



**MARCADORES PROTEÓMICOS DE
RESPUESTA A FÁRMACOS ANTI-TNF EN
PACIENTES CON ENFERMEDAD
INFLAMATORIA INTESTINAL**

**PROTEOMIC MARKERS OF RESPONSE TO ANTI-
TNF TREATMENT IN PATIENTS WITH
INFLAMMATORY BOWEL DISEASE**

Tesis doctoral presentada por

Rosario Medina Medina

Graduada en Enfermería, para optar al grado de

Doctor en Biomedicina

Directores

Dra. Patricia Aguilar Melero

Dr. Gustavo Ferrín Sánchez

Dra. Valle García Sánchez

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

Córdoba, 06 de Noviembre 2023

TITULO: *Marcadores proteómicos de respuesta a fármacos anti-TNF en Pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.*

AUTOR: *Rosario Medina Medina*

© Edita: UCOPress. 2024
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



INFORME RAZONADO DE LAS/LOS DIRECTORAS/ES DE LA TESIS



DOCTORANDA/O

Rosario Medina Medina

TÍTULO DE LA TESIS:

Marcadores proteómicos de respuesta a fármacos anti-TNF en pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal

INFORME RAZONADO DE LAS/LOS DIRECTORAS/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma)

El trabajo de investigación que se presenta es un trabajo original que ha permitido identificar potenciales biomarcadores de respuesta al tratamiento biológico con fármacos anti-TNF en pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal, concretamente la Enfermedad de Crohn y la Colitis Ulcerosa. El uso de estos biomarcadores en combinación con parámetros clínicos relacionados con la enfermedad podrá resultar útil para una mejor selección de los pacientes candidatos a terapia, mejorando la tasa de respuesta y la salud de los pacientes.

Los resultados derivados de este trabajo de tesis han sido publicados en la revista científica "International Journal of Molecular Sciences" y tienen un evidente carácter traslacional, proporcionando nuevas herramientas clínicas y potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. En este sentido, se han solicitado las patentes P202330350 y P201930901, relacionadas con la indentificación de marcadores proteómicos y el desarrollo de un método predictivo de respuesta al tratamiento anti-TNF en pacientes con Enfermedad de Crohn, respectivamente.

El desarrollo del trabajo de tesis ha permitido a la doctoranda adquirir conocimientos teóricos y metodológicos relacionados con su formación científica, que la habilitan para desarrollar nuevas hipótesis y participar de forma activa en la redacción y coordinación de nuevos proyectos de investigación y artículos científicos. Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, a 26 de octubre de 2023

Las/los directoras/es

Firmado por AGUILAR
MELERO PATRICIA -
30959650V el díaFERRIN SANCHEZ
GUSTAVO -
44353484PFirmado digitalmente por
FERRIN SANCHEZ GUSTAVO -
44353484P
Fecha: 2023.10.26 13:53:26
+02'00'Fdo.: Patricia Aguilar Melero /
Gustavo Ferrín SánchezGARCIA SANCHEZ
MARIA DEL VALLE
- 30806191ZFirmado digitalmente por
GARCIA SANCHEZ MARIA
DEL VALLE - 30806191Z
Fecha: 2023.11.15 13:04:43
+01'00'

Agradecimientos

Después de mucho tiempo aprendí que la investigación es algo que se cocina a fuego lento y necesitarás la ayuda de muchos maestros para que no se te quemé.

Quisiera agradecer en primer lugar a mi tutora Valle García Sánchez y a mi directora Patricia Aguilar Melero, porque juntas las dos me dieron la oportunidad en 2014 de iniciarme en un campo donde, por suerte, cada vez menos, la enfermería no ha estado muy representada, el campo de la investigación. Así de nuevo, en 2018, me dieron la oportunidad de enfrentarme a un nuevo reto, esta tesis doctoral y de esta manera empezamos el camino que, pese a todos los inconvenientes surgidos a lo largo de los años, ahora ven su fruto. Quiero agradecer de igual manera a mi otro director, Gustavo Ferrín Sánchez, que en un momento complicado consiguió continuar con la labor de guiarme para finalizar este trabajo de la mejor manera.

También quiero agradecerlo a todo el equipo de la Unidad de Enfermedad Inflamatoria Intestinal que ha participado directa o indirectamente en el proyecto, José Manuel, Sandra, Pilar, Isi, Eva, Conchi, Rosa y una especial mención a Eva Iglesias, que me ha aguantado y me ha ayudado con todas mis inquietudes en el proceso, así como un agradecimiento a la otra parte de la unidad que son todos los pacientes que han participado.

Gracias también a todos los compañeros que forman parte de la unidad de investigación del IMIBIC, Clara, Sandra, Lola, porque también me habéis ayudado, así como agradecerlo también al Dr. Manuel Rodríguez, por todo el conocimiento aportado y dudas resueltas, de igual manera quiero extender el agradecimiento a todos los centros que han colaborado con el envío de muestras y a su personal, tanto del Hospital de Galdakao, como del Hospital Universitario de la Princesa.

Por último y no menos importante, gracias a toda a mi familia, por todo el apoyo prestado, en especial a mis padres, Diego y Chari que han sabido en todo momento señalarme el sendero correcto, a mi abuela, Lupe, que disfruta aun viendo como evolucionamos y a mi hermano Diego, que cada día me preguntaba sobre cuando tenía que venir para no perderse este momento, también se lo agradezco a la otra parte de mi familia, la política, suegros, cuñados y demás familia de la que soy una agregada, como ellos dicen y cuyo nexo de unión es la persona que más me ha sufrido día a día y a quien más le agradezco que no dejara de animarme a seguir con ello, gracias, David.

Los resultados de esta tesis doctoral han sido posible gracias a la financiación recibida de las siguientes entidades:

- Junta de Andalucía
- Instituto de Salud Carlos III

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|--------------|
| ABREVIATURAS..... | - 4 - |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | - 6 - |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | - 7 - |
| 1. RESUMEN | 10 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 17 |
| 2.1. Enfermedad inflamatoria intestinal..... | 17 |
| 2.2. Clasificación de la enfermedad inflamatoria intestinal..... | 17 |
| 2.2.1. Enfermedad de Crohn..... | 17 |
| 2.2.2. Colitis ulcerosa | 23 |
| 2.3. Manifestaciones extraintestinales de la enfermedad inflamatoria intestinal | 26 |
| 2.4. Etiología de la enfermedad inflamatoria intestinal | 28 |
| 2.4.1. La genética en la enfermedad inflamatoria intestinal | 28 |
| 2.4.2. El sistema inmune en la enfermedad inflamatoria intestinal | 29 |
| 2.4.3. Factores ambientales..... | 31 |
| 2.5. Terapias en la enfermedad inflamatoria intestinal..... | 32 |
| 2.5.1. Corticoides..... | 33 |
| 2.5.2. Aminosalicilatos | 33 |
| 2.5.3. Inmunomoduladores | 34 |
| 2.5.4. Terapias biológicas | 35 |
| 2.5.5. Otras terapias para EII..... | 37 |
| 2.6. Predictores de respuesta al tratamiento en pacientes de EII..... | 38 |
| 2.6.1. La proteómica en la identificación de marcadores de respuesta a anti-TNF | 39 |
| 3. HIPÓTESIS/OBJETIVOS..... | 43 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS | 46 |
| 4.1 Diseño..... | 46 |
| 4.2 Aspectos éticos | 46 |
| 4.3 Pacientes | 47 |
| 4.4 Recopilación y análisis de datos..... | 47 |
| 4.5 Manejo de las muestras de plasma | 48 |
| 4.5.1 Preparación de las muestras para el análisis proteómico..... | 48 |
| 4.5.2 Análisis mediante proteómica SWATH | 50 |
| 4.5.3 Validación de marcadores | 54 |
| 5. RESULTADOS | 57 |
| 5.1 Enfermedad de Crohn. Respuesta primaria al tratamiento anti-TNF | 57 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 5.1.1 | Análisis de los factores clínicos y demográficos | 57 |
| 5.1.2 | Proteómica..... | 60 |
| 5.1.3 | Validación de ENOA y VINC como potenciales marcadores de respuesta primaria..... | 63 |
| 5.1.4 | Valor pronóstico de ENOA y VINC en la respuesta primaria..... | 64 |
| 5.2 | Enfermedad de Crohn. Respuesta secundaria al tratamiento anti-TNF..... | 66 |
| 5.2.1 | Análisis de los factores clínicos y demográficos | 67 |
| 5.2.2 | Valor pronóstico de ENOA y VINC en la respuesta secundaria | 70 |
| 5.3 | Colitis Ulcerosa | 72 |
| 5.3.1 | Análisis de los factores clínicos y demográficos | 72 |
| 5.3.2 | Proteómica..... | 73 |
| 6. | DISCUSIÓN | 79 |
| 7. | CONCLUSIONES | 89 |
| 8. | BIBLIOGRAFÍA | 92 |
| 9. | ANEXOS..... | 106 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------|---|
| 1433Z | Proteína 14-3-3 zeta/delta |
| ACTN1 | Alfa-actinina-1 |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AEMPS | Agencia Española del Medicamento y Producto Sanitario |
| ALDOA | Fructosa-bisfosfato aldolasa A |
| AQP9 | Acuaporina 9 |
| ASCA | Anticuerpos anti-Saccharomyces cerevisiae |
| ATG16L1 | Proteína relacionada con la autofagia 16-1 |
| C1QA | Subunidad A del subcomponente C1q del Complemento |
| C1QC | Subunidad C del subcomponente C1q del Complemento |
| CCR4 | Receptor de quimioquinas C-C tipo 4 |
| CCR9 | Receptor de quimioquinas C-C tipo 9 |
| CDAI | Índice de actividad de la enfermedad clínica |
| COF1 | Cofilina-1 |
| CU | Colitis ulcerosa |
| DDA | Adquisición dependiente de datos |
| DE | Desviación estándar |
| EC | Enfermedad de Crohn |
| EII | Enfermedad Inflamatoria Intestinal |
| ENOA | Alfa-enolasa |
| EPA | Enfermedad Perianal |
| FC | Cambio de expresión |
| FDA | Evaluación del drenaje de la fístula |
| FDR | Falsos descubrimientos |
| FOXP3 | <i>Forkhead box P3</i> o escurfina |
| FPR2 | Receptor 2 del péptido N-formilo |
| GDIB | Inhibidor de disociación de Rab GDP beta |
| GDIR2 | Inhibidor de disociación Rho GDP 2 |
| GSTO1 | Glutación S-transferasa omega-1 |
| HCAR3 | Receptor 3 del ácido hidroxicarboxílico |
| HRP | Peroxidasa de rábano picante |
| IC | Intervalo de confianza |
| IGG1 | Inmunoglobulina G 1 |
| IL | Interleuquina |
| IMC | Índice de masa corporal |
| IQR | Rango intercuartílico |
| LTR | Respuesta secundaria |
| MALDI-TOF | <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight</i> |
| MASP1 | Serina-proteasa-1 asociada a lectina de unión a manosa |
| MEI | Manifestaciones extraintestinales |
| MOES | Moesina |
| MS | Espectrometría de masas |
| MS/MS | Espectrometría de masas tándem |

| | |
|--------------|--|
| NKX2-3 | NK2 Homeobox 3 |
| nLC-MS/MS | Nano-cromatografía líquida y espectrometría de masas tándem |
| NLTR | No respuesta secundaria |
| NOD2 | Proteína que contiene el dominio de oligomerización de unión a nucleótidos 2 |
| NSTR | No respuesta primaria |
| p-Anca | Anticuerpos perinucleares anti-citoplasma de neutrófilos |
| PCR | Proteína C reactiva |
| PDLI1 | PDZ y LIM dominio 1 (<i>PDZ and LIM domain protein 1</i>) |
| PGLYRP2 | N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa |
| PLEK | Pleckstrina |
| PRSS1 | Serina proteasa 1 |
| RBP4 | Proteína de unión al retinol 4 |
| ROC | Curva de la característica operativa del receptor |
| RSU1 | Proteína supresora de ras 1 |
| S10A4 | Proteína S100-A4 |
| SDPR | Proteína de respuesta a la privación de suero o Cavina-2 |
| SELDI-TOF | <i>Surface Enhanced Laser Desorption Ionization-Time of Flight</i> |
| SELE | Selectina E |
| SERPINA1 | Alfa-1-antitripsina |
| SERPINA4 | Kalostatina |
| SERPINA5 | Inhibidor de serina proteasa plasmática |
| SERPINA6 | Globulina de unión a corticosteroides |
| STAT3 | Transductor de señal y activador de la transcripción 3 |
| STR | Respuesta primaria |
| SWATH | <i>Sequential Window Acquisition of all THEoretical Mass Spectra</i> |
| TA | Temperatura ambiente |
| TAGL2 | Transgelin-2 |
| TGF- β | Factor de crecimiento transformante beta |
| Th-17 | Linfocitos Th17 ó linfocitos T <i>helper</i> 17 |
| TNFR1 | Receptor 1 del factor de necrosis tumoral |
| TNFR2 | Receptor 2 del factor de necrosis tumoral |
| TPIS | Triosafofato isomerasa |
| TREM1 | Receptor desencadenante expresado en células mieloides 1 |
| UPLC | Cromatografía líquida de ultra rendimiento |
| VHB | Virus de la hepatitis B |
| VHC | Virus de la hepatitis C |
| VIH | Virus de la inmunodeficiencia humana |
| VINC | Vinculina |
| VSG | Velocidad de sedimentación globular |
| ZYX | Zyxin |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Anatomía de la Enfermedad de Crohn (EC)..... | 18 |
| Figura 2. Clasificación de la EC en función de su localización en el tramo intestinal..... | 19 |
| Figura 3. Clasificación de la EC en función del patrón evolutivo de la enfermedad. | 21 |
| Figura 4. Anatomía de la Colitis Ulcerosa (CU)..... | 23 |
| Figura 5 Clasificación de la CU en función de la zona anatómica afectada..... | 24 |
| Figura 6. Etiología de la EII..... | 28 |
| Figura 7. Subgrupos de células T y funciones en la mucosa intestinal en la EII..... | 31 |
| Figura 8. Mecanismo de acción del anti-TNF | 36 |
| Figura 9. Estructura molecular del anticuerpo anti-TNF | 36 |
| Figura 10. Esquema del seguimiento realizado a los pacientes de EII incluidos en el estudio | 47 |
| Figura 11. Sistema de eliminación de afinidad múltiple..... | 49 |
| Figura 12. Columna de concentración de proteínas..... | 49 |
| Figura 13. Sistema nano-LC (Ekspert nLC415) | 51 |
| Figura 14. Espectrómetro de masas híbrido con analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo TRIPLE TOF 5600+ de alta resolución (Siex)..... | 51 |
| Figura 15. Reactivo de Bradford y espectrofotómetro..... | 54 |
| Figura 16. Validación de los resultados de proteómica | 64 |
| Figura 17. Curva ROC del modelo propuesto para predecir la respuesta primaria al tratamiento anti-TNF en pacientes con EC. | 66 |
| Figura 18. Validación de ENOA y VINC en la respuesta secundaria al tratamiento anti-TNF..... | 72 |
| Figura 19. Curva ROC del modelo de regresión para predecir respuesta secundaria al tratamiento anti-TNF en la EC.. | 71 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Clasificación de Montreal para la Enfermedad de Crohn | 18 |
| Tabla 2. Índice de actividad de la enfermedad clínica en Enfermedad de Crohn (CDAI) | 22 |
| Tabla 3. Clasificación del brote de actividad según la puntuación de CDAI. | 22 |
| Tabla 4. Clasificación de Montreal para la colitis ulcerosa. | 23 |
| Tabla 5. Índice de Mayo parcial para medir la actividad clínica de la colitis ulcerosa. | 25 |
| Tabla 6. Clasificación de la actividad de la colitis ulcerosa según el índice de Mayo. | 26 |
| Tabla 7. Manifestaciones extraintestinales en la enfermedad inflamatoria intestinal..... | 26 |
| Tabla 8. Análisis univariante para pacientes con respuesta primaria y pacientes sin respuesta primaria | 58 |
| Tabla 9. Proteínas expresadas diferencialmente entre los grupos de pacientes de Enfermedad de Crohn con respuesta primaria y no respuesta primaria..... | 60 |
| Tabla 10. Análisis multivariante para predecir fallo primario a la terapia anti-TNF en la EC | 65 |
| Tabla 11. Área bajo la curva del modelo multivariante de la figura 17..... | 65 |
| Tabla 12. Análisis univariante para pacientes con respuesta secundaria y pacientes respuesta sin secundaria..... | 67 |
| Tabla 13. Área Bajo Curva del modelo multivariante propuesto para la respuesta secundaria al tratamiento anti-TNF en la Enfermedad de Crohn..... | 71 |
| Tabla 14. Relación entre las características demográficas y clínicas y la respuesta primaria del paciente con colitis ulcerosa a la terapia anti-TNF. | 72 |
| Tabla 15. Proteínas expresadas diferencialmente entre los grupos STR y NSTR de pacientes con colitis ulcerosa..... | 74 |

RESUMEN/SUMMARY

1. RESUMEN

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) abarca una serie de patologías crónicas, caracterizadas por desarrollar una inflamación a nivel intestinal. Las dos patologías más representativas de la EII son la Enfermedad de Crohn (EC) y la Colitis Ulcerosa (CU). En los últimos 50 años, su prevalencia en países industrializados ha incrementado hasta los 120–200 casos anuales por cada 100,000 habitantes. En España, la incidencia actual es similar a la de otros países europeos, con aproximadamente 16 casos por cada 100.000 habitantes y año. Se trata de patologías de origen no totalmente conocido, en las que interviene una combinación de factores genéticos, inmunológicos y ambientales, necesarios para desencadenar los síntomas a los que se asocian.

Al ser una patología crónica, el objetivo del tratamiento médico es reducir la inflamación que se produce y recuperar la integridad de la mucosa intestinal. Históricamente se han usado tratamientos como corticoides e inmunosupresores para el tratamiento de la EII, pero el desarrollo de las terapias biológicas abrió un nuevo campo en la farmacoterapia de estas patologías. Los primeros fármacos biológicos aprobados para la EII fueron los anti-TNF o inhibidores del factor de necrosis tumoral, en el año 2000. Pese a su eficacia para inducir la remisión de la enfermedad, un 30-50% de los pacientes tratados no responden inicialmente al tratamiento biológico, y hasta un tercio de los pacientes que sí lo hacen pueden perder la respuesta al fármaco a lo largo del seguimiento.

En este trabajo de tesis nos propusimos identificar biomarcadores de predicción de respuesta al tratamiento biológico con objeto de optimizar el uso de la terapia anti-TNF en pacientes con EII, evitando el desarrollo de efectos secundarios adversos asociados y favoreciendo un mejor aprovechamiento de los recursos del sistema sanitario público. En primer lugar, reclutamos de manera prospectiva dos cohortes independientes de pacientes con EC o con CU, que no hubieran sido tratados previamente con terapia biológica anti-TNF. A los pacientes incluidos voluntariamente en el estudio, se les extrajo una muestra de sangre antes del inicio del tratamiento y se les realizó un seguimiento clínico durante los 12 meses posteriores al mismo. Durante el seguimiento, se evaluaron diferentes parámetros clínicos y se clasificó a los pacientes como respondedores/no respondedores a los 3 meses (corto plazo; grupos STR/NSTR, respectivamente) o a los 12 meses (largo plazo, grupos LTR/NLTR, respectivamente) del comienzo del tratamiento. Una vez clasificados los pacientes, se seleccionó aleatoriamente un número representativo de cada grupo para analizar el perfil proteómico de los mismos mediante SWATH.

Para la EC, identificamos como factores clínicos de respuesta primaria al tratamiento (a corto plazo, STR): la edad y el diagnóstico reciente. Como factores de no respuesta primaria (NSTR) identificamos: el tratamiento con corticoides durante la inducción de la enfermedad, la resección intestinal previa y el índice de actividad de la enfermedad (CDAI) basal elevado. En el análisis proteómico de las muestras de plasma, identificamos un total de 14 proteínas con expresión diferencial entre ambos grupos de pacientes STR y NSTR ($\geq 2,4$ veces y significación estadística por prueba t con $p \leq 0,01$), como potenciales biomarcadores de respuesta primaria al tratamiento biológico. Estas proteínas se relacionaron con la hemostasia, la función plaquetaria, el citoesqueleto celular, la respuesta inflamatoria y la glucólisis. En base a sus valores de expresión diferencial, las proteínas enolasa 1 (alfa-enolasa o ENOA) y vinculina (VINC) fueron validadas en una cohorte de 113 pacientes con EC mediante ELISA. A partir de los valores obtenidos en este ensayo, solamente VINC aportó valor al modelo de predicción de respuesta generado a partir de las variables clínicas seleccionadas (corticoides en la inducción, resección intestinal previa y CDAI basal) (AUC (95% IC)=0.919 (0.862-0.977), $p < 0.000$). Cuando comparamos los valores de VINC entre los pacientes con respuesta mantenida y aquellos con pérdida de respuesta a los 12 meses, observamos que estos eran significativamente más altos en el grupo de pacientes con respuesta a largo plazo (NLTR: 0,8 (0,2-1,5) vs LTR: 1,2 (0,8-2,1); $p = 0,038$). No obstante, aunque la concentración plasmática basal de VINC añadió valor al modelo multivariante de predicción a largo plazo, la capacidad discriminante de dicho modelo fue discreta (AUC (IC 95%)=0,696 (0,592-0,800), $p < 0.001$).

En el caso de los pacientes con CU, no pudimos identificar ninguna variable clínica relacionada con la respuesta al tratamiento biológico, posiblemente debido al tamaño muestral. En el análisis proteómico, manteniendo los mismos parámetros definidos anteriormente para la EC, seleccionamos un total de 10 proteínas como biomarcadores candidatos de STR, relacionadas con la fase aguda, el sistema del complemento, la inmunidad innata, el transporte y el mantenimiento del epitelio intestinal. En este caso, no pudimos validar ninguna de ellas al no disponer de una cohorte suficiente de pacientes.

En resumen, la proteómica SWATH resultó una técnica válida para identificar potenciales marcadores de respuesta al tratamiento anti-TNF. El uso de estos biomarcadores candidatos en combinación con parámetros clínicos relacionados con la enfermedad podría resultar útil para identificar a los pacientes con EII que pueden beneficiarse de los fármacos anti-TNF, antes de comenzar la terapia. Ello evitaría el desarrollo de efectos secundarios indeseables y permitiría a los pacientes beneficiarse de tratamientos de segunda línea más eficaces, mejorando su calidad de vida y optimizando el uso de los recursos médicos.

Resumen

Palabras clave: Enfermedad Inflamatoria Intestinal; Enfermedad de Crohn; Colitis Ulcerosa; Anti-TNF; Proteómica SWATH; Biomarcadores; Vinculina

Inflammatory Bowel Disease (IBD) encompasses a series of chronic pathologies, characterized by developing intestinal inflammation. The two most representative pathologies of IBD are Crohn's Disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC). In the last 50 years, the prevalence of these pathologies in industrialized countries has increased to 120–200 annual cases per 100,000 inhabitants. In Spain, the current incidence is similar to that of other European countries, with approximately 16 cases per 100,000 inhabitants per year. The ethology of IBD is not fully known, but a combination of genetic, immunological, and environmental factors is necessary to trigger the associated symptoms.

Because IBD is a chronic pathology, the aim of medical treatment is to reduce the inflammation and to recover the integrity of the intestinal mucosa. Historically, corticosteroids and immunosuppressants have been used for the treatment of IBD, but the development of biologic therapies opened a new field in the pharmacotherapy of these pathologies. Tumor necrosis factor (TNF) inhibitors were the first class of biologics approved to treat IBD in the year 2000. Despite its effectiveness in inducing disease remission, 30-50% of treated patients do not initially respond to biological treatment, and up to a third of patients who do respond may lose response to the drug throughout follow-up.

In this thesis we set out to identify biomarkers for predicting response to biological treatment in order to optimize the use of anti-TNF therapy in patients with IBD, avoiding the development of associated adverse side effects and favouring better use of the resources of the public health system. First, we prospectively recruited two independent cohorts of patients with CD or UC who had not been previously treated with anti-TNF therapy. We collected a blood sample from the patients before the start of treatment, and performed clinical follow-up for 12 months after treatment. During follow-up, different clinical parameters were evaluated and patients were classified as responders/non-responders at 3 months (short-term; STR/NSTR groups, respectively) or at 12 months (long-term, LTR/NLTR groups, respectively) after the start of the treatment. Once the patients were classified, a representative number of samples from each group was randomly selected to analyse the proteomic profile using SWATH.

For CD, we identified the clinical factors of primary response to treatment (short term, STR): age and recent diagnosis. As primary non-response (NSTR) factors we identified: treatment with corticosteroids during disease induction, previous intestinal resection and high baseline CD activity index (CDAI). In the proteomic analysis of the plasma samples, we identified a total of 14 proteins with differential expression between the STR and NSTR patient groups (≥ 2.4 fold change and statistical significance by t test with $p \leq 0.01$) as potential biomarkers of primary response to

biological treatment. These proteins were related to haemostasis, platelet function, cellular cytoskeleton, inflammatory response and glycolysis. Based on their differential expression values, the proteins enolase 1 (alpha-enolase or ENOA) and vinculin (VINC) were validated by ELISA in a cohort of 113 patients with CD. Based on the values obtained in this assay, only VINC contributed to the response prediction model generated from the selected clinical variables (corticosteroids at induction, previous intestinal resection and baseline CDAI) (AUC (95% CI)=0.919 (0.862-0.977), $p<0.000$). When we compare VINC values between patients with sustained response and those with loss of response at 12 months, we observed that they were significantly higher in the group of patients with long-term response (NLTR: 0.8 (0.2-1.5) vs. LTR: 1.2 (0.8-2.1); $p=0.038$). However, although the baseline plasma concentration of VINC contributed to the multivariate long-term prediction model, the discriminant capacity of this model was modest (AUC (95% CI)=0.696 (0.592-0.800), $p<0.001$).

In the case of patients with UC, we were not able to identify any clinical variable related to the response to biological treatment, possibly due to the sample size. In the proteomic analysis, maintaining the same parameters defined above for CD, we selected a total of 10 proteins as candidate biomarkers of STR, related to the acute phase, the complement system, innate immunity, transport and maintenance of the intestinal epithelium. In this case, we could not validate any of them as we did not have a sufficient cohort of patients.

In summary, SWATH proteomics was a valid technique to identify potential markers of response to anti-TNF treatment. The use of these candidate biomarkers in combination with disease-related clinical parameters could be useful in identifying IBD patients who may benefit from anti-TNF drugs, before starting therapy. This would prevent the development of undesirable side effects and would allow these patients to benefit from more effective second-line treatments, improving their quality of life and optimizing the use of medical resources.

Keywords: Inflammatory bowel disease; Crohn's Disease; Ulcerative Colitis; Anti-TNF; SWATH proteomics; Biomarkers; Vinculin.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Enfermedad Inflamatoria Intestinal

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) engloba una serie de patologías crónicas con una evolución y pronóstico variables en cada individuo. Se trata de una afección inflamatoria remitente-recidivante que afecta principalmente al tracto gastrointestinal y se caracteriza por la inflamación crónica de las mucosas y submucosas, la pérdida de la integridad de las uniones estrechas epiteliales y una respuesta inmune desregulada (1,2). Los pacientes con EII suelen presentar un amplio espectro de síntomas, que incluyen dolor abdominal, diarrea, aumento de las deposiciones y rectorragia (3). La EII afecta a ambos sexos por igual y su prevalencia en países desarrollados se estima en torno al 0,3%. La incidencia de la EII ha aumentado de forma continua en las últimas décadas, con especial énfasis en países de África, Asia y América del Sur envueltos en el proceso de industrialización (4,5). En España, la incidencia de la EII es de 16 casos por cada 100.000 habitantes, similar a la de otros países del norte de Europa (6).

