clínicament molt heterogènia i amb una important varietat demogràfica, clínica i fenotípica, que ha obligat a subclassificar als pacients en funció de l'edat en el moment del diagnòstic, la localització i el comportament de la malaltia.

Arrel de la classificació prèvia de Viena de la MC, es va modificar l'any 2005 a l'actual classificació de Montreal ⁵ (Taula 1).

Taula 1: Classificació de la MC de Montreal

Edat al diagnòstic (A)		
A1 : Menor de 16 anys		
A2 : 17-40 anys		
A3 . Major de 41 anys		
Localització (L)	Modificada per gastrointestinal (GI) alta (L4)	
L1 : Ili terminal	L1 + L4	Ili terminal + GI alta
L2 . Còlon	L2 + L4	Còlon + GI alta
L3 : Ili-còlon	L3 + L4	Ili-còlon + GI alta
L4 : GI alta		
Comportament (B)	Modificat per malaltia perianal	
B1 : Inflamatori	B1p	Inflamatori + perianal
B2 : Estenosant	B2p	Estenosant + perianal
B3 : Penetrant	B3p	Penetrant + perianal

1.3 Factors de risc externs

Molts han estat fins ara els factors ambientals relacionats amb la MII, continuant encara sense aclarir el mecanisme fisiopatogènic de cada un d'ells. Alguns es comporten de manera totalment diferent en la CU i en la MC, reforçant la hipòtesi de que probablement ambdues entitats són entitats heterogènies.

El paper dels diferents factors ambientals estudiats per a cada MII per separat, es resumeixen a la taula 2.

La influència que els factors genètics tenen sobre l'etiopatogènia de la MII està actualment essent molt estudiada. Existeix una major concordança en bessons sobretot homozigots per desenvolupar una MII, i l'associació familiar s'ha documentat en nombrosos estudis, descrivint percentatges d'antecedents familiars de MC de 2-14% (en cas d'un pacient amb MC) i del 5% (en un antecedent familiar de qualsevol tipus de MII)⁶. També està sent objecte d'un important estudi la identificació del gen NOD2 (actualment anomenat CARD15), la mutació del qual és responsable d'un augment de susceptibilitat per presentar MC⁷.

Cal remarcar també que l'hàbit tabàquic en els pacients amb MC està clarament associat a una pitjor evolució de la seva malaltia ⁸, amb major nombre de brots, i també s'associa a una major recurrència post-quirúrgica en els pacients intervinguts.

S'han descrit fins el moment múltiples microorganismes que podrien estar implicats en l'etiologia i/o patogènia de la MII (bacteris, micobacteris, virus, ...) sense poder demostrar el paper patògen de cap d'ells de forma conclouent ⁹.

Taula 2: Associació dels diferents factors amb la CU i la MC.

Factors de risc	CU	MC
Tabaquisme		
. Fumador	Factor protector	Factor de risc
. Ex fumador	Factor de risc	Factor protector
. No fumador	Factor de risc	Factor protector
Apendicectomia	Factor protector	Factor protector ???
Anticonceptius orals	Factor risc ???	-----
Predisposició genètica	↑	↑↑
Dieta	Falta evidència	Falta evidència
Infeccions	Contribució patogènica	Contribució patogènica
AINE's	Controvertit	Controvertit

1.4 Tractament

El tractament de la MC ha de ser individualitzat en cada pacient tenint en compte no només la gravetat de la malaltia en un determinat moment, sinó també la història de la malaltia, el pronòstic de la mateixa a llarg terme i les expectatives del pacient. No és infreqüent que aquests dos últims punts quedin fora de l'equació que guia el tractament, però són fonamentals per oferir al pacient una actitud pro activa per canviar el curs de la malaltia, i no només una pauta reactiva a l'aparició de l'activitat o de complicacions.

L'elecció del tractament per la MC ve determinada bàsicament per la localització de la malaltia (ileal, ileo-còlica, colònica, ...), pel patró (inflamatori, estenosant i fistulitzant) i/o per la gravetat i presència de manifestacions extraintestinals. El tractament mèdic estarà enfocat a induir la remissió clínica, aconseguir la curació

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

de la mucosa, prevenir la recidiva a llarg termini i les complicacions. S'ha de realitzar un diagnòstic diferencial dels símptomes i confirmar l'activitat de la malaltia prèviament a l'inici del tractament del brot.

Taula 3: Estratègies de tractament a la MC. Possibles estratègies de tractament en la MC, segons el seu fenotip, localització i activitat.

Ileal o ileo-cecal	
<u>Malaltia activa</u>	
Lleu	Budesonida 9 mg/dia
Moderada	Budesonida / esteroides sistèmics /AZA, 6-MP o MTX*
Greu	Esteroides sistèmics / Anti-TNF α +/- immunomodulador
Corticodepenent/ Corticoresistència	AZA o 6-MP / MTX / anti-TNF α / cirurgia
<u>Manteniment</u>	AZA o 6-MP o MTX / Anti- TNF α
Còlica	
<u>Malaltia activa</u>	
Lleu	Esteroides sistèmics
Moderada/greu	Esteroides sistèmics / AZA o 6-MP o MTX / Anti-TNF α / cirurgia
Corticodependent/ Corticoresistència	AZA o 6-MP o MTX / Anti- TNF α / cirurgia
<u>Manteniment</u>	AZA o 6-MP o MTX / Anti- TNF α / cirurgia
Malaltia fistulitzant	
<u>Actiu</u>	Antibiòtics / AZA o 6-MP / anti-TNF α /cirurgia
<u>Manteniment</u>	AZA o 6-MP / anti-TNF α /cirurgia

* AZA: azatioprina / 6-MP: 6- mercaptopurina / MTX: metotrexate

Anti-TNF: Infliximab , Adalimumab. Antibiòtics: ciprofloxacino, metronidazol

En la pràctica clínica, s'acostuma a utilitzar un enfocament "escalonat" en el que s'afegeixen tractaments si els mètodes de primera línia o menys tòxics no són eficaços en un període de temps apropiat. Malgrat això, el tractament definitiu amb un agent potent (enfocament *top-down*) en una fase inicial pot ser preferit pel pacient que presenta símptomes de la malaltia activa¹⁰. Alguns investigadors afirmen que es podrien considerar en fases més precoces els tractaments amb possibilitat de modificar l'evolució de la malaltia, és a dir, immunomoduladors i fàrmacs biològics amb l'esperança d'alterar l'evolució natural de la malaltia.

Els fàrmacs que s'utilitzen per induir la remissió de la malaltia lleu a moderada inclouen 5-aminosalicilats, budesonida i antibiòtics. Malgrat això, no s'ha demostrat de forma constant l'eficàcia de mesalazina ni dels antibiòtics en la inducció de la remissió. Per la malaltia moderada a greu, s'utilitzen els esteroids sistèmics, immunomoduladors (azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexate) i teràpies biològiques.

Aquestes últimes actuen sobre citoquines proinflamàtores (TNF) que participen en els processos inflamatoris relacionats amb la MII. El TNF té una funció important en la cadena inflamatòria de la MC, i es relaciona amb la inducció de moltes altres respostes proinflamàtores en el tub digestiu, com l'activació dels macròfags que dona lloc a l'alliberació de mediadors proinflamatoris. Aquests mediadors indueixen l'expressió de molècules d'adhesió, que donen lloc a l'arribada de noves cèl·lules inflamatòries fins a la mucosa. El TNF altera la integritat de les membranes epitelials i contribueix a la lesió intestinal.

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

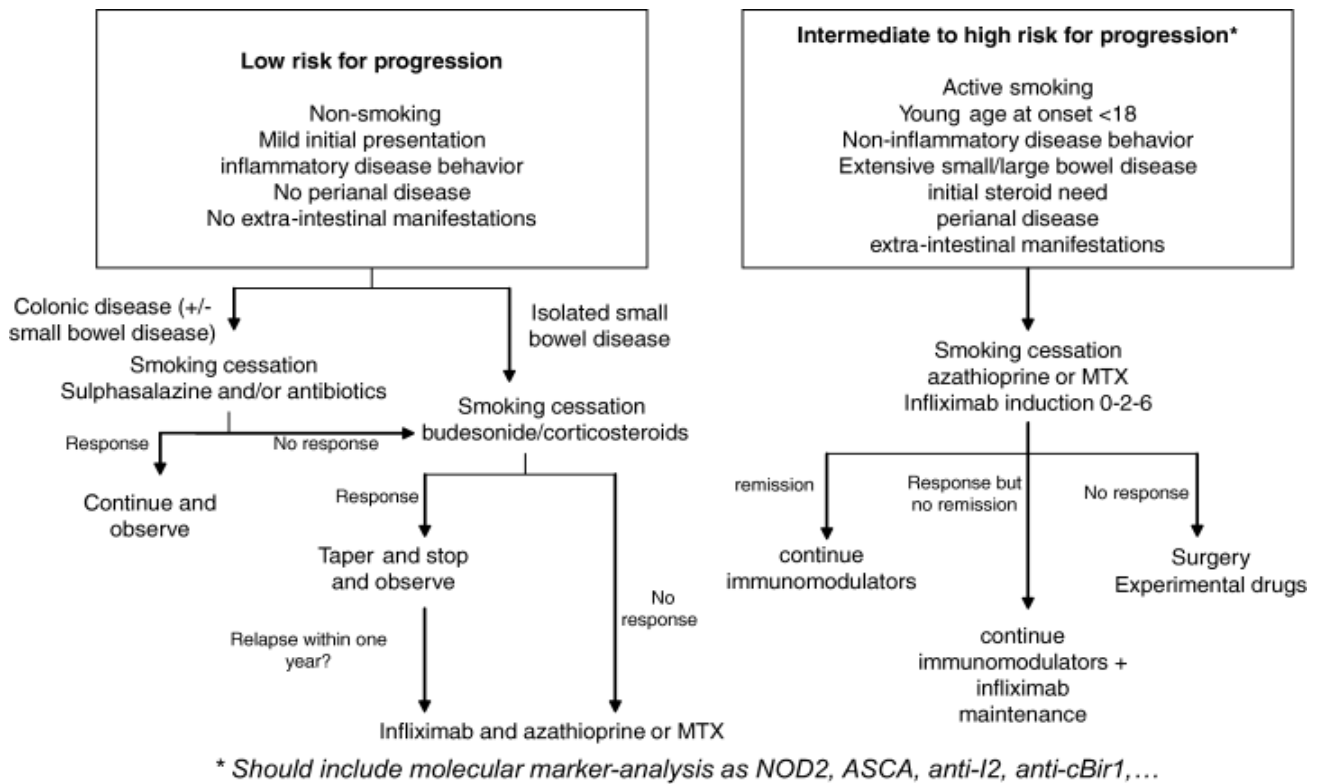


Figura 2: Possible algoritme terapèutic en la MC organitzat segons risc de progressió de la malaltia¹¹.

1.4.1 Paper d'Adalimumab en la Malaltia de Crohn

La inclusió del primer antagonista del TNF, Infliximab, en els algoritmes terapèutics va ser un dels avanços més importants en el tractament de la MC a la última dècada. S'ha demostrat que Infliximab indueix ràpidament i manté la remissió en pacients amb MC activa.

Adalimumab és el segon antagonista del TNF que s'ha autoritzat per la MC als Estats Units i a la Unió Europea. Està autoritzat actualment pel tractament de

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

L'artritis reumatoide, l'artritis psoriàsica, l'espondilitis anquilopoiètica i la MC, i està pendent per l'any la probable autorització en la MC pediàtrica i en la CU. Actualment no disposem de cap altre tractament anti-TNF aprovat per la MC.

És un anticòs monoclonal IgG₁ humà totalment recombinant, estructuralment idèntic als anticòssos humans, característica que redueix la possibilitat de desenvolupar resposta immune. S'autoadministra per via subcutània, i presenta una vida mitja de 12-14 dies (Figura 3). Es va crear utilitzant regions variables (porcions dels anticòssos que confereixen l'especificitat en la unió a l'antigen) dels anticòssos humans que apareixen de forma natural i que es troben en els linfòcits B de l sang perifèrica de voluntaris sans. S'uneix amb elevada afinitat i especificitat al TNF unit a la membrana i soluble, impedint que activi als receptors del TNF de la superfície cel.lular p55 i p75. També modula les respostes biològiques d'altres molècules que són induïdes o regulades per TNF (ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1)¹².

La diferència principal amb la molècula de Infliximab, és que aquesta és un anticòs monoclonal anti-TNF de classe IgG1 quimèrica, amb un 25% de molècula d'origen murí, localitzada a la porció Fab de l'anticòs, encarregada específicament de reconèixer específicament el TNF humà.

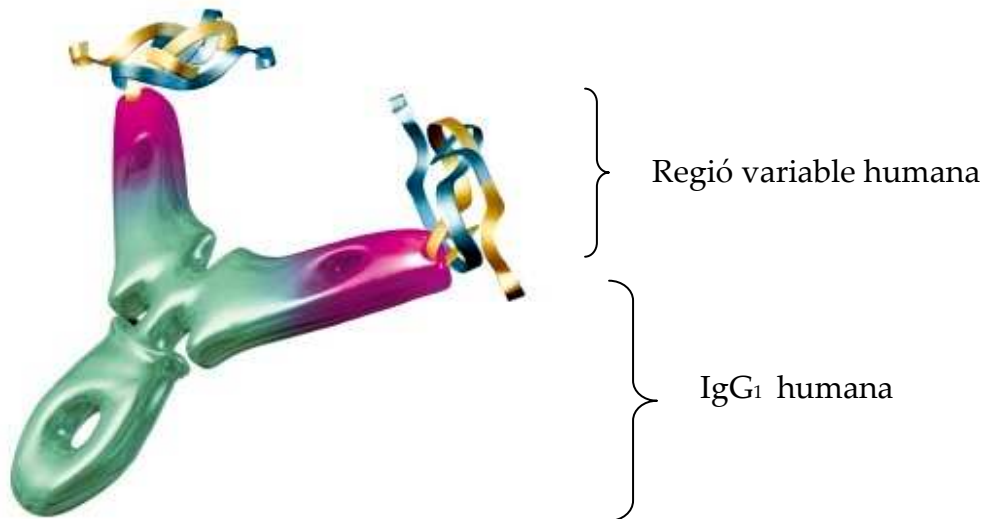


Figura 3: Anticòs monoclonal humà anti-TNF

L'aprovació es va basar en les dades de quatre assajos pivotals d'Adalimumab, realitzats en més de 1400 pacients adults amb MC activa entre moderada i greu.