2.2. Clasificación de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal

En términos generales, cuando nos referimos a EII solemos hablar de Enfermedad de Crohn (EC) o Colitis Ulcerosa (CU), pero también engloba la colitis indeterminada que no puede clasificarse como EC o CU y que supone menos del 10% de los casos de EII (7). A continuación, se describen los rasgos generales de estas dos patologías.

2.2.1. Enfermedad de Crohn

La EC es una EII crónica y de causa no totalmente conocida, en la que puede verse afectado cualquier tramo del tracto digestivo. Se caracteriza por alternar periodos de actividad de la enfermedad, denominados brotes y donde se manifiestan los síntomas, con periodos de remisión o inactividad. Aunque la actividad inflamatoria de la patología se desarrolla, principalmente, en el tracto gastrointestinal, la EC tiene también carácter sistémico, pudiendo afectar a otros órganos en forma de manifestación extraintestinal (1).

La EC afecta a todas las capas de la pared intestinal debido a que produce un daño transmural (Figura 1), que puede condicionar la aparición de estenosis en algunas zonas del intestino e, incluso, llegar a ocasionar una oclusión completa de la luz intestinal. A nivel endoscópico, nos podemos encontrar una afectación parcheada, con zonas afectadas y zonas libres de enfermedad. Las zonas afectadas presentan úlceras, generalmente longitudinales y sobre un patrón de mucosa empedrado.

En función de la edad al diagnóstico, la localización y el comportamiento de la enfermedad, la EC se describe de distinta forma siguiendo la clasificación de Montreal (8–10) (Tabla 1). En función de esta clasificación, la EC puede cursar con distinta sintomatología, asociarse con más o menos frecuencia a complicaciones, precisar una cirugía, y progresar, con mayor o menor brevedad, a formas más complejas de la patología que pueden requerir diferentes tratamientos. Por todo esto, la EC debe considerarse como una enfermedad variable a lo largo del tiempo, con cambios en su localización y su comportamiento.

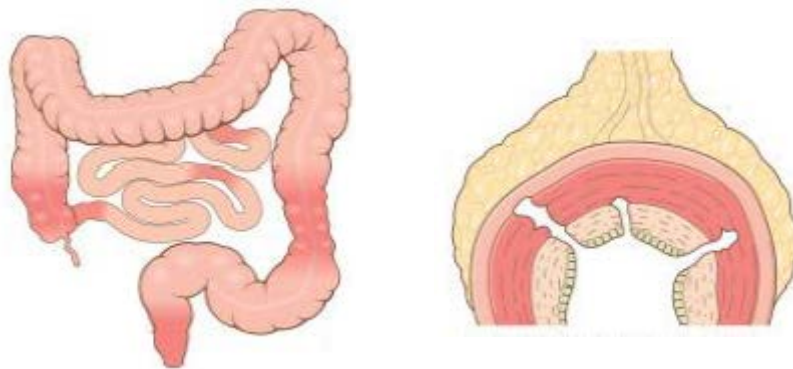


Figura 1. Anatomía de la Enfermedad de Crohn (EC). Esta afección se caracteriza por presentar lesiones parcheadas en cualquier parte del tubo digestivo y producirse un daño transmural. Imagen tomada de: Kumar V. Robbins. Patología Humana. 10 ed. Elsevier; 2018.

Tabla 1. Clasificación de Montreal para la EC. En función de la edad al diagnóstico, su localización y comportamiento, la EC se describe de forma diferente siguiendo esta clasificación.

| EDAD AL DIAGNÓSTICO | LOCALIZACIÓN | COMPORTAMIENTO |
|---------------------|-------------------------------|------------------------|
| A1 <16 AÑOS | L1: ILEAL | B1: INFLAMATORIO |
| A2 17-40 AÑOS | L2: CÓLICO | B2: ESTENOSANTE |
| A3 > 40 AÑOS | L3: ILEOCÓLICO | B3: PENETRANTE |
| | L4: TRACTO DIGESTIVO SUPERIOR | p: AFECTACIÓN PERIANAL |

Según la localización de la afectación en el intestino, la clasificación de Montreal cataloga la EC en 4 tipos (Figura 2):

- **Ileal (L1):** Está afectada la última porción del intestino delgado, el íleon terminal. Alrededor del 30% de los pacientes con EC presentan una afectación aislada del intestino delgado (11). Se

suele manifestar con dolor agudo en la zona de la fosa ilíaca derecha y es común que se presenten estenosis y fístulas (1). Las fístulas son conexiones anormales entre dos cavidades, o entre una cavidad y el exterior del cuerpo, y pueden acompañarse de abscesos abdominales y complicaciones, derivando incluso a un manejo hospitalario con tratamiento quirúrgico y médico.

- **Cólico (L2):** Supone la afectación de alguna zona del intestino grueso. Alrededor del 20% de los pacientes presentan este tipo de EC (11), el cual está ocasionalmente asociado a enfermedad perianal (EPA) y manifestaciones extraintestinales. Puede manifestarse dolor en la palpación de la fosa ilíaca derecha durante la exploración abdominal (1).

- **Ileocólico (L3):** Se trata de la afectación más frecuente en la EC dado que casi un 50% de los pacientes la presentan (11). En este caso, la zona afectada es el íleon distal y alguna parte del colon, normalmente aquellas próximas al íleon, como es el ciego y la válvula ileocecal. Como ocurre en la afectación ileal, puede aparecer también obstrucción intestinal, fístulas y abscesos (1).

- **Tracto digestivo superior (L4):** Es la localización menos frecuente de la enfermedad, apenas lo presentan un 10% de los pacientes (11). Se ve afectada la zona del estómago y el duodeno e intestino delgado proximal. No suele verse como una afectación aislada, sino que suele asociarse a alguna de las anteriores. Como síntomas característicos están la dispepsia y los vómitos, si existe estenosis (1).

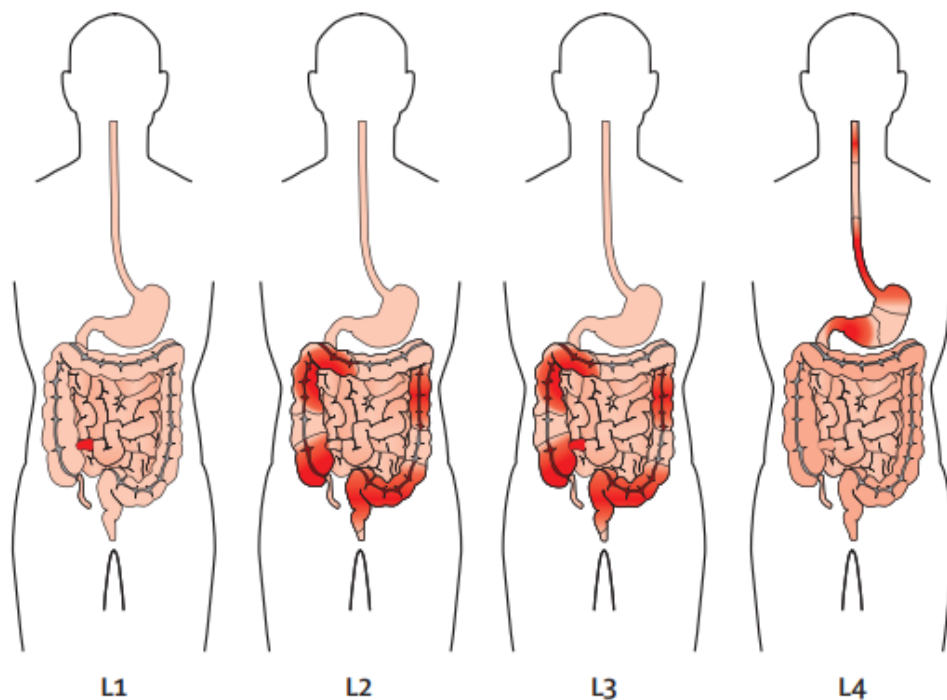


Figura 2. Clasificación de la EC en función de su localización en el tramo intestinal. Imagen tomada de: Lancet 2012; 380: 1590–1605.

Como se ha comentado anteriormente, la clasificación de Montreal también describe el tipo de daño que se presenta en el intestino. Según este, existen 3 tipos de patrones de enfermedad: inflamatorio, estenosante y penetrante o fistulizante. En la mayoría de los pacientes suele haber una transición de un tipo de comportamiento menos agresivo a otro más agresivo. Así, la EC se inicia normalmente con un patrón inflamatorio, que evoluciona hacia un patrón estenosante y/o perforante hasta en el 90% de los casos (12). A continuación, se describen estos 3 patrones:

- **Patrón inflamatorio (B1):** También denominado patrón no estenosante o no penetrante. Se caracteriza por actividad inflamatoria a nivel de la zona afectada en el intestino. Endoscópicamente, se pueden apreciar úlceras a nivel de la mucosa, la capa más interna del tracto gastrointestinal. Este patrón suele cursar con dolor abdominal, diarrea con o sin productos patológicos y astenia; en ningún caso se asocia a la presencia de estenosis o fístulas. La gravedad del patrón inflamatorio dependerá de la extensión de la enfermedad, y su manejo suele realizarse mediante tratamiento farmacológico (1).

- **Patrón estenosante (B2):** Caracterizado por la presencia de estenosis y fibrosis, como consecuencia de la inflamación permanente y el constante proceso reparador, que termina dejando tejido cicatricial que le resta elasticidad al intestino. Estas estenosis intestinales provocan que la luz del intestino se reduzca, influyendo ocasionalmente en la movilidad intestinal al dificultar el paso de las heces hasta ocasionar oclusión intestinal. Este proceso puede generar un dolor tipo cólico, distensión abdominal y, en ocasiones, vómitos. Aunque el tratamiento médico es una opción, no suele tener buena respuesta debido a que el componente de la afectación es fibrótico y suele requerir cirugía para reseca la zona intestinal afectada. La intervención quirúrgica dependerá, en gran medida, del componente fibrótico e inflamatorio de la estenosis y de la longitud de la misma (1).

- **Patrón penetrante o fistulizante (B3):** Es el patrón más evolucionado de daño transmural en el intestino y se asocia a la presencia de fístulas y abscesos que pueden requerir de cirugía (1).

- **Afectación perianal (P):** Caracterizada por la presencia de fisuras, fístulas o abscesos en la zona perianal, puede aparecer asociada a cualquier patrón y comportamiento. Se presenta como la primera manifestación de la EC en, aproximadamente, el 10% de los pacientes. Además, alrededor del 75% de los pacientes con EC diagnosticada presentan afectación perianal (13).

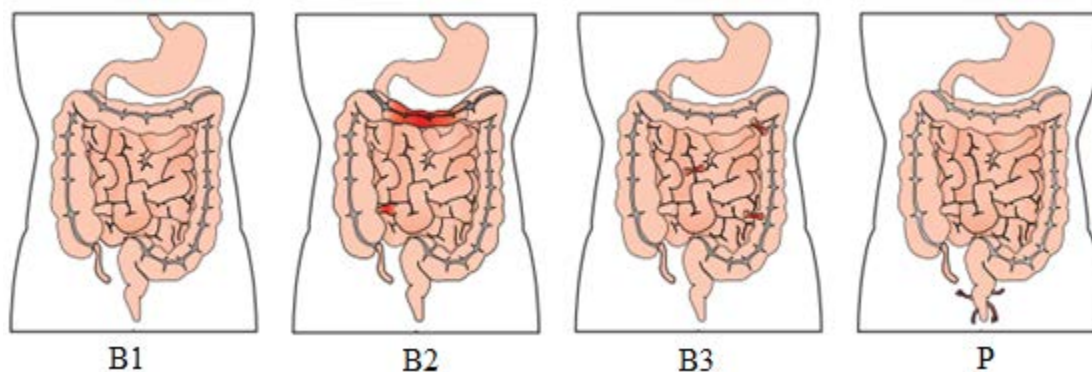


Figura 3. Clasificación de la EC en función del patrón evolutivo de la enfermedad. Imagen tomada de: Lancet 2012; 380: 1590–1605.

En resumen, en la EC los brotes suelen cursar con dolor abdominal (presente en, al menos, el 70% de los pacientes), característico de una localización u otra según la zona del abdomen donde se presente. La diarrea es también otro síntoma frecuente de la EC y se presenta, aproximadamente, en el 80% de los casos, debido a la disbiosis, la mala absorción de sales biliares y la propia inflamación, entre otras causas. Además, la diarrea puede acompañarse de productos patológicos como sangre o moco. A todos estos síntomas también se puede asociar la pérdida de peso, presencia de masa abdominal palpable a la exploración y fiebre, en casos más graves (14).

Debido a la variabilidad de brotes entre pacientes, y con objeto de disponer de una herramienta de valoración estandarizada, se desarrolló el Índice de actividad de la enfermedad clínica (CAI; del inglés, *Clinical Disease Activity Index*) como medida de actividad clínica de la EC (15) (Tabla 2). En función del valor alcanzado al aplicar el CAI, el brote de actividad de la EC se clasifica como remisión asintomática, brote leve, brote moderado o brote grave (Tabla 3). En el caso de los pacientes que presentan EPA, también se requiere una valoración de la evolución de su patología. Entre otras escalas, la FDA (del inglés, *fistula drainage assessment*) se utiliza para medir la curación de las fístulas en ensayos clínicos. El examen requiere realizar una presión suave sobre los orificios fistulosos; según la respuesta, se define como ‘remisión’ a la ausencia de drenaje, y como ‘respuesta’ a la reducción de, al menos, el 50% del drenaje a través de las fístulas.

Tabla 2. Índice de actividad de la enfermedad clínica (CDAI) para medir la actividad clínica de la EC.

| | | Factor multiplicador |
|--|---|----------------------------------|
| Deposiciones líquidas diarias (número) | | 2 x (suma de los últimos 7 días) |
| Dolor abdominal | Ninguno = 0 Leve=1 Moderado=2 Grave=3 | 5 x (suma de los últimos 7 días) |
| Estado general | Bueno=0 Ligeramente decaído=1 Malo=2 Muy malo=3 Terrible=4 | x 7 |
| Complicaciones | Artritis o artralgia =1 Uveítis o iritis =1 EN/ PG/ EA =1 Enfermedad Perianal =1 Otra fístula =1 Fiebre >37.8°C =1 | x 20 |
| Toma de antidiarreicos | No=0 Si=1 | x 30 |
| Masa Abdominal | No=0 Dudoso=1 Si=2 | x 10 |
| Hematocrito | Hombres (DA del 47%) Mujeres (DA del 42%) | x 6 |
| Peso | Estándar (kg) Actual(kg) | 100 x (1-actual/ estándar) |

EN, Eritema nodoso; PG, pioderma gangrenoso; EA, estomatitis aftosa; DA, desviación absoluta.

Tabla 3. Clasificación del brote de actividad según la puntuación de CDAI.

| | |
|-----------------------|-------------------|
| Remisión asintomática | 0 – 149 puntos |
| Brote leve | 150 – 220 puntos |
| Brote moderado | 221 – 450 puntos |
| Brote grave | 450 – 1100 puntos |

2.2.2. Colitis Ulcerosa

Como ya hemos avanzado, la CU es otra de las principales EII. Al igual que la EC, es de tipo crónico y de causa parcialmente conocida. Además, también tiene carácter sistémico y presenta manifestaciones extraintestinales, aunque con menos frecuencia (16).

En la mayor parte de los casos, la CU comienza como una inflamación del recto y se extiende a otros segmentos del colon, habitualmente de manera continua y simétrica. Se caracteriza por afectar exclusivamente a la mucosa, siendo la aparición de estenosis y fístulas menos frecuente que en la EC. No obstante, los pacientes con CU son más propensos a presentar pseudopólipos en la mucosa intestinal (Figura 4). Para una correcta valoración endoscópica, se debe valorar la granularidad mucosa, el patrón vascular, la presencia de úlceras y la friabilidad al paso del endoscopio (2).

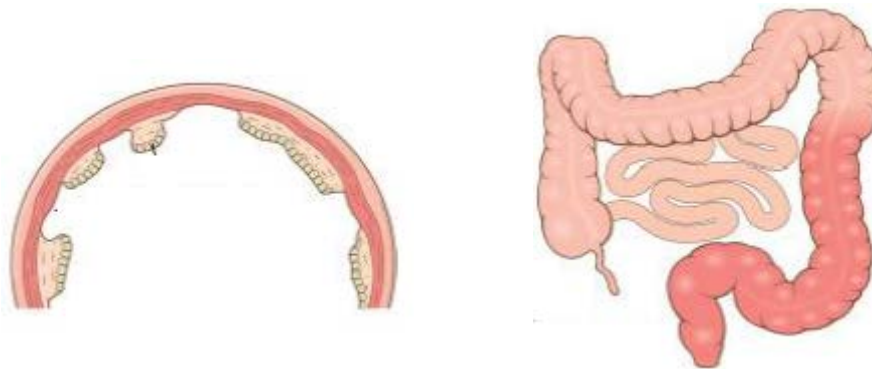


Figura 4. Anatomía de la Colitis Ulcerosa (CU). Esta afección se caracteriza por una afectación continua de la mucosa intestinal. Imagen tomada de: Kumar V. Robbins. Patología Humana. 10 ed. Elsevier; 2018.

La clasificación de Montreal ordena a esta patología, según su extensión y gravedad, de la forma en que se recoge en la Tabla 4.

Tabla 4. Clasificación de Montreal para la Colitis Ulcerosa (CU). En función de la extensión y gravedad, la CU se describe siguiendo esta clasificación.

| EXTENSIÓN | GRAVEDAD |
|---|----------------------|
| E1. Proctitis ulcerosa | S0. Remisión clínica |
| E2. Colitis izquierda o Colitis ulcerosa distal | S1. Leve |
| E3. Pancolitis o Colitis ulcerosa extensa | S2. Moderada |
| | S3. Grave |

Según su extensión o zona anatómica afectada, la CU se clasifica en (Figura 3):

- **Proctitis ulcerosa (E1):** Solamente afecta al recto. Por ello, normalmente se acepta que los pacientes que presentan proctitis ulcerosa no tienen daño más allá a partir de los 15 cm desde el esfínter anal. Afecta al 30-50% de los pacientes con CU (17).
- **Colitis izquierda o CU distal (E2):** Se encuentra afectado el recto, sigma y colon descendente hasta llegar al colon transverso. También se puede encontrar afectación hasta el ángulo esplénico que forma el colon descendente con el colon transverso. Afecta al 20-30% de los pacientes con CU (17).
- **Pancolitis o CU extensa (E3):** Entre el 25-50% de los pacientes diagnosticados de proctitis ulcerosa o colitis distal pueden progresar a afectaciones más extensas a lo largo del tiempo. En la pancolitis o CU extensa, la afectación se extiende pasado el ángulo esplénico, pudiendo llegar hasta el colon ascendente. Es la presentación de la enfermedad menos frecuente, afectando a un 20% de los pacientes, y la que puede presentar los cuadros más graves (17).

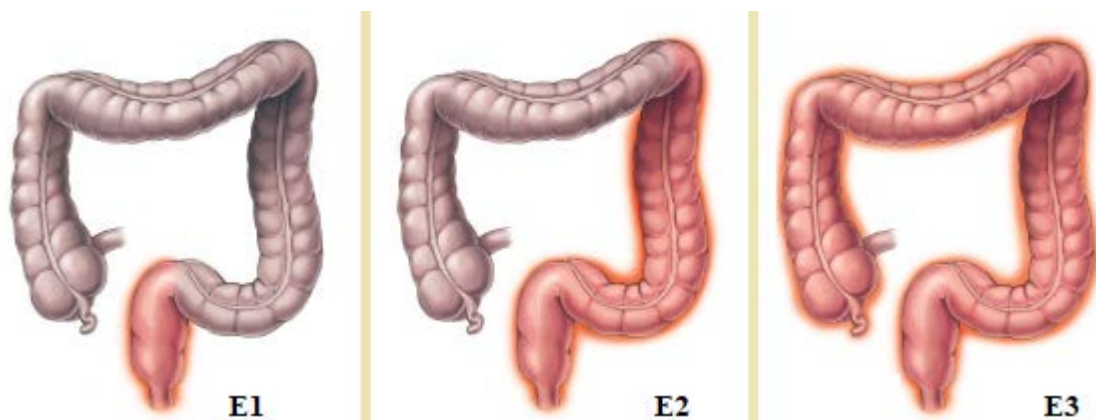


Figura 5 Clasificación de la CU en función de la zona anatómica afectada. E1, Proctitis ulcerosa; E2, Colitis Izquierda; E3, Pancolitis. Fuente: (18)

En función de la gravedad de la enfermedad, podemos clasificar la CU como:

- **Remisión clínica (S0):** Asintomático, no existe actividad inflamatoria manifiesta. Coincide con un periodo de inactividad de la enfermedad (17).
- **Leve (S1):** No hay actividad inflamatoria elevada, tampoco síntomas sistémicos, pero sí podemos encontrar un leve aumento de la frecuencia de las deposiciones (1 ó 2 más de los normal) y aparecer algo de sangre en las heces y molestias abdominales (17).

- **Moderada (S2):** Comienza a existir una actividad inflamatoria evidente, ligeros síntomas sistémicos y deposiciones diarias más frecuentes, en torno a 3 ó 4 por encima del hábito normal del paciente. El sangrado en las heces empieza a ser más evidente, sin existir un compromiso fisiológico (17).

- **Grave (S3):** Existe una actividad inflamatoria intensa, con presencia de síntomas muy evidentes y generalizados, con un aumento de más de 5 deposiciones por encima del hábito deposicional normal. Los pacientes pueden presentar dolor intenso y sangrado evidente que no precisa de ir acompañado de heces. Esta pérdida puede ocasionar anemia y cursar con fiebre (17).

Al igual que la EC, la CU alterna periodos de remisión asintomáticos con brotes o periodos de actividad, en los que la intensidad y el tipo de síntomas son muy variables. En el caso de la CU, cerca del 90% de los pacientes con actividad presentan sangrado rectal, diarrea o aumento de deposiciones (2). La pérdida de peso no suele ser tan frecuente como en la EC, y una presentación grave de la enfermedad, con pérdida de peso, fiebre, taquicardia, náuseas y vómitos, no suele aparecer en más del 15% de los casos (2). Como herramienta de medida estandarizada de la actividad de la CU disponemos del índice de Mayo (19), o índice de Mayo parcial en caso de no disponer de endoscopia del paciente (Tabla 5). La medida de este índice nos permite clasificar los brotes de actividad como se resume en la Tabla 6.

Tabla 5. Índice de Mayo parcial para medir la actividad clínica de la CU.

| | | |
|-------------------------------|---|---|
| Deposiciones diarias (número) | Normal | 0 |
| | 1-2 deposiciones más de lo habitual | 1 |
| | 3-4 deposiciones más de lo habitual | 2 |
| | >5 deposiciones más de lo habitual | 3 |
| | | |
| Sangre en heces | Sin sangre | 0 |
| | Hilos de sangre en menos de la mitad de las deposiciones | 1 |
| | Presencia de sangre evidente en casi todas las deposiciones | 2 |
| | Solo sangre | 3 |
| Valoración médica global | Normal | 0 |
| | Enfermedad leve | 1 |
| | Enfermedad moderada | 2 |
| | Enfermedad grave | 3 |

Tabla 6. Clasificación de la actividad de la CU según puntuación del índice de Mayo.

| | |
|---------------------|------------|
| Remisión | < 2 puntos |
| Enfermedad leve | 2-4 puntos |
| Enfermedad moderada | 5-7 puntos |
| Enfermedad grave | > 7 puntos |

2.3. Manifestaciones extraintestinales de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal

Al ser una patología de base autoinmune, la EII tiene carácter sistémico y puede afectar a otras localizaciones aparte del sistema digestivo. Estas denominadas manifestaciones extraintestinales (MEI) pueden desarrollarse a lo largo de la evolución de la enfermedad (20) y afectar a las articulaciones, piel, ojos, hígado, así como al riñón y vías urinarias. En la Tabla 7, se recogen de manera resumida las MEI descritas por la Organización Europea de Enfermedad de Crohn y Colitis (2,20).

Tabla 7. Manifestaciones extraintestinales (MEI) en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII).

| | |
|---|---|
| Manifestaciones reumatológicas u osteoarticulares | Artritis periférica Artritis axial Osteopatía metabólica Otras |
| Manifestaciones dermatológicas o cutáneas | Eritema nodoso Pioderma gangrenoso Estomatitis aftosa Psoriasis Otras |
| Manifestaciones hepatobiliares | Colelitiasis Esteatosis hepática Colangitis esclerosante primaria Otras |
| Manifestaciones oftalmológicas | Escleritis y Epiescleritis Uveítis |
| Manifestaciones urológicas y renales | Cálculos, Fístulas, Obstrucciones Glomerulonefritis, Nefropatías, Amiloidosis |

En general, las MEI pueden clasificarse en 3 tipos: las que tienen relación directa con la EII (son las consideradas como verdaderas manifestaciones extraintestinales, e incluyen la espondiloartritis periférica, uveítis, eritema nodoso, pioderma gangrenoso, etc.), las enfermedades inmunomediadas asociadas (psoriasis, hidradenitis supurativa, etc.), y las que aparecen como consecuencia de las complicaciones de la propia EII o del tratamiento seguido por el paciente (osteoporosis, nefrolitiasis, fenómenos tromboembólicos, etc.) (14).

- Manifestaciones reumatológicas: son aquellas que afectan a las articulaciones o músculo esquelético, y son las MEI más frecuentes de la EII. Aquellas con relación directa con la EII son la artritis axial y periférica. La osteopatía metabólica aparece por el déficit nutricional de minerales y vitaminas esenciales para el mantenimiento de la médula ósea, y surge como consecuencia de las complicaciones de la EII. Además de estas, la osteoporosis y la necrosis avascular son manifestaciones que pueden aparecer como consecuencia del tratamiento de la EII. De entre todas ellas, las artralgias inespecíficas son las más frecuentes.

- Manifestaciones dermatológicas o mucocutáneas: aparecen en cualquier localización de la piel o de las mucosas, y afectan al 15% de los pacientes (21). Además de las manifestaciones ‘verdaderas’ y debidas al tratamiento, existen lesiones cutáneas relacionadas con alteraciones del sistema inmune, como la psoriasis. La MEI dermatológica más frecuente es el eritema nodoso, aunque también cabe mencionar el pioderma gangrenoso, la estomatitis aftosa y la psoriasis.

- Manifestaciones oftalmológicas: Los síntomas oftalmológicos suelen ser inespecíficos y es importante tenerlos presentes. En ocasiones, estas manifestaciones pueden preceder al diagnóstico de la EII y afectar a varias estructuras oculares. Destacan la blefaritis, dacriostenosis, conjuntivitis, queratitis, escleritis, epiescleritis, uveítis o neuritis.

- Manifestaciones hepatobiliares: Son unas de las MEI más frecuentes de la EII y normalmente cursan de manera independiente a la actividad intestinal. Las más importantes son la colelitiasis, la esteatosis hepática y la colangitis esclerosante primaria, sin olvidar las alteraciones hepáticas por medicamentos, en especial por tiopurinas y metotrexato.

- Manifestaciones renales y del aparato urinario: Aunque son también frecuentes en la EII, suelen estar relacionadas con la actividad de la enfermedad. Las complicaciones urológicas son más frecuentes que las renales e incluyen la formación de cálculos y fístulas o la obstrucción de la vía urinaria por extensión del proceso inflamatorio intestinal. Los tratamientos para estas manifestaciones abarcan desde recomendaciones dietéticas hasta cirugía. Entre las complicaciones renales encontramos la glomerulonefritis, nefropatías tubulointersticiales y amiloidosis.

2.4. Etiología de la Enfermedad Ininflamatoria Intestinal

Aunque la etiología de la EII no ha sido completamente definida, se sabe que implica una combinación de factores genéticos, ambientales e inmunológicos, que promueven la disfunción de la barrera intestinal, el daño tisular y la desregulación del sistema inmunitario (Figura 4) (22,23). A continuación, describimos brevemente el papel que desarrolla cada uno de estos factores en la EII.

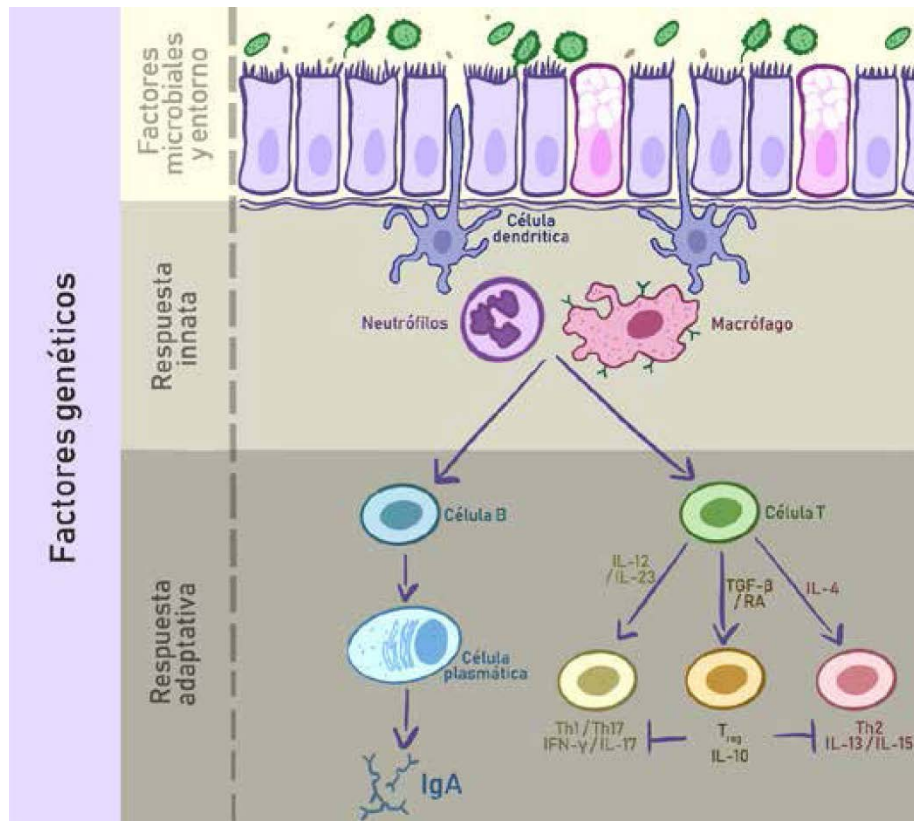


Figura 6. Etiología de la EII. Se muestran los distintos factores etiológicos relacionados con el desarrollo de la EII. Fuente: (22).

2.4.1. La genética en la Enfermedad Ininflamatoria Intestinal

Existen diversos estudios que han investigado el papel que desempeña la genética en el desarrollo y progresión de la EII (24),(25),(26). Gemelos monocigóticos tienen hasta un 58% de concordancia para desarrollar EII, y pacientes con familiares de primer grado que padecen la enfermedad tienen un riesgo de entre cuatro a seis veces mayor de desarrollar la afección (24),(27). Así pues, es necesaria la investigación de los genes (y proteínas) específicos involucrados en la EII, así como de

sus interacciones, para comprender de una manera más completa la etiología y fisiopatología de la enfermedad.

El desarrollo de las técnicas de secuenciación de ADN permitió que, en 2001, se descubriera el primer locus de susceptibilidad a EC en el cromosoma 16, conteniendo el gen NOD2, también conocido como CARD15 (28,29). Las variantes genéticas de NOD2 han sido asociadas a un defecto en el reconocimiento intracelular de los microorganismos (30). En la EC, los pacientes portadores de genes NOD2 heterogéneos tienen de 2 a 4 veces más riesgo de desarrollar la enfermedad, mientras que aquellos con alelos homogéneos incrementan ese riesgo a entre 20 y 40 veces (31). Además de este, se han estudiado otros genes, identificándose fuertes asociaciones entre NOD2 e IL23R y ATG16L1. El gen IL23R está implicado en la diferenciación de los linfocitos Th-17 y, asociado a ello, la producción desregulada de citoquinas. Los linfocitos Th-17 secretan interleuquina-17 (IL-17), que es un efector clave en el desarrollo de colitis en modelos animales (32,33). En la actualidad, la evaluación de mutaciones genéticas en la EII constituye únicamente una herramienta de investigación aún no probada en la clínica como instrumento de diagnóstico, tratamiento o pronóstico (34).

Los estudios de asociación del genoma completo han facilitado también el análisis de los antecedentes genéticos y de las vías patogénicas, contribuyendo al desarrollo de la denominada terapia específica de vías de señalización. Sin embargo, estos estudios identificaron un número muy elevado de posibles variantes genéticas con una puntuación de bajo riesgo para cada una (33). Recientemente, un reanálisis *in silico* del conjunto de datos públicos disponibles de microarrays de transcriptómica en pacientes de EII, ha identificado un grupo de genes con expresión diferencial que podría participar en la patogénesis y progresión de la EII y afectar la respuesta de los pacientes al tratamiento (35). Estos genes corresponden a SELE, AQP9, FPR2, TREM1 y HCAR3, y participan en procesos tales como la respuesta inmune, la inflamación o el transporte celular.

A pesar de la carga genética, el ambiente y otros factores influyen las variaciones en el tipo de EII y el curso natural de la enfermedad que ocurre, incluso, entre gemelos (36). En este sentido, estudios de asociación del epigenoma completo también han asociado cambios epigenéticos específicos de la mucosa rectal con la severidad y el pronóstico de la EII (37).

2.4.2. El sistema inmune en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal

El sistema inmunológico se divide en dos ramas principales, la respuesta inmune innata y la adaptativa. Las células inmunes innatas (neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas), responden de forma rápida e inespecífica a patógenos u otras entidades extrañas como primera línea

de defensa. Una vez activadas, las células inmunes innatas provocan inflamación liberando citoquinas y quimioquinas, activando la cascada del complemento y fagocitando patógenos y restos celulares. Además, algunas células inmunes innatas captan, procesan y presentan antígenos para activar la respuesta inmune adaptativa, actuando como células presentadoras de antígeno. La inmunidad adaptativa depende de esta presentación de antígeno y del entorno de citoquinas generado por la respuesta innata, y es altamente específica. Las células clave del sistema inmunológico adaptativo son las células T y las células B CD4 y CD8. Las células NK y las células $\gamma\delta$ son linfocitos T citotóxicos que se encuentran en el límite entre la inmunidad innata y adaptativa. Existen numerosos datos que apoyan el hecho de que ambos sistemas inmunológicos, innato y adaptativo, desempeñan un papel clave en el origen y desarrollo de la EII (38).

Una característica clave en la aparición, progresión y pronóstico de la EII es una mucosa intestinal con un sistema inmune aberrante. Se trata de un trastorno crónico, caracterizado por el ataque del sistema inmunológico al propio tracto gastrointestinal del paciente. La infiltración del tejido intestinal por células T inflamatorias y la acumulación de varias citoquinas proinflamatorias asociadas con células T activadas, constituye un denominador común de la enfermedad en todos los pacientes con EII (38). En general, la EII surge sobre una base de características genéticas que incluyen diferentes moléculas, como las mencionadas NOD2, IL23R y ATG16L1, y otras como NKX2-3 o STAT3, que favorecen la autoinmunidad del sistema inmunológico (39). A su vez, factores ambientales diversos, como las partículas de alimentos y la flora microbiana del tracto gastrointestinal pueden inducir el sistema inmunológico del intestino. En un tracto gastrointestinal sano, existe un equilibrio entre las células inmunitarias. Dicho equilibrio se consigue gracias a la función antiinflamatoria de las células T reguladoras (Treg)(40), que proceden bien de las células T del timo (Treg naturales), bien del desarrollo periférico de células T-*naive* (Treg adaptativas) en respuesta a citoquinas antiinflamatorias como el TGF- β (41,42). En el intestino delgado, las células Treg que expresan FOXP3 residen en la lámina propia y expresan el receptor CCR4 y CCR9 (43). Tras su estimulación, las células Treg reducen la actividad de otras células inmunes al producir IL-10 y TGF- β , provocando la muerte de otras células inmunes por apoptosis o daño celular directo por enzimas (44),(45),(46). La falta de células Treg funcionales causada por la falta de expresión de FOXP3, conduce a una afección denominada síndrome IPEX, que afecta al tracto gastrointestinal y causa diarrea e íleo, o falta del peristaltismo o motilidad intestinal relacionada con la obstrucción intestinal (47). Los resultados contradictorios respecto a la frecuencia de células Treg en sangre periférica de pacientes con EII, enfatizan la necesidad de determinar las funciones de las Treg en la patogénesis de la EII (48).

Los recientes avances tecnológicos han contribuido a un mejor conocimiento de los tipos celulares implicados en la fisiopatología de la EII, revelando una amplia gama de diferentes subconjuntos fenotípicos de células T y la plasticidad entre ellos (Figura 7). La comprensión de los mecanismos que controlan los cambios entre estos fenotipos, así como de los comportamientos de estos diferentes subconjuntos celulares, promoviendo o aliviando la enfermedad, podría favorecer el desarrollo de terapias más específicas para cada paciente y cada etapa de la enfermedad (43).

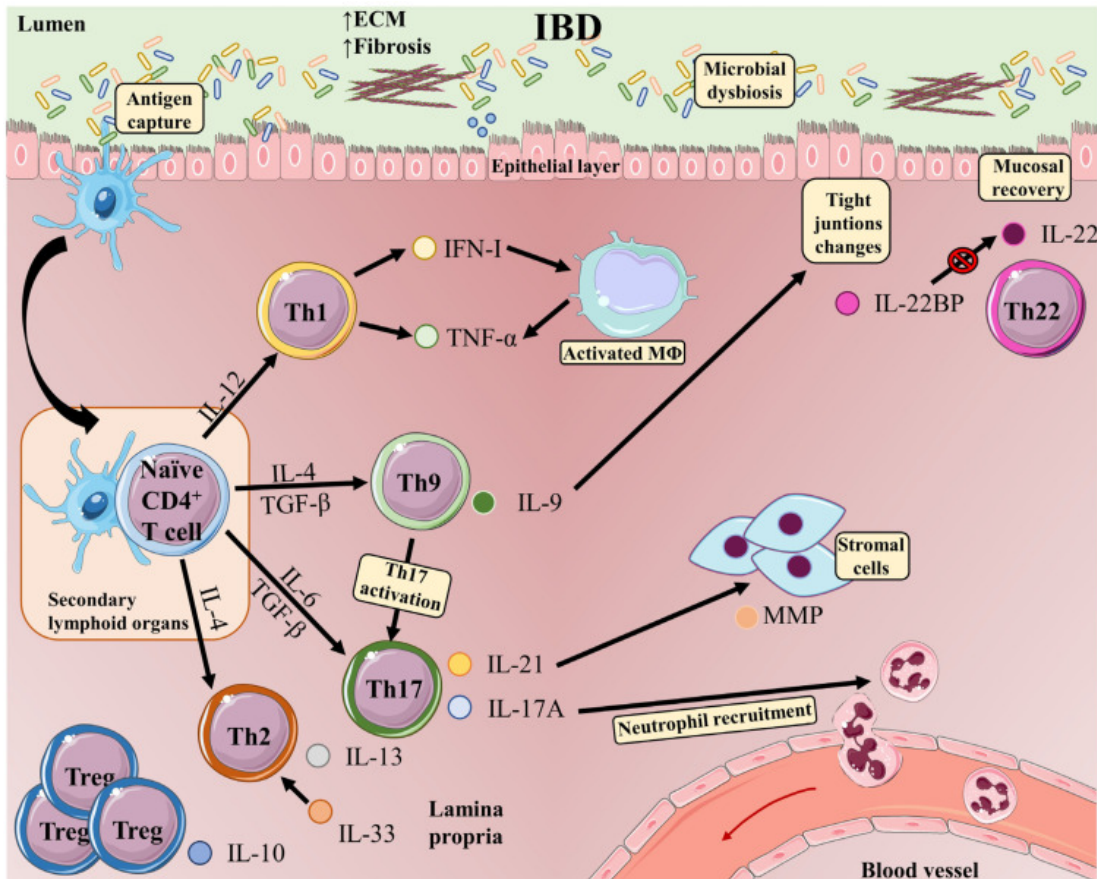


Figura 7. Subgrupos de células T y funciones en la mucosa intestinal en la EII. Fuente: (38).

2.4.3. Factores ambientales

Las poblaciones con alta prevalencia de EII, establecidas en América del Norte y Europa, experimentaron el mayor aumento en la incidencia de la enfermedad hacia la segunda mitad del siglo XX. Aunque la incidencia se está estabilizando en los denominados ‘países occidentales’, la prevalencia sigue siendo alta. Por otro lado, en los países recientemente industrializados, cuyas sociedades se han vuelto más ‘occidentalizadas’, la EII tiene una incidencia cada vez mayor. Además, poblaciones como Japón y la India, anteriormente consideradas de ‘bajo riesgo’, están

presenciando un aumento de la incidencia (4,6,49). Las influencias ambientales potencialmente relevantes como factor de riesgo para la EII abarcan todo el espectro de la vida, y se cree son responsables del incremento de la incidencia de la enfermedad en el siglo XXI.

Debido a que la EII suele cursar con la desnutrición en pacientes, se ha estudiado su relación con los hábitos dietéticos (50), hallándose el consumo de alimentos ricos en azúcar un factor de riesgo para la EC (51). El hábito tabáquico es también un importante factor de riesgo en la EC (52), agravando el curso de la enfermedad y la respuesta al tratamiento (53,54). Este no es el caso de la CU, donde la nicotina del tabaco podría ejercer un efecto protector en pacientes fumadores mediante un mecanismo desconocido (55). Otro factor importante considerado en este apartado es la microbiota intestinal. Esta comunidad de microorganismos residentes en el tubo digestivo participa en los procesos inmunológicos del individuo para mantener la homeostasis y está muy ligada al desarrollo de la EII. Una baja biodiversidad de microbiota contribuye al proceso inflamatorio y altera la producción intestinal de ácidos grasos de cadena corta, contribuyendo a la disfunción de la barrera de la mucosa intestinal y la alteración de la diferenciación de los linfocitos T (56,57).

Además de estos, existen otros factores ambientales potenciales que pueden contribuir a la patogénesis de la EII, como son el modo de parto, la lactancia materna, la exposición a antibióticos en la infancia, y otras exposiciones posteriores, en la edad adulta, como el estrés y el estilo de vida, junto con las infecciones, el uso de antibióticos, los niveles bajos de vitamina D, la extirpación quirúrgica del apéndice y diversos fármacos. Se han realizado numerosos estudios de intervención con objeto de modificar los factores de riesgo y el curso de la EII, como son estudios sobre el hábito tabáquico. Así, por ejemplo, en pacientes con EC que dejaron de fumar durante más de 29 meses, se redujo el riesgo de sufrir un brote y la necesidad de corticoides o inmunosupresores (49).

A lo largo del tiempo, se han desarrollado distintos modelos que intentan explicar el desarrollo de la EII a partir de la interacción de factores ambientales. En este sentido, la teoría de la higiene relaciona el incremento de la incidencia de la enfermedad con la mejora de las medidas higiénicas ocurridas durante el siglo XX, relativas al progreso en la potabilización del agua, la conservación de alimentos, todo ello asociado al incremento de las enfermedades alérgicas (58).

2.5. Terapias en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal

En el tratamiento de la EII cabe destacar, en primer lugar, la cirugía. La resección intestinal ha sido la única opción en casos graves tanto de EC como de CU. Sin embargo, la compleja patogénesis de la EII involucra a numerosos factores que desencadenan intrincados procesos inflamatorios,

ofreciendo abundantes objetivos terapéuticos (59). Actualmente, existen documentos de posicionamiento terapéutico, desarrollados por las sociedades científicas para la EC y la CU (60,61). Previamente al desarrollo de los fármacos de última generación, se utilizaban moléculas antiinflamatorias e inmunosupresoras para el tratamiento de la EII, como corticoides, aminosalicilatos, metotrexato, azatioprina y otras moléculas. Durante las dos últimas décadas, la llegada de las terapias biológicas ha introducido el concepto de estrategias de tratamiento dirigido, centradas en controlar la inflamación y alterar el curso de la enfermedad. El objetivo terapéutico es la mejoría de la sintomatología, la curación de la mucosa y la prevención de la recidiva. Aunque estos nuevos medicamentos mejoraron los resultados de salud, en muchos pacientes se observa fracaso del tratamiento, ya sea como no respuesta primaria o secundaria. Además, el uso de biológicos conlleva el riesgo de eventos adversos raros pero graves, que incluyen infecciones graves, reacciones autoinmunes paradójicas y una ligera elevación del riesgo de malignidad (62). En consecuencia, es necesario establecer nuevas aproximaciones farmacéuticas altamente eficientes y seguras, que mejoren los resultados clínicos, endoscópicos e histológicos. A continuación, describimos brevemente los fármacos disponibles para el tratamiento de las EII y otras terapias innovadoras.

2.5.1. Corticoides

Los corticoides constituyeron la primera aproximación de tratamiento eficaz para la EII. Actualmente, la terapia con corticoides es la más utilizada en la mayoría de los brotes graves de EC y CU. Sin embargo, aunque poseen un gran poder antiinflamatorio, su uso no está indicado para el mantenimiento de la remisión. Existen dos tipos de corticoides: los clásicos, como la prednisona, y los de baja biodisponibilidad, como la budesonida o la beclometasona. Los corticoides clásicos tienen un mayor efecto antiinflamatorio que los de baja biodisponibilidad, pero acarrear mayores efectos adversos. Por tanto, en los casos en que no sean necesarios los sistémicos, se optará por los corticoides de baja disponibilidad, ya que el uso de los primeros se asocia a la retención de líquidos, alteración de los niveles de glucosa, alteración en la absorción de calcio y otros efectos que pueden acarrear complicaciones, principalmente, en pacientes mayores y pluripatológicos (60,63),(61) .

2.5.2. Aminosalicilatos

Los aminosalicilatos son una familia de fármacos con diversas formulaciones que liberan el principio activo, la mesalazina, en sitios previstos. Aunque se desconoce el mecanismo de acción exacto, se cree que debe estar relacionado con un efecto tópico sobre la mucosa gastrointestinal y no asociado a un efecto sistémico. Los aminosalicilatos tienen una amplia variedad de funciones

antiinflamatorias e inmunomoduladoras, incluyendo: bloqueo de la producción de IL-1 y TNF- α , y de la unión de TNF- α a su receptor; inhibición de la ciclooxigenasa y la 5-lipoxigenasa; bloqueo de la actividad inflamatoria y quimiotáctica de la prostaglandina E2 y los leucotrienos, respectivamente; propiedades antioxidantes y secuestrador de radicales libres; inhibición de la presentación de antígenos, la proliferación de células T, la producción de anticuerpos por células B, las células T citotóxicas, las células NK, y la activación y expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales. Muchos de los efectos antiinflamatorios de los aminosalicilatos pueden explicarse por la inhibición de la vía de señalización del factor de transcripción nuclear NF κ B (64). En general, los aminosalicilatos llevan usándose para tratar la EII desde los años 70 y son bien tolerados por los pacientes. Existen presentaciones orales y tópicas y se usan en pacientes de CU, tanto para la inducción a la remisión como para el mantenimiento de esta. Sin embargo, estudios comparativos de aminosalicilatos (sulfasalazina, mesalazina y mesalazina) frente a placebo y corticoides en pacientes con EC, han concluido que la sulfasalazina es moderadamente efectiva para el tratamiento de la EC activa, mostrando un leve beneficio sobre la mesalazina (60,61). La mesalazina y las preparaciones de mesalazina no son eficaces para inducir la remisión en la EC activa (65).

2.5.3. Inmunomoduladores

Las tiopurinas y el metotrexato son los tratamientos inmunosupresores que se usan con más frecuencia en pacientes con EII. Por su parte, las tiopurinas (azatioprina y mercaptopurina) son capaces de obtener una remisión duradera con un bajo coste económico, pese a no mostrar un perfil de seguridad ideal. Se utilizan, solas o en combinación con otros agentes (66), para mantener la remisión clínica y endoscópica. En la EC, la monoterapia con tiopurinas solamente se aconseja para el mantenimiento de la remisión en pacientes corticodependientes. Por el contrario, en pacientes con CU, las tiopurinas se utilizan ampliamente y están indicadas para el mantenimiento de la remisión, así como para su inducción en casos particulares (66). Aunque no se conoce cómo actúan las tiopurinas específicamente, como posibles mecanismos de acción han sido sugeridos la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, el daño al ADN o la inducción de apoptosis, entre otros.

En el caso del metotrexato, aunque fue originalmente diseñado como antineoplásico, actualmente se utiliza en enfermedades de base autoinmune. Se trata de un antagonista del ácido fólico que actúa bloqueando la síntesis de las purinas, produciendo potentes efectos antiinflamatorios. En la EII, el metotrexato se suele usar en casos de intolerancia a tiopurinas (1). Al igual que estas, se usa solo o en combinación con otros agentes biológicos para disminuir la inmunogenicidad a la terapia. Como

efecto secundario, el metotrexato interfiere en la absorción de ácido fólico, por lo que se requiere tratamiento suplementario del mismo (67).

2.5.4. Terapias biológicas

El último escalón de tratamiento en la EII lo constituyen las terapias biológicas. Según recoge la directiva 2001/89 del Parlamento Europeo “Un medicamento biológico es un producto cuyo principio activo es biológico. Una sustancia biológica es aquella que se produce o se extrae a partir de una fuente biológica y que necesita, para su caracterización y determinación de su calidad, una combinación de ensayos físico-químicos y biológicos junto con el proceso de producción y su control”. Por ello, se consideran medicamentos biológicos los medicamentos inmunológicos, los medicamentos derivados de la sangre o el plasma humanos y los medicamentos de terapia avanzada, los cuales tienen una fabricación más compleja que las medicinas de síntesis química (68).

Los primeros biológicos aprobados para EII fueron los tratamientos anti-TNF, que actúan captando el factor de necrosis tumoral (TNF) circulante e inhibiendo su efecto, al no unirse a sus receptores TNFR1 y TNFR2 (Figura 8). El TNF es una citoquina proinflamatoria producida por macrófagos, linfocitos, fibroblastos y otras células que intervienen en la respuesta inmune adaptativa durante el desarrollo de la EII. Debido al amplio espectro de patologías de base autoinmune donde interviene el TNF, los tratamientos anti-TNF no son exclusivos para la EII, sino que también se utilizan en otros trastornos como la artritis reumatoide, la espondilitis anquilosante o la psoriasis. Infliximab (Remicade®) fue el primer biológico anti-TNF que se comercializó. Obtuvo la autorización de la AEMPS en 1999 y se trata de un anticuerpo monoclonal IgG1 quimérico con la región Fab de origen murino (69) (Figura 9). Es frecuente que pacientes que no se encuentren en tratamiento concomitante con un inmunosupresor, reciban terapia con hidrocortisona o polaramine para minimizar la aparición de efectos adversos relacionados con la infusión del biológico. Actualmente, además del tratamiento intravenoso, hay disponible una presentación subcutánea de uno de sus biosimilares.

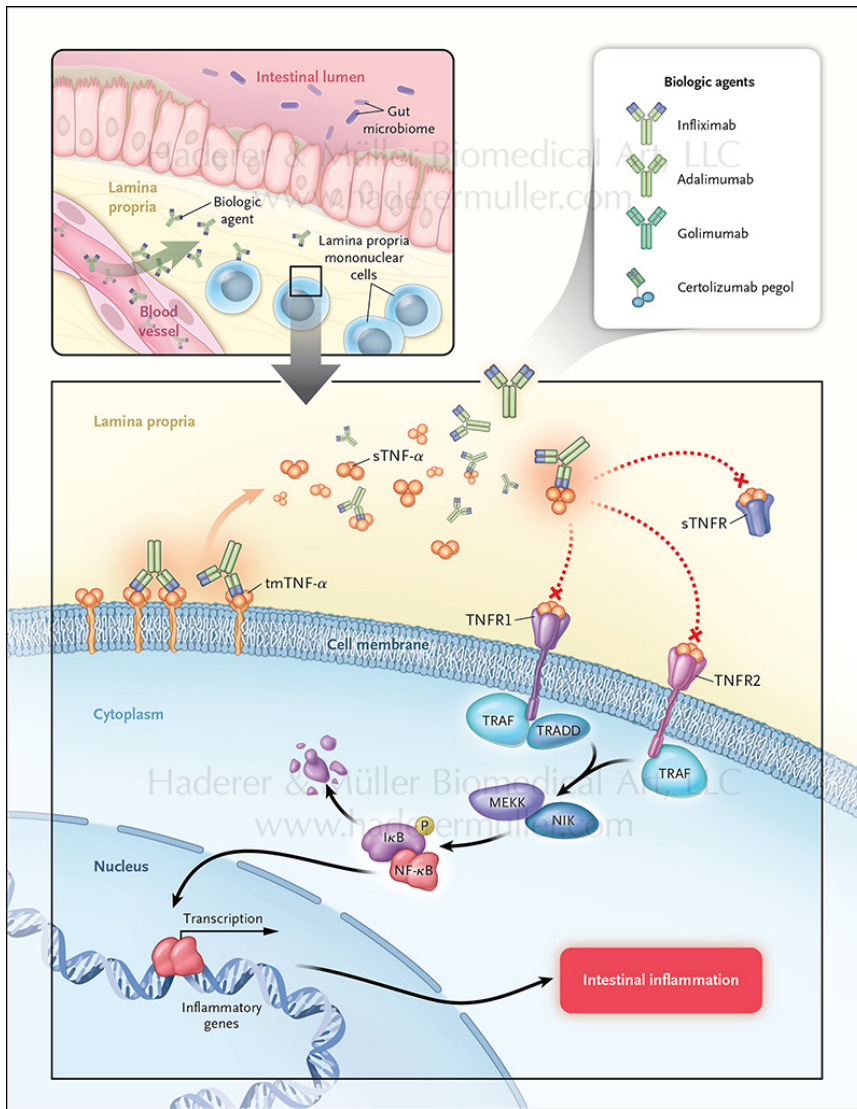


Figura 8. Mecanismo de acción del anti-TNF. Fuente: (70)

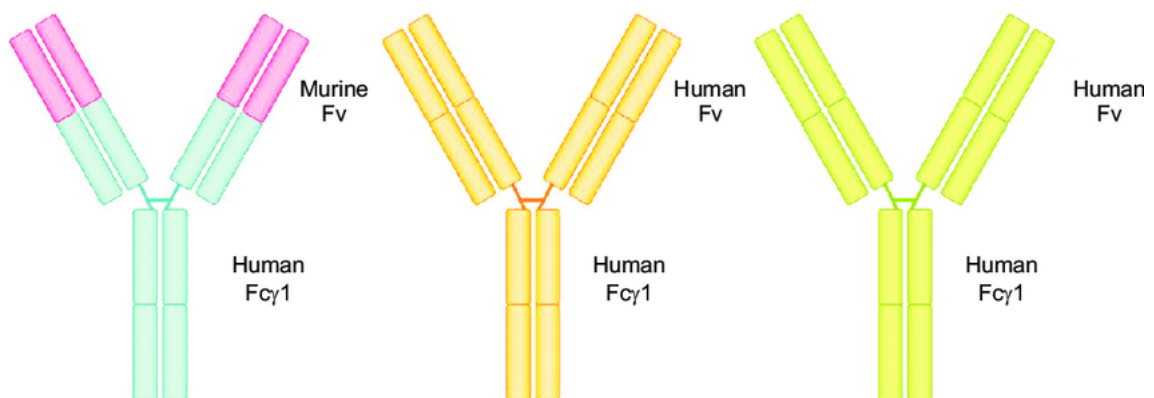


Figura 9. Estructura molecular del anticuerpo anti-TNF. De izquierda a derecha: Infliximab, Adalimumab, Golimumab. Fc, fragmento cristalizante; Fv, fragmento variable o de unión a antígeno. Fuente: (71)

El segundo anti-TNF que se sintetizó fue Adalimumab (Humira®), que se autorizó en 2003. Este, a diferencia de Infliximab, es un anticuerpo monoclonal humano recombinante producido en células de ovario de hámster chino (72) (Figura 9). Los efectos adversos por reacciones alérgicas suelen ser menos frecuentes que con Infliximab. Solo tiene presentación subcutánea. Golimumab (Simponi®) fue el último anti-TNF en comercializarse en España en 2009 y solo está indicado para el tratamiento de la CU. Se trata de un anticuerpo monoclonal IgG1k humano, producido en una línea celular de hibridoma murino mediante tecnología de ADN recombinante (73), y, al igual que adalimumab, solo se administra de manera subcutánea (Figura 9).