A l'estudi CLASSIC I es va demostrar que els dos règims d'inducció amb Adalimumab a la setmana 0 i setmana 2 (160/80 i 80/40mg) són dosis de càrrega eficaces per induir la resposta clínica i remissió en pacients amb MC de moderada a greu que mai han rebut tractament anti-TNF¹³, malgrat que el de 160/80mg seria el règim posològic òptim d'inducció.

L'estudi CLASSIC II va determinar que després d'una dosi d'inducció d'Adalimumab, els règims posològics de manteniment amb Adalimumab 40mg quinzenal o 40mg setmanal són més eficaços que placebo en el manteniment de la remissió en pacients amb MC moderada a greu durant 56 setmanes¹⁴.

Posteriorment, l'estudi CHARM va demostrar que en comparació amb placebo, el tractament de manteniment amb Adalimumab 40mg de forma quinzenal i Adalimumab 40mg setmanal, tenia la mateixa eficàcia en el manteniment de la

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

remissió clínica i la resposta en pacients amb MC moderada a greu¹⁵. En un subanàlisi d'aquest estudi, es va detectar que el tractament continu amb Adalimumab tant de forma bisetmanal com setmanal, va donar lloc a un augment estadísticament significatiu de la taxa de remissió, millora de la qualitat de vida, menys brots de malaltia i reducció dels ingressos hospitalaris per totes les causes i les relacionades amb la MC, en comparació amb el tractament sols durant la inducció/reinici¹⁶.

L'estudi GAIN va ser el primer estudi aleatoritzat, emmascarat i controlat amb un placebo que va avaluar l'eficàcia d'Adalimumab en els pacients que no havia sigut eficaç a un primer antagonista del TNF (Infliximab)¹⁷.

A la taula 4 es presenta el consens d'ús d'Adalimumab en la MC.

Fa més de 10 anys que s'utilitza Adalimumab pel tractament de múltiples indicacions en el camp de la reumatologia (artritis reumatoide, artritis psoriàsica, espondilitis anquilopoiètica), amb una base de dades de seguretat de més de 200000 pacients tractats.

Aquest fàrmac també es tolera bé en la MC moderada-greu, i ha demostrat un perfil de seguretat més que acceptable. La base de dades d'estudis clínics amb Adalimumab en la MC, ha demostrat que la incidència de reaccions adverses lleus, greus i reaccions adverses que hagin portat a l'abandonament dels estudis clínics va ser major en els pacients tractats amb placebo que en el grup tractat amb Adalimumab. Es van produir infeccions oportunistes en aproximadament el 2% dels pacients tractats amb Adalimumab.

Taula 4: Consens de la AGA (American Gastroenterology Association) de l'ús d'Adalimumab a la MC

Inducció resposta	En adults o infants amb MC moderada-severa, que han fallat o en tractament concomitant amb salicilats, antibiòtics, esteroides o immunomoduladors.
Inducció remissió	En adults o infants amb MC moderada-severa, que han fallat o en tractament concomitant amb salicilats, antibiòtics, esteroides o immunomoduladors.
Manteniment remissió	En adults i nens
Pèrdua resposta o intolerància A Influximab	En adults
Inducció resposta i manteniment de la MC perianal fistulitzant	En adults amb MC moderada-severa, que han fallat o en tractament concomitant amb salicilats, antibiòtics, esteroides o immunomoduladors

1.5 MALALTIA DE CROHN i microbiota intestinal

1.5.1 Microbiota intestinal en pacients sans

L'intestí humà és l'hàbitat natural d'una població nombrosa, diversa, complexa i dinàmica de microorganismes, principalment bacteris, però també virus, llevats i arqueus que s'han adaptat a la vida en les superfícies mucoses o a la llum intestinal¹⁸.

L'ecosistema microbià de l'intestí inclou espècies natives que colonitzen permanentment el tracte gastrointestinal i una sèrie variable de microorganismes vius que transiten temporalment pel tracte digestiu. Els bacteris comensals s'adquireixen al néixer i durant el primer any de vida, mentre que les bacteris en trànsit s'ingereixen contínuament a través de la dieta. La població microbiana de l'intestí humà inclou uns 100 milions de bacteris d'unes 500 a 1000 espècies diferents.

La gran biodiversitat d'espècies dins l'ecosistema intestinal facilita la vida i el desenvolupament del conjunt, que inclou no només a les comunitats bacterianes si no també a l'hoste humà. Per aquest últim, la presència de la microbiota bacteriana no és imprescindible per la vida, però sí té un impacte important en la seva fisiologia. La relació de l'hoste amb la seva microbiota és de simbiosi, o sia, que la relació entre ambdós comporta beneficis per almenys un d'ells (en aquest cas pels dos), sense que existeixi cap perjudici per a cap de les dues parts¹⁹.

Estudis amb colonització intestinal controlada han permès identificar tres funcions primàries de la microbiota intestinal:

- a) funcions de nutrició i metabolisme, com resultat de l'activitat bioquímica de la flora, que inclouen recuperació d'energia en forma d'àcids grassos de cadena curta, producció de vitamines i efectes favorables sobre la absorció de calci i ferro en el còlon
- b) funcions de protecció, prevenint la invasió d'agents infecciosos o el sobrecreixement bacterià d'espècies residents amb potencial patògen
- c) funcions tròfiques sobre la proliferació i diferenciació de l'epiteli intestinal i sobre el desenvolupament i modulació del sistema immune ¹⁸.

S'ha posat de manifest que la microbiota comensal dels intestins està constituïda principalment per bacteris de metabolisme anaerobi que pertanyen als 4 fílums (Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria i Proteobacteria). Entre aquests, els constituents majoritaris són representants de 4 grups: *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, Clostridis del clúster XIVa (grup de *Clostridium coccoïdes*) i Clostridis del clúster IV (grup de *Clostridium leptum*)²⁰. Els membres del domini *Bacteria* són predominants en la comunitat intestinal, però també s'hi han trobat fongs i *Archaea*, representant menys del 0,05% i el 1% de la població total respectivament.

Actualment s'ha vist que la comunitat bacteriana que es pot trobar als intestins és específica per a cada individu pel que fa a diversitat, és estable al llarg del tracte gastrointestinal i existeix certa estabilitat temporal²¹⁻²³. A més, entre diferents individus s'ha pogut observar que existeix una part de la comunitat que és comuna (un 30-40% aproximadament), mentre que la resta és variable.

Això indicaria que per al bon funcionament intestinal cal que hi hagin un conjunt concret d'espècies.

1.5.2 Microbiota intestinal i malaltia inflamatòria intestinal

La presència de bacteris a la llum i les mucoses de l'intestí és una condició *sine qua non* en la patogènia de les lesions cròniques de l'intestí associades a CU o MC. S'ha demostrat que els bacteris del tracte intestinal són importants pel desenvolupament de la inflamació, essent necessaris per tal que aquesta s'iniciï en models de MII emprant animals immunodeprimits ²⁴. En pacients amb MC ileal, l'exposició de l'ili terminal després de cirurgia a contingut fecal està associat amb un augment de la inflamació ²⁵.

En aquests pacients existeix una resposta immune exagerada enfront als bacteris de la microbiota habitual. Aquest mecanisme fisiopatològic és decisiu en la generació de les lesions mucoses, ja que la derivació del contingut fecal aconsegueix una important remissió inflamatòria .

Diversos factors poden explicar aquesta reactivitat anormal del sistema immune enfront a la microbiota autòctona, destacant la susceptibilitat genètica de l'individu, defectes en la barrera mucosa intestinal i/o desequilibris en la comunitat bacteriana de l'ecosistema del tracte digestiu (Figura 4)

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

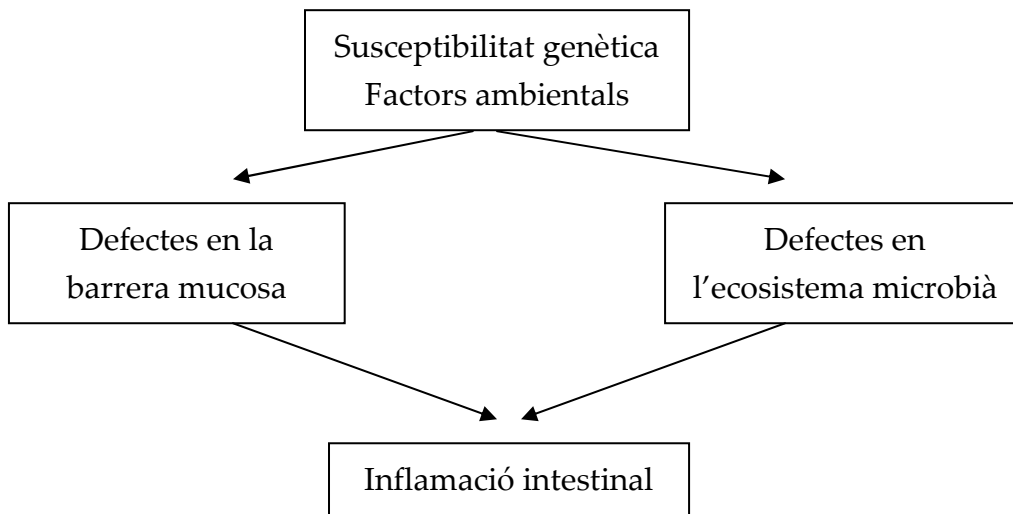


Figura 4: Factors involucrats en la reactivitat anormal dels sistema immune enfront a la microbiota.

1.5.3 La disbiosi a la Malaltia de Crohn

Diversos estudis de la composició bacteriana del lumen en pacients amb MII basats en cultiu i tècniques moleculars han demostrat que existeix un trencament en el balanç entre espècies protectores i els seus productes respecte a bacteris intestinals perjudicials i els seus metabòlits tòxics (situació coneguda com a disbiosi)²⁶⁻³¹.

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

Encara no està clar si els bacteris associats a la mucosa intestinal de pacients amb MII, i en particular amb MC, serien els agents etiològics primaris de la malaltia o colonitzadors secundaris oportunistes que s'estableixen en un còlon ja alterat. Tot i així, les espècies que componen aquesta fracció diferent poden ser un grup important per determinar la patogènesis de la MC així com també poden tenir aplicació a nivell de diagnòstic, ja que s'ha vist que pacients amb MC i individus control són clarament diferenciables en base als microorganismes que constitueixen la comunitat ^{26,30}.

En diversos estudis recents, s'ha observat que en individus amb MC, la comunitat bacteriana és característica de cada persona, no canvia significativament al llarg del tracte intestinal, i és independent de si existeixen signes inflamatoris de la mucosa o no. No obstant, aquesta comunitat bacteriana no és estable al llarg del temps i presenta una major variabilitat, és més fluctuant.

A més, com s'ha comentat, en pacients amb MC existeix una alteració de la microbiota intestinal respecte població sana, podent-se establir dos grups clarament diferenciables en base a aquesta. A la taula 5 es resumeixen les alteracions més importants detectades en aquests estudis comentats

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

Taula 5: Variacions microbiota bacteriana en MC ³³

Bacteris fecals	Bacteris associats a mucosa
Microbiota inestable al llarg del temps ^{26,31}	Augment de la concentració de bacteris totals ²⁷
Presència de bacteris poc habituals ^{26,34}	Augment de la concentració d'anaerobis totals i facultatius ²⁹
Disminució de la biodiversitat ^{31,34,36}	
Disminució de la quantitat i la biodiversitat de <i>Firmicutes</i> (en particular de membres del subgrup <i>C. leptum</i>) ^{29,31,32,34}	
Disminució de la concentració de <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> ^{30,32,35}	
Disminució de bifidobacteris i lactobacils ²⁶	
	Augment d'enterobacteris ^{26,30}
	AIEC associat a CD ileal ³³

MAM, microorganismes associats a mucosa; AIEC, *adherent-invasive E. coli*; MAP, *Mycobacterium avium subespècie pseudotuberculosis*

Retornant al concepte de disbiosi, s'han detectat dos grups d'espècies en diferent proporció en pacients amb MC. Aquelles que es troben en menor proporció de l'habitual, principalment *Firmicutes*, particularment del subgrup *Lachnospiraceae*. A destacar dins aquest subgrup, *Faecalibacterium prausnitzii* que sembla trobar-se en menor prevalença en aquest pacients, juntament amb els *Bifidobacterium* i *Bacteroides vulgatus* (membres dominants en la microbiota associada a la mucosa intestinal de població sana), i bacteris de l'àcid làctic (que s'utilitzen com a probiòtics i presenten activitat immunomoduladora).

Per contra, les altres espècies que mostren més prevalença en la MC en els estudis comentats serien el subgrup de *Bacteroides fragilis*, *Clostridium spp* i *Ruminococcus torques*²⁹⁻³². També s'ha detectat una major concentració d'*Enterobacteriàcies*, destacant la presència en un estudi d'un patovar adherent-invasiu d'*Escherichia coli* (AIEC) amb propietats fenotípiques diferents dels *E. coli* comensals i que s'ha trobat més freqüentment associat a la mucosa intestinal de pacients amb CD d'afectació ileal³³.