En general, los anti-TNF tienen un buen perfil de seguridad. Sin embargo, debido a la inmunosupresión provocada por la inhibición del TNF, hay algunos aspectos que deben ser considerados en los pacientes que reciben tratamiento con estos agentes. En primer lugar, existe riesgo de reactivación de infecciones, como el VIH, VHB, VHC o la tuberculosis. Por ello, previamente al inicio del tratamiento biológico, debe realizarse un cribado de infecciones. Del mismo modo, estos pacientes son más propensos a infecciones oportunistas, por lo que debe hacerse un seguimiento a lo largo del tratamiento. Además, los pacientes con insuficiencia cardíaca pueden ver agravada su patología. Por otro lado, relacionado también con la inmunosupresión, el uso de los fármacos anti-TNF se asocia a un mayor riesgo de cáncer (1,2). Otro aspecto para discutir es el precio de estos fármacos. Pese a que inicialmente era muy elevado, el precio actual se ha reducido considerablemente al cumplir la vigencia de las patentes y poderse desarrollar los denominados biosimilares, que son biológicos equivalentes en calidad, eficacia y seguridad, al biológico similar.

2.5.5. Otras terapias para EII

Además de los anti-TNF utilizados en la práctica clínica expuestos anteriormente, los progresos en el campo de la biología molecular y la comprensión de las vías inmunológicas que participan en la EII han permitido aproximaciones a nuevas terapias farmacológicas, con un perfil de seguridad y farmacocinética mejorado. Estas terapias incluyen nuevos biológicos que modulan la señalización celular o que obstaculizan el tráfico de leucocitos (59). Entre estas otras terapias tenemos:

- Anticuerpos anti-interleuquinas: Estos anticuerpos bloquean la actividad de las distintas interleuquinas (IL) que regulan la respuesta inmune y participan en el desarrollo de la EII. Hasta la fecha, la Agencia Europea de Medicamentos ha aprobado los fármacos ustekinumab, que actúa sobre IL-12/23, y risankizumab y mirikizumab, que actúan sobre IL-23 (74,75). Además de estos, existen fármacos que bloquean otras IL o receptores de estas, que están siendo actualmente evaluados en ensayos clínicos.

- Anticuerpos anti-integrinas: Actúan bloqueando la adhesión y migración de los linfocitos dentro de la mucosa gastrointestinal durante la inflamación. Vedolizumab es un anticuerpo monoclonal aprobado por la Agencia Europea de Medicamentos, que pertenece a este grupo de fármacos. Su diana terapéutica es la integrina $\alpha 4\beta 7$, la cual se expresa en la superficie de una subpoblación de linfocitos T que migran preferentemente al tracto gastrointestinal y que causan la inflamación característica de la EII (76).

Además de estas terapias, existen las denominadas moléculas pequeñas, que son moléculas orales desarrolladas en los últimos años. Entre ellas cabe destacar:

- Inhibidores Janus quinasa o JAK: Su acción se centra en la inhibición de la vía JAK, que participa en la producción de citoquinas proinflamatorias relacionadas con la respuesta inmune alterada en la EII (77). En la actualidad, hay 3 fármacos comercializados de este tipo: tofacitinib, que actúa sobre JAK1 y JAK3 y solo está aprobado para la CU (78); upacitinib, que inhibe a JAK-1 (79); y filgotinib, que es un inhibidor competitivo y reversible del adenosin trifosfato, necesario para activar la vía de las JAK quinasas (80).

- Moduladores del receptor de la esfingosina 1-fosfato (S1P): SP1 participa en diversos procesos relacionados con la migración linfocitaria, permeabilidad endotelial, angiogénesis, diferenciación, proliferación y apoptosis. Ozanimod se une con gran afinidad a los receptores 1 y 5 de S1P, modulando su actividad, y está indicado para el tratamiento de la CU activa con respuesta inadecuada, pérdida de respuesta o intolerante al tratamiento convencional o biológico (81).

Además de estas terapias aprobadas, hay una batería de nuevas moléculas que se encuentran en fase de ensayos clínicos, donde se analiza tanto su actividad biológica como la seguridad de su uso. Estas nuevas moléculas se sumarán en un futuro próximo al arsenal farmacológico actualmente disponible para el tratamiento de la EII (82).

2.6. Predictores de respuesta al tratamiento en pacientes de EII

La evidencia clínica ha demostrado que la terapia anti-TNF produce una rápida remisión de la enfermedad, alta tasa de curación de la mucosa y mejor calidad de vida, en aproximadamente el 60% de los pacientes con EII. Sin embargo, entre el 15-40% de los pacientes no responden a la terapia de inducción. Además, cerca del 50% de los pacientes con respuesta primaria pueden perder posteriormente la respuesta a la terapia de mantenimiento (83). Por ello, es necesario disponer de marcadores que permitan evaluar la respuesta terapéutica e identificar los pacientes capaces de beneficiarse de la terapia biológica.

La identificación de marcadores de respuesta al tratamiento en la EII, al igual que en otras patologías, se ha realizado de forma paralela al desarrollo de dichas terapias. Una reciente revisión de Gisbert et al. (84), resume una serie de potenciales predictores de respuesta primaria a corto plazo a agentes anti-TNF, así como a agentes anti-adhesión o anti-interleuquinas. En general, los diferentes predictores candidatos no han demostrado su utilidad: o esta es muy limitada o existe controversia sobre su uso para este propósito. En concreto, para los anti-TNF, aunque se recoge una elevada cantidad de predictores candidatos, ninguno de ellos cumple los criterios para ser aplicado como tal en la EII. Por ejemplo, factores como la edad, el género o el peso de los pacientes, y factores relacionados con la enfermedad, como su duración, extensión/localización, fenotipo o severidad, muestran resultados contradictorios o inconsistentes en los diversos estudios que han analizado su utilidad como predictores de respuesta. Lo mismo ha ocurrido con el recuento de parámetros hematológicos y marcadores serológicos conocidos, como la proteína C reactiva (PCR), albúmina, anticuerpos perinucleares anti-citoplasma de neutrófilos (pANCA) y anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), y marcadores fecales como la calprotectina. Tampoco se han identificado polimorfismos genéticos robustos con utilidad clínica para este propósito, siendo necesaria una investigación más ambiciosa en este sentido, que abarque un amplio número de polimorfismos en grandes cohortes de pacientes bien caracterizadas.

A pesar de todo ello, los marcadores más utilizados para evaluar la eficacia del tratamiento anti-TNF en la clínica son: calprotectina fecal, PCR, y la concentración de anticuerpos anti-TNF y de anticuerpos frente a estos, en sangre o mucosa. Además de estos, están cobrando especial relevancia otros como los transcritos de citoquinas de la mucosa, los microRNAs, el perfil de la microbiota intestinal fecal y de la mucosa, o las características histológicas de la mucosa (85).

2.6.1. La proteómica en la identificación de marcadores de respuesta a anti-TNF

La proteómica es el estudio de la estructura, función e interacciones de las proteínas (86). En general, la proteómica se refiere al análisis experimental y a gran escala de proteínas y proteomas (conjunto completo de proteínas de un organismo o sistema). En las últimas décadas, ha habido un esfuerzo importante para aplicar las distintas ciencias “ómicas” a la identificación de marcadores biológicos en el campo de las enfermedades humanas. Entre todas ellas, las técnicas en proteómica ofrecen un potente enfoque para el diagnóstico, vigilancia, seguimiento y control de las enfermedades, así como para el desarrollo de fármacos. Las técnicas en proteómica engloban a una multitud de metodologías, incluyendo la electroforesis bidimensional, la cromatografía líquida o la

espectrometría de masas (MS), que se combinan entre sí para el estudio proteico, que se realiza a partir del análisis bioinformático posterior.

En investigación clínica, entre otras aplicaciones, la proteómica se utiliza para la búsqueda de biomarcadores predictores de enfermedades y biomarcadores de respuesta a fármacos (87). En el caso de la EII, existe un número limitado de estudios que identifiquen marcadores proteómicos con aplicabilidad clínica. Además, tales estudios utilizan con frecuencia un reducido número de pacientes, no diferencian entre las diferentes patologías, o no realizan estudios de validación posteriores de los marcadores propuestos (88). Recientemente, utilizando muestras de suero y orina, un estudio proteómico ha identificado diversos marcadores candidatos para la predisposición a la EII en pacientes con un diagnóstico reciente de la enfermedad. Dichos biomarcadores proteicos estaban relacionados con la degranulación de los neutrófilos, la cascada del complemento, la coagulación y la respuesta inmune (89). No obstante, estos resultados no han sido validados aún y, por tanto, tampoco han sido aplicados a la práctica clínica. Respecto a la identificación de marcadores de respuesta a agentes anti-TNF en la EII, tampoco hay muchos estudios proteómicos hasta la fecha. Entre las diferentes técnicas proteómicas utilizadas para este propósito destacan el SELDI-TOF MS (del inglés '*Surface Enhanced Laser Desorption Ionization-Time of Flight*') y la electroforesis en gel bidimensional acoplada a MALDI-TOF MS (del inglés '*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*'). La primera de ellas fue utilizada en 2 cohortes de pacientes con EC o CU y 2 cohortes de control inflamatorio y control sano, para identificar biomarcadores proteómicos en suero con alta capacidad diagnóstica (90). Esta misma aproximación también fue utilizada en el primer estudio que buscó marcadores proteómicos de respuesta a infliximab en una cohorte de 20 pacientes, identificando, entre otros, al factor plaquetario 4 (91). Sin embargo, los resultados de este estudio no fueron validados posteriormente. Con este mismo propósito de identificar biomarcadores predictores de respuesta a infliximab, se utilizó la electroforesis en gel bidimensional acoplada a MALDI-TOF MS en una cohorte de 18 pacientes con EC que presentaban remisión, respuesta y no respuesta primaria a la terapia, comparando los perfiles proteómicos séricos previos al inicio de la terapia y posteriormente, a las 12 semanas de su inicio. Entre las proteínas identificadas, la apolipoproteína A-I, apolipoproteína E, proteína del complemento C4-B, plasminógeno, serotransferrina, beta-2-glicoproteína 1 y clusterina, resultaron estar sobreexpresadas en los grupos de respuesta y de no respuesta primaria. Asimismo, las proteínas glicoproteína alfa-2-rica en leucina, proteína de unión de vitamina D (VTDB), glicoproteína-alfa-1B y subcomponente C1r del complemento, se encontraron incrementadas en el grupo de remisión. A pesar de los resultados, estos no fueron validados en una cohorte suficientemente amplia de pacientes (92). En

alguno de estos estudios, y en otros no mencionados aquí, se han identificado biomarcadores potencialmente útiles para el diagnóstico temprano o la clasificación de la EII, que podrían resultar de mayor utilidad que los utilizados actualmente. Aunque no disponemos todavía de un marcador que cumpla todos los criterios necesarios para su implementación clínica, los resultados obtenidos hasta la fecha demuestran la utilidad de la proteómica para identificar marcadores candidatos de respuesta a tratamientos biológicos en la EII. Esto resulta lógico puesto que la interacción entre los factores ambientales y genéticos implicados en la etiología de la enfermedad está asociada a la inevitable alteración del proteoma.

La proteómica mediante SWATH (del inglés, '*Sequential Window Acquisition of all THEoretical Mass Spectra*') es una técnica innovadora de MS que monitoriza todos los péptidos detectables en una muestra y en una sola carrera (93). Esta técnica utiliza un método de adquisición independiente de datos para adquirir todas las transiciones detectadas, a alta resolución. Las intensidades de señal registradas se pueden consultar para obtener una indicación de la abundancia de cualquier proteína de interés, permitiendo su cuantificación (94). Para ello se construye una librería de transiciones que relaciona la transición (par precursor-fragmento) con un péptido de determinada secuencia y con una proteína. Después, las transiciones adquiridas mediante SWATH se relacionan con la proteína de interés mediante esa librería y se compara la intensidad registrada para las distintas transiciones entre las muestras estudiadas. Esta novedosa técnica ha demostrado tener una alta precisión en la cuantificación masiva de proteínas (95) y, además, se ha utilizado en diversas patologías para la identificación de biomarcadores (96). Sin embargo, todavía no ha sido utilizada para identificar posibles marcadores de respuesta a tratamientos biológicos en la EII.

HIPÓTESIS/OBJETIVOS

3. HIPÓTESIS/OBJETIVOS

La terapia anti-TNF ha surgido como la opción terapéutica de elección para el tratamiento de la EC y la CU. Sin embargo, un porcentaje importante de pacientes no responde tras 12 semanas de tratamiento, o pierde la respuesta a lo largo del seguimiento. Pese al esfuerzo realizado, no existen biomarcadores predictores de respuesta al tratamiento que se utilicen en la práctica clínica actual para identificar aquellos pacientes capaces de beneficiarse de la terapia biológica. El análisis de proteínas en sangre es una fuente importante de marcadores biológicos cuya identificación ha sido previamente relacionada con las características clínicas de los pacientes, su pronóstico o la resistencia a la terapia. La técnica proteómica SWATH utiliza un método altamente sensible, capaz de incrementar notablemente el rendimiento en la identificación y cuantificación de péptidos. Sin embargo, esta técnica no ha sido aplicada hasta la fecha en la EII.

La hipótesis del presente trabajo es que el análisis proteómico mediante SWATH de las muestras de plasma de pacientes con EII, de forma previa al inicio del tratamiento anti-TNF, podría resultar útil para identificar marcadores de respuesta a la terapia. El uso de estos biomarcadores, solos o en combinación con parámetros clínico-patológicos relacionados con la enfermedad, podría ayudar a predecir la respuesta de los pacientes al tratamiento. Esto permitiría identificar anticipadamente aquellos pacientes capaces de beneficiarse de la terapia biológica y distinguirlos de los que no. De este modo, este segundo grupo de pacientes con pronóstico de no respuesta a la terapia anti-TNF podría favorecerse de tratamientos con otro mecanismo de acción, que podrían resultar más eficaces y que incluyen a moléculas como ustekinumab, vedolizumab e inhibidores de JAK, entre otros.

Los objetivos de esta tesis doctoral fueron los siguientes:

1. Identificación y validación de potenciales marcadores de respuesta a fármacos anti-TNF en pacientes con EC y pacientes con CU mediante la técnica proteómica SWATH.
2. Identificación de factores demográficos y clínicos relacionados con la respuesta de los pacientes con EC y pacientes con CU a la terapia anti-TNF.
3. Analizar la capacidad predictiva individual y combinada de los diferentes biomarcadores y factores clínico-patológicos identificados para seleccionar los pacientes con EC y los pacientes con CU que pueden beneficiarse del tratamiento anti-TNF.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Diseño

Estudio observacional, prospectivo y multicéntrico que se coordinó desde la Unidad de Aparato Digestivo del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba y el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), en cooperación con los Servicios de Digestivo de los Hospitales Universitarios de La Princesa (Madrid) y Galdakao-Usansolo (Bizkaia). Se diseñaron dos estudios en paralelo, en pacientes que padecían EC o CU y que iniciaban tratamiento con terapias biológicas anti-TNF (infliximab, adalimumab o sus biosimilares y golimumab).

La valoración principal del estudio fue la no respuesta primaria (NSTR del inglés “*no short-term remission*”) o pérdida de respuesta al tratamiento anti-TNF, basada en los siguientes criterios:

- Enfermedad de Crohn: Aumento de CDAI >150 puntos; Actividad endoscópica o radiológica; Presencia de drenaje a través de las fístulas en el caso de EPA; Aparición de nuevas fístulas en el caso de EPA; Tratamiento con corticoides; Intensificación del tratamiento biológico; Cambio de tratamiento biológico; Cirugía o dilatación endoscópica.
- Colitis ulcerosa: Aumento de índice parcial de Mayo >2; Actividad endoscópica o radiológica; Tratamiento con corticoides; Intensificación del tratamiento biológico; Cambio de tratamiento biológico; Cirugía o dilatación endoscópica.

4.2 Aspectos éticos

Ambos estudios fueron evaluados y aprobados para su ejecución por el Comité de Ética del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, cumpliendo con los principios éticos para la investigación médica en seres humanos y de confidencialidad proclamados en la Declaración de Helsinki (última revisión de 2013) y en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica. La inclusión de cada paciente en el estudio requirió la firma de la hoja de información del paciente y el consentimiento informado, diseñados para el estudio. Los datos clínicos y analíticos de los pacientes fueron recogidos por el equipo clínico que forma parte del proyecto e incorporados a un fichero de SPSS anonimizado, para garantizar la fidelidad de los datos y preservar el anonimato y confidencialidad en el tratamiento de datos de carácter personal. La información obtenida durante el

proyecto se trató de forma anónima, dando cumplimiento a la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales.

4.3 Pacientes

Se reclutaron, de forma prospectiva, una cohorte consecutiva de pacientes adultos (>18 años) que iniciaban tratamiento con anti-TNF para el tratamiento de su EII y que aceptaban voluntariamente participar en el proyecto con la firma del consentimiento informado. La actividad de la EC se evaluó según el CDAI, en el caso de enfermedad luminal, o el FDA, en el caso de EPA. La actividad de la CU se midió usando el índice de Mayo parcial. Como criterios de exclusión se consideraron los siguientes: artritis reumatoide concomitante, gestación o lactancia, tratamiento previo con un fármaco biológico, contraindicación de tratamiento con fármacos biológicos, síndrome de intestino corto, portador de ostomía, cirugía abdominal en los últimos 6 meses antes del inicio del tratamiento, infección activa por VHC o VHB, infección por VIH, e inicio del tratamiento por otra indicación distinta a su EII. Estos criterios fueron compartidos para ambos estudios. Además de estos, se estableció como criterio de exclusión en el grupo de EC el estar diagnosticado de CU, y viceversa.

4.4 Recopilación y análisis de datos

Se realizó un seguimiento a los pacientes durante 12 meses, programando las visitas cada 3 meses para evaluar la respuesta al fármaco, coincidiendo con el seguimiento clínico habitual. En cada visita se realizó una analítica y se calculó el CDAI, en el caso de la EC, y el índice de Mayo parcial, en el caso de la CU (Figura 10).



Figura 10. Esquema del seguimiento realizado a los pacientes de EII incluidos en el estudio.

Las variables demográficas (género, edad), parámetros clínico-patológicos (fumador, tratamiento anti-TNF, indicación del tratamiento, tratamiento inmunomodulador concomitante, inducción con corticoides, índice de masa corporal (IMC), tiempo desde el diagnóstico, clasificación Montreal, EPA, MEI, apendicetomía, resección intestinal previa, cirugía perianal previa, CDAI basal) y antecedentes de enfermedad previa se recogieron en la visita basal. La analítica de sangre incluyó los parámetros normales de hemoglobina, leucocitos, albumina, plaquetas, ferritina, PCR y velocidad de sedimentación globular (VSG).

4.5 Manejo de las muestras de plasma

Se recogieron muestras de plasma de los pacientes antes de comenzar con la terapia anti-TNF. Para ello, se extrajeron 9mL de sangre periférica mediante punción venosa en un miembro superior del paciente, utilizando un tubo EDTA-K³ VACUETTE® (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). Posteriormente, y siempre en un plazo inferior a 1h tras su recolección, la muestra de sangre se centrifugó a 1500g y 4°C, durante 10min, en una centrífuga refrigerada con rotor oscilante (Thermo Scientific, San Diego, California, EE.UU). Tras la centrifugación, la fase acuosa superior, correspondiente al plasma sanguíneo, se recuperó con cuidado de no arrastrar células blancas de la interfase leucocitaria, se fraccionó en tubos de 1mL y se almacenó a -80°C hasta su análisis.

4.5.1 Preparación de las muestras para el análisis proteómico

Tras descongelarlas en hielo, las muestras de plasma se sometieron a un procedimiento de depleción mediante el kit “Hu-14 Multiple Affinity Removal System” (Agilent Technologies, Wilmington, DE, EE.UU) para mejorar la resolución y el rango dinámico de la cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS). Se trata de un sistema de centrifugación en columnas de afinidad (Figura 11) que retiene las 14 proteínas más abundantes del plasma humano, que constituyen, aproximadamente, el 94% de la masa total de proteínas plasmáticas y que podrían interferir en el posterior análisis proteómico. En concreto, las proteínas eliminadas en este proceso fueron la albúmina, inmunoglobulina G (IgG), anti-tripsina, IgA, transferrina, haptoglobulina, fibrinógeno, alfa2-macroglobulina, alfa1 glicoproteína ácida, IgM, apolipoproteína A-I, apolipoproteína A-II, proteína del complemento C3 y transtirretina. Posteriormente, las muestras deplecionadas fueron concentradas en un volumen final de 200µL mediante el kit ‘Agilent Spin Concentrators for Proteins’ para su análisis proteómico.

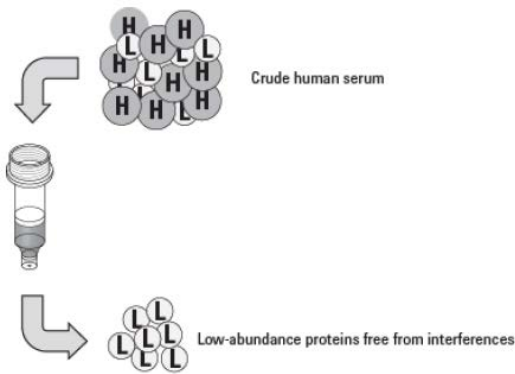


Figura 11. Sistema de eliminación de afinidad múltiple. A partir de la centrifugación secuencial de las muestras de plasma en columnas de afinidad, las 14 proteínas más abundantes son eliminadas de las muestras de plasma antes del análisis proteómico. H, proteínas de alta abundancia; L, proteínas de baja abundancia.

Para la depleción, en primer lugar, se atemperó la columna de afinidad y se diluyeron las muestras de plasma 1:20 con buffer A (100µL plasma + 1.900µL buffer A). Cada muestra se pasó un total de 10 veces por su columna correspondiente, en volúmenes de 200µL cada vez, hasta completar los 2mL totales de muestra diluida. Brevemente, se añadieron 200µL de muestra diluida de plasma en la columna situada sobre un tubo de recolección F1. Tras reposar 5min a temperatura ambiente (TA), se centrifugaron las muestras 1min a 100g y lavó la columna con 400µL de buffer A. A continuación, se centrifugaron durante 2,5min a 100g y se realizó un segundo lavado con buffer A, utilizando un nuevo tubo F2 en esta ocasión. Antes de volver a pasar otros 200µL de muestra, se eliminaron las proteínas unidas a la columna (usando la jeringa de 2,5mL de buffer B disponible) y se rehidrató (con la jeringa de 5mL de buffer A). Tras completar la depleción de los 2mL de muestra de plasma diluida, los volúmenes de los tubos F1 y F2 resultantes se juntaron en un solo tubo y se concentraron en un volumen final de 200µL mediante el kit ‘Spin Concentrators for Proteins’ (Figura 12). Para ello, la muestra deplecionada se depositó en la respectiva columna del kit y se centrifugó a 5.000g hasta obtener un volumen final de 200µl.



Figura 12. Columna de concentración de proteínas. La muestra de plasma deplecionado se deposita en la columna, dentro del tubo correspondiente. El tubo se centrifuga hasta obtener el volumen de concentración requerido.

4.5.2 Análisis mediante proteómica SWATH

Este análisis fue realizado con el apoyo del Servicio de Proteómica del IMIBIC. Para la preparación de las muestras, estas se limpiaron para eliminar cualquier contaminante mediante la precipitación de proteínas con ácido tricloroacético/acetona. A continuación, las muestras se diluyeron en 50 μ L de RapiGest SF al 0,2% (Waters, Milford, MA, EE.UU) en bicarbonato de amonio 50mM, se calculó la concentración de proteína total mediante el kit de análisis Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU) y se tomaron 50 μ g de proteína para digerir con tripsina siguiendo un protocolo adaptado de Vowinckel (97) de Vowinckel. Brevemente, las muestras de proteínas se incubaron con ditiotretitol 5mM a 60°C durante 30min, y luego con 10mM de yodoacetamida a TA y oscuridad durante 30min. A continuación, se añadió tripsina (*'Sequencing Grade Modified Trypsin'*; Promega, Madison, WI, EE.UU) a una relación 1:40 (tripsina:proteína) y se incubó a 37°C durante 2h; tras este tiempo, se añadió la misma cantidad de tripsina y se incubó de nuevo a 37°C durante otras 15h. Finalmente, el RapiGest se precipitó tras incubar con ácido trifluoroacético al 0,5% a 37°C durante 1h, y se centrifugó durante 10 minutos a 15000 g a 4°C. El volumen final se ajustó con agua milliQ y acetonitrilo a una concentración final de 0,5 μ g péptido/ μ L, 2,25% de acetonitrilo y 0,2% de TFA.

4.5.2.1 Creación de la biblioteca espectral

Para construir las bibliotecas espectrales de masas tándem (MS/MS), las soluciones de péptidos se analizaron por un enfoque de adquisición dependiente de datos (DDA) con nano-LC y MS/MS. Para obtener una buena representación de los péptidos y proteínas presentes en las 20 muestras, se prepararon viales agrupados que consistían en mezclas iguales de las muestras originales. Se tomó 1 μ g de cada mezcla o *'pool'* de muestras (2 μ L) y se separó en un sistema nano-LC Ekspert nLC415 (Eksigent, Dublin, CA, EE.UU.), utilizando una columna Acclaim PepMap C18 (75 μ m x 25cm, 3 μ m, 100 Å) (Thermo Fisher scientific) con un caudal de 300nL/min (Figura 13). Como solventes A y B se utilizaron agua y acetonitrilo, respectivamente, ambos conteniendo 0,1% de ácido fórmico. El gradiente de carrera empleado fue del 5% al 30% de solvente B durante 120min, 10min al 90% de solvente B y, finalmente, 20min al 5% de solvente B para el equilibrado de la columna (tiempo total de carrera de 150min).