Aquests bacteris que presenten una prevalença diferent entre pacients control sans i amb MC es podrien utilitzar amb finalitats terapèutiques o de diagnòstic. Així, per exemple, en un estudi del nostre grup³⁰, es va observar que la combinació de la presència *Clostridium* spp i *E. coli* amb l'absència de *Faecalibacterium* es detectava amb una probabilitat 100 vegades superior en MC. Aquests microorganismes són bons indicadors de microbiota intestinal alterada (disbiosi). Per tant, podrien utilitzar-se per al diagnòstic, però també per monitorar quan hi ha un retorn a una condició més propera a la sana.

1.5.4 *Faecalibacterium prausnitzii* i Malaltia de Crohn

Faecalibacterium prausnitzii és un microorganisme que forma part de la microbiota intestinal normal, dins la família dels Firmicutes. Metabòlicament, és un bacteri anaerobi estricte, utilitzador d'acetat i productor de butirat, D-lactat i fomat.

La seva presència, a més de a la mucosa intestinal, també s'ha detectat en femtes i com a microorganisme colonitzador del bolus alimentari. La seva principal funció a l'intestí s'ha relacionat amb la producció de butirat a partir de la fermentació de carbohidrats. El butirat és un àcid gras de cadena curta que s'ha revelat essencial per al bon funcionament de l'epiteli intestinal, ja que és la principal font d'energia per als colonòcits. A més, se li atribueixen propietats protectores contra el càncer colorectal (CRC) i la MII³⁷. El butirat pot reduir la

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

inflamació de la mucosa intestinal a través de la inhibició de l'activació del factor de transcripció NF- κ B³⁸. Per tant, la deficiència de bacteris productors de butirat pot predisposar a certs individus a inflamació intestinal.

1.6 Objectius de l'estudi

La nostra hipòtesi es basa en que la supressió de la resposta inflamatòria deguda a la immunitat primària de la mucosa intestinal, i secundàriament la regressió de l'estat inflammat a un estat "normal" en termes endoscòpics i histològics induïts per Adalimumab, es pot traduir en un retorn al patró "sa" de la microbiota intestinal.

Per comprovar aquesta hipòtesi, s'han plantejat els següents objectius de treball:

- Estudiar l'evolució del patró microbià (*fingerprint*) de la mucosa colònica de pacients amb MC, en els que s'inicia tractament amb Adalimumab.
- Avaluar si el control de l'activitat inflamatòria per Adalimumab en pacients amb MC produeix canvis qualitius en la microbiota intestinal.

Per tal d'assolir aquests objectius s'ha estudiat:

- El perfil molecular bacterià mitjançant PCR-DGGE
- La identificació dels filotips corresponents a les bandes retallades i seqüenciades dels gels
- L'anàlisi estadística de similitud dels perfils moleculars bacterians (clústers)

Material i mètodes

2. MATERIALS i MÈTODES

2.1 Selecció de pacients

L'estudi va rebre la conformitat del Comitè Ètic de l'Hospital Universitari Dr. Josep Trueta de Girona.

Els pacients introduïts a l'estudi presentaven una MC de diferents localitzacions com s'especifica a la taula 5. Es van seleccionar d'acord als següents criteris d'inclusió:

- a) Edat >16 anys.
- b) Està d'acord en firmar el consentiment informat per la participació en l'estudi.
- c) Diagnòstic de MC basat en criteris establerts. Es van incloure aquells pacients majors de 16 anys tributaris d'iniciar tractament amb Adalimumab a criteri del seu digestòleg. En el moment de la inclusió tots presentaven un brot lleu o moderat, amb un càlcul del CDAI entre 150 i 450.

Els criteris d'exclusió utilitzats han estat els següents:

- a) Tractament amb qualsevol agent anti-TNF α en els últims 6 mesos.
- b) Ús d'antibiòtics les 4 setmanes prèvies a l'inici de l'estudi.

- c) Qualsevol dels criteris generals que contraindiquen el tractament amb agents biològics.

2.2 Recopilació d'informació i consentiment informat

Com a requeriment imprescindible per participar a l'estudi, era necessària la conformitat del pacient mitjançant la seva signatura del consentiment informat. Totes les dades i paràmetres que es van obtenir s'han emprat sota una rigorosa confidencialitat.

De cada pacient també es va obtenir dades del seu historial mèdic, exploració física, analítica clínica, medicació prèvia i actual, estudis endoscòpics, càlculs d'activitat inflamatòria global (CDAI) i endoscòpica de la MC (SES-CD).

2.3 Recollida de mostres

En el treball es van estudiar 33 mostres de mucosa rectal, que corresponen a 11 pacients malalts de Crohn que complien els criteris d'inclusió, i que van iniciar tractament amb Adalimumab per indicació mèdica. Quatre pacients presentaven corticodependència motiu pel qual es va iniciar el tractament anti-TNF α ; els sis restants van desenvolupar resistència a immunomoduladors (en tots els casos a azatioprina). A comentar que tots els pacients inclosos eren "naïve" a qualsevol altre tractament anti-TNF α .

També es van estudiar mostres rectals de 4 controls sans.

Taula 6. Dades clíniques dels individus inclosos a l'estudi

Grup	n	Mitjana d'edat \pm SD (anys)	Sexe (%H/M)
Control	4	27 \pm 5,4	25/75
MC	11	32,2 \pm 10,5	36,4/63,3
I-MC (L1)	6	34,8 \pm 9,6	17,6/83,6
C-MC (L2)	3	30,8 \pm 14,2	33,3/66,6
IC-MC (L3)	1	30	100/0
GI alta (L4)	1	54	100/0

C: individus control, CD: pacients amb MC, I-CD: pacients amb MC ileal , IC-CD: pacients MC amb afectació ileal i colònica, C-CD: pacients amb CD colònica ; GI alta : gastrointestinal alta

Dels 11 pacients amb MC inclosos, 6 presentaven una localització ileal (L1), 3 afectació colònica (L2), i dels dos restants un presentava una localització ileo-còlica (L3) i l'últim una afectació gàstrica i còlica (L2+L4).

Pel que fa al grup control, es tractava de 4 pacients sans sense tractament concomitant, dels que es van obtenir també mostres rectals al llarg del temps.

Les biòpsies rectals es van obtenir durant una simple rectoscòpia rutinària a l'hospital (sense necessitat de preparació còlica rectal) , amb presa de biòpsies de 4 mostres de mucosa sana rectal a la setmana prèvia a l'inici del tractament amb Adalimumab (temps 0), al mes de l'inici del tractament (temps 1) i als 3 mesos (temps 3). (Figura 3)

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

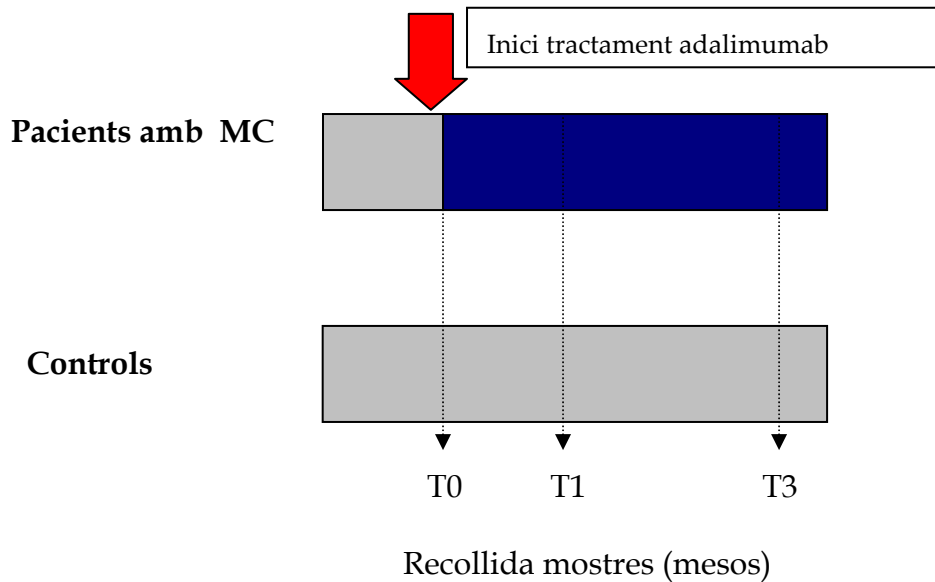


Figura 5: Recollida mostres rectals per l'estudi

2.4 Processament de les mostres

Les mostres obtingudes i preservades en un tub *Eppendorf*® varen ser traslladades en fred i, seguint el protocol de seguretat indicat pel transport de mostres biològiques, fins a la Universitat de Girona (UdG). Allà van ésser conservades posteriorment a -20°C fins el seu processat al laboratori de Microbiologia molecular de seguretat biològica (nivell II), com és obligatori per mostres d'origen humà.

Aquest estudi té com a objectiu l'estudi dels bacteris íntimament associades a la mucosa intestinal, al ésser aquests els que estan més directament en contacte

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

amb l'hoste. Això, prèviament a l'extracció del DNA genòmic bacterià de les biòpsies, es van descartar aquells bacteris lleument adherides a la mucosa intestinal mitjançant rentat amb PBS (*phosphate buffer saline*) durant tres cicles de sonicació suau de 30 segons amb un sonicador Labsonic 2000(Braun®). Posteriorment es va realitzar l'extracció del DNA mitjançant el *kit* comercial *DNA purification kit Nucleospin® Tissue* (Macherey-Nägel®) seguint les instruccions del fabricant.

Les extraccions de DNA obtingudes es van emmagatzemar a -20°C per al posterior anàlisi de la comunitat bacteriana mitjançant PCR-DGGE, tal com es detalla a la figura 3.

2.5 Anàlisi de la comunitat bacteriana mitjançant PCR-DGGE

Per l'obtenció de la empremta molecular (*fingerprint*) de cada mostra es va utilitzar el mètode de PCR-DGGE (*Polymerase chainreaction-Denaturing gradient gel electrophoresis*), que ofereix un patró de bandes representatiu dels principals constituents de la comunitat. El protocol de tractament de les mostres per l'anàlisi bacteriològic mitjançant tècniques moleculars es resumeix esquemàticament a la figura 3.

El primer pas va ser l'amplificació mitjançant PCR amb els primers 357F i 907R del fragment de 580pb del gen 16S rRNA que flanqueja les regions hipervariables V3 a V5. Per la DGGE es va utilitzar el *Ingeny phorU DGGE system* (Vlissingen, the Netherlands), a 60°C i TAE 0.5x. Es van carregar aproximadament 2µg de

DNA producte de la PCR en cada carril del gel. En un gel de poliacrilamida al 6%, el gradient desnaturalitzant que es va utilitzar va ser del 30% al 70%. L'electroforesi va córrer 16 hores a 120V i el gel es va tenyir amb *SYBR gold* (Molecular Probes, Paisley, UK) durant 45 minuts i es va posar en un transil.luminador de UV per ser fotografiat. Posteriorment es van retallar les bandes del gel representatives per la seva presència o absència dins del mateix pacient. El DNA de les bandes es va reamplificar mitjançant PCR i es va seqüenciar. El protocol utilitzat ha sigut descrit anteriorment pel nostre grup (Martinez-Medina *et al* ³⁰). Les seqüències es van analitzar per comparació amb les del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilitzant el software BLAST® ³³ i amb el software SequenceMatch de *Ribosomal Database Project II* ³⁴ per determinar el filotip i la soca tipus més pròximes, el que ens dóna una aproximació més precisa a l'afiliació taxonòmica de les seqüències obtingudes.

Els gels DGGE es van normalitzar utilitzant el programa GelCompar II (Applied Maths) utilitzant la barreja de bacteris que formen l'estàndard. Es va realitzar un anàlisi jeràrquic amb els *fingerprints* (patró de bandes) bacterians de cada pacient utilitzant el mètode del UPGMA amb el coeficient Dice. D'aquesta manera es va obtenir informació de la similitud entre els *fingerprints* de les mostres i la seva evolució general al llarg del tractament.

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

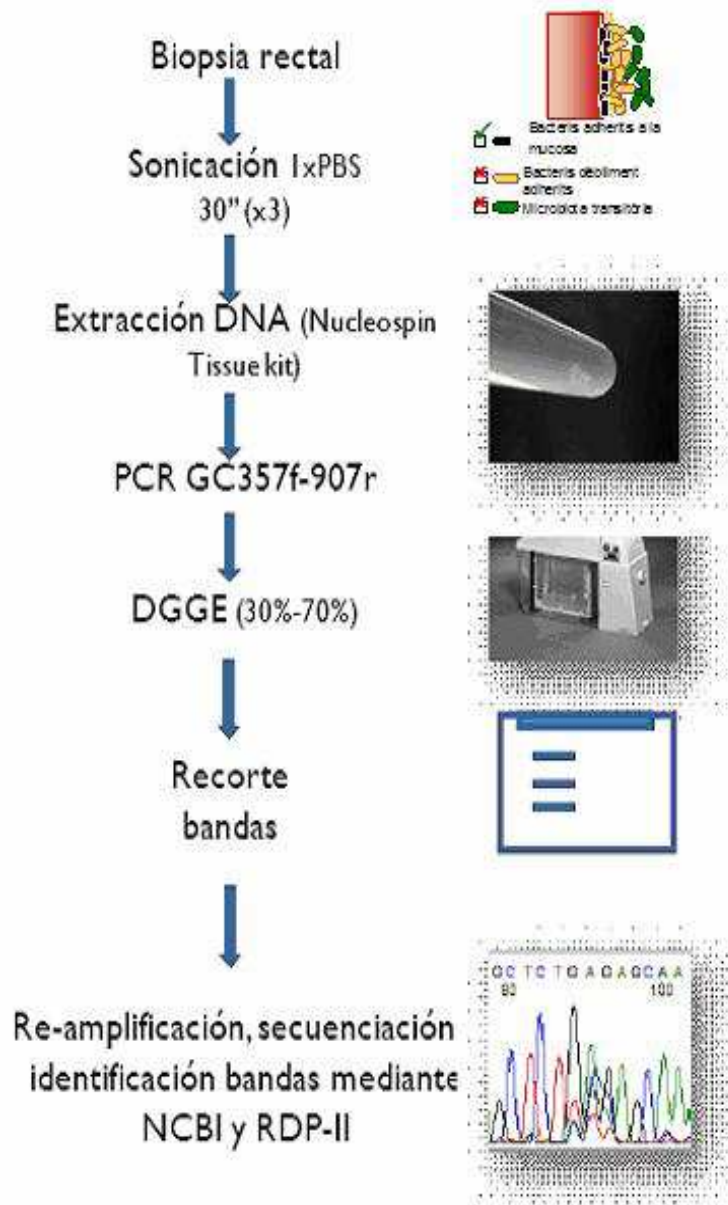


Figura 6: Esquema de la seqüència metodològica seguida en el tractament de les biòpsies i la posterior determinació molecular de la composició bacteriana. Es va utilitzar la tècnica de PCR-DGGE.