Figura 13. Sistema nano-LC (Ekspert nLC415). Utilizando una columna de HPLC Acclaim PepMap 100 C18 para el análisis de alta resolución de péptidos tripticos.

A medida que se eluyeron los péptidos, se inyectaron directamente en un espectrómetro de masas híbrido con analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo TRIPLE TOF 5600+ de alta resolución (Sciex, Redwood City, CA, EE.UU) (Figura 14), con un sistema de adquisición dependiente de datos "top 65" en modo de ión positivo. Se usó una fuente ESI NanoSpray III (Sciex) para la interfaz entre nLC-MS/MS, con una aplicación de 2.600V de tensión. El modo de adquisición consistió en un barrido de 250ms de 350 a 1.250m/z, seguido de un escaneo MS/MS de 230 a 1.700m/z (60ms de tiempo de adquisición, energía de colisión rodante) de los principales 65 iones precursores del barrido exploratorio, para un tiempo de ciclo total de 4,2s. Los precursores fragmentados fueron añadidos a continuación a una lista de exclusión dinámica durante 15s; cualquier ion individual cargado individualmente se excluyó del análisis MS/MS.



Figura 14. Espectrómetro de masas híbrido con analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo TRIPLE TOF 5600+ de alta resolución (Siex).

La identificación de péptidos y proteínas se realizó utilizando el software Protein Pilot (versión 5.0.1, Sciex) con la base de datos Swiss-Prot (descargada en marzo de 2016), que contiene 20.200

secuencias de proteínas, especificando yodoacetamida como alquilación Cys. La tasa de falsos descubrimientos (FDR) se fijó en 0,01 para péptidos y proteínas. Los péptidos identificados se usaron para generar la biblioteca espectral para la extracción de las áreas de pico de los archivos de datos SWATH, utilizando el flujo de trabajo 'MS/MS^{ALL} with SWATH™ Acquisition MicroApp' asociado al software PeakView (versión 2.1, Sciex). Los péptidos con una puntuación de confianza superior al 99% (según lo obtenido de la búsqueda en la base de datos de 'Protein Pilot') se incluyeron en la biblioteca espectral.

4.5.2.2 Cuantificación relativa por la adquisición de SWATH

Las muestras individuales se analizaron utilizando un método de adquisición de datos independiente. Cada muestra (2µL) se analizó utilizando el equipo LC-MS y el gradiente LC descrito anteriormente para construir la biblioteca espectral, en lugar de utilizar el método de adquisición SWATH-MS. El método consistía en repetir un ciclo de 60 escaneos TOF MS/MS (300 a 1.600m/z, modo de alta sensibilidad, tiempo de adquisición de 90ms) de ventanas de aislamiento de precursores secuenciales supeSTRuestas de ancho variable (supeSTRosición de 1m/z), cubriendo el rango de masa de 350 a 1.250m/z con un escaneo TOF MS previo (350 a 1.250m/z, tiempo de adquisición de 50ms) para cada ciclo. El tiempo total del ciclo fue 5,5s. Para cada conjunto de muestras, se optimizó el ancho de las 60 ventanas variables de acuerdo con la densidad de iones encontrada en las carreras previas DDA utilizando una hoja de cálculo de ventana variable SWATH de Sciex.

4.5.2.3 Análisis SWATH de datos

La extracción de datos específicos de los fragmentos del cromatograma de iones del SWATH fue realizado por PeakView (versión 2.1) usando el MS/MS^{ALL} con SWATH Acquisition MicroApp (versión 2.0). Esta aplicación procesó los datos utilizando la biblioteca espectral creada a partir de los datos de la secuenciación; hasta 10 péptidos por proteína y 12 fragmentos por péptido, basándose en la intensidad de la señal; cualquier fragmento de los péptidos compartido y modificado fue excluido del procesamiento. Ventanas de diez minutos y anchos de 20ppm se emplearon para extraer los cromatogramas de iones; se intentó cuantificar por SWATH todas las proteínas en la librería de iones que fueron identificadas por ProteinPilot con un FDR inferior al 1%.

Los tiempos de retención de los péptidos que se seleccionaron para cada proteína fueron realineados en cada carrera de acuerdo con 118 péptidos endógenos de la Apolipoproteína B-100, eluida a lo largo de todo el eje de tiempo. Los cromatogramas de iones extraídos fueron generados para cada uno de los fragmentos del ión seleccionado; se obtuvieron las áreas de pico para los péptidos sumando las áreas de pico de los correspondientes fragmentos de iones. PeakView calculó un FDR y una puntuación para cada péptido asignado de acuerdo con la cromatografía y los componentes del espectro; sólo se utilizaron péptidos con un FDR inferior al 1% para la cuantificación de la proteína. La cuantificación de proteínas se calculó sumando las áreas de pico de los péptidos correspondientes. MarkerView (versión 1.2.1, Sciex) se utilizó para la normalización de la señal; la abundancia diferencial de proteína se calculó aplicando la prueba T mediante el software estadístico SPSS versión 15.0 (IBM coSTR, Chicago, IL, EE.UU.).

4.5.2.4 Análisis de las vías funcionales

Las vías funcionales de los biomarcadores identificados fueron analizadas por DAVID Bioinformatics Resources 6.7 y por STRING 12.0.

4.5.2.5 Análisis Estadístico

Las variables se mostraron en tablas de frecuencia o se expresaron como medias y desviaciones estándar, para aquellas con distribución normal, o como medianas y rango intercuartílico (IQR), para aquellas con distribución asimétrica. La prueba de Shapiro-Wilk se utilizó para estudiar la distribución de la muestra. La prueba de Chi cuadrado se usó para comparar variables cualitativas; las pruebas T de Student o ANOVA para variables con distribución normal, y U de Mann Whitney o Kruskal-Wallis para distribuciones asimétricas. Se utilizó la regresión logística para conocer el efecto predictivo de uno o varios parámetros clínicos y/o analíticos variables sobre la respuesta del paciente a la terapia anti-TNF. El valor umbral óptimo de los candidatos predictores para la identificación de pacientes con respuesta no primaria a anti-TNF fue establecida por la curva de la característica operativa del receptor (ROC), eligiendo el umbral más bajo posible con el valor predictivo negativo más alto. Un valor de p menor que 0,05 fue considerado estadísticamente significativo. Los análisis se realizaron con el software SPSS versión 25.

4.5.3 Validación de marcadores

4.5.3.1 Cuantificación de proteínas

El cálculo de la concentración de proteínas en las muestras se realizó mediante la técnica colorimétrica de Bradford(98), utilizando el reactivo “Protein Assay Dye Reagent Concentrate” (Biorad, Munich, Alemania) (Figura 15). El reactivo se encuentra a una concentración 10x y hay que realizar una dilución 1:10 con agua destilada para su uso. Se realizaron diversas diluciones de la muestra de plasma sanguíneo hasta dar con una que permitiera su cuantificación dentro de una recta patrón de concentración conocida. Dicha dilución fue de 1:20.000. Para la cuantificación se usaron placas transparentes de 96 pocillos con fondo plano. En cada pocillo se añadieron 20 μ L de la muestra diluida más 180 μ L del reactivo Bradford diluido. Tras incubar 5 minutos en oscuridad, se midió la absorbancia a 595nm en un espectrofotómetro BioTek Power Wave XS (Agilent Technologies) (Figura 15). Para la recta patrón utilizamos albúmina de suero bovino (BSA) (BioRad) como proteína estándar, a la concentración siguiente: 0,7ng/ μ L, 1,4ng/ μ L, 2,8ng/ μ L, 4,2ng/ μ L, 5,6ng/ μ L, 7,0ng/ μ L, 8,4ng/ μ L, 9,8ng/ μ L, 11,2ng/ μ L, 12,6ng/ μ L y 14,0ng/ μ L.



Figura 15. Reactivo de Bradford y espectrofotómetro. Utilizados para medir la absorbancia en las muestras de plasma, como medida de la concentración de proteína.

4.5.3.2 Ensayo de ELISA

Se utilizaron los siguientes tests de ELISA (acrónimo del inglés ‘*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*’) para calcular la concentración de las proteínas alfa-enolasa (ENOA o ENO1) y vinculina (VINC) en las muestras de plasma: ENO1 (Human) ELISA Kit KA3318 (Abnova, Taipei, Taiwan) y VINC (Human) ELISA Kit ABIN6975111 (Antibodies-online, Aachen, Germany). En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante. Así, en primer lugar, se determinó la dilución óptima de las muestras de plasma para cada prueba, utilizando la recta patrón proporcionada en cada uno de ellos. En el caso de ENOA, se determinó que una dilución 1:40 de la muestra con el buffer de dilución, era la más apropiada. En el caso de VINC, se comprobó que era recomendable

usar las muestras de plasma sin diluir, tal y como aconsejaba el fabricante. Estas pruebas se realizaron utilizando muestras de todos los grupos de pacientes.

Para la recta patrón, reconstituimos el liofilizado del estándar añadiendo 1mL de diluyente. Esta dilución se utilizó dentro de la primera hora tras su reconstitución. Las concentraciones de la recta patrón fueron de 30ng/mL, 15ng/mL, 7,5ng/mL, 3,75ng/mL, 1,875ng/mL, 0,938ng/mL, 0,469ng/mL, y 0ng/mL en el caso de ENOA, y de 1.800pg/mL, 900pg/mL, 450pg/mL, 225pg/mL, 113pg/mL, 56pg/mL, 28pg/mL y 0pg/mL en el caso de VINC. Para realizar el ensayo, se añadieron a cada pocillo 100µL de muestra, o estándar, previamente atemperados, y posteriormente se incubó la placa a 37°C durante 2h. En el caso de VINC, a continuación, se añadieron 100µL del correspondiente anticuerpo biotinilado a cada pocillo y se incubó la placa a 37°C durante 1h. Seguidamente, se realizaron 3 lavados de los pocillos con 200µL de buffer de lavado 1x, dejando transcurrir 2min entre cada lavado, se añadieron 100µL de avidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se incubó 1h a 37°C. Tras hacer tres nuevos lavados, se añadieron 90µL del sustrato de detección, se incubó 30min a 37°C y oscuridad, y se paró la reacción con 50µL de solución de parada antes de medir en el espectrofotómetro.

En el caso de ENOA, tras la incubación inicial con la muestra, se realizaron 3 lavados de los pocillos, se añadieron 100µL de anticuerpo secundario y se incubó la placa a 37°C durante 1h. Tras hacer 3 nuevos lavados, se incubaron los pocillos con 100µL de Estreptavidina-HRP, a 37°C y durante 30min. Posteriormente, se realizaron otros 3 lavados de los pocillos y se incubó a 37°C y oscuridad, con 100µL del sustrato de detección, durante 10min. Finalmente, la reacción se detuvo con otros 100µL de solución de parada y se leyó la absorbancia.

Para medir la concentración de VINC o ENOA presente en cada muestra, se utilizó un espectrofotómetro BioTek Power Wave XS con el que se registró la absorbancia de cada pocillo a 450nm, usando una longitud de onda de corrección a 540nm. Esta lectura a 540nm se restó de la obtenida a 450nm (Figura 15).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Enfermedad de Crohn. Respuesta primaria al tratamiento anti-TNF

5.1.1 Análisis de los factores clínicos y demográficos

Se analizaron los factores clínicos y demográficos de los 113 pacientes con EC que iniciaron tratamiento con anti-TNF, para determinar su valor como predictores de respuesta primaria a la terapia. Del total de pacientes, el 85,8% mostró una remisión mantenida (grupo STR, acrónimo del inglés “*Short Term Remission*”) y un 14,2% mostró un fallo primario a la terapia biológica (NSTR) a los 3 meses del inicio del tratamiento. En la tabla 8 se recogen las características basales de los pacientes de cada grupo. En relación con el tratamiento biológico empleado, un 50,4% de los pacientes recibió tratamiento con infliximab o su biosimilar, y un 49,6% recibió terapia con adalimumab; no se observaron diferencias estadísticamente significativas sobre la respuesta al tratamiento en función de la terapia usada. Los pacientes más jóvenes (NSTR: 53,5 (43,0-59,3) vs. STR: 39,0 (27,5-50,0), $p=0,005$) y con un diagnóstico más reciente de la EC (NSTR: 22,0 (2,5-26,0) vs. STR: 4,0 (1,0-13,0), $p=0,021$), fueron más propensos a tener STR al tratamiento anti-TNF. Al contrario, los pacientes con corticoides durante la inducción (NSTR: 50,0% vs. STR: 16,5%, $p=0,004$), con, al menos, una resección intestinal previa (NSTR: 62,5% vs. STR: 20,6%, $p=0,001$) y con un CDAI basal aumentado (NSTR: 235,5 (149,3-310,0) vs. STR: 91,2 U.I. (54,9-166,0), $p=0,000$) se asociaron positivamente con una NSTR.

Resultados

Tabla 8. Relación entre las características demográficas y clínicas y la respuesta del paciente de EC a la terapia anti-TNF. Análisis univariante para pacientes con respuesta primaria (STR) y pacientes sin respuesta primaria (NSTR).

| Variable | Valores perdidos | NSTR (16) | STR (97) | OR (95% IC) | p |
|---|------------------|------------------|------------------|----------------------------|---------------|
| Género (% , H) | - | 11 (68,8%) | 53 (54,6%) | 0,5 (0,2-1,7) | 0,296 |
| Edad (años, media ± DE) | - | 53,5 (43,0-59,3) | 39,0 (27,5-50,0) | 1,1 (1,0-1,1) | 0,009* |
| Tabaco | 8 (7,1%) | | | | |
| Sí | | 9 (69,2%) | 46 (50,0%) | 1 (Ref.) | |
| No | | 4 (30,8%) | 32 (34,8%) | 0,6 (0,2-2,3) | 0,486 |
| Exfumador | | 0 (0,0%) | 14 (15,2%) | 0,0 (0,0-) | 0,999 |
| Anti-TNF | - | | | | |
| Infliximab/Biosimilar (%) | | 9 (56,3%) | 48 (49,5%) | 1 (Ref.) | |
| Adalimumab (%) | | 7 (43,8%) | 49 (50,5%) | 0,8 (0,3-2,2) | 0,617 |
| Indicación del tratamiento | - | | | | |
| Enfermedad luminal (%) | | 15 (93,8%) | 84 (86,6%) | 1 (Ref.) | |
| Enfermedad perianal (%) | | 1 (6,3%) | 8 (8,2%) | 0,7 (0,1-6,0) | 0,745 |
| Enfermedad luminal y perianal (%) | | 0 (0,0%) | 5 (5,2%) | 0,0 (0,0-) | 0,999 |
| Tratamiento concomitante | - | | | | |
| Ninguno (%) | | 2 (12,5%) | 17 (17,5%) | 1 (Ref.) | |
| Azatioprina (%) | | 13 (81,3%) | 74 (76,3%) | 1,5 (0,3-7,2) | 0,619 |
| Metotrexato (%) | | 0 (0,0%) | 3 (3,1%) | 0,0 (0,0-) | 0,999 |
| Otros (%) | | 1 (6,3%) | 3 (3,1%) | 2,8 (0,2-42,0) | 0,449 |
| Corticoides durante la inducción (%) | - | 8 (50,0%) | 16 (16,5%) | 5,1 (1,7-15,5) | 0,004* |
| IMC basal (kg/m ²) | 10 (8,8%) | 23,0 (20,8-24,9) | 22,4 (20,5-26,0) | 1,0 (0,8-1,1) | 0,838 |
| Tiempo desde el diagnóstico (años, mediana [IQR]) | 8 (7,1%) | 22,0 (2,5-26,0) | 4,0 (1,0-13,0) | 1,1 (1,0-1,2) | 0,006* |
| Clasificación Montreal - Edad | 11 (9,7%) | | | | |
| A1 < 17 (%) | | 0 (0,0%) | 7 (7,8%) | 1 (Ref.) | |
| A2 17-40 (%) | | 9 (75,0%) | 64 (71,1%) | 2,3x10 ⁸ (0,0-) | 0,999 |
| A3 >40 (%) | | 3 (25,0%) | 19 (21,1%) | 2,6x10 ⁸ (0,0-) | 0,999 |

Resultados

| Variable | Valores perdidos | NSTR (16) | STR (97) | OR (95% IC) | p |
|--|------------------|---------------------|---------------------|----------------|---------------|
| Localización | 3 (2.7%) | | | | |
| L1 Ileal (%) | | 8 (53.3%) | 39 (41.1%) | 1 (Ref.) | |
| L2 Cólico (%) | | 1 (6.7%) | 16 (16.8%) | 0,3 (0,0-2,6) | 0,281 |
| L3 Ileocólico (%) | | 6 (40,0%) | 37 (38,9%) | 0,8 (0,3-2,5) | 0,689 |
| L4 Localización aislada de tramo superior (%) | | 0 (0,0%) | 3 (3,2%) | 0,0 (0,0-) | 0,999 |
| Comportamiento | 8 (7,1%) | | | | |
| Inflamatorio (%) | | 5 (38,5%) | 56 (60,9%) | 1 (Ref.) | |
| Estenosante (%) | | 1 (7,7%) | 16 (17,4%) | 0,7 (0,1-6,4) | 0,753 |
| Fistulizante (%) | | 7 (53,8%) | 18 (19,6%) | 4,4 (1,2-15,4) | 0,023* |
| Estenosante y fistulizante (%) | | 0 (0,0%) | 2 (2,2%) | 0,0 (0,0-) | 0,999 |
| EPA (Sí, %) | 1 (0,9%) | 2 (12,5%) | 32 (33,3%) | 0,3 (0,1-1,3) | 0,111 |
| MEI (Sí, %) | 8 (7,1%) | 2 (15,4%) | 14 (15,2%) | 1,0 (0,2-5,1) | 0,987 |
| Apendicetomía (Sí, %) | 8 (7,1%) | 1 (7,7%) | 8 (8,7%) | 0,9 (0,1-7,6) | 0,904 |
| Resección intestinal previa (Sí, %) | - | 10 (62,5%) | 20 (20,6%) | 6,4 (2,1-19,8) | 0,001* |
| Cirugía perianal previa (Sí, %) | - | 0 (0,0%) | 18 (18,6%) | 0,0 (0,0-) | 0,998 |
| CDAI basal (UI, media ± [IQR]) | - | 235,5 (149,3-310,0) | 91,2 (54,9-166,0) | 1,0 (1,0-1,0) | 0,000* |
| Hemoglobina basal (g/L media ± DE) | 9 (8,0%) | 12,7 ± 1,0 | 13,0 ± 1,5 | 0,8 (0,6-1,3) | 0,384 |
| Leucocitos basales (10 ³ /mL, mediana, IQR) | 9 (8,0%) | 7,5 (5,5-11,7) | 7,6 (5,6-10,4) | 1,1 (0,9-1,2) | 0,561 |
| Plaquetas basales (10 ³ /mL, mediana, IQR) | 10 (8,8%) | 304,0 (223,0-356,5) | 312,5 (263,5-363,5) | 1,0 (1,0-1,0) | 0,235 |
| Albumina basal (g/dL, media ± SD) | 22 (19.5%) | 4.0 ± 0.4 | 4.0 ± 0.5 | 0.9 (0.2-3.8) | 0.940 |
| Ferritina basal (ng/mL, mediana, IQR) | 19 (16.8%) | 119.5 (51.2-187.3) | 55.0 (26.0-114.9) | 1.0 (1.0-1.0) | 0.449 |
| PCR basal (mg/L, mediana, IQR) | 14 (12.4%) | 2.3 (0.6-3.4) | 4.4 (0.6-14.6) | 1.0 (0.9-1.0) | 0.253 |
| VSG basal (mm/h, mediana, IQR) | 34 (30.1%) | 35.0 (10.8-85.8) | 27.0 (11.0-37.0) | 1.0 (1.0-1.0) | 0.121 |
| ENOA basal (µg/mg proteína) | 1 (0.9%) | 0.1 (0.0-0.2) | 0.1 (0.0-0.2) | 0.1 (0.0-4.7) | 0.199 |
| VINC basal (pg/mg proteína) | - | 0.8 (0.2-1.2) | 1.2 (0.6-2.0) | 0.7 (0.4-1.2) | 0.171 |

STR, respuesta primaria; NSTR, no respuesta primaria; OR, razón de probabilidades; IC, intervalo de confianza; DE, desviación estándar; IQR, rango intercuartílico; IMC, índice de masa corporal; Clasificación Montreal - Edad, Edad al diagnóstico; EPA, enfermedad perianal; MEI, manifestaciones extraintestinales; CDAI, índice de actividad de la enfermedad de Crohn; PCR, proteína C reactiva; VSG, velocidad de sedimentación globular; ENOA, alfa-enolasa; VINC, vinculina.

5.1.2 Proteómica

De las 300 proteínas cuantificadas en el análisis proteómico, identificamos 18 de ellas como potenciales biomarcadores de respuesta primaria al tratamiento anti-TNF (cambio de expresión $\geq 2,4$ y significación estadística por prueba t con $p \leq 0,01$) (Tabla 9).

Tabla 9. Proteínas expresadas diferencialmente entre los grupos de pacientes de EC con STR y NSTR. Número de identificación de la proteína (ID, base UniProt); abreviatura que la identifica; valor de probabilidad (p); valor del cambio de expresión de la proteína en el grupo STR respecto al grupo NSTR (FC); proceso(s) biológico en el que participa; función molecular.

| ID | Proteína | p | FC | Proceso biológico | Función molecular |
|--------|----------|--------|-----|--|-------------------------------|
| P06733 | ENOA | 0,0001 | 3,9 | Glucólisis/ Activación de plasminógeno/ Regulación de la transcripción | Unión ADN/ Liasa/ Represor |
| P18206 | VINC | 0,0007 | 4,6 | Adhesión celular/ Citoesqueleto Hemostasis/ Función Plaquetaria | Unión actina |
| O00151 | PDLI1 | 0,0013 | 2,4 | Adhesión celular/ Citoesqueleto | Unión actina |
| P52566 | GDIR2 | 0,0013 | 4,9 | Adhesión celular/ Citoesqueleto | GTPasa |
| Q15942 | ZYX | 0,0014 | 5,5 | Adhesión celular/ Citoesqueleto | Unión metales / Unión RNA |
| P04075 | ALDOA | 0,0021 | 3,3 | Glicólisis/ Adhesión celular/ Citoesqueleto/ Hemostasis/ Función Plaquetaria | Unión actina / Aldolasa |
| P26038 | MOES | 0,0023 | 2,5 | Adhesión celular/ Citoesqueleto/ Hemostasis/ Función plaquetaria | Unión actina |
| P78417 | GSTO1 | 0,0025 | 3,2 | Respuesta inflamatoria | Oxidorreductasa / Transferasa |
| P12814 | ACTN1 | 0,0025 | 3,2 | Adhesión celular/ Citoesqueleto/ Hemostasis/ Función plaquetaria | Unión actina |
| P37802 | TAGL2 | 0,0027 | 6,4 | Adhesión celular/ Citoesqueleto/ Hemostasis/ Función plaquetaria | Unión cadherina |
| O95810 | SDPR | 0,0027 | 4,2 | Adhesión celular/ Citoesqueleto/ Hemostasis/ Función plaquetaria | Unión lípidos |
| P50395 | GDIB | 0,0028 | 3,0 | Respuesta inflamatoria | GTPasa |
| P23528 | COF1 | 0,0029 | 3,0 | Adhesión celular/ Citoesqueleto/ Hemostasis/ Función plaquetaria | Unión actina |
| P26447 | S10A4 | 0,0031 | 3,3 | Adhesión celular / Citoesqueleto / Respuesta inflamatoria | Unión actina |
| Q15404 | RSU1 | 0,0037 | 3,9 | Adhesión celular / Citoesqueleto | Regulación actividad GTPasa |
| P08567 | PLEK | 0,0048 | 5,7 | Adhesión celular/Citoesqueleto /Hemostasis/Función plaquetaria | Unión proteínas |
| P63104 | 1433Z | 0,0078 | 4,2 | Adhesión celular / Citoesqueleto | Unión proteínas |
| P60174 | TPIS | 0,0093 | 3,6 | Glucólisis | Isomerasa/ Liasa |

El análisis funcional de las proteínas demostró que 17 de las 18 identificadas están reguladas por acetilación. De todas ellas, 14 proteínas participan en la hemostasia y la función plaquetaria y están relacionadas con la adhesión celular y el citoesqueleto, 3 proteínas regulan la respuesta inflamatoria, y otras 3 están relacionadas con la glucólisis (Tabla 9). A continuación, se describen brevemente las funciones y procesos biológicos en los que participan las proteínas seleccionadas, según se refleja en las base de datos Uniprot:

- ENOA (Alfa-enolasa) se trata de una es una enzima glicolítica que cataliza la conversión de 2-fosfoglicerato en fosfoenolpiruvato, además de la glucólisis, participa en diversos procesos como el control del crecimiento, la tolerancia a la hipoxia y las respuesta alérgica. También interviene en el sistema fibrinolítico intravascular y pericelular gracias a su capacidad para servir como receptor y activador del plasminógeno en la superficie celular de varios tipos de células, como leucocitos y neuronas. Asimismo, estimula la producción de inmunoglobulinas.

- VINC (Vinculina) es una proteína de unión al filamento de actina (actina F), implicada en la adhesión a la matriz celular y adhesión célula-célula. Regula la expresión de E-cadherina y potencia la detección mediante el complejo E-Cadherina. También puede estar implicada en funciones importantes para la morfología y la locomoción celular (99).

- PDLI1 (proteína 1 de dominio PDZ y LIM) es una proteína del citoesqueleto celular que puede actuar como un adaptador para unir otras proteínas al propio citoesqueleto. Participa en el ensamblaje y desensamblaje y direccionamiento de fibras de estrés en fibroblastos. Es necesario para la localización de ACTN1 y PALLD en las fibras de estrés y para la migración celular y el mantenimiento de la polaridad celular de los fibroblastos.

- GDIR2 (Inhibidor de disociación Rho GDP 2) regula la reacción de intercambio GDP/GTP de las proteínas Rho, inhibiendo la disociación del GDP y la posterior unión del GTP a ellas. Regula la reorganización del citoesqueleto de actina mediada por los miembros de la familia Rho(100).

- ZYX (Zyxin) se trata de una proteína de la placa de adhesión. Se une a la alfa-actina y a la proteína C reactiva. Tiene un papel importante para dirigir a los miembros de la familia TES y ENA/VASP a adherencias focales y para la formación de las estructuras

ricas de actina. Se posiciona como un componente de la vía de transducción de señales que media en los cambios estimulados por la adhesión en la expresión genética.

- ALDOA (Fructosa-bisfosfato aldolasa A) juega un papel clave en la glucólisis y en la gluconeogénesis. Convierte la fructosa-1,6-bisfosfato a fosfato de dihidroxiacetona y gliceraldehído-3-fosfato. También tiene función como proteína de andamiaje.