2.6 Quantificació d'*Escherichia coli*, *Faecalibacterium prausnitzii* i cèl·lules humanes mitjançant PCR a temps real.

Aquesta tècnica, a diferència de La PCR convencional, permet la quantificació dels bacteris objecte de l'estudi. Concretament es van realitzar 3 proves. El protocol seguit està descrit a la figura 4.

2.6.1 Quantificació d'*Escherichia coli*.

La quantificació de *E. coli* es va portar a terme amb un mètode prèviament descrit per *Huijsdens et al*³⁵, en el qual s'utilitzen *primers* i una sonda basada en la química Taqman que s'uneix al 16S rDNA.

Totes les mostres es van analitzar per triplicat. A més, es va afegir un tub addicional que contenia un inòcul de DNA de concentració coneguda a mode d'estàndard intern amb la finalitat de detectar inhibició de la reacció.

2.6.2 Quantificació de *Faecalibacterium prausnitzii*.

La quantificació de *F. prausnitzii* es va realitzar mitjançant un sistema de PCR a temps real dissenyat en el nostre laboratori. Aquest sistema també es basa en l'ús de primers i una sonda Taqman que s'uneix al 16S rDNA. A més, el sistema inclou segon joc de *primers* i sonda Taqman independent que permet la detecció

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

d'un DNA sintètic afegit a la mostra a mode de control intern d'amplificació (IAC), amb la finalitat de detectar inhibicions en la reacció.

Totes les mostres problema es van analitzar per triplicat. Per cada reacció, a més del IAC, es va portar a terme un control positiu de quantificació i dos controls negatius.

2.6.3 Quantificació de cèl·lules humanes

Per normalitzar la mida mostral, es va realitzar una quantificació de cèl·lules humanes utilitzant el control RTi-CKFT-18S kit (*Eurogentec, Belgium*) d'acord amb el protocol recomanat per la casa comercial.

Cada mostra es va analitzar per triplicat. A més, es va afegir un tub addicional que contenia un inòcul de DNA de concentració coneguda a mode d'estàndard intern amb la finalitat de detectar inhibició de la reacció.

Totes les amplificacions per PCR a temps real es van dur a terme en un 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) seguint un perfil de temperatures.

2.7 Anàlisi de dades

Una vegada obtingudes les quantitats per mostra de *E. coli* i *F. prausnitzii*, es varen normalitzar els resultats referenciant-los al nombre de cèl·lules humanes detectades en la mateixa mostra, a fi de corregir canvis quantitius que poguessin ser deguts a diferències en la mida la mostra. Així mateix, també es va calcular la proporció de *F. prausnitzii*/*E. coli* per cada mostra.

Totes les dades quantitatives varen ser analitzades en relació a les dades clíniques del pacient per evidenciar qualsevol relació amb el tipus d'afectació de la malaltia de Crohn, l'activitat, els anys d'evolució de la malaltia, tabaquisme i/o l'existència de resecció intestinal prèvia a l'inici del tractament amb Adalimumab.

Resultats

3. RESULTATS

3.1 Anàlisi de la comunitat microbiana per PCR-DGGE

Un primer anàlisi comparatiu visual dels gels de DGGE obtinguts pels controls i per les mostres de pacients amb MC tractats amb Adalimumab, indica que en els primers existeix una major homogeneïtat al llarg del temps. A més s'observen una sèrie de bandes que són comuns a tots els individus i que reflecteixen una major homogeneïtat en la composició bacteriana dels controls.

En termes generals podem afirmar que cada individu, tant els controls sans com malalts, conserven el seu patró al llarg del temps durant els 3 mesos de tractament, amb lleugeres variacions. Aquestes variacions són qualitativament més importants en els pacients de Crohn que en els controls sans. Els canvis en composició específica observats en les mostres control no van comportar l'aparició o desaparició d'espècies indicadores de salut còlica.

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

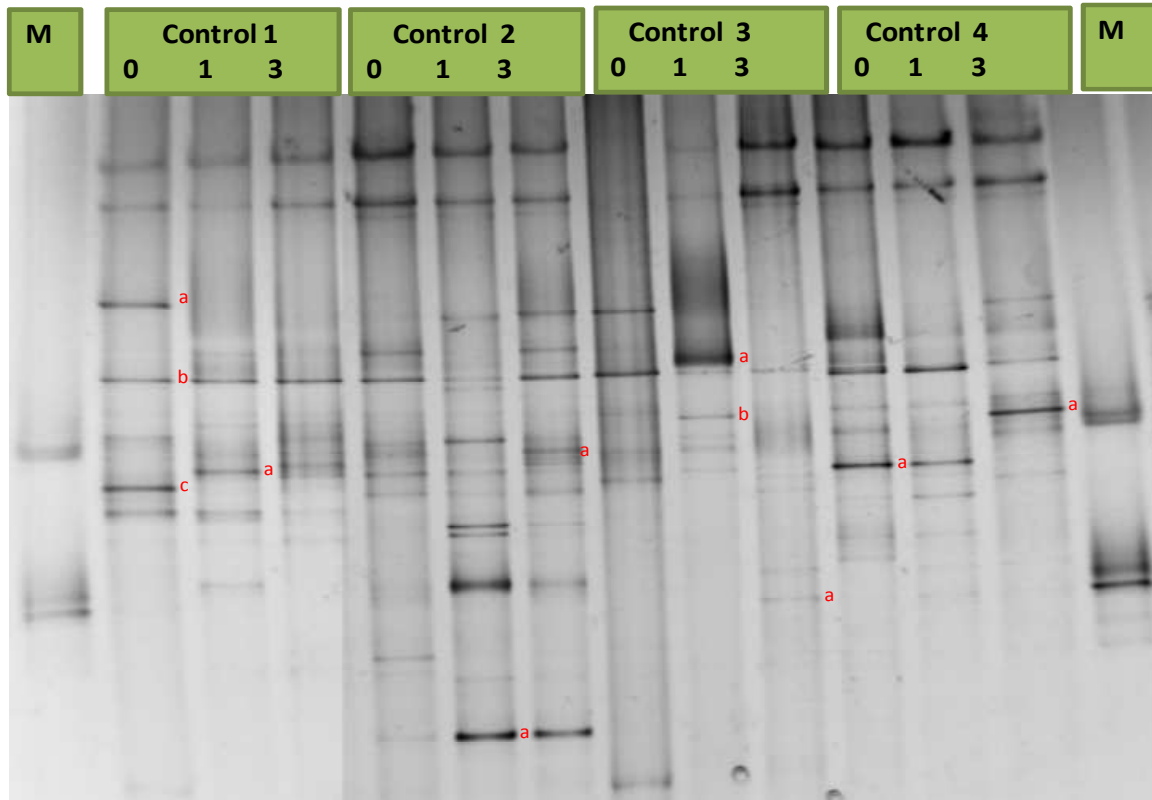


Figura 7: PCR-DGGE de mostres de controls sans

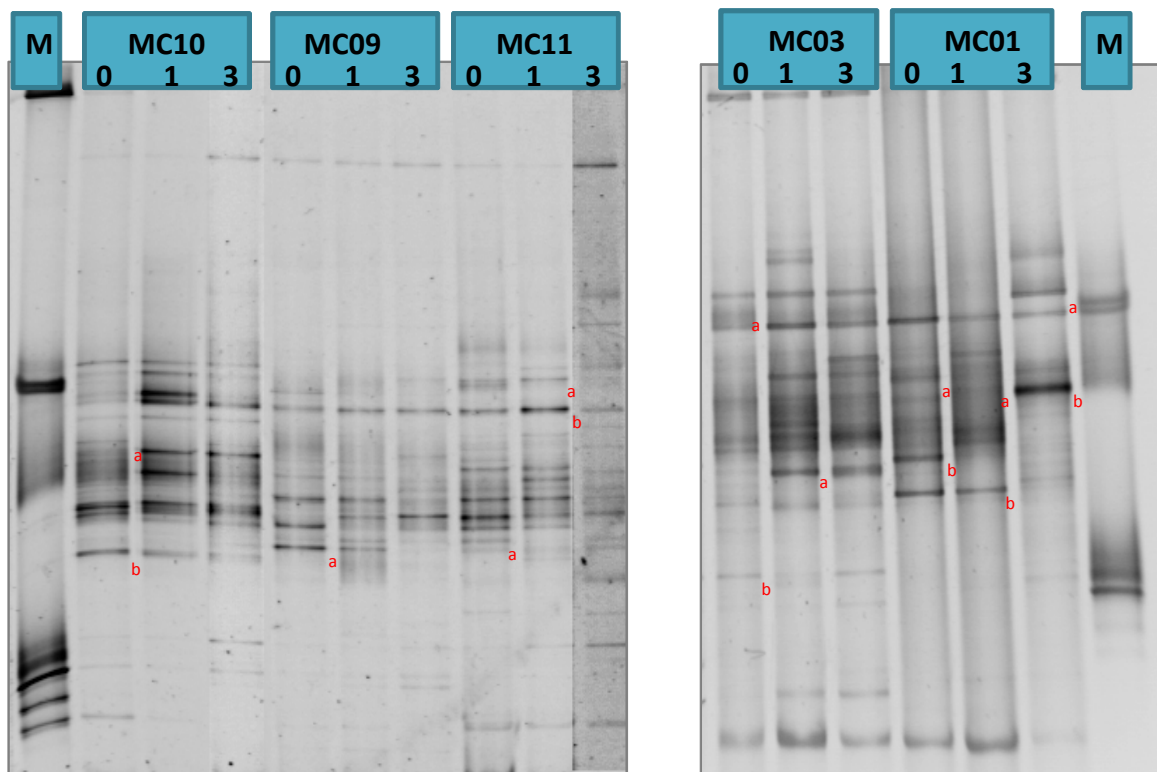


Figura 8: PCR-DGGE de mostres de malalts de Crohn

A la figura 5, es mostren els gels amb els perfils de bandes de PCR-DGGE dels 4 controls, tant al temps 0, 1 i 3. A la figura 8, es reflecteixen el perfil de varis dels pacients amb MC inclosos. Cada banda representa una espècie bacteriana. S'indiquen amb lletres les més representatives, les quals varen ser retallades, sotmeses a reamplificació i posterior seqüenciació.

Com s'expressa a la Figura 8, l'anàlisi visual dels gels de PCR-DGGE de les mostres dels pacients inclosos a l'estudi revela una major heterogeneïtat temporal traduïda en l'aparició i desaparició o disminució de la intensitat d'algunes de les bandes. Per exemple, la banda "b" de la mostra del pacient MC10 desapareix progressivament al llarg del temps de tractament. El mateix ocorre amb la banda "a" del pacient MC09 i la banda "b" del MC01. Per altra part, s'observa com algunes bandes apareixen o augmenten la seva intensitat al llarg del temps, com la "a" i la "b" dels pacients MC03 i MC01, respectivament. Això es traduiria en que els pacients amb MC tractats amb Adalimumab presenten canvis en la composició de la microbiota al llarg del temps.

Durant l'estudi dels gels de PCR-DGGE, vam obtenir un resultat peculiar no esperat. Un dels pacients estudiats (A10), va ser exclòs de l'estudi al presentar durant el primer mostreig (temps 0) una severa disbiosi (Figura 9). És visible per l'aparició d'una banda molt densa i clarament dominant en la PCR-DGGE, i l'absència de la diversitat esperada. L'anàlisi d'aquesta banda dominadora va revelar que es tractava de *Enterococcus faecalis*, una espècie causant d'infecció intestinal i que en el moment de la presa de la primera mostra rectal devia formar part majoritària del conjunt de bacteris presents en la mucosa intestinal

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

del pacient. Aquesta infecció va ser corroborada per dades clíniques. A part de la dada merament anecdòtica, aquest resultat confirma la utilitat del mètode per obtenir informació real de la composició bacteriana de les mostres.

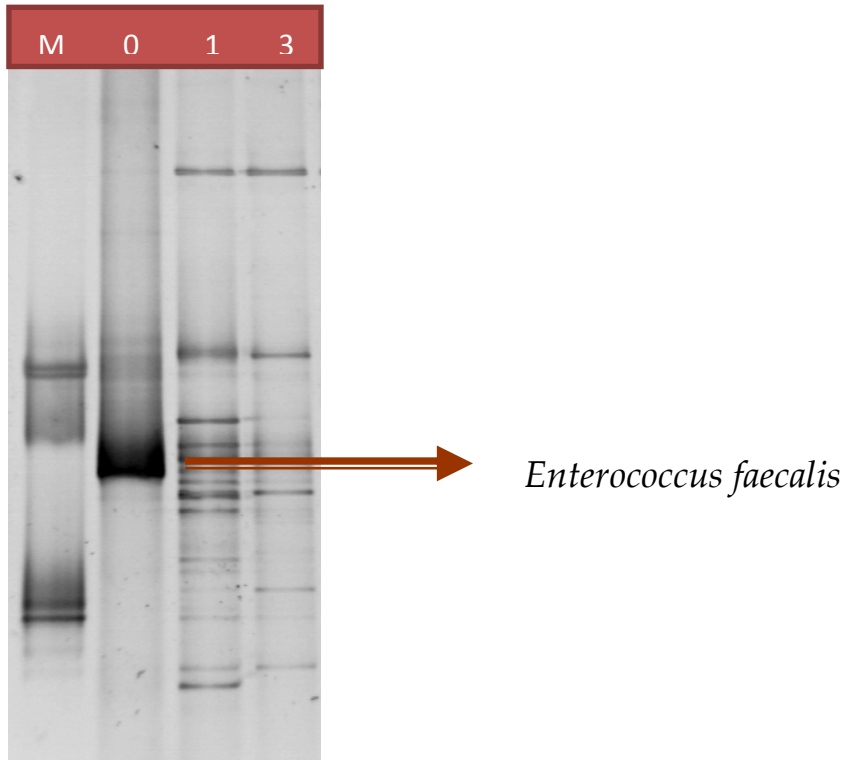


Figura 9: PCR- DGGE del pacient A10

En l'anàlisi jeràrquic dels perfils bacterians, els pacients analitzats s'agrupen en dos grans clústers, associats al seu diagnòstic (Control o MC), indicant que existeixen diferències en la composició de la microbiota associada a la mucosa intestinal d'ambdós grups, d'acord amb el que s'ha observat en estudis previs³⁰.

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

Les mostres analitzades, principalment s'agrupen per pacient, indicant que cada individu (ja sigui C o MC) presenta un patró microbià característic, relativament estable al llarg del temps (Figura 10).

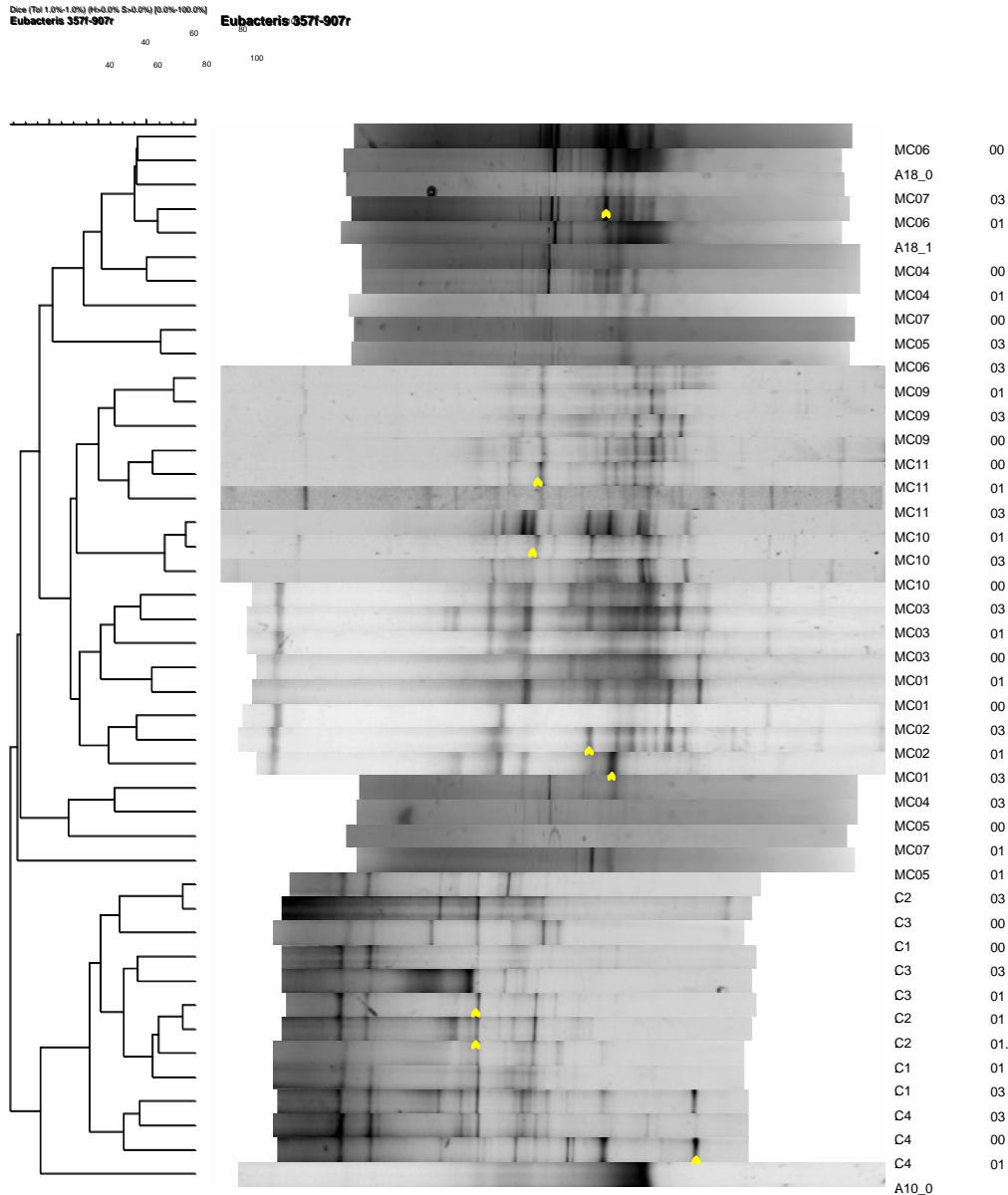


Figura 10. Anàlisi jeràrquic dels perfils bacterians de cada mostra mitjançant el mètode de UPGMA utilitzant el programa GelCompar (Applied Maths.).

Una vegada realitzada la seqüenciació del DNA de les bandes, es van poder determinar els probables filotips i soques corresponents, aportant una important informació sobre la naturalesa dels canvis que tenen lloc tant en les mostres control com en les mostres de tractament (Taula 7).

El posterior anàlisi d'aquestes bandes va revelar l'origen de les mateixes, aportant informació interessant sobre la naturalesa dels canvis que tenen lloc tant en les mostres control com en les de tractament.

Espècies ben conegudes per ser més prevalents en pacients amb MC com *Ruminococcus spp* i *Clostridium spp*, han desaparegut o reduït considerablement la intensitat de la banda com demostren les 37 seqüències analitzades dels 11 pacients amb MC d'aquest estudi (excepte pel pacient 170, que correspondria al pacient MC01, on al temps 3 apareixen bandes que després de la seqüenciació són suggestives de *Clostridium spp* i *Corinebacterium*).

D'altra banda, bacteris indicadors de normalitat en relació a la composició bacteriana com per exemple *Bacteroides spp* reapareixen al llarg del tractament. Especialment remarcable, és l'aparició de bandes que pertanyen al que avui en dia es considera indicador bacterià de salut colònica: *Faecalibacterium prausnitzii*. Aquestes bandes incrementen la seva intensitat, i per tant la seva presència i pes en la comunitat bacteriana analitzada en els pacients 148, 149 i A16 (pacients MC09, MC11 i MC07). La menor representació d'aquest microorganisme ja es va observar en estudis previs en pacients amb MC amb un 52% de presència enfront al >90% de presència en persones sanes³⁰.

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

Taula 7: Identificació de les bandes dels gels de DGGE després de la seqüenciació.

DGGE band	Accession	Description	Similarity (%)	Source	S_ab	Strain RD II	Observations
147(0)a	AB382610.1	Uncultured bacterium clone: KC-C-078	99	Piglet caecum	0.99	<i>Ruminococcus bromii</i>	↓
147(0)b	EF405503.1	Uncultured bacterium clone SJTU_G_06_62	96	Human fecal sample	0.76	<i>Phascolarctobacterium faecium</i>	↓
148(0)a	DQ350809.1	Uncultured Clostridia bacterium clone Clept59	90	Human feces	<0.6	no significant match	×
149(0)a	DQ905754.2	Uncultured bacterium clone 29A-e9	99	<i>Homo sapiens</i> fecal sample	0.79	<i>Ruminococcus luti</i>	×
149(1)a	DQ825272.1	Uncultured bacterium clone RL185_aan87f02	98	Human feces	0.90	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	↑
149(1)b	DQ798468.1	Uncultured bacterium clone RL181_aan97b02	97	Human feces	0.83	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	↑
C1a	EF405484.1	Uncultured bacterium clone SJTU_G_10_74	99	Human fecal sample	0.95	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	↔
C1b	EF405484.1	Uncultured bacterium clone SJTU_G_10_74	99	Human fecal sample	0.98	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	↔
A10(0)a	EU717955.1	<i>Enterococcus faecium</i> strain wh05	97	Type strain	0.87	<i>Enterococcus faecium</i>	×
A10(0)b	FJ378895.1	<i>Enterococcus hirae</i> strain RS-1	99	Type strain	0.94	<i>Enterococcus hirae</i>	×
A10(1)a	FJ378892.1	<i>Enterococcus faecium</i> strain B-30	99	Type strain	0.95	<i>Enterococcus faecium</i>	⚙
A10(1)b	EU766615.1	Uncultured bacterium clone B5_249	98	Fecal sample	0.91	<i>Bacteroides vulgatus</i>	⚙
A10(1)f	EF413638.1	<i>Eggerthella sp.</i> SDG-2	100	Type strain	0.84	<i>Eggerthella sp.</i>	⚙
A10(1)g	AY321960.1	<i>Eggerthella hongkongensis</i> strain HKU12	100	Type strain	0.93	<i>Eggerthella hongkongensis</i>	⚙
A10(3)a	FJ213473.1	Uncultured bacterium clone TSPB_18	99	Air samples	0.82	<i>Propionibacterium acnes</i>	↑
A12(0)b	EU768790.1	Uncultured bacterium clone C5_772	98	Fecal sample	0.95	<i>Bacteroides dorei</i>	↑
A12(0)c	AY333095.1	Uncultured bacterium clone 3-3	91	Enviromental sample	<0.5	no significant match	×
A12(1)c	DQ802194.1	Uncultured bacterium	96	Human feces	0.84	butyrate-producing bacterium SR1/1	⚙

170(0)a	EU467277.1	Uncultured bacterium clone SPIM_f03	98	Spider monkey feces	0.65	Prevotellaceae bacterium P4P_62 P1	×
170(0)b	FJ375931.1	Uncultured bacterium clone PBM_b23	99	Polar bear feces	0.94	<i>Ruminococcus gnavus</i>	×
170(1)a	EU778318.1	Uncultured bacterium clone RL388_aao93f08	99	Mammal feces	0.90	<i>Prevotella sp.</i> DJF_B112	×
170(1)c	AM075720.1	Uncultured bacterium isolate CD0715	98	Intestinal mucosa from CD	0.84	<i>Catenibacterium mitsuokai</i>	×
170(3)b	EF399597.1	Uncultured bacterium clone SJTU_F_12_45	98	Human fecal sample	0.92	<i>Clostridium innocuum</i>	⚙
170(3)c	EU767107.1	Uncultured bacterium clone C1_136	98	Fecal sample	0.79	Butirate producing bacterium	⚙
170(3)d	EU767133.1	Uncultured bacterium clone C1_253	100	Fecal sample	0.92	<i>Clostridium nexile</i>	⚙
170(3)e	AF227828.1	<i>Corynebacterium sp.</i> 61722	99	Type strain	0.93	<i>Corynebacterium sp.</i>	⚙
A13(1)a	EU778934.1	Uncultured bacterium clone SPIM_f04	97	Monkey feces	0.8	Clostridiales	×
A13(1)b	EU530381.1	Uncultured <i>Ruminococcus sp.</i>	100	Non-adenoma control	0.98	<i>Ruminococcus gnavus</i>	×
A13(3)a	GQ898014.1	Uncultured bacterium clone A4-136	99	Human feces	0.85	<i>Clostridium sp.</i>	⚙
A13(3)b	EU778061.1	Uncultured bacterium clone RL388_aao96c10	99	Human feces	0.94	<i>Ruminococcus obeum</i> ; 1-33; AY169419	⚙
A14(1)a	FJ357796.1	<i>Clostridium sp.</i> PN6-15	99	phenol treated soil	0.93	<i>Clostridium sp.</i> PN6-15	×
A14(1)b	EU410376.2	<i>Butyricoccus pullicaecorum</i> strain 25-3	99	Type strain	0.98	<i>Butyricoccus pullicaecorum</i>	×
A14(3)a	DQ807111.1	Uncultured bacterium clone RL244_aaj46d07	99	human feces	0.80	genus Blautia	⚙
A15(1)a	CP001107.1	<i>Eubacterium rectale</i> ATCC 33656	100	Type strain	0.99	<i>Eubacterium rectale</i>	×
A15(1)b	FJ368834.1	Uncultured bacterium clone TS4_a01b07	99	feces	0.93	<i>Clostridium clostridioforme</i>	×
A15(1)c	FJ679935.1	Uncultured bacterium clone 4-3H13	99	beef feces	0.80	Clostridiales	×
A16(3)a	AJ518875.1	<i>Bacteroides sp.</i> ANH 2438	99	Type strain	0.98	<i>Bacteroides sp.</i> ANH 2438; AJ518875	↑
A16(3)b	EU530496.1	Uncultured <i>Ruminococcus sp.</i> clone M9-68	100	non-adenoma control	0.96	<i>Ruminococcus torques</i>	↑
A16(3)c	GQ493967.1	Uncultured bacterium clone PM3_a03b08	100	cecal contents from Mus musculus	0.95	<i>Clostridium sp.</i> HFTH-1	↑

↓: Disminució intensitat banda X: Desapareix la banda ↑: Augmenta la intensitat de la banda ↔: Intensitat estable ⚙: Apareix la banda

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

Paral·lelament és important esmentar que els 11 pacients amb malaltia de Crohn inclosos a l'estudi, van presentar una resposta clínica definida per la ECCO (European Crohn's and Colitis Organisation) com una disminució del CDAI de >100 punts respecte al valor basal. Més de la meitat van aconseguir remissió clínica definida com disminució del CDAI basal de >150 punts als 3 mesos del tractament³⁶ (Taula 8).