- MOES (Moesina) es una proteína de la familia ezrin-radixin-moesin que conecta el citoesqueleto de actina con la membrana plasmática, regulando así la estructura y función de los dominios específicos de la corteza celular. Interacciona con el citoesqueleto de actina, produciendo su reordenamiento que da lugar a múltiples procesos celulares como la determinación de la forma celular, el transporte de membrana y la transducción de señales. Actúa sobre la homeostasis y la autotolerancia de las células T y B, regulando la salida de linfocitos de los órganos linfoides. Modula la biogénesis fagolisosomal en macrófagos. Participa también en la formación de sinapsis inmunológicas (101).

- GSTO1 (Glutación S-transferasa omega-1) muestra actividades de tior transferasa y deshidroascorbato reductasa dependientes de glutación. Participa en la biotransformación de arsénico inorgánico y reduce el ácido monometilarsónico y el ácido dimetilarsónico.

- ACTN1 (Alfa-actinina-1) es una proteína agrupadora que pertenece a la superfamilia de proteínas reticulantes de actina filamentosa (actina F) se cree que se ancla a la actina y a otras estructuras intracelulares.

- TAGL2 (Transgelin-2) se cree que ejerce función de supresión en tumores, pero aún no se ha determinado su función específica.

- SDPR (Proteína de respuesta a la privación de suero o Cavina-2) participa en la formación de caveolas, que son pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática con la morfología característica en forma de matraz y que participan en diversos procesos celulares, incluida la endocitosis.

- GDIB (Inhibidor de disociación de Rab GDP beta) se trata de un inhibidor de la disociación del GDP que previene el intercambio de GDP a GTP de la mayoría de las proteínas Rab. Al mantener estas pequeñas GTPasas en su forma inactiva unida al PIB, se regula el tráfico de la membrana intracelular. También regula negativamente el

transporte de proteínas al cilio y la ciliogénesis mediante la inhibición de RAB8A (Ras-related protein Rab-8A).

- COF1 (Cofilina-1) es una proteína clave en la regulación de la polimerización de actina y ciclo de despolimerización. Desempeña un papel importante para la progresión de los cigotos durante las primeras divisiones celulares, a través de la regulación de la dinámica de la actina.

- S10A4 (Proteína S100-A4) se trata de un cotransportador de sodio/bicarbonato que juega un papel importante en la regulación del pH intracelular, realiza esta función a cambio de cloruro intracelular. Controla el pH neuronal y puede contribuir a la secreción de líquido cefalorraquídeo. Reduce la excitabilidad de las neuronas piramidales CA1 y modula la plasticidad sináptica a corto plazo. Es necesario en las células de la retina para mantener el pH necesario para una visión normal. En el riñón también está posicionado como un recuperador de bicarbonato.

- RSU1 (Proteína supresora de ras 1) desempeña un papel importante en la vía de transducción de señales Ras. Capaz de suprimir la transformación de V-Ras in vitro.

- PLEK (Pleckstrina) es el sustrato principal de la proteína C quinasa de las plaquetas.

- 1433Z (Proteína 14-3-3 zeta/delta) es una proteína adaptadora implicada en la regulación de un amplio espectro de vías de señalización especializadas (102). Se une a un gran número de proteínas, generalmente por reconocimiento de un motivo de fosfoserina o fosfotreonina.

- TPIS (Triosafosfato isomerasa) es una enzima metabólica que cataliza la conversión entre fosfato de dihidroxiacetona y D-gliceraldehído-3-fosfato en la glucólisis y gluconeogénesis. También está relacionada con el metabolismo de los lípidos a través de la alternancia de glicerol-3-fosfato y la vía de las pentosas.

5.1.3 Validación de ENOA y VINC como potenciales marcadores de respuesta primaria

Para validar los resultados de proteómica mediante ELISA, se seleccionaron las proteínas ENOA y VINC por su alto nivel de significación (Tabla 9). De acuerdo con los resultados obtenidos en la cohorte total de pacientes, ambas proteínas mostraron un

aumento en plasma en el grupo STR, aunque dicho incremento no fue significativo. Sin embargo, en el caso de la VINC hubo una tendencia hacia la significación estadística (NSTR: 0.8 (0.2-1.2) vs. STR: 1.2 (0.6-2.0), $p=0.054$) (Tabla 8 y Figura 16).

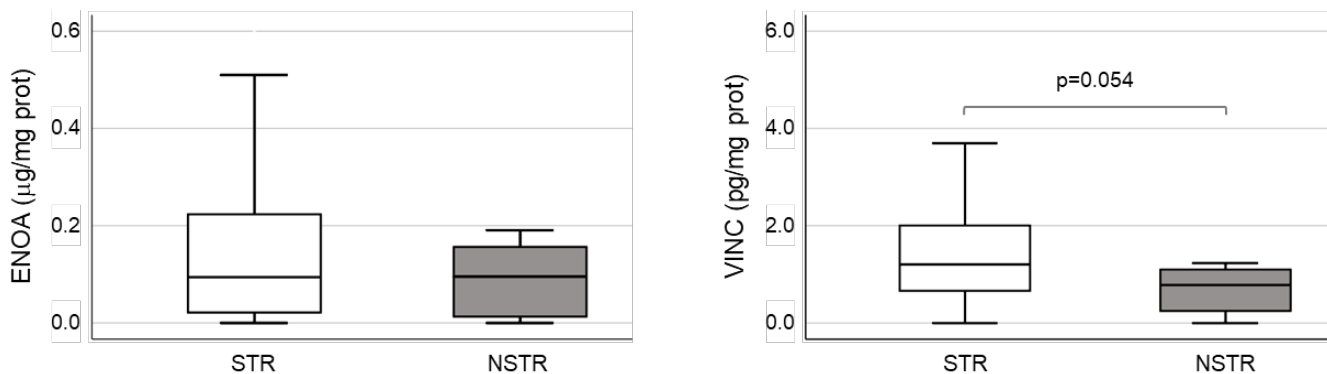


Figura 16. Validación de los resultados de proteómica. Cuantificación de la concentración plasmática de alfa-enolasa (ENOA) y vinculina (VINC) por ELISA. El tamaño de la muestra fue de 97 para el grupo de respuesta primaria (STR) y 16 para el grupo de no STR (NSTR).

5.1.4 Valor pronóstico de ENOA y VINC en la respuesta primaria

A continuación, se analizó el valor de los parámetros clínicos y patológicos para predecir la respuesta del paciente de EC al tratamiento con anti-TNF. La edad [OR: 1,1 (1,0-1,1), $p=0,009$], la duración de la enfermedad [OR: 1,1 (1,0-1,2), $p=0,006$], el CDAI basal [OR: 1,0 (1,0-1,0), $p=0,000$], la administración concomitante de corticoides durante la inducción [OR: 5,1 (1,7-15,5), $p=0,004$] y la resección intestinal previa [OR: 6,4 (2,1-19,8), $p=0,001$] se identificaron como factores independientes de NSTR (Tabla 8). En un análisis multivariante, el tratamiento concomitante con corticoides [OR: 8,6 (1,7-43,4), $p=0,009$], la resección intestinal previa [OR: 10,5 (2,1-52,0), $p=0,004$] y el CDAI basal [OR: 1,0 (1,0-1,0), $p=0,003$] se mantuvieron como factores predictivos de NSTR (Tabla 10). La inclusión en el análisis de los niveles plasmáticos de VINC basales incrementó el valor predictivo del modelo (Tabla 10). El modelo ajustado obtuvo un buen valor discriminante [AUC (95% IC) = 0,919 (0,862-0,977)] (Tabla 11 y Figura 17).

Tabla 10. Análisis multivariante para predecir fallo primario a la terapia anti-TNF en la EC.

| | OR (95% IC) | p | OR (95% IC) | p |
|---|-----------------|--------|-----------------|--------|
| Valores perdidos | 9 | | 10 | |
| Edad (años) | - | - | - | - |
| Corticoides durante la inducción (%) | 8,6 (1,7-43,5) | 0,009* | 14,4 (2,6-77,7) | 0,002* |
| Duración de la Enfermedad (años) | - | - | - | - |
| Resección intestinal (%) | 10,5 (2,1-52,0) | 0,004* | 14,8 (2,8-78,0) | 0,001* |
| CDAI basal (AU) | 1,0 (1,0-1,0) | 0,003* | 1,0 (1,0-1,0) | 0,002* |
| VINC basal (pg/mg proteína) | | | 0.5 (0.3-0.9) | 0.032* |

Tabla 11. Área bajo la curva del modelo multivariante de la figura 17. La tabla muestra la comparación del área bajo la curva obtenida para cada uno de los parámetros individuales incluidos en el modelo ajustado. Se muestran los datos del modelo ajustado considerando o no la inclusión de VINC.

| Variable | AUC | p | 95% IC |
|------------------------------------|-------|--------|---------------|
| VINC basal (pg/mg) | 0,651 | 0,054 | (0,500-0,802) |
| Corticoides en la inducción | 0,668 | 0,032* | (0,511-0,824) |
| Resección Intestinal | 0,709 | 0,007* | (0,562-0,857) |
| Puntuación CDAI | 0,829 | 0,000* | (0,718-0,940) |
| Modelo ajustado (sin VINC) | 0,904 | 0,000* | (0,838-0,970) |
| Modelo ajustado (con VINC) | 0,919 | 0,000* | (0,862-0,977) |

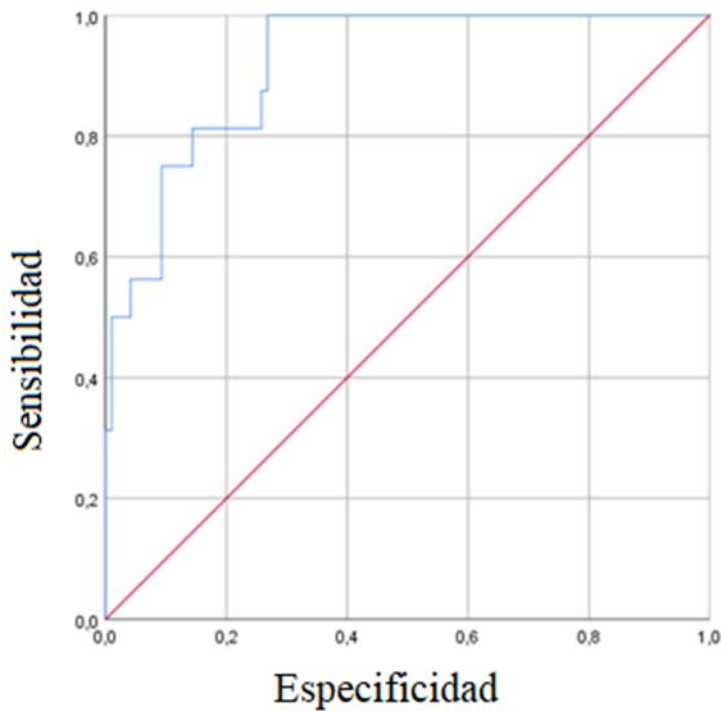


Figura 17. Curva ROC del modelo propuesto para predecir la respuesta primaria al tratamiento anti-TNF en pacientes con EC. La curva muestra como el modelo de regresión puede predecir la respuesta primaria de los pacientes de EC a la terapia biológica a partir de los niveles plasmáticos de VINC en combinación con las características clínicas descritas.

5.2 Enfermedad de Crohn. Respuesta secundaria al tratamiento anti-TNF

A los 12 meses de seguimiento tras el inicio del tratamiento con anti-TNF, los pacientes fueron reagrupados considerando el mantenimiento o la pérdida de respuesta a la terapia biológica a largo plazo. De esta forma, se generaron los grupos de respuesta sostenida o respuesta secundaria (grupo LTR, acrónimo del inglés “*Long Term Remission*”; n=75) y de pérdida de respuesta secundaria (NLTR, del inglés “*No Long Term Remission*”; n=38), que fueron comparados de nuevo entre sí.

5.2.1 Análisis de los factores clínicos y demográficos

Al reagrupar a los pacientes con EC en función de la respuesta al tratamiento a los 12 meses del inicio del mismo, el 66,4% mostró respuesta secundaria y el 33,6% restante pérdida de respuesta. En la Tabla 12 se recogen las características demográficas y clínicas basales de los pacientes de cada grupo, LTR y NLTR. Al igual que con la respuesta primaria, no observamos diferencias significativas relativas a la respuesta al tratamiento en función de la terapia biológica administrada. Además, la pérdida de respuesta secundaria se asoció nuevamente a una evolución más larga de la enfermedad (NLTR: 12,0 (4,0-21,2) vs. LTR: 3,0 (1,0-13,0); $p=0,011$), una mayor actividad de la EC al inicio del tratamiento (NLTR: 149,2 (69,1-230,3) vs. LTR: 90,4 (50,5-152,7); $p=0,006$) y haber sufrido, al menos, una resección intestinal previa (NLTR: 39,5% vs. LTR: 20%; $p=0,041$) (Tabla 12).

En esta ocasión, al medir la concentración plasmática basal de ambas proteínas seleccionadas, ENOA (NLTR: 0,1 (0,0-0,2) vs. LTR: 0,1 (0,0-0,3); $p=0,031$) y VINC (NLTR: 0,9 (0,4-1,9) vs. LTR: 1,4 (0,9-2,1); $p=0,002$), observamos un incremento significativo en el grupo de pacientes LTR respecto al grupo NLTR (Figura 18). Este resultado coincidía el obtenido previamente mediante proteómica al comparar los grupos de pacientes de respuesta primaria.

Tabla 12. Relación entre las características demográficas y clínicas y la respuesta secundaria del paciente de EC a la terapia anti-TNF. Análisis univariante para pacientes con respuesta secundaria (LTR) y pacientes sin secundaria (NLTR).

| Variable | Valores perdidos | NLTR (38) | LTR (75) | OR (95% IC) | p |
|---|------------------|-----------------|----------------|----------------|---------------|
| Género (% , H) | - | 21 (56,8%) | 42 (56 %) | 0,9 (0,4-2,0) | 0,848 |
| Edad (años, mediana [IQR]) | - | 45 (30,8-54,3) | 39 (27-50) | 1,0 (1,0-1,1) | 0,096 |
| Tabaco | 8 (7,1 %) | | | | |
| Sí | | 9 (27,3 %) | 27 (37,5 %) | 1 (Ref.) | |
| No | | 21 (63,6 %) | 34 (47,2%) | 1,2 (0,3-5,4) | 0,791 |
| Exfumador | | 3 (9,1%) | 11 (15,3 %) | 2,3 (0,6-9,1) | 0,248 |
| Anti-TNF | - | | | | |
| Infliximab/Biosimilar (%) | | 20 (52,6%) | 37 (49,3%) | 1 (Ref.) | |
| Adalimumab (%) | | 18 (47,4%) | 38 (50,7%) | 0,9(0,4-1,9) | 0,740 |
| Indicación del tratamiento | - | | | | |
| Enfermedad luminal (%) | | 31 (81,6%) | 68 (90,7%) | 1 (Ref.) | |
| Enfermedad perianal (%) | | 6 (15,8%) | 3 (4%) | 4,4 (1,0-18,7) | 0,046 |
| Enfermedad luminal y perianal (%) | | 1 (2,6%) | 4 (5,3%) | 0,55 (0,1-5,1) | 0,598 |
| Tratamiento concomitante | - | | | | |
| Ninguno (%) | | 6 (15,8%) | 13 (17,3 %) | 1 (Ref.) | |
| Azatioprina (%) | | 30 (78,9%) | 57 (76 %) | 1,1 (0,4-3,3) | 0,809 |
| Metotrexato (%) | | 1 (2,6%) | 2 (2,7 %) | 1,1 (0,8-14,4) | 0,952 |
| Otros (%) | | 1 (2,6%) | 3 (4%) | 0,7 (0,1-8,5) | 0,722 |
| Corticoides durante la inducción (%) | - | 9 (23,7 %) | 15 (20%) | 1,2 (0,5-3,2) | 0,651 |
| IMC basal (kg/m ²) | 10 (8,8%) | 24,4 (4,0) | 22,9 (3,8) | 1,1 (1,0-1,2) | 0,072 |
| Tiempo desde el diagnóstico (años, mediana [IQR]) | 8 (7,1%) | 11,9 (3,0-20,5) | 3,0 (1,0-13,0) | 1,1 (1,0-1,1) | 0,018* |
| Clasificación Montreal - Edad | 11 (9,7 %) | | | | |
| A1 < 17 (%) | | 3 (9,4 %) | 4 (5,7%) | 1 (Ref.) | |
| A2 17-40 (%) | | 23 (71,9 %) | 50 (71,4%) | 0,6 (0,1-3,0) | 0,543 |
| A3 >40 (%) | | 6 (18,8 %) | 16 (22,9%) | 0,5 (0,1-3,0) | 0,442 |

Resultados

| Variable | Valores perdidos | NLTR (38) | LTR (75) | OR (95% IC) | p |
|--|------------------|---------------------|---------------------|---------------|---------------|
| Clasificación Montreal - Localización | 3 (2,7 %) | | | | |
| L1 Ileal (%) | | 19 (51,4%) | 28 (38,4%) | 1 (Ref.) | |
| L2 Cólico (%) | | 7 (18,9%) | 10 (13,7%) | 1,0 (0,3-3,2) | 0,957 |
| L3 Ileocólico (%) | | 11 (29,7 %) | 32 (43,8%) | 0,5 (0,2-1,2) | 0,138 |
| L4 Aislada de tramo superior (%) | | 0 | 3 (4,1%) | 0 (0,0-) | 0,999 |
| Comportamiento | 8 (7,1%) | | | | |
| Inflamatorio (%) | | 15 (44,1%) | 46 (64,8 %) | 1 (Ref.) | |
| Estenosante (%) | | 6 (17,6%) | 11 (15,5%) | 1,7 (0,5-5,3) | 0,382 |
| Fistulizante (%) | | 13 (38,2%) | 12 (16,9%) | 3,3 (1,3-8,8) | 0,016* |
| Estenosante y fistulizante (%) | | 0 | 2 (2,8%) | 0 (0,0-) | 0,999 |
| Enfermedad Perianal (Sí, %) | 1 (0,9 %) | 15 (39,5%) | 19 (25,7%) | 0,5 (0,2-1,2) | 0,135 |
| Manifestaciones extraintestinales (Sí, %) | 8 (7,1%) | 4 (12,1%) | 12 (16,7%) | 0,7 (0,2-2,3) | 0,549 |
| Apendicetomía (Sí, %) | 8 (7,1 %) | 4 (12,1%) | 5 (6,9%) | 1,9 (0,5-7,4) | 0,385 |
| Resección intestinal previa (Sí, %) | - | 15 (39,5%) | 15 (20%) | 2,6 (1,1-6,2) | 0,029* |
| Cirugía perianal previa (Sí, %) | - | 9 (23,7%) | 9 (12%) | 2,3 (0,8-6,3) | 0,115 |
| CDAI basal (UI, media ± [IQR]) | - | 157,5 (77,8-233,8) | 90,3 (52-158,0) | 1,0 (1,0-1,0) | 0,011* |
| Hemoglobina basal (g/L media ± DE) | 9 (8,0%) | 13,1 (1,4) | 12,9 (1,5) | 1,1 (0,8-1,5) | 0,516 |
| Leucocitos basales (10 ³ /μL, mediana, IQR) | 9 (8,0%) | 7,2 (6,4-10,7) | 7,6 (4,8-10,4) | 1,0 (0,9-1,2) | 0,637 |
| Plaquetas basales (10 ³ /μL, mediana, IQR) | 10 (8,8%) | 325,0 (245,5-376,0) | 300,5 (267,8-354,0) | 1,0 (1,0-1,0) | 0,872 |
| Albumina basal (g/dL, media ± DE) | 22 (19,5%) | 4,0 (3,8-4,4) | 4,0 (3,6-4,4) | 1,8 (0,6-5,0) | 0,271 |
| Ferritina basal (ng/mL, mediana, IQR) | 19 (16,8%) | 82,8 (35,5-152,8) | 50,9 (22,6-113,6) | 1,0 (1,0-1,0) | 0,877 |
| CRP basal (mg/L, mediana, IQR) | 14 (12,4 %) | 2,8 (0,8-12,1) | 4,6 (0,6-14,3) | 1,0 (1,0-1,0) | 0,306 |
| ESR basal (mm/h, mediana, IQR) | 34 (30,1 %) | 30,0 (12,5-60,5) | 26,0 (10,0-26,0) | 1,0 (1,0-1,0) | 0,047 |
| ENOA basal (μg/mg proteína) | 1 (0,9 %) | 0,1 (0,0-0,1) | 0,1 (0,0-0,2) | 0,1 (0,0-1,4) | 0,085 |
| VINC basal (pg/mg proteína) | - | 0,8 (0,2-1,5) | 1,2 (0,8-2,1) | 0,7 (0,5-1,0) | 0,038* |

LTR, respuesta sostenida; NLTR, no respuesta sostenida; IMC, índice de masa corporal; CDAI, índice de actividad de la enfermedad de Crohn; PCR, proteína C reactiva; VSG: velocidad de sedimentación globular; ENOA, alfa-enolasa; VINC, vinculina; OR, razón de probabilidades; IC, intervalo de confianza; DE, desviación estándar; IQR, rango intercuartílico; Clasificación Montreal - Edad, Edad al diagnóstico.

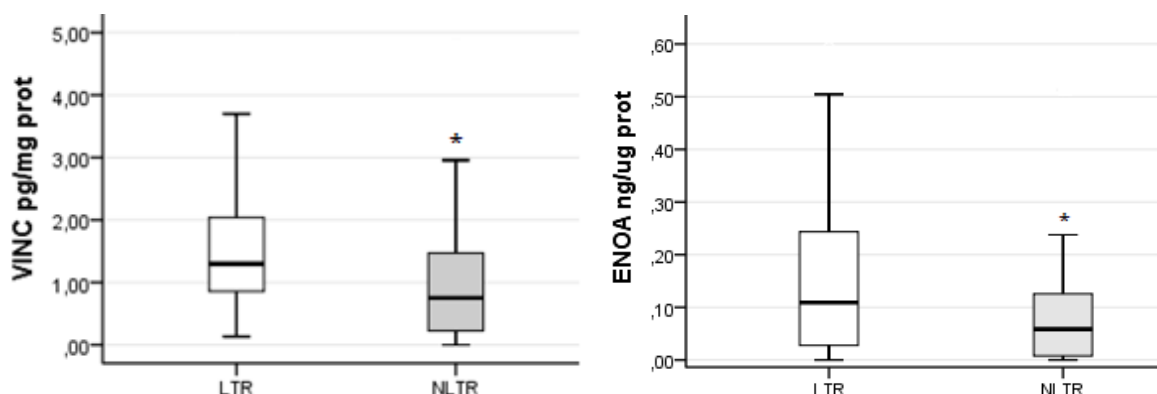


Figura 18. Validación de ENOA y VINC en la respuesta secundaria al tratamiento anti-TNF. Cuantificación de la concentración plasmática de ENOA y VINC por ELISA. El tamaño muestral fue 75 para el grupo de respuesta secundaria (LTR) y 38 para el de no LTR (NLTR).

5.2.2 Valor pronóstico de ENOA y VINC en la respuesta secundaria

Al analizar los diferentes parámetros clínicos, observamos que la duración de la enfermedad [OR: 1,1 (1,0-1,1), $p=0,018$], el CDAI basal [OR: 1,0 (1,0-1,0), $p=0,011$] y la existencia de resección intestinal previa al tratamiento [OR: 2,6 (1,1-6,2), $p=0,029$] se mantenían como factores independientes de respuesta secundaria (Tabla 12). Asimismo, la concentración plasmática basal de VINC [OR: 0,7 (0,5-1,0), $p=0,038$], pero no de ENOA [OR: 0,1 (0,0-1,4), $p=0,085$], confirmó ser un predictor de respuesta sostenida al tratamiento. En el análisis multivariante, la concentración de VINC [OR: 0,7 (0,5-1,0), $p=0,031$] agregaría valor predictivo de respuesta secundaria, al modelo compuesto por la resección intestinal previa [OR: 2,9 (1,1-7,6), $p=0,026$] y el CDAI basal [OR: 1,0 (1,0-1,0), $p=0,040$]. La capacidad discriminante del modelo ajustado que incluye a estos tres factores fue discreta, aunque significativa estadísticamente [AUC (IC 95%) = 0,696 (0,592-0,800)] (Tabla 13) (Figura 18).

Tabla 13. Área Bajo Curva (AUC) del modelo multivariante propuesto para la respuesta secundaria al tratamiento anti-TNF en la EC. La tabla muestra la comparación del AUC obtenido para los parámetros individuales incluidos en el modelo ajustado.

| Variable | AUC | p | 95% IC |
|----------------------|-------|--------|-------------|
| Resección intestinal | 0,597 | 0,092 | 0,483-0,711 |
| Índice CDAI | 0,660 | 0,006* | 0,549-0,771 |
| VINC Basal (pg/mg) | 0,678 | 0,002* | 0,567-0,789 |
| Modelo ajustado | 0,696 | 0,001* | 0,592-0,800 |

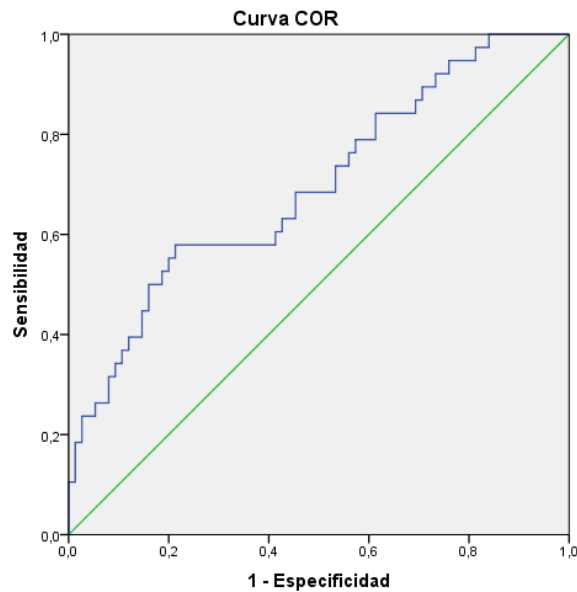


Figura 189. Curva ROC del modelo de regresión para predecir respuesta secundaria al tratamiento anti-TNF en la EC. El modelo combina los niveles plasmáticos de VINC con las características clínicas relacionadas con la actividad basal de la enfermedad y la presencia de resección intestinal previa.

5.3 Colitis Ulcerosa

5.3.1 Análisis de los factores clínicos y demográficos

En el caso de la CU, realizamos el análisis estadístico de los parámetros clínicos y demográficos obtenidos para los 24 pacientes incluidos en el estudio. De estos, el 33,3% presentó NSTR al tratamiento, fallando al mismo en los 3 primeros meses tras su inicio.

En la Tabla 14 se recogen las características clínicas basales de los pacientes de cada grupo. En relación con el tratamiento prescrito, un 91,6% de los pacientes inició tratamiento con infliximab o su biosimilar, un 4,2% recibió tratamiento con adalimumab y otro 4,2% recibió golimumab. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al tratamiento prescrito y la pérdida de respuesta al mismo. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos STR y NSTR cuando se analizaron el resto de las variables clínicas registradas (Tabla 14).