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

Taula 8: Característiques clíniques del grup control i de pacients (C01: control 1 / MC01: malalt Crohn 1)

Id pacients	Edat	Sexe	Diagnòstic	MC Afectació: I-MC, C-MC, IC-MC	Montreal	Anys evolució	CDAI	SES-CD	Tractaments anteriors	Resecció	Tabaquisme
C01	25	dona	C								
C02	23	dona	C								
C03	35	dona	C								
C04	25	home	C								
MC01	30	home	CD	IC-MC	A2 L3 B1	1	actiu	17	Corticoides + Azatioprina	no	si
MC02	25	dona	CD	I-MC	A2 L1 B1	4	actiu	13	Azatioprina	no	si
MC03	54	home	CD	C-MC, gàstric	A3 L2+L4 B1	2	actiu	18	Azatioprina	no	si
MC04	43	dona	CD	C-MC	A2 L2 B1	17	actiu	12	Azatioprina	no	no
MC05	26	dona	CD	C-MC	A2 L2 B1	0	actiu	14	Corticoides	no	no
MC06	21	dona	CD	I-MC	A2 L1 B1	0	actiu	5	Corticoides	no	no
MC07	34	dona	CD	C-MC	A2 L2 B1	1	actiu	11	Corticoides	no	sí (5/dia)
MC08	35	home	CD	I-MC	A2 L1 B3	13	actiu	10	Corticoides	SI	si
MC09	29	dona	CD	I-CD	A2 L1 B3	2	actiu	14	Azatioprina	no	si
MC10	29	dona	CD	I-CD	A2 L1 B1	10	actiu	20	Corticoides	no	no
MC11	45	dona	CD	I-CD, malaltia fistulitzant	A3 L1 B3	3	actiu	9	Azatioprina	no	si

Discussió

Malgrat dècades de recerca, l'etiologia de la MII continua encara inexplicada. De totes maneres, el que cada vegada sembla més clar és que es tracta d'un desordre de característiques multifactorials. Considerant les dades epidemiològiques, genètiques i immunològiques, es pot concloure que la MII és un desordre heterogeni on factors hereditaris (genètica) i ambientals (microbiota intestinal, dieta,...) interactuen produint la malaltia⁴³.

L'evidència obtinguda de diversos estudis recents ha tret a la llum la confirmació que la composició i l'activitat de la microbiota intestinal en pacients amb MII és anormal. Particularment, varis estudis han demostrat que aquests pacients afectats es caracteritzen per una reducció de l'abundància dels membres dominants de la microbiota.

La voluntat del nostre estudi ha sigut determinar les característiques de la microbiota intestinal en els pacients amb MC de forma basal, i posteriorment valorar com i quan s'afecten a l'iniciar tractament amb un antiinflamatori potent que ha demostrat capacitat de curació mucosa com és l'anti-TNF específicament l'Adalimumab.

Fins al moment no s'han publicat estudis on es valori el possible efecte del tractament anti-TNF α i la microbiota intestinal. Els últims anys s'han publicat diversos articles on es valora l'efecte de varies substàncies i la microbiota intestinal. En un estudi recent, es va estudiar l'efecte del probiòtic VSL#3 sobre la microbiota intestinal en rates amb colitis induïda per TNBS (*trinitrobenzene sulfonic acid*), demostrant que el probiòtic altera la composició de la microbiota

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

correlacionant-se amb una disminució dels *scores* clínics de colitis⁴⁴. En un altre estudi, s'ha utilitzat la rifaximina, una nova molècula antibiòtica bactericida amb un ampli espectre d'acció sobre bacteris Gram-positius i Gram-negatius, tant aerobis com anaerobis, amb una absorció en el tracte gastrointestinal pràcticament nul·la, i amb molt bona tolerància. S'ha valorat el seu efecte en pacients amb MC còlica activa (CDAI>200), estudiant la seva microbiota intestinal mitjançant PCR quantitatives i PCR-DGGE. Han demostrat que malgrat l'estructura global de la microbiota còlica no canvia, sí que detecten un increment de la concentració de bacteris de la família de les *Bifidobacteris* i de *F. Prausnitzii*, conegut indicador de salut còlica⁴⁵.

Sota condicions de normalitat, la mucosa intestinal es troba en un estat de "inflamació controlada" regulada per un delicat equilibri entre citokines pro inflamatòries i antiinflamatòries. La làmina pròpia intestinal conté una complexa població de cèl·lules immunes que equilibren la tolerància immunològica de la microbiota luminal amb la necessitat de defensar-se contra patògens, l'excessiva entrada de bacteris intestinals, o ambdues. La MII es deu a una alteració del mecanisme immunitari local intestinal relacionada amb un infiltrat de cèl·lules d'immunitat innata (neutròfils, macròfags, cèl·lules dendrítiques i cèl·lules T *natural killer*) i d'immunitat adaptativa (cèl·lules B i T). L'increment del nombre i l'activació d'aquestes cèl·lules a la mucosa intestinal, eleva els nivells locals de *tumor factor necrosis* (TNF α), interleuquina-1 β , interferó- γ (IFN- γ) i interleuquina-23.

La resposta immune inicial sobre la microbiota intestinal està estretament regulada, cosa que determina si la tolerància immune o una resposta

inflamatòria defensiva apareix. La distorsió de l'equilibri d'aquestes respostes pot evolucionar cap a l'aparició d'una MII.

La resposta innata del sistema immune proporciona una ràpida resposta inicial als bacteris. Cèl·lules del sistema innat exposen els receptors encarregats de reconèixer els patrons microbians, al contrari del reconeixement antígen-específic del sistema immune adaptatiu. L'epiteli intestinal expressa diversos tipus de receptors, que s'encarreguen de la defensa enfront la microbiota intestinal, però també l'estat de l'epiteli i les cèl·lules presentadores d'antigen indueixen els mecanismes per mantenir l'homeòstasi immune a l'intestí. L'expressió dels receptors de membrana *toll-like* (intracel·lular o basolateral) i la infra-regulació de l'expressió i resposta per part del receptors, limiten l'activació de les cèl·lules epitelials intestinals pels bacteris luminals.

La contínua presència de microbiota intestinal és bàsica en la resposta immune intestinal reguladora. Activades les cèl·lules presentadores d'antigen, normalment cèl·lules dendrítiques, presenten els antígens a les cèl·lules T en els òrgans limfoides intestinals, com són les plaques de Peyer, els nòduls mesentèrics limfoides o fol·licles limfoides (Figura 11). Aquesta interacció inicia la resposta adaptativa, desenvolupant-se posteriorment els limfòcits de memòria⁴⁶.

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

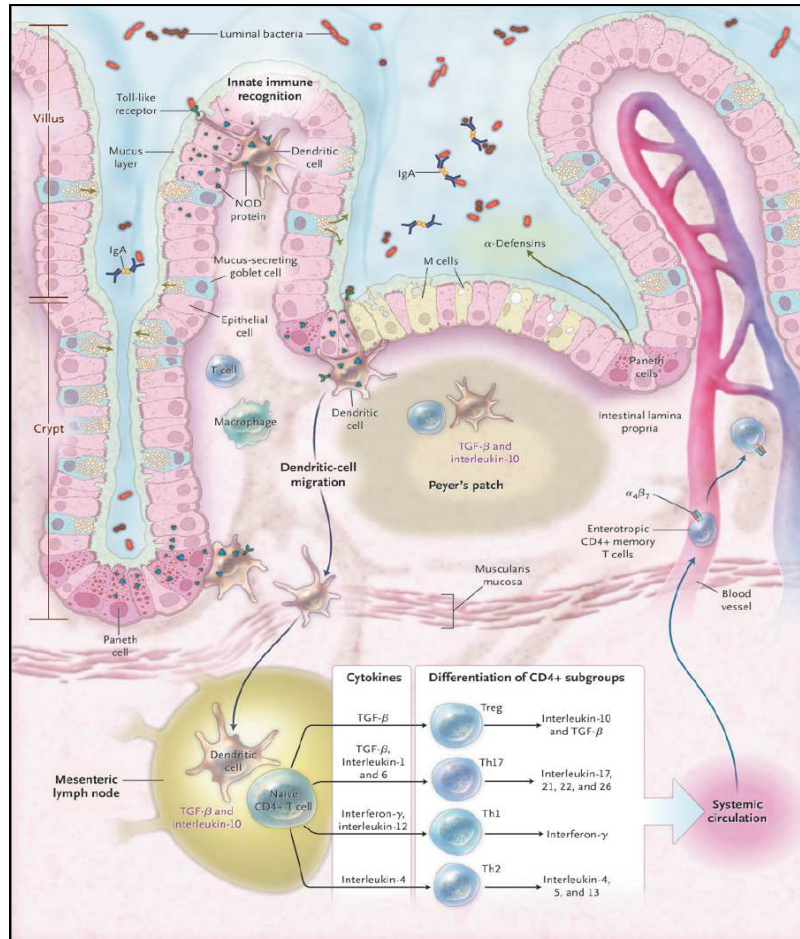


Figura 11. Sistema immunitari intestinal. Figura esquemàtica des del reconeixement de la immunitat innata dels bacteris luminals fins el pas de les cèl·lules T CD4+ activades a la lamina pròpia.

La reacció inflamatòria incontrolada que té lloc a la MII, probablement resulta de la relació entre deficiències genètiques en el sistema immune i una exagerada resposta adaptativa immune regulada per les cèl·lules T. El rol crucial de les cèl·lules T CD4+ en la cascada inflamatòria de la MII ha sigut ben establerta. L'activació d'aquestes és un procés de varies fases que implica la hiperproducció de citocines⁴⁷.

Les cèl·lules *T helper* (Th1, Th2 i Th17) i les T reguladores (Treg), són subgrups de les T CD4+. El seu paper és crític enfront patògens i l'excessiva entrada de microbiota intestinal en estats de normalitat (Figura 10 A), però l'expansió i sobreactivitat d'aquestes cèl·lules pot esdevenir en una reacció inflamatòria intestinal, com és el cas de la MII. Les cèl·lules Th1 s'encarreguen de la resposta immune cel·lular i es caracteritzen per secretar diverses citocines com la IL-2, IFN- γ i TNF- α . Per contra les cèl·lules Th2, intercedeixen en la resposta humoral i secreten IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13. Aquestes citocines es regulen recíprocament: IFN- γ secretada per Th1 és capaç de suprimir el desenvolupament de les cèl·lules Th2, mentre que la IL-4, IL10 i IL-13 secretades per Th2, inhibeixen la resposta Th1.

Les Th17 representen una branca del sistema immune adaptatiu especialitzat en millorar la protecció de l'hoste enfront bacteris extracel·lulars, fongs o microbis probablement no ben coberts per la immunitat Th1 i Th2.

Per estudis recents sabem que la MC hi ha un increment en la producció a la mucosa intestinal de citocines de Th 17 (IL-17) i de citocines Th1 com el IFN- γ i TNF- α , mentre que en la CU no queda tan clar, malgrat sembla existir un increment de citocines Th2. Coneixent aquestes dades, la inhibició de la resposta Th1 podria representar una fi molt important en el tractament de la MII, especialment de la MC on hi ha evidència que l'efecte Th1 és potent^{48,49}.

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

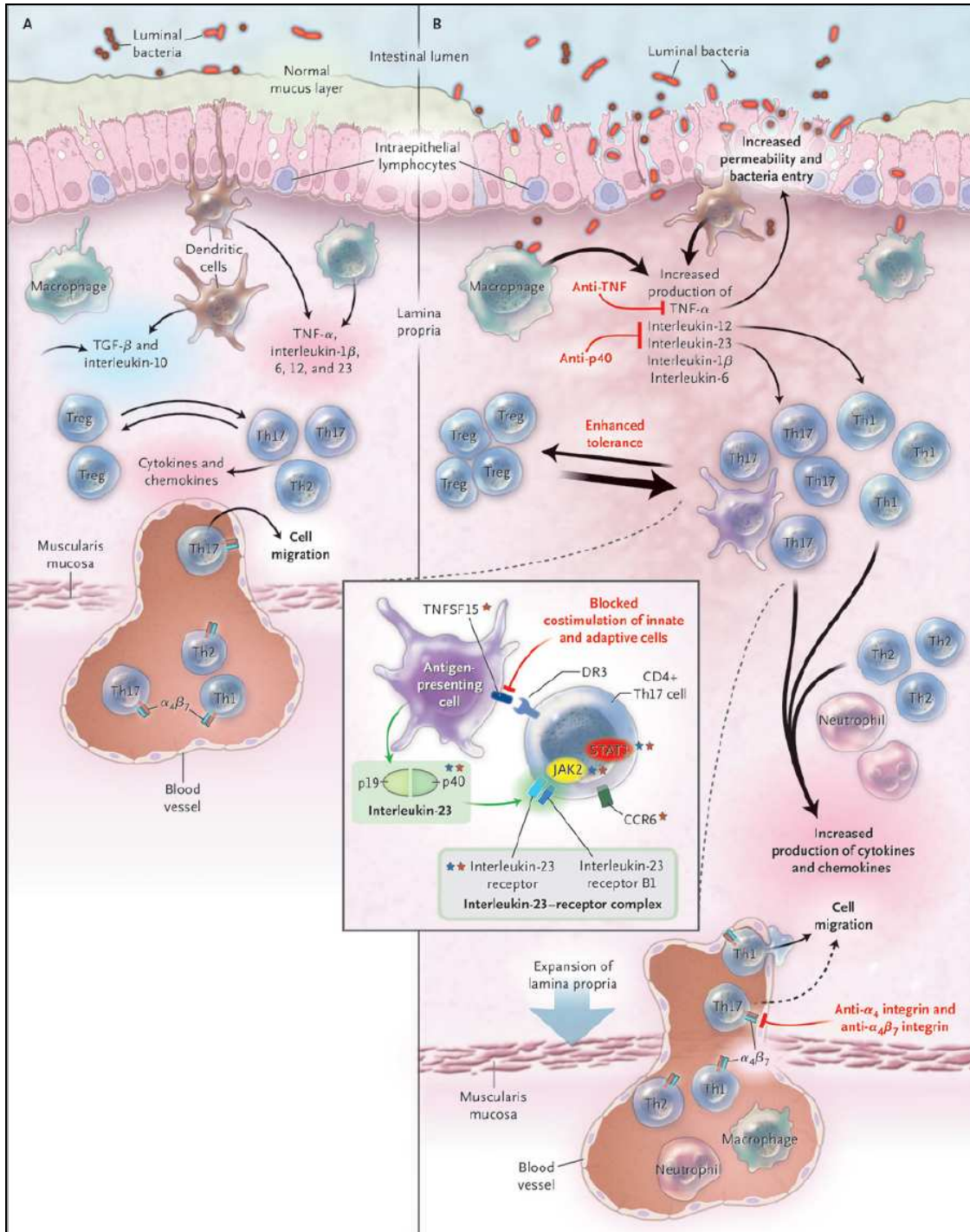


Figura 12. Sistema immunitari intestinal en un intestí sa (A) i en una cas de MII (B).

El TNF- α és un polipèptid sintetitzat per monòcits, macròfags i limfòcits T una vegada activats, induint a altres macròfags intestinals, neutròfils, fibroblasts i cèl·lules múscul llis a elaborar prostaglandines, proteases, i altres mediadors solubles inflamatoris. L'efecte lesiu del TNF- α es relaciona amb l'activació de fosfolipases, alliberació de radicals lliures d'oxigen, activació polimorfonuclear, activació de la síntesi d'altres citokines proinflamatòries (IL-1, IL-6 i IL-8), activació de metaloproteinases i del factor estimulador de colònies de granulòcits i macròfags⁵⁰. Com s'ha comentat prèviament, a la MII existeix una augmentada expressió augmentada de TNF- α ; l'efecte d'aquest factor a nivell intestinal juga un paper molt important en la inflamació de la mucosa i la disrupció de la barrera epitelial, induint apoptosi de les cèl·lules epitelials i la secreció d'altres citokines proinflamatòries

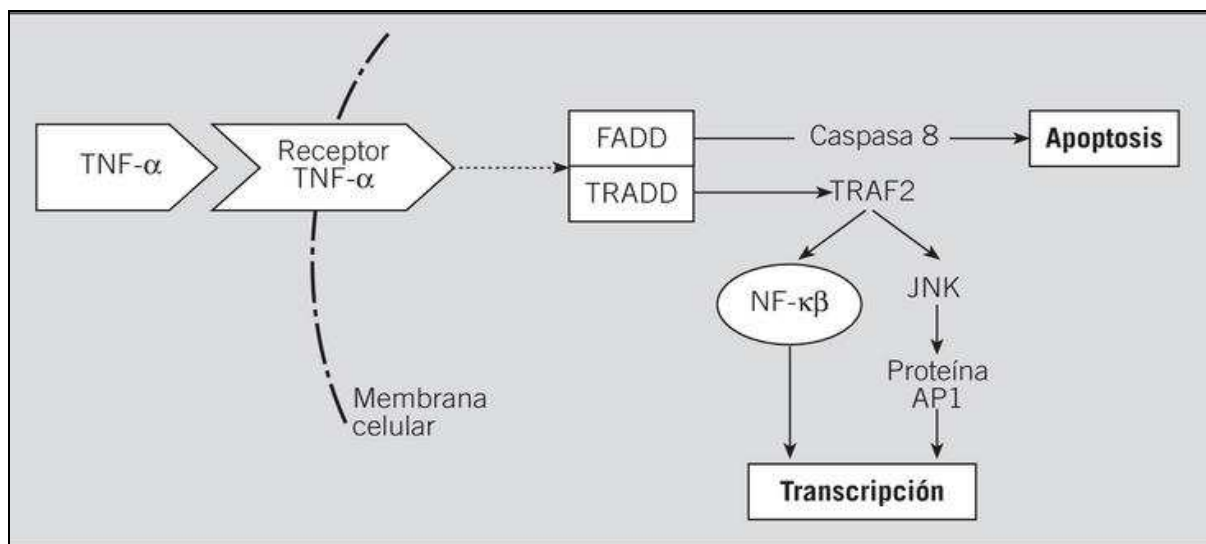


Figura 13. Esquema de la via de la senyal del TNF- α a la cèl·lula efectora. Una vegada lligat al receptor de membrana, entra a la cèl·lula on recluta proteïnes citoplasmàtiques al death domain (DD) a través del factor associated death domain (FADD) i del TNF associated death domain (TRADD). Per la via del FADD s'activa el sistema de les caspases que conduirà a l'apoptosi. Per la via del TRADD s'activen dos importants factors de transcripció.

D'acord amb el model fisiopatològic comentat, hauria d'existir una relació causal entre la flora entèrica i la producció local de TNF- α . Aquesta relació s'ha confirmat mitjançant dos estudis que han demostrat que la mucosa còlica dels pacients amb MII reacciona alliberant TNF- α al contacte amb antígens bacterians^{51,52}. En pacients amb MC activa refractària als que s'ha administrat Infliximab (primer tractament anti-TNF aprovat en MC), s'ha observat que el número de cèl·lules mononuclears de la làmina pròpia que expressen TNF- α està significativament disminuït⁵³, i que s'estimula l'apoptosi dels limfòcits T activats del còlon⁵⁴. Això explicaria que els anti-TNF bloquejarien la resposta dels limfòcits Th1 de la mucosa intestinal, el que justificaria el seu ús en MII.

En pacients amb inflamació intestinal com és el cas de la MII (Figura 12 B), diversos factors contribueixen a augmentar l'exposició bacteriana, incloent la disrupció de la capa de moc, la desregulació de les unions de les cèl·lules epitelials, l'augment de la permeabilitat intestinal, i l'increment de l'adherència bacteriana a les cèl·lules epitelials. Això es traduirà en un augment dels nivells de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 i IL-23, que provocarà una marcada expansió de la làmina pròpia, amb increment del nombre de cèl·lules T CD4+, específicament del subgrups proinflamatoris (Th1, Th2 i Th 17), els quals a la seva vegada incrementaran els nivells de més citokines, perpetuant el cicle inflamatori.

Un altre factor essencial en la defensa de l'hoste i en el manteniment de l'homeòstasi immune són les defensines, pèptids endògens amb activitat

bactericida (“antibiòtics naturals”) contra bacteris Gram-negatiu i positiu, fongs, virus i protozoous. L’atenuació de l’expressió d’aquestes defensines que es troba en pacients amb MII, comporta una reducció de l’activitat antibacteriana i una específica reducció de les defensines de les cèl·lules de Paneth ileals en pacients amb MC ileal, mentre que en pacients a amb afectació colònica es caracteritza per una inducció de la mucosa perjudicial de β -defensines^{55,56}. Els bacteris aprofitarien aquesta deficiència de les defensines per perpetuar la inflamació (Figura 14).

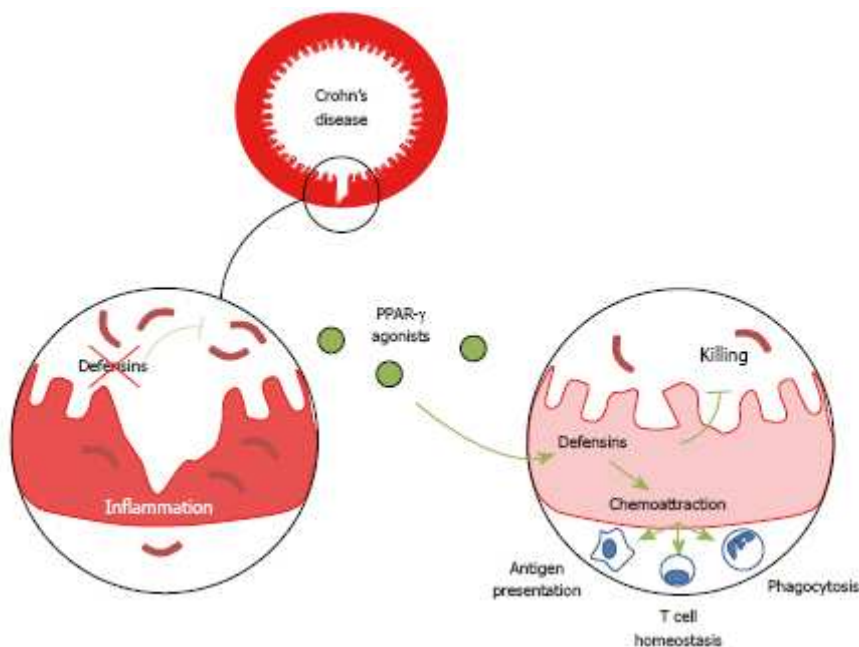


Figura 14: Efecte de les defensines en un intestí inflamat com el de la MC i en un intestí sa.

Fins el moment tenim poca informació de com tots aquests mediadors inflamatoris descrits prèviament de la paret intestinal, afecten directament la microbiota intestinal *in vivo*. Sabem que les espècies *Clostridium* i *Bacteroides* són els principals productors d'àcids grassos de cadena curta (SCFA) al còlon humà. La disminució dels grups de *Clostridium* IV i XIVa, dels quals forma part el *Faecalibacterium prausnitzii*, principals bacteris productors de butirat, prodria

explicar la disminució de la concentració de SCFA trobades en mostres fecals de pacients amb MII. El butirat actua com la major font d'energia pels colonòcits, i actua d'inhibidor de l'expressió de les citoquines proinflamatòries a la mucosa intestinal. A més, protegeix la barrera mucosa induint la producció de mucina i pèptids antimicrobials (defensines), i millora la integritat de la barrera epitelial incrementant l'expressió de les proteïnes d'unió. Per tant, una disminució dels nivells de butirat, explicaria l'estat inflamatori característic de la MII⁵⁵.

Traslladant tota aquesta informació al nostre estudi, i tenint en compte els resultats obtinguts, confirmem que els nostres pacients com ja es descriu a la literatura, presenten una tendència en estat basal a presentar perfils bacterians perjudicials, que corroboraria el terme de disbiosi d'aquests pacients. La presència d'espècies de *Clostridium spp* i *Ruminicoccus spp* en els nostres casos al temps 1, podria explicar una probable disminució de butirat a nivell de la mucosa intestinal, i per tant un dèficit dels seus efectes beneficiosos sobre la mucosa i de l'efecte antiinflamatori, que permetria una major invasió de la microbiota, i perpetuació de la cascada inflamatòria de la MII.

Hem de tenir en compte que els 11 pacients inclosos presentaven abans de la inclusió signes clínics de MC activa refractària al tractament mèdic que portaven fins al moment, i precisaven de la introducció d'un anti-TNF (Adalimumab). Després de 3 mesos de tractament, 7 estaven en remissió clínica i 4 havien aconseguit resposta clínica definida com una disminució de >100 punts del CDAI respecte el valor basal. Per tant, a part de la resposta clínica obtinguda amb el tractament anti-TNF, l'estudi de la microbiota ens ha demostrat una tendència de

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.

recuperació cap a patrons bacterians més propis de mucosa normal, amb aparició d'espècies com *Bacteroides* o el bacteri *F. prausnitzii*.

L'efecte anti-TNF d'Adalimumab, al bloquejar part de la resposta inflamatòria induïda en aquests pacients amb MC, podria provocar de forma retrògrada una recuperació de l'homeòstasi de la mucosa intestinal, disminuint l'activació de cèl·lules T, i per tant limitant l'aparició de citoquines pro inflamatòries, juntament amb una probable recuperació de la barrera epitelial i de mucina alterada en aquests pacients. Aquest efecte podria explicar la recuperació del perfil de la microbiota intestinal cap a patrons més característics de mucosa sana.

Fins el moment utilitzem a la pràctica clínica el terme de remissió clínica, endoscòpica i/o analítica per definir l'objectiu òptim final del tractament de la MII. Aquest canvi en el *fingerprinting* bacterià que hem obtingut en l'estudi podria ser utilitzat com un marcador de resposta del tractament anti-TNF o d'altres tractaments en la MII, marcador que ens podria indicar la remissió de la disbiosi bacteriana involucrada en la MII.

Queden encara dubtes per esvaïr sobre l'efecte real de la microbiota intestinal en la MII, i els canvis d'aquesta durant el tractament amb anti-TNF. S'està estudiant el paper de les defensines a la cascada inflamatòria de la MII, però creiem interessant com a estudi de futur definir millor la relació entre aquests pèptids endògens i la microbiota intestinal.