Tabla 14. Relación entre las características demográficas y clínicas y la respuesta primaria del paciente con CU a la terapia anti-TNF. Análisis estadístico entre los grupos STR y NSTR.

| Variable | Valores perdidos | NSTR (8) | STR (16) | p |
|---|------------------|----------------|----------------|-------|
| Genero (% , H) | - | 3 (37,5%) | 11 (68,8%) | 0,204 |
| Edad (años, media \pm DE) | - | 4,6 \pm 5,0 | 4,8 \pm 5,5 | 0,975 |
| Tabaco (%) | - | | | 0,339 |
| No | | 5 (62,5%) | 9 (56,3%) | |
| Sí | | 1 (12,5%) | 0 (0,0%) | |
| Exfumador | | 2 (25,0%) | 7 (43,8%) | |
| Anti-TNF (%) | - | | | 0,283 |
| Infliximab/ Infliximab biosimilar | | 7 (87,5%) | 15 (93,8%) | |
| Adalimumab | | 1 (12,5%) | 0 (0,0%) | |
| Golimumab | | 0 (0,0%) | 1 (6,3%) | |
| 0 | - | | | 1,000 |
| Colitis ulcerosa grave | | 6 (75,0%) | 13 (81,3%) | |
| Enfermedad crónicamente activa | | 2 (25,0%) | 3 (18,8%) | |
| Tratamiento concomitante (%) | 3 (12,5%) | | | 0,564 |
| Azatioprina | | 1 (12,5%) | 1 (7,7%) | |
| Mesalazina | | 3 (37,5%) | 8 (61,5%) | |
| Ambos | | 4 (50,0%) | 4 (30,8%) | |
| Corticoides durante la inducción (Sí) (%) | - | 2 (25%) | 7 (43,8%) | 0,657 |
| IMC basal (Kg/m2) | 4 (16,7%) | 23,4 \pm 4,7 | 24,9 \pm 5,4 | 0,502 |
| Tiempo desde el diagnóstico (años, mediana [IQR]) | - | 3,0 (1,0-3,0) | 3,5 (0,0-6,8) | 0,226 |

| Variable | Valores perdidos | NSTR (8) | STR (16) | <i>p</i> |
|--|------------------|------------------|-------------------|----------|
| Montreal al diagnóstico (%) | 1 (4,2%) | | | 1,000 |
| Proctitis | | 2 (28,6%) | 3 (18,8%) | |
| Colitis izquierda | | 3 (42,9%) | 7 (43,8%) | |
| Pancolitis | | 2 (28,6%) | 6 (37,5%) | |
| Mayo parcial (%) | - | | | 0,054 |
| Actividad leve-moderada | | 8 (100,0%) | 9 (56,3%) | |
| Actividad grave | | 0 (0,0%) | 7 (43,8%) | |
| Hemoglobina basal (g/L, media ± DE) | - | 12,8 ± 1,2 | 12,6 ± 1,3 | 0,696 |
| Leucocitos basal (10 ³ /mL, media ± DE) | - | 9,2 ± 3,1 | 8,5 ± 2,5 | 0,539 |
| Plaquetas basal (10 ³ /mL, media ± DE) | 1 (4,2%) | 361,3 ± 92,8 | 352,9 ± 104,3 | 0,852 |
| Albumina basal (g/dL, media ± DE) | 3 (12,5%) | 4,0 ± 0,3 | 3,7 ± 0,6 | 0,250 |
| Ferritina basal (ng/mL, mediana, IQR) | 2 (8,3%) | 31,3 (8,6-172,4) | 75,1 (37,5-136,8) | 0,145 |
| PCR basal (mg/L, mediana, IQR) | 1 (4,2%) | 2,2 (0,8-95,2) | 43,5 (14,9-71,3) | 0,135 |
| VSG basal (mm/h, media ± DE) | 7 (29,2%) | 30,4 ± 27,4 | 33,0 ± 27,9 | 0,851 |

STR, respuesta primaria; NSTR, no respuesta primaria; IMC, índice de masa corporal; PCR, proteína C reactiva; VSG: velocidad de sedimentación globular; DE, desviación estándar; IQR, rango intercuartílico.

5.3.2 Proteómica

A partir del análisis proteómico de las muestras de plasma de pacientes con CU de los grupos STR y NSTR, se cuantificaron un total de 260 proteínas. Tras el análisis estadístico de los resultados, fijando un cambio de expresión diferencial entre los grupos $\geq 2,4$ veces y una significación estadística para la prueba t con $p \leq 0,010$, seleccionamos un total de 10 proteínas como potenciales marcadores de respuesta primaria al tratamiento anti-TNF (Tabla 15). Debido a que no hemos conseguido una cohorte de pacientes suficientemente amplia, no hemos podido validar ninguna de las proteínas seleccionadas.

Tabla 15. Proteínas expresadas diferencialmente entre los grupos STR y NSTR de pacientes con CU. Se muestra la identidad y abreviatura de la proteína, valor de probabilidad (*p*), valor del cambio de expresión de la proteína en el grupo NSTR respecto al grupo STR (FC), proceso biológico en el que participa y función molecular.

| ID | Abrev. | <i>p</i> | FC | Proceso biológico | Función Molecular |
|--------|-----------------|----------|-------------|---|--------------------------------------|
| Q96PD5 | PGLYRP2 | 0,000 | 2,4 | Inmunidad | Hidrolasa |
| P01009 | SERPINA1 | 0,002 | -2,8 | Fase aguda/ Coagulación/ Hemostasis | Inhibidor proteasas |
| P02753 | RBP4 | 0,002 | 2,6 | Transporte | Unión retinol |
| P29622 | SERPINA4 | 0,003 | 2,8 | Inhibición endopeptidasas | Inhibidor proteasas |
| P48740 | MASP1 | 0,004 | 2,6 | Inmunidad/ Activación Complemento | Hidrolasa / Proteasa |
| P02745 | C1QA | 0,004 | 2,4 | Inmunidad/ Sistema del Complemento | Componente del Complemento |
| P05154 | SERPINA5 | 0,005 | 2,6 | Transporte lípidos/ Coagulación/ Hemostasis | Inhibidor proteasas / Unión heparina |
| P07477 | PRSS1 | 0,006 | -3,0 | Digestión | Hidrolasa / Proteasa |
| P08185 | SERPINA6 | 0,010 | 3,0 | Transporte glucocorticoides y progestinas | Unión lípidos y esteroides |
| P02747 | C1QC | 0,010 | 2,4 | Inmunidad/ Sistema del complemento | Componente del Complemento |

A continuación, describimos brevemente las funciones y procesos biológicos en los que participan las proteínas seleccionadas, según se recoge en la base de datos UniProt:

- PGLYR2 (N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa) puede participar como ‘*scavenger*’ a través de la digestión de peptidoglicanos biológicamente activos a fragmentos biológicamente inactivos. No tiene actividad bacteriolítica directa. Hidroliza la unión entre los residuos de N-acetilmuramoilo y los residuos de L-aminoácidos en ciertos glicopéptidos de la pared celular.

- SERPINA1 (Alfa-1-antitripsina) es un inhibidor de serina-proteasas. Su objetivo principal es la elastasa, pero también presenta afinidad por la plasmina y la trombina. Inhibe irreversiblemente la tripsina, la quimiotripsina y el activador del plasminógeno. La forma aberrante inhibe la síntesis de óxido nítrico inducida por insulina en plaquetas, disminuye el tiempo de coagulación y tiene actividad proteolítica frente a insulina y plasmina.

- RBP4 (Proteína de unión al retinol 4) es miembro de la familia de las lipocalinas y la principal proteína de transporte de retinol (vitamina A) en la sangre. Se encarga de movilizar las reservas de retinol del hígado hacia los tejidos periféricos. Transfiere el retinol a STRA6, que a su vez facilita su transporte a través de la membrana celular.

- SERPINA4 (Kalistatina) inhibe las actividades amidolítica y kininogenasa de la kalicreína tisular a través de la formación de un complejo. La heparina bloquea la formación de dicho complejo y, por tanto, su efecto inhibitor sobre la kalicreína tisular.

- MASP1 (Serina-proteasa-1 asociada a lectina de unión a manosa) es una proteasa clave que inicia la activación de la vía de las lectinas del sistema del complemento, que desempeña un papel clave en la inmunidad innata al reconocer y neutralizar patógenos a través de fracciones de azúcar. MASP1 es activada tras la unión de *mannan-binding lectin* (MBL) y ficolinas a los grupos de azúcar de los patógenos, favoreciendo la activación de MASP2 o C2, o incluso directamente de C3, componente clave del complemento. La isoforma 2 puede tener un efecto inhibitor sobre la activación de la vía de las lectinas o puede escindir IGFBP5 (*Insulin-like growth factor-binding protein* 5). También participa en el desarrollo.

- C1QA (Subunidad A del subcomponente C1q del Complemento) es un subcomponente que se asocia con las proenzimas C1r y C1s para generar C1, que es el primer componente del sistema del complemento sérico. C1q interactúa con el complejo C1r₂C1s₂ dependiente de Ca²⁺, dando lugar a la activación de C1 a través de la interacción de C1q con las regiones Fc de los anticuerpos IgG o IgM presentes en los complejos inmunes.

- SERPINA5 (Inhibidor de serina proteasa plasmática) es otro inhibidor irreversible de serina proteasa, dependiente de heparina. Está implicado en la regulación de las actividades proteolíticas intra- y extra-vasculares. En el plasma sanguíneo, desempeña funciones hemostáticas como factor procoagulante y proinflamatorio, al inhibir la acción y generación del factor de proteína C activado anticoagulante por el complejo trombina/trombomodulina. También actúa como factor anticoagulante al inhibir factores de coagulación sanguínea como la protrombina, factor XI, factor Xa, kalicreína y enzimas fibrinolíticas como los activadores del plasminógeno. También puede desempeñar un papel no inhibitor en plasma seminal y orina como transportador de hormonas hidrofóbicas mediante su unión al ácido retinoico.

Resultados

- PRSS1 (Serina proteasa 1), también referida como TRY1 o tripsinógeno, es una proteína sintetizada en el páncreas y relacionada con la digestión de los alimentos.
- SERPINA6 (Globulina de unión a corticosteroides) es la principal proteína de transporte de glucocorticoides y progestinas en la sangre de casi todas las especies de vertebrados.
- C1QC (Subunidad A del subcomponente C1q del Complemento) es otro subcomponente que forma parte del complejo C1q del sistema del complemento.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

En pacientes con EC, la no respuesta primaria al tratamiento es más frecuente en pacientes de mayor edad y con una evolución más larga de la enfermedad (103), dándole sentido a la estrategia terapéutica denominada “*top-down*”, basada en el uso precoz de biológicos, solos o en combinación, como terapia de primera línea cuando la EC es diagnosticada. En comparación, la estrategia “*step-up*” ofrece un riesgo de toxicidad sistémica relativamente menor, al proporcionar una intensificación gradual de la terapia ajustada a la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, esta estrategia tradicional podría retrasar la supresión inflamatoria de la mucosa intestinal en pacientes con un patrón más agresivo, provocando la intensificación de la actividad de la enfermedad y la resistencia a otros fármacos (104).

A pesar de la ventaja que podría ofrecer una estrategia “*top-down*”, el uso de biológicos no está libre de riesgos y efectos adversos. Por ello, es urgente la identificación de marcadores de respuesta a estos fármacos para ser implantados en la práctica clínica. El objetivo del presente estudio piloto ha sido demostrar la utilidad de la proteómica SWATH para identificar potenciales marcadores de respuesta al tratamiento anti-TNF en pacientes con EII. El uso de estos nuevos marcadores, solos o en combinación con parámetros clínicos ya conocidos, podría ayudar a seleccionar a los pacientes con una mayor probabilidad de respuesta al tratamiento biológico. De esta forma, la terapia anti-TNF podría administrarse de manera más segura y eficaz, permitiendo al resto de pacientes beneficiarse de tratamientos de segunda línea que pudieran resultarles más eficientes. Esto se traduciría en la aplicación de una medicina personalizada en la EII, adaptando el tratamiento médico a las características individuales de cada paciente.

Marcadores de respuesta al tratamiento anti-TNF en la Enfermedad de Crohn

En el caso de la EC, la proteómica SWATH identificó proteínas relacionadas con la organización del citoesqueleto, la unión celular, la hemostasia/función plaquetaria, el metabolismo de carbohidratos y la respuesta inmune como posibles marcadores de respuesta al tratamiento biológico. El citoesqueleto está involucrado en un numerosas funciones celulares, como el anclaje, la adhesión, la migración y la señalización celular (105). Ejerce funciones clave en el mantenimiento de la barrera celular a través de uniones célula-célula o célula-matriz. Junto con la capa mucosa y el sistema inmunológico celular, las células epiteliales del sistema digestivo forman la primera

barrera física contra factores externos e, incluso, el microbioma intestinal, y permite la absorción de nutrientes y la detección inmunológica. Así pues, la integridad del citoesqueleto es fundamental para mantener la correcta funcionalidad de la barrera del epitelio intestinal y juega un importante papel en el desarrollo de la EII (106). En las enfermedades inflamatorias inmunomediadas, los mediadores proinflamatorios pueden inducir cambios en el citoesqueleto que causan defectos en la barrera intestinal (107). Por tanto, no resulta extraño que el mayor número de marcadores potenciales identificados en nuestro estudio corresponda a proteínas relacionadas con el citoesqueleto celular. En línea con el papel del TNF en la permeabilidad del epitelio intestinal (108), nuestros resultados muestran que la respuesta a anti-TNF puede estar condicionada por la expresión de proteínas involucradas en las estructuras de unión celular. La VINC es una proteína fijadora de filamentos de actina (99) que, al igual que RSU1 (109), se localiza en las adherencias focales y participa en la adhesión a la matriz celular. La disminución de la expresión de VINC se ha descrito tanto en la EII activa como quiescente, sugiriendo que este cambio es una característica estructural de la capa epitelial en la EII y no está influenciada por el proceso inflamatorio. La inhibición de la expresión de VINC podría implicar una disminución de la rigidez del citoesqueleto y la alteración de las propiedades mecánicas de la capa epitelial, aumentando el riesgo de exposición a bacterias (110). En nuestro estudio, VINC fue identificada como la segunda proteína más diferencialmente expresada y la quinta con un cambio de expresión mayor entre los grupos STR y NSTR de pacientes con EC. El análisis de la cohorte total de pacientes mediante ELISA confirmó parcialmente este resultado, alcanzando la significación estadística cuando se analizó la respuesta secundaria a largo plazo. En el caso de COF1, se trata de un factor de polimerización de actina que controla la apertura de las uniones estrechas de la barrera epitelial y participa en el proceso de invasión del epitelio colónico por el patógeno *Shigella* (111). Además, el aumento de la expresión de fosfo-COF1 se ha asociado con la capacidad migratoria de las células dendríticas (112), con alto poder antigénico y con un papel principal en la patogenia de la EII (113). La 1433Z es una proteína de unión a cadherina que participa en la adhesión célula a célula y, aunque está implicada en la regulación de un gran número de vías de señalización, no ha sido asociada con anterioridad a la EC.

Otras proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina expresadas diferencialmente en el análisis proteómico fueron: GDIR2 (100), TAGL2 (105,114), ZYX (115), PDLI1

(116), SDPR, MOES, PLEK, y ACTN1 (117). GDIR1 es otro miembro de la familia Rho GDI que regula la reorganización del citoesqueleto y cuya sobreexpresión en células epiteliales intestinales primarias aisladas de pacientes con EC se ha asociado con la destrucción de la homeostasis epitelial bajo inflamación intestinal crónica (118). SDPR es una proteína involucrada en la señal de transducción, que ha sido asociada con PLEK en plaquetas; por su parte, ACTN1 y MOES han sido asociadas indirectamente con PLEK y actina (117). Esto es particularmente interesante debido a que todas ellas han sido anteriormente asociadas con la hemostasia/función plaquetaria, probablemente debido a que la fisiología celular de las plaquetas requiere la polimerización de la actina (119). De hecho, el metabolismo de las plaquetas se ha asociado con una respuesta terapéutica a infliximab en pacientes con EC (91). Las plaquetas son potentes inmunomoduladores que reconocen y eliminan directamente a los patógenos, reclutan y facilitan la actividad inmunitaria de los leucocitos en zonas de infección e inflamación (120), e inducen la diferenciación de los monocitos en células dendríticas (121,122). La activación de PLEK puede ser detectada pronto, tras la estimulación plaquetaria (123), y ha sido asociada a la polimerización de la actina y reorganización del citoesqueleto, la agregación plaquetaria, la secreción granular o la migración celular (117,124,125). SDPR (126) y MOES pueden participar en distintos procesos relacionados con la reorganización del citoesqueleto y la biología plaquetaria, como la endocitosis, la adhesión, la locomoción o la señalización. Además, la actividad de MOES está asociada con la transducción de la señal mediada por lipopolisacáridos en monocitos/macrófagos a través de la inducción de la secreción de TNF- α (127).

S10A4 fue la última proteína relacionada con el citoesqueleto celular, identificada en nuestro análisis como marcador de STR. Esta proteína de unión a calcio es una promesa terapéutica como marcador en EII debido a que, al igual que el resto de proteínas descritas anteriormente, amplifica la respuesta inflamatoria del microambiente (128). Un estudio prospectivo que incluyó a 118 pacientes, identificó a la proteína sérica S10A4 como marcador candidato para distinguir a la población con EII y entre subgrupos de pacientes con EC (129). Además, componentes de la familia de proteínas S-100, como son S10A8 y S10A9, fueron identificados dentro de los 5 genes más diferencialmente expresados en muestras de biopsia de mucosa de pacientes con EC, con capacidad para predecir la respuesta de infliximab con un 100% de precisión (130). El resto de las proteínas relacionadas con la respuesta inflamatoria e identificadas en

este estudio fueron GDIB y GSTO1. La expresión de GDIB ha sido asociada a la reducción de inflamación en el microambiente tumoral (131) y la supresión de metástasis (132), y es un predictor de supervivencia libre de recidiva tumoral en cáncer colorrectal (133). Además, GDIB participa en la apoptosis de neutrófilos polimorfonucleares mediada por TNF- α (134). En concordancia con nuestros resultados, los ratones con un déficit de GSTO-1 muestran una respuesta inflamatoria más grave y un mayor escape de bacterias del colon al sistema linfático en un modelo preclínico de EII (135).

Además del citoesqueleto y la respuesta inflamatoria, los pacientes con EC del grupo NSTR mostraron niveles más reducidos de proteínas plasmáticas relacionadas con la glucólisis. ENOA es una enzima multifuncional que actúa como un sensor celular universal y participa en diversas patologías, incluidos los trastornos inflamatorios (136). Así, ENOA ha sido identificada como la segunda proteína más diferencialmente expresada en patologías humanas (137). En células hematopoyéticas, ENOA sirve como receptor del plasminógeno (138), el cual se encuentra sobreexpresado en pacientes de EC con falta de respuesta primaria a infliximab (92). En nuestro estudio, ENOA fue la proteína más diferencialmente expresada entre los grupos STR y NSTR de pacientes con EC. A pesar de que la validación mediante ELISA no pudo confirmar el resultado de proteómica para ENOA en la respuesta primaria a la terapia anti-TNF, sí lo confirmó para la respuesta secundaria. Además de esta, otras proteínas relacionadas con la glucólisis, como ALDOA y TIPS, también fueron identificadas mediante SWATH como proteínas con expresión disminuida en el grupo de pacientes NSTR. En general, los pacientes con EII muestran una fuerte seroreactividad frente a las enzimas glucolíticas, habiendo sido identificados autoanticuerpos frente a ENOA en CU y EC (139,140). Por tanto, la disminución de enzimas glucolíticas en pacientes con EII podría estar asociada a una mayor producción de anticuerpos frente a ellas, coincidiendo con una enfermedad más grave. Curiosamente, el citoesqueleto también puede afectar a la vía glucolítica, ya que la activación completa de la glucólisis requiere la remodelación del citoesqueleto de actina. La coordinación entre ambos procesos puede facilitar la biosíntesis macromolecular necesaria para el crecimiento y división celular (141).

Marcadores de respuesta al tratamiento anti-TNF en la Colitis Ulcerosa

La proteómica SWATH identificó un total de 10 proteínas con expresión diferencial en el plasma de pacientes con CU del grupo STR respecto al grupo NSTR, relacionadas principalmente con la respuesta de fase aguda, el sistema del complemento, la inmunidad innata, el transporte o el mantenimiento del epitelio gastrointestinal. Es importante señalar que un número importante de estas proteínas identificadas han sido previamente propuestas como marcadores biológicos de CU (142). El análisis de los parámetros clínicos asociados con la actividad de la enfermedad, tales como la VSG o la abundancia de leucocitos, plaquetas o de las proteínas PCR y ferritina (142), no encontró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de pacientes STR y NSTR. Así pues, basándonos en los criterios clínicos, podríamos decir que la actividad de la CU era similar en ambos grupos de pacientes. No obstante, las diferencias observadas en algunas de las proteínas identificadas podrían indicar que existen perfiles de mayor actividad de la CU en el grupo de pacientes STR. Así, la SERPINA1 es un marcador que se encuentra incrementado en CU (142) y que en nuestro estudio está disminuido 2,8 veces, en el grupo NSTR respecto al grupo STR. Sin embargo, hay que recordar que el kit de depleción utilizado para eliminar las proteínas más abundantes del plasma, como paso previo al análisis proteómico, incluye en su lista a esta proteína. Por tanto, pese a que el kit de depleción se utilizó en las mismas condiciones para todas las muestras (mismo volumen de plasma, mismo protocolo), las diferencias observadas entre ambos grupos podrían estar sesgadas por el rendimiento de dicho kit. A pesar de ello, encontramos diferencias significativas en otro grupo de proteínas, cuyos niveles en plasma podrían estar indicando una respuesta al tratamiento dependiente de la actividad de la EII. Por ejemplo, en colitis experimental, la expresión de MASP2 en mucosa se encuentra disminuida (143). Aunque en nuestro estudio detectamos un incremento de MASP1 en el grupo NSTR (+2,6 veces), se sabe que MASP2 es activada por MASP1 en la vía de activación del sistema del complemento (144,145); Kalistatina o SERPINA4 es un inhibidor de la actividad serín proteasa que se encuentra disminuida significativamente en plasma y biopsias de pacientes con CU y enfermedad activa frente a controles sanos (146,147). De forma similar, encontramos en nuestro análisis que su expresión en plasma está incrementada 2,8 veces en el grupo NSTR vs. STR. Curiosamente, otro grupo de inhibidores de serín proteasas de la misma familia, como SERPINA4 y SERPINA5, también se encuentran sobreexpresados en el mismo grupo

de pacientes; Por último, encontramos a la proteína RBP4, cuyos niveles en el plasma son 2,6 veces superiores en el grupo NSTR. Esta proteína es particularmente interesante porque el retinol se asocia directamente y de forma positiva con la integridad del epitelio intestinal y el mantenimiento de la inmunidad (148). Dado su papel protector, la sobreexpresión de RBP4 en el grupo NSTR podría entenderse como una respuesta fisiológica a una CU más activa. Sin embargo, se ha observado que las alteraciones en RBP4 son independientes de la actividad de la enfermedad en EC y CU (149). Es más, en pacientes pediátricos, el incremento de RBP4 en suero correlaciona negativamente con la actividad de la EII (150). Es decir, pacientes con niveles más altos de la proteína tienen una enfermedad menos activa.

En este estudio, para facilitar su análisis, solamente hemos considerado aquellas proteínas con expresión diferencial estadísticamente significativa, fijando un valor de $p \leq 0,01$ y un cambio de expresión entre ambos grupos ($FC \geq 2,4$ veces). No obstante, en la larga lista de proteínas identificadas, encontramos más proteínas que no han sido tenidas en cuenta ($0,01 \leq p \leq 0,02$ y/o $FC \leq 2,4$) cuya expresión diferencial entre ambos grupos de pacientes STR/NSTR concuerda con la idea de que perfiles de CU menos activos responden peor a la terapia anti-TNF. La proteína de fase aguda alfa-1-glicoproteína ácida ($p=0,02$ y $FC=-4,3$) es un marcador de CU (142) que, como SERPINA1, se encuentra en la lista de proteínas deplecionadas y su expresión está reducida en el grupo NSTR; Otra proteína de fase aguda, la proteína amiloide sérica A1 ($p=0,028$ y $FC=-7,2$), es también un marcador candidato de CU cuyos niveles se encuentran incrementados en pacientes (142) y que encontramos 7,2 veces disminuido en el grupo NSTR en comparación con el grupo STR; Por último, la ficolina-3 (o ficolina-H) es una proteína relacionada con la activación del complemento, cuya concentración sérica en pacientes con CU es significativamente menor respecto a los controles sanos (151). En nuestro estudio, detectamos un incremento de 2,6 veces en el grupo NSTR vs. STR ($p=0,015$).

A pesar de estos resultados, los pacientes que peor responden a la terapia biológica son, en términos generales, aquellos que han fallado previamente a un biológico y los que tienen mayor carga inflamatoria y actividad, determinada mediante endoscopia y el análisis de biomarcadores como la calprotectina, y también en relación con los niveles de fármaco (91,152–154). El escaso número de muestras que hemos podido recoger en este estudio nos ha impedido confirmar estos resultados. Asimismo, es muy probable

que el bajo tamaño muestral sea el responsable de no haber encontrado diferencias significativas en los factores clínicos y demográficos entre los grupos STR y NSTR de pacientes con CU. Por último, las muestras utilizadas para el análisis proteómico fueron seleccionadas cuando ya habíamos clasificado a los pacientes como STR o NSTR, pero aún no disponíamos de los datos clínicos relativos a la respuesta a largo plazo. Al finalizar el seguimiento de los pacientes a largo plazo, los grupos de respuesta y no respuesta no se mantuvieron uniformes y, por ese motivo, no pudimos realizar el análisis comparativo a este tiempo de estudio.

En resumen, la proteómica SWATH ha resultado una metodología apta para la identificación de potenciales marcadores plasmáticos de respuesta a tratamiento en la EII. El análisis basal de VINC en pacientes con EC añadió valor a nuestro modelo multivariante en el que, combinado con los parámetros clínicos corticoides en la inducción, resección intestinal previa y CDAI basal, podría resultar de utilidad para predecir la respuesta primaria al tratamiento con anti-TNF. En la respuesta a largo plazo, el análisis de VINC se mostró aún más robusto. A pesar de que en la práctica clínica, la pérdida de respuesta secundaria se deja en segundo plano y depende de aspectos como la inmunogenicidad, la creación de anticuerpos frente al fármaco, o los niveles de fármaco (155), este resultado es interesante porque hemos identificado un potencial biomarcador de respuesta a corto plazo que, además, advierte que la respuesta se mantendrá en el tiempo. Debido a ello, VINC podría ser una diana terapéutica interesante para el tratamiento de la EC. En el caso de la CU, queda por determinar si alguna de las proteínas identificadas, relacionadas con la respuesta de fase aguda, el sistema del complemento, la inmunidad innata, el transporte o el mantenimiento del epitelio gastrointestinal, puede resultar útil como marcador de respuesta al tratamiento biológico. Por último, el hecho de no haber identificado proteínas comunes en ambas patologías podría corresponder al hecho de que, a pesar de formar parte del grupo de EII, la EC y la CU se manifiestan de un modo diferente en cuanto a la zona de afectación, inflamación, complicaciones o síntomas.