Un altre punt a tenir en compte, i que en el nostre estudi no hem valorat, és quina relació podrien tenir els polimorfismes del NOD2 dels pacients estudiats i els canvis observats de la microbiota intestinal. Actualment desconeixem com els polimorfismes NOD2 incrementen la susceptibilitat de Malaltia de Crohn. La importància de la resposta de la microbiota intestinal en la MII s'ha posat de relleu per l'associació entre la MC i el gen NOD2, el qual codifica un sensor intracel·lular de peptidoglicà, component de la paret bacteriana. Existeixen tres polimorfismes del gen NOD2 coneguts fins el moment, els portadors dels quals presenten una major tendència respecte als no-portadors de presentar una MC amb afectació ileal de comportament fibro-estenòtic i amb majors requeriments de resecció quirúrgica intestinal. Una opció de futur seria ampliar el nostre estudi amb aquestes dades genètiques dels pacients estudiats.

Conclusions

4. CONCLUSIONS del treball

- El tractament amb Adalimumab s'associa a canvis en la composició de la microbiota, els quals poden ja observar-se a les poques setmanes de l'inici del tractament.
- Aquests canvis s'expressen especialment en aquelles espècies que altres estudis mostren amb prevalences diferencials entre malalts de Crohn i sans (*Faecalibacterium* o *Ruminococcus*) de manera que els patrons de bandes dels MC tractats adquireixen elements propis dels patrons corresponents a mucoses normals.
- Per a determinar si aquests patrons convergeixen cap als propis dels controls sans manquen més pacients i mostres a llarg termini.
- El *fingerprinting* bacterià pot esdevenir un marcador útil en el seguiment de resposta al tractament amb anti-TNF α i a d'altres tractaments, i també per a distingir un brot d'alguna infecció digestiva intercurrent.

En resum, els resultats obtinguts després de l'anàlisi de la composició bacteriana de la mucosa intestinal de pacients de Crohn tractats amb Adalimumab, són esperançadors ja que apunten a una recuperació del patró normal a través de la recuperació d'espècies pròpies de persones sanes i la desaparició d'aquelles més prevalents en malalts de Crohn. Aquesta "regressió" de la mucosa intestinal cap a una posició pròpia de mucoses sanes s'ha de confirmar amb un major número de pacients analitzats i a més llarg terme.

Perspectives de futur:

- La utilització en aquest estudi d'un grup control de voluntaris sans sense cap tractament concomitant (no seguien tractament anti-TNF α), limita la comparació que podem fer amb el grup de pacients, ja que ens qüestiona si els resultats obtinguts en aquest segon grup són directament secundaris a la influència del fàrmac o bé són una expressió secundària a la millora de la inflamació de la mucosa que es produeix com a resposta al tractament.

La necessitat d'obtenir un grup control més homogeni i més semblant amb el grup de pacients, per tal de poder realitzar una millor comparació, ens ha fet valorar la possibilitat d'utilitzar com a grup control a pacients amb artritis reumatoide que iniciïn tractament amb Adalimumab. Els

pacients amb aquesta afectació reumatològica podrien suposar un bon grup control per dues raons:

- 1) No tenen malaltia intestinal associada
 - 2) El tractament anti-TNF α amb Adalimumab forma part de la seva bateria de tractament.
- La possibilitat de poder definir quina relació presenta la microbiota intestinal i els seus canvis durant el tractament en pacients amb MC amb polimorfismes del gen NOD2, ens fa valorar l'opció d'afegir aquest estudi genètic en un futur.
 - Creiem que ampliar l'estudi dels canvis de la microbiota i la relació existent amb les defensines de la mucosa intestinal, podria ser de gran interès.

Bibliografia

Bibliografia

1. Mendoza Hernandez JI. Definiciones y manifestaciones clínicas generales. En: Gassull MA, Gomollon F, Hinojosa J, Obrador A, editores. Enfermedad Inflamatoria intestinal. III ed. Madrid: Aran; 2007. p 21-28.
2. Morahan G, Morel L. Genetics of autoimmune diseases in humans and in animal models. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 803-11.
3. Brauer B, Korzenik JR. Clinical features, course and laboratory finding in Crohn's disease. In: Lichtenstein GR, editor. *The clinical's guide to inflammatory bowel disease*. 1ª ed. Nueva York: Slack Incorporated; 2003. p 41-58.
4. Sands BE. Enfermedad de Crohn. En: Feldman M, Friedman FS, Sleisenger MH, editores. *Enfermedades gastrointestinales y hepáticas. Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento*. 7ª ed. Tomo 2. Buenos Aires: Medica Panamerica; 2004. p. 2139-77.
5. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005; 19(Supl. A): 5-36.
6. Halme L, Turunen U, Helio T, Paavola T, Walle T, Miettinen A, et al. Familial and sporadic inflammatory bowel disease: comparison of clinical features and serological markers in a genetically homogeneous population. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:692-8.
7. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype/phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002;70:845-57.
8. Miad SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 2006; 81(11):1462-71.
9. Sicilia Aladren B. Epidemiología de las enfermedades inflamatorias intestinales. Factores ambientales internos y externos en su patogenia. En:

- Gassull MA, Gomollon F, Hinojosa J, Obrador A, editores. Enfermedad Inflamatoria intestinal. III ed. Madrid: Aran; 2007. p 29-50.
10. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lemann M, Söderholm J, Colombel JF, et al. European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). Segundo consenso europeo basado en la evidencia sobre el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Crohn: tratamiento actual. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2010; 4: 28-62.
 11. Review article: Altering the natural history of Crohn's disease--evidence for and against current therapies. Vermeire S, van Assche G, Rutgeerts P. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007 Jan 1;25(1):3-12
 12. Colombel JF. Efficacy and safety of Adalimumab for the treatment of Crohn's disease in adults. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2008; 2(2); 163-176.
 13. Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P *et al*. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (Adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology* 2006; 130: 323-33.
 14. Sandborn WJ, Hanauer SB, Rutgeerts P *et al*. Adalimumab for maintenance treatment of Crohn's disease: results of the CLASSIC II trial. *Gut* 2007; 56: 1232-9
 15. Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P *et al*. Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial. *Gastroenterology* 2007; 132: 52-65.
 16. Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P *et al*. Comparison of two Adalimumab treatment schedule strategies for moderate-to-severe Crohn's disease: results from the CHARM trial. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 1170-9.
 17. Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R *et al*. Adalimumab induction therapy for Crohn disease previously treated with Infliximab: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007; 146: 829-38.
 18. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361:512-9.
 19. Backled F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005; 307: 1915-20.

20. Lay C., Rigottier-Gois L., Holmstrøm K., Rajilic M., Vaughan E.E., de Vos W.M., Collins M.D., Thiel R., Namsolleck P., Blaut M., Doré J. Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71:4153-4155
21. Vanhoutte T., Huys G., De Brandt E., Swings J. Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers. *FEMS Microbiology Ecology*. 2004;48:437-446.
22. Zoetendal E.G, Akkermans A.D.L and De Vos W. L. Temperature Gradient Gel Electrophoresis Analysis of 16S rRNA from Human Fecal Samples Reveals Stable and Host-Specific Communities of Active Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998;164(10):3854-385
23. Zoetendal E.G, von Wright A, Vilpponen-Salmela T., Ben-Amor K., Akkermans A.D.L and De Vos W.M . Mucosa-Associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differs from the community recovered from feces *Applied and Environmental Microbiology*. 2002;68 (7):3401-340
24. Sellon R.K., Tonkonogy S., Schultz M., Dieleman L.A., Grenther W., Balish E., Rennick D.M., Sartor R.B. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infection and Immunity*. 1998;66:5224-5231.
25. Rutgeerts P., Goboos K., Peeters M., Hiele M., Penninckx F., Aerts R., Kerremans R., Vantrappen G. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet*. 1991;338:771-774.
26. Seksik P., Rigottier-Gois L., Gramet G., Sutren M., Pochart P., Marteau P., Jian R. and Doré J. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003;52:237-242.
27. Swidsinski A., Weber J., Loening-Baucke V., Hale L .P., Lochs H. Spatial Organization and Composition of the Mucosal Flora in Patients with Inflammatory Bowel Disease *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43:3380-3389.
28. Bibiloni R., Mangold M., Madsen K.L., Fedorak R.N., Tannock G.W. The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *Journal of Medical Microbiology*. 2006;55:1141-1149.

29. Gophna U., Sommerfeld K., Gophna S., Doolittle W.F. and Veldhuyzen van Zanten S.J.O. Differences between Tissue-Associated Intestinal Microfloras of Patients with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44:4136–4141.
30. Martinez-Medina M., Aldeguer X., Gonzalez-Huix F., Acero D., and Garcia-Gil L.J. Abnormal Microbiota Composition in the Ileocolonic Mucosa of Crohn's Disease Patients as Revealed by Polymerase Chain Reaction Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2006;12:1136-1145
31. Scanlan P.D., Shanahan F., O'Mahony C., Marchesi J.R. Culture-Independent Analyses of Temporal Variation of the dominant Fecal Microbiota and Targeted Bacterial Subgroups in Crohn's Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(11): 3980–3988.
32. Frank D.N., St. Amand A.L., Feldman R.A., Boedeker E.C., Harpaz N., and Pace N.R. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *PNAS*. 2007;104(34): 13780–13785
33. Darfeuille-Michaud A., Boudeau J., Bulois P., Neut C., Glasser A.L., Barnich N., Bringer M.A., Swidsinski A., Beaugerie L. and Colombel J.F. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004;127:412-421
34. Sokol H., Seksik P., Rigottier-Gois L., Lay C., Lepage P., Podglajen I., Marteau P., Doré J. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2006;122:44-54.
35. Swidsinski A., Loening-Baucke V., Vanechoutte M., Doerffel Y. Active Crohn's disease and ulcerative colitis can be specifically diagnosed and monitored based on the biostructure of the fecal flora. *Inflammatory Bowel Disease*. 2008;14(2):147-61.
36. Ott S.J, Musfeldt M., Ullmann U., Hampe J., Schreiber S. Quantification of Intestinal Bacterial Populations by Real-Time PCR with a Universal Primer Set and Minor Groove Binder Probes: a Global Approach to the Enteric Flora. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(6): 2566–2572
37. Archer S., Meng S, Wu J., Johnson J, Tang R. and Hodin R. Butyrate inhibits colon carcinoma cell growth through two distinctive pathways. *Surgery*. 1998;124:248–253.

38. Inan, M. S., Rasoulpour R. J., Yin L., Hubbard A. K., Rosenberg D. W. and Giardina C. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF kappa B activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology*. 2000;**118**:724–734.
39. S F Altschul, T L Madden, A A Schäffer, J Zhang, Z Zhang, W Miller, and D J Lipman,. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;**25**(17): 3389–3402
40. Maidak BL, Cole JR, Parker CT Jr, Garrity GM, Larsen N, Li B, Lilburn TG, McCaughey MJ, Olsen GJ, Overbeek R, Pramanik S, Schmidt TM, Tiedje JM, Woese CR.. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res*.1999;**27**(1):171-3.
41. Fujita H, Eishi Y, Ishige I, *et al.*. Quantitative analysis of bacterial DNA from Mycobacteria spp., *Bacteroides vulgatus*, and Escherichia coli in tissue samples from patients with inflammatory bowel diseases. *Journal of Gastroenterology*. 2002;**37**:509-16.
42. Van Assche, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, *et al.* European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). Segundo consenso europeo basado en la evidencia sobre el diagnóstico y manejo de la enfermedad de Crohn: definiciones y diagnóstico. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2010; **4**, 7-27.
43. Tsianos Ev, Katsanos K. Do we really understand what the immunological disturbances in inflammatory bowel disease mean? *World J Gastroenterol* 2009;**15**:521-5.
44. Uronis JM, arthur JC, Keku T, Fodor A, Carroll IM, Cruz ML, Appleyard CB, Jobin C. Gut microbial diversity is reduced by the probiotic VSL#3 and correlates with decreased TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2011;**17**(1):289-97
45. Maccaferri S, Vitali B, Klinder A, Kolida S, Ndagijimana M, Laghi L, Calanni F, Brigidi P, Gibson GR, Costabile A. Rifaximin modulates de colonic microbiota of patients with Crohn's disease: an in vitro approach using a continuous culture colonic model system. *J Antimicrob Chemother*. 2010; **65**:2556-65.
46. Abraham C, H. Cho J. Mechanisms of disease Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2009;**361**:2066-78.

47. Bosani M, Ardizzone S, Porro G. Biologic targeting in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Biologics: Targets & Therapy* 2009;3:77-97.
48. Fujino S, Andoh A, Bamba S, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;52:65-70.
49. Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, et al. IL-23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2008;57:1682-9.
50. Casellas F. Inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Med Clin (Barc)* 2005;123:627-34.
51. Borruel N, Casellas F, Antolín M, Llopis M, Carol M, Espín E, et al. Effects of nonpathogenic bacteria on cytokine secretion by human intestinal mucosa. *Am J Gastroenterol* 2003;98:865-70.
52. Dionne S, Laberge S, Deslandres C, Seidman EG. Modulation of cytokine release from colonic explants by bacterial antigens in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2003;133:108-14
53. Ten Hove T, Van Montfrans C, Peppelenbosch MP, Van Deventer SJH. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* 2002;50:206-11.
54. Stephens S, Emtage S, Vetterlein O, Chaplin L, Bebbington C, Nesbitt A, et al. Comprehensive pharmacokinetics of a humanized antibody and analysis of residual anti-idiotypic responses. *Immunology* 1995;85:668-74
55. Chamailard M, Dessein R. Defensins couple dysbiosis to primary immunodeficiency in Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2011;17:567-71.
56. Wehlamp J, Stange EF, Fellermann K. Defensin-immunology in inflammatory bowel disease. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 2009;33:S137-S144.
57. Fava F, Danese S. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: Friend of foe? *World J Gastroenterol* 2011;17:557-566.

Estudi de l'efecte del tractament amb Adalimumab sobre la microbiota associada a la mucosa intestinal en pacients amb malaltia de Crohn.