Limitaciones

Existen diversas limitaciones en el desarrollo de esta tesis doctoral. Una de ellas es que, cuando se planificó, aún no se analizaban marcadores como la calprotectina fecal o los niveles de fármacos en sangre, disponibles actualmente en el laboratorio de rutina como parámetros útiles en la práctica clínica habitual para valorar la respuesta del paciente con EII al tratamiento farmacológico. Por tanto, no hemos podido evaluar la utilidad de estos marcadores en nuestro estudio ni compararlos con los resultados obtenidos. Otra de las limitaciones que hemos acusado ha sido la baja tasa de reclutamiento. En el caso de la EC, pudimos salvar este obstáculo a través de la obtención de muestras donadas de otros centros hospitalarios. Gracias a ello, pudimos completar la validación posterior al estudio proteómico. En el caso de la CU, no conseguimos reclutar un número suficiente de muestras para este propósito. No obstante, esperamos abrir colaboraciones próximamente para validar los resultados de CU. Estos aspectos fueron reflejados en las memorias de seguimiento del doctorado.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. El presente estudio identificó la edad, la duración de la enfermedad, el tratamiento concomitante con corticoides durante la inducción de la enfermedad, la resección intestinal previa y el CDAI al inicio del tratamiento como factores independientes de no respuesta primaria de los pacientes con EC al tratamiento anti-TNF.
2. En la respuesta secundaria de los pacientes con EC al tratamiento, la duración de la enfermedad, la resección intestinal previa y el CDAI basal se mantuvieron como factores independientes de respuesta al tratamiento en la EC.
3. El análisis proteómico mediante SWATH de las muestras de plasma de los pacientes con EC, identificó un total de 18 proteínas diferencialmente expresadas ($FC \geq 2,4$ y $p < 0,001$) entre los grupos de respuesta y no respuesta primaria al tratamiento anti-TNF. La expresión de VINC y ENOA se relacionó con la respuesta secundaria a la terapia anti-TNF.
4. El modelo multivariante formado por la combinación de los parámetros clínicos tratamiento concomitante con corticoides, resección intestinal previa y CDAI basal, junto con los niveles plasmáticos de VINC, mostró el mejor valor predictivo de respuesta primaria al tratamiento anti-TNF en la EC.
5. El modelo multivariante formado por la combinación de los parámetros clínicos resección intestinal previa y CDAI basal, más la concentración plasmática de VINC, mostró una capacidad discriminante significativa, aunque discreta, en la respuesta secundaria de los pacientes con EC al tratamiento.
6. El análisis proteómico de las muestras de plasma de pacientes con CU identificó un total de 10 proteínas con expresión diferencial ($FC \geq 2,4$ y $p < 0,001$), como potenciales biomarcadores de respuesta al tratamiento biológico. La falta de una cohorte de validación impidió la validación de los resultados, así como la identificación de parámetros clínicos asociados a la respuesta.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Gomollón F, Dignass A, Annese V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, et al. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *ECCOJC*. enero de 2017;11(1):3-25.
2. Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, Ardizzone S, Armuzzi A, Barreiro-de Acosta M, et al. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders. *Journal of Crohn's and Colitis*. 1 de junio de 2017;11(6):649-70.
3. Sairenji T, Collins KL, Evans DV. An Update on Inflammatory Bowel Disease. Primary Care: Clinics in Office Practice. diciembre de 2017;44(4):673-92.
4. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*. diciembre de 2017;390(10114):2769-78.
5. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology*. enero de 2012;142(1):46-54.e42.
6. Chaparro M, Garre A, Núñez Ortiz A, Diz-Lois Palomares M, Rodríguez C, Riestra S, et al. Incidence, Clinical Characteristics and Management of Inflammatory Bowel Disease in Spain: Large-Scale Epidemiological Study. *JCM*. 29 de junio de 2021;10(13):2885.
7. Price AB. Overlap in the spectrum of non-specific inflammatory bowel disease--'colitis indeterminate'. *Journal of Clinical Pathology*. 1 de junio de 1978;31(6):567-77.
8. 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. *Canadian Journal of Gastroenterology*. 2005;19(suppl a):5A-36A.
9. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine JE, et al. A Simple Classification of Crohn's Disease: Report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998: Inflammatory Bowel Diseases. febrero de 2000;6(1):8-15.
10. Satsangi J. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*. 1 de junio de 2006;55(6):749-53.

11. Feuerstein JD, Cheifetz AS. Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. *Mayo Clinic Proceedings*. julio de 2017;92(7):1088-103.
12. Cosnes J, Cattan S, Blain A, Beaugerie L, Carbonnel F, Parc R, et al. Long-Term Evolution of Disease Behavior of Crohn's Disease: Inflammatory Bowel Diseases. julio de 2002;8(4):244-50.
13. Langner C, Magro F, Driessen A, Ensari A, Mantzaris GJ, Villanacci V, et al. The histopathological approach to inflammatory bowel disease: a practice guide. *Virchows Arch [Internet]*. 1 de febrero de 2014 [citado 10 de octubre de 2023]; Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00428-014-1543-4>
14. Enfermedad inflamatoria intestinal. 4ª ed. Majadahonda (Madrid): Ergon; 2019.
15. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*. marzo de 1976;70(3):439-44.
16. Flynn S, Eisenstein S. Inflammatory Bowel Disease Presentation and Diagnosis. *Surgical Clinics of North America*. diciembre de 2019;99(6):1051-62.
17. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *The Lancet*. noviembre de 2012;380(9853):1606-19.
18. Kayal M, Shah S. Ulcerative Colitis: Current and Emerging Treatment Strategies. *JCM*. 30 de diciembre de 2019;9(1):94.
19. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated Oral 5-Aminosalicylic Acid Therapy for Mildly to Moderately Active Ulcerative Colitis. *N Engl J Med*. 24 de diciembre de 1987;317(26):1625-9.
20. Harbord M, Annesse V, Vavricka SR, Allez M, Barreiro-de Acosta M, Boberg KM, et al. The First European Evidence-based Consensus on Extra-intestinal Manifestations in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's and Colitis*. 1 de marzo de 2016;10(3):239-54.
21. Vide J, Osório F, Costa-Silva M, Lopes S, Azevedo F, Camila Dias C, et al. Cutaneous Morbidity Among Inflammatory Bowel Disease Patients: A Cohort Study. *Journal of Crohn's and Colitis*. 28 de marzo de 2018;12(4):442-51.
22. Silva F, Gatica T, Pavez C. ETIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL. *Revista Médica Clínica Las Condes*. julio de 2019;30(4):262-72.
23. de Souza HSP, Fiocchi C, Iliopoulos D. The IBD interactome: an integrated view of aetiology, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. diciembre de 2017;14(12):739-49.
24. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. julio de 2007;448(7152):427-34.

25. Ramos GP, Papadakis KA. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases. *Mayo Clinic Proceedings*. enero de 2019;94(1):155-65.
26. The International IBD Genetics Consortium (IIBDGC), Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, et al. Host–microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. noviembre de 2012;491(7422):119-24.
27. Santos MPC. Familial and ethnic risk in inflammatory bowel disease. *aog* [Internet]. 2017 [citado 6 de octubre de 2023]; Disponible en: <http://www.annalsgastro.gr/files/journals/1/earlyview/2017/ev-10-2017-10-AG3236-0208.pdf>
28. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. mayo de 2001;411(6837):599-603.
29. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugier L, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature*. febrero de 1996;379(6568):821-3.
30. Wehkamp J, Stange EF. NOD2 mutation and mice: no Crohn's disease but many lessons to learn. *Trends in Molecular Medicine*. julio de 2005;11(7):307-9.
31. Vermeire S. NOD2/CARD15: relevance in clinical practice. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. junio de 2004;18(3):569-75.
32. Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut*. 1 de agosto de 2009;58(8):1152-67.
33. De Lange KM, Moutsianas L, Lee JC, Lamb CA, Luo Y, Kennedy NA, et al. Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease. *Nat Genet*. febrero de 2017;49(2):256-61.
34. Gajendran M, Loganathan P, Catinella AP, Hashash JG. A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Disease-a-Month*. febrero de 2018;64(2):20-57.
35. Kaddoura R, Ghelani H, Alqutami F, Altaher H, Hachim M, Jan RK. Identification of Specific Biomarkers and Pathways in the Treatment Response of Infliximab for Inflammatory Bowel Disease: In-Silico Analysis. *Life*. 2 de marzo de 2023;13(3):680.
36. Halme L. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *WJG*. 2006;12(23):3668.
37. Venkateswaran S, Somineni HK, Matthews JD, Kilaru V, Hyams JS, Denson LA, et al. Longitudinal DNA methylation profiling of the rectal mucosa identifies cell-specific signatures of disease status, severity and clinical outcomes in ulcerative colitis cell-specific DNA methylation signatures of UC. *Clin Epigenet*. 24 de marzo de 2023;15(1):50.

38. Gomez-Bris R, Saez A, Herrero-Fernandez B, Rius C, Sanchez-Martinez H, Gonzalez-Granado JM. CD4 T-Cell Subsets and the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *IJMS*. 31 de enero de 2023;24(3):2696.
39. Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. junio de 2008;8(6):458-66.
40. Boden EK, Snapper SB. Regulatory T cells in inflammatory bowel disease: Current Opinion in Gastroenterology. noviembre de 2008;24(6):733-41.
41. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol*. 1 de mayo de 1999;162(9):5317-26.
42. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K jian, Li L, Marinos N, et al. Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor *Foxp3*. *The Journal of Experimental Medicine*. 15 de diciembre de 2003;198(12):1875-86.
43. Guo Z, Jang MH, Otani K, Bai Z, Umemoto E, Matsumoto M, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells in the small intestinal lamina propria show an effector/memory phenotype. *International Immunology*. 1 de marzo de 2008;20(3):307-15.
44. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor- β -secreting Th3 regulatory cells: TGF- β -secreting Th3 regulatory cells. *Immunological Reviews*. agosto de 2001;182(1):207-14.
45. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T Regulatory Cells Can Use the Perforin Pathway to Cause Autologous Target Cell Death. *Immunity*. octubre de 2004;21(4):589-601.
46. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*. diciembre de 2007;8(12):1353-62.
47. Wildin RS. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *Journal of Medical Genetics*. 1 de agosto de 2002;39(8):537-45.
48. Jalalvand M, Enayati S, Akhtari M, Madreseh E, Jamshidi A, Farhadi E, et al. Blood regulatory T cells in inflammatory bowel disease, a systematic review, and meta-analysis. *International Immunopharmacology*. abril de 2023;117:109824.
49. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. abril de 2015;12(4):205-17.
50. Balestrieri P, Ribolsi M, Guarino MPL, Emerenziani S, Altomare A, Cicala M. Nutritional Aspects in Inflammatory Bowel Diseases. *Nutrients*. 31 de enero de 2020;12(2):372.

51. Hibi T, Ogata H. Novel pathophysiological concepts of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 20 de febrero de 2006;41(1):10-6.
52. Birrenbach T, Böcker U. Inflammatory Bowel Disease and Smoking: A Review of Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutic Implications. *Inflammatory Bowel Diseases*. noviembre de 2004;10(6):848-59.
53. Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. junio de 2004;18(3):481-96.
54. Nunes T, Etchevers MJ, Merino O, Gallego S, García-Sánchez V, Marín-Jiménez I, et al. Does Smoking Influence Crohn's Disease in the Biologic Era? The TABACROHN Study: *Inflammatory Bowel Diseases*. enero de 2013;19(1):23-9.
55. Marín-Jiménez I, Gomollón F. Año 1983: el tabaquismo disminuye el riesgo de colitis ulcerosa. *Gastroenterología y Hepatología*. agosto de 2020;43(7):373-4.
56. Tumani MF, Pavez C, Parada A. Microbiota, hábitos alimentarios y dieta en enfermedad inflamatoria intestinal. *Rev chil nutr*. septiembre de 2020;47(5):822-9.
57. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*. 8 de agosto de 2013;500(7461):232-6.
58. Koloski NA, Bret L, Radford-Smith G. Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: A critical review of the literature. *WJG*. 2008;14(2):165.
59. Bretto E, Ribaldone DG, Caviglia GP, Saracco GM, Bugianesi E, Frara S. Inflammatory Bowel Disease: Emerging Therapies and Future Treatment Strategies. *Biomedicines*. 11 de agosto de 2023;11(8):2249.
60. Torres J, Bonovas S, Doherty G, Kucharzik T, Gisbert JP, Raine T, et al. ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: Medical Treatment. *Journal of Crohn's and Colitis*. 1 de enero de 2020;14(1):4-22.
61. Raine T, Bonovas S, Burisch J, Kucharzik T, Adamina M, Annese V, et al. ECCO Guidelines on Therapeutics in Ulcerative Colitis: Medical Treatment. *Journal of Crohn's and Colitis*. 28 de enero de 2022;16(1):2-17.
62. Shivaji UN, Sharratt CL, Thomas T, Smith SCL, Iacucci M, Moran GW, et al. Review article: managing the adverse events caused by anti-TNF therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. marzo de 2019;49(6):664-80.
63. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. *N Engl J Med*. 20 de octubre de 2005;353(16):1711-23.
64. Desreumaux P, Ghosh S. Review article: mode of action and delivery of 5-aminosalicylic acid – new evidence. *Aliment Pharmacol Ther*. septiembre de 2006;24(s1):2-9.

65. Lim WC, Wang Y, MacDonald JK, Hanauer S. Aminosalicilates for induction of remission or response in Crohn's disease. Cochrane IBD Group, editor. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. 3 de julio de 2016 [citado 6 de octubre de 2023];2016(7). Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD008870.pub2>
66. Bermejo F, Aguas M, Chaparro M, Domènech E, Echarri A, García-Planella E, et al. Recomendaciones del Grupo Español de Trabajo en Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa (GETECCU) sobre el uso de tiopurinas en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterología y Hepatología*. marzo de 2018;41(3):205-21.
67. Gomollón F, Rubio S, Charro M, García-López S, Muñoz F, Gisbert JP, et al. Recomendaciones del Grupo Español de Trabajo de Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa (GETECCU) sobre el uso de metotrexato en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterología y Hepatología*. enero de 2015;38(1):24-30.
68. CELEX_02001L0083-20220101_ES_TXT.pdf.
69. remicade-epar-product-information_es.pdf [Internet]. [citado 12 de agosto de 2023]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/remicade-epar-product-information_es.pdf
70. Nielsen OH, Ainsworth MA. Tumor Necrosis Factor Inhibitors for Inflammatory Bowel Disease. Jarcho JA, editor. *N Engl J Med*. 22 de agosto de 2013;369(8):754-62.
71. Park SC, Jeon YT. Current and Emerging Biologics for Ulcerative Colitis. *Gut Liver*. 15 de enero de 2015;9(1):18-27.
72. humira-epar-product-information_es.pdf [Internet]. [citado 13 de agosto de 2023]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/humira-epar-product-information_es.pdf
73. simponi-epar-product-information_es.pdf.
74. McDonald BD, Dyer EC, Rubin DT. IL-23 Monoclonal Antibodies for IBD: So Many, So Different? *Journal of Crohn's and Colitis*. 11 de mayo de 2022;16(Supplement_2):ii42-53.
75. Chaparro M, Gisbert JP. Nuevas moléculas en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterología y Hepatología*. junio de 2016;39(6):411-23.
76. entyvio-epar-public-assessment-report_en.pdf.
77. Coskun M, Salem M, Pedersen J, Nielsen OH. Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacological Research*. octubre de 2013;76:1-8.
78. xeljanz-epar-product-information_en.pdf.

79. rinvoq-epar-product-information_en.pdf.
80. jyseleca-epar-product-information_en.pdf.
81. Argollo M, Furfaro F, Gilardi D, Roda G, Allocca M, Peyrin-Biroulet L, et al. Modulation of sphingosine-1-phosphate in ulcerative colitis. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2 de abril de 2020;20(4):413-20.
82. Grossberg LB, Papamichael K, Cheifetz AS. Review article: emerging drug therapies in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. abril de 2022;55(7):789-804.
83. Ding NS, Hart A, De Cruz P. Systematic review: predicting and optimising response to anti- TNF therapy in Crohn's disease – algorithm for practical management. *Aliment Pharmacol Ther*. enero de 2016;43(1):30-51.
84. Gisbert JP, Chaparro M. Predictors of Primary Response to Biologic Treatment [Anti-TNF, Vedolizumab, and Ustekinumab] in Patients With Inflammatory Bowel Disease: From Basic Science to Clinical Practice. *Journal of Crohn's and Colitis*. 19 de junio de 2020;14(5):694-709.
85. Cui G, Fan Q, Li Z, Goll R, Florholmen J. Evaluation of anti-TNF therapeutic response in patients with inflammatory bowel disease: Current and novel biomarkers. *EBioMedicine*. abril de 2021;66:103329.
86. Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*. agosto de 1998;19(11):1853-61.
87. Miguel-Hernández ÁS, Martín-Gil FJ, Armentia-Medina A. Metodología y aplicaciones en proteómica clínica. *Diálisis y Trasplante*. octubre de 2009;30(4):139-43.
88. Gisbert JP, Chaparro M. Clinical Usefulness of Proteomics in Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review. *Journal of Crohn's and Colitis*. 26 de marzo de 2019;13(3):374-84.
89. M. Baldán Martín, M. Azkargorta, I. Iloro, L. Ortega Moreno, L. Aldars Garcia, I. Soleto Fernández¹, et al. PERFIL PROTEÓMICO EN SUERO Y ORINA DE PACIENTES RECIÉN DIAGNOSTICADOS DE ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL: NUEVA APROXIMACIÓN PARA EL DESCUBRIMIENTO DE BIOMARCADORES. *Gastroenterol Hepatol* 2022;45. 23 de marzo de 2022;Especial Congresos(1):24.
90. Meuwis MA, Fillet M, Geurts P, De Seny D, Lutteri L, Chapelle JP, et al. Biomarker discovery for inflammatory bowel disease, using proteomic serum profiling. *Biochemical Pharmacology*. mayo de 2007;73(9):1422-33.
91. Meuwis MA, Fillet M, Lutteri L, Marée R, Geurts P, De Seny D, et al. Proteomics for prediction and characterization of response to infliximab in Crohn's disease: A pilot study. *Clinical Biochemistry*. agosto de 2008;41(12):960-7.

92. Gazouli M, Anagnostopoulos AK, Papadopoulou A, Vaiopoulou A, Papamichael K, Mantzaris G, et al. Serum protein profile of Crohn's disease treated with infliximab. *Journal of Crohn's and Colitis*. noviembre de 2013;7(10):e461-70.
93. Gillet LC, Navarro P, Tate S, Röst H, Selevsek N, Reiter L, et al. Targeted Data Extraction of the MS/MS Spectra Generated by Data-independent Acquisition: A New Concept for Consistent and Accurate Proteome Analysis. *Molecular & Cellular Proteomics*. junio de 2012;11(6):O111.016717.
94. Law KP, Lim YP. Recent advances in mass spectrometry: data independent analysis and hyper reaction monitoring. *Expert Review of Proteomics*. diciembre de 2013;10(6):551-66.
95. Huang Q, Yang L, Luo J, Guo L, Wang Z, Yang X, et al. SWATH enables precise label-free quantification on proteome scale. *Proteomics*. abril de 2015;15(7):1215-23.
96. Anjo SI, Santa C, Manadas B. SWATH-MS as a tool for biomarker discovery: From basic research to clinical applications. *Proteomics*. febrero de 2017;17(3-4):1600278.
97. Vowinckel J, Capuano F, Campbell K, Deery MJ, Lilley KS, Ralser M. The beauty of being (label)-free: sample preparation methods for SWATH-MS and next-generation targeted proteomics. *F1000Res*. 7 de abril de 2014;2:272.
98. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. mayo de 1976;72(1-2):248-54.
99. Le Clainche C, Dwivedi SP, Didry D, Carlier MF. Vinculin Is a Dually Regulated Actin Filament Barbed End-capping and Side-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry*. julio de 2010;285(30):23420-32.
100. Leffers H, Nielsen MS, Andersen AH, Honoré B, Madsen P, Vandekerckhove J, et al. Identification of Two Human Rho GDP Dissociation Inhibitor Proteins Whose Overexpression Leads to Disruption of the Actin Cytoskeleton. *Experimental Cell Research*. diciembre de 1993;209(2):165-74.
101. Huang L, Wong TYW, Lin RCC, Furthmayr H. Replacement of Threonine 558, a Critical Site of Phosphorylation of Moesin in Vivo, with Aspartate Activates F-actin Binding of Moesin. *Journal of Biological Chemistry*. abril de 1999;274(18):12803-10.
102. Zheng W, Zhang Z, Ganguly S, Weller JL, Klein DC, Cole PA. Cellular stabilization of the melatonin rhythm enzyme induced by nonhydrolyzable phosphonate incorporation. *Nat Struct Mol Biol*. diciembre de 2003;10(12):1054-7.
103. Kennedy NA, Heap GA, Green HD, Hamilton B, Bewshea C, Walker GJ, et al. Predictors of anti-TNF treatment failure in anti-TNF-naive patients with active luminal Crohn's disease: a prospective, multicentre, cohort study. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*. mayo de 2019;4(5):341-53.

104. Hirschmann S, Neurath MF. Top-down approach to biological therapy of Crohn's disease. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 4 de marzo de 2017;17(3):285-93.
105. Dvorakova M, Nenutil R, Bouchal P. Transgelins, cytoskeletal proteins implicated in different aspects of cancer development. *Expert Review of Proteomics*. abril de 2014;11(2):149-65.
106. Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med*. agosto de 2018;50(8):1-9.
107. López-Posadas R, Stürzl M, Atreya I, Neurath MF, Britzen-Laurent N. Interplay of GTPases and Cytoskeleton in Cellular Barrier Defects during Gut Inflammation. *Front Immunol*. 5 de octubre de 2017;8:1240.
108. Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, et al. TNF- α -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- κ B activation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. marzo de 2004;286(3):G367-76.
109. Dougherty GW, Chopp T, Qi S mei, Cutler ML. The Ras suppressor Rsu-1 binds to the LIM 5 domain of the adaptor protein PINCH1 and participates in adhesion-related functions. *Experimental Cell Research*. mayo de 2005;306(1):168-79.
110. Moriggi M, Pastorelli L, Torretta E, Tontini GE, Capitano D, Bogetto SF, et al. Contribution of Extracellular Matrix and Signal Mechanotransduction to Epithelial Cell Damage in Inflammatory Bowel Disease Patients: A Proteomic Study. *Proteomics*. diciembre de 2017;17(23-24):1700164.
111. Maldonado-Contreras A, Birtley JR, Boll E, Zhao Y, Mummy KL, Toscano J, et al. *Shigella* depends on SepA to destabilize the intestinal epithelial integrity via cofilin activation. *Gut Microbes*. 2 de noviembre de 2017;8(6):544-60.
112. Choi NR, Lee HJ, Jung SH, Hong CY, Vo MC, Hoang MD, et al. Generation of potent dendritic cells with improved migration ability through p-cofilin and sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ transport ATPase 2 regulation. *Cytotherapy*. octubre de 2015;17(10):1421-33.
113. Ortega Moreno L, Fernández-Tomé S, Chaparro M, Marin AC, Mora-Gutiérrez I, Santander C, et al. Profiling of Human Circulating Dendritic Cells and Monocyte Subsets Discriminates Between Type and Mucosal Status in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 19 de enero de 2021;27(2):268-74.
114. Guo Z, Neilson LJ, Zhong H, Murray PS, Zanivan S, Zaidel-Bar R. E-cadherin interactome complexity and robustness resolved by quantitative proteomics. *Sci Signal* [Internet]. 2 de diciembre de 2014 [citado 30 de julio de 2023];7(354). Disponible en: <https://www.science.org/doi/10.1126/scisignal.2005473>
115. Hirata H, Tatsumi H, Sokabe M. Mechanical forces facilitate actin polymerization at focal adhesions in a zyxin-dependent manner. *Journal of Cell Science*. 1 de septiembre de 2008;121(17):2795-804.

116. Kotaka M, Kostin S, Ngai S ming, Chan K keung, Lau Y man, Lee SMY, et al. Interaction of hCLIM1, an enigma family protein, with β -actinin 2. *J Cell Biochem.* 15 de septiembre de 2000;78(4):558-65.
117. Baig A, Bao X, Haslam RJ. Proteomic identification of pleckstrin-associated proteins in platelets: Possible interactions with actin. *Proteomics.* septiembre de 2009;9(17):4254-8.
118. Shkoda A, Werner T, Daniel H, Gunckel M, Rogler G, Haller D. Differential Protein Expression Profile in the Intestinal Epithelium from Patients with Inflammatory Bowel Disease. *J Proteome Res.* 1 de marzo de 2007;6(3):1114-25.
119. Bearer EL, Prakash JM, Li Z. Actin dynamics in platelets. En: *International Review of Cytology* [Internet]. Elsevier; 2002 [citado 30 de julio de 2023]. p. 137-82. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0074769602170148>
120. Jenne CN, Kubes P. Platelets in inflammation and infection. *Platelets.* 19 de mayo de 2015;26(4):286-92.
121. Nishat S, Wuescher LM, Worth RG. Platelets Enhance Dendritic Cell Responses against *Staphylococcus aureus* through CD40-CD40L. Freitag NE, editor. *Infect Immun.* septiembre de 2018;86(9):e00186-18.
122. Nguyen XD, Müller-Berghaus J, Kälsch T, Schadendorf D, Borggrefe M, Klüter H. Differentiation of monocyte-derived dendritic cells under the influence of platelets. *Cytotherapy.* enero de 2008;10(7):720-9.
123. Tyers M, Haslam RJ, Rachubinski RA, Harley CB. Molecular analysis of pleckstrin: The major protein kinase c substrate of platelets. *J Cell Biochem.* junio de 1989;40(2):133-45.
124. Roll RL, Bauman EM, Bennett JS, Abrams CS. Phosphorylated Pleckstrin Induces Cell Spreading via an Integrin-Dependent Pathway. *The Journal of Cell Biology.* 18 de septiembre de 2000;150(6):1461-6.
125. Ma AD, Abrams CS. Pleckstrin Induces Cytoskeletal Reorganization via a Rac-dependent Pathway. *Journal of Biological Chemistry.* octubre de 1999;274(40):28730-5.
126. Hansen CG, Bright NA, Howard G, Nichols BJ. SDPR induces membrane curvature and functions in the formation of caveolae. *Nat Cell Biol.* julio de 2009;11(7):807-14.
127. Iontcheva I, Amar S, Zawawi KH, Kantarci A, Van Dyke TE. Role for Moesin in Lipopolysaccharide-Stimulated Signal Transduction. *Infect Immun.* abril de 2004;72(4):2312-20.
128. Zhang J, Hou S, Gu J, Tian T, Yuan Q, Jia J, et al. S100A4 promotes colon inflammation and colitis-associated colon tumorigenesis. *OncoImmunology.* 11 de junio de 2018;e1461301.

129. Morávková P, Kohoutová D, Vávrová J, Bureš J. S100A4 Protein in Inflammatory Bowel Disease: Results of a Single Centre Prospective Study. *Acta Med (Hradec Kralove, Czech Repub)*. 2017;60(3):108-13.
130. Arijs I, Quintens R, Van Lommel L, Van Steen K, De Hertogh G, Lemaire K, et al. Predictive value of epithelial gene expression profiles for response to infliximab in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. diciembre de 2010;16(12):2090-8.
131. Said N, Theodorescu D. RhoGDI2 suppresses bladder cancer metastasis via reduction of inflammation in the tumor microenvironment. *OncoImmunology*. octubre de 2012;1(7):1175-7.
132. Theodorescu D, Sapinoso LM, Conaway MR, Oxford G, Hampton GM, Frierson HF. Reduced Expression of Metastasis Suppressor RhoGDI2 Is Associated with Decreased Survival for Patients with Bladder Cancer. *Clinical Cancer Research*. 1 de junio de 2004;10(11):3800-6.
133. Fujita A, Shida A, Fujioka S, Kurihara H, Okamoto T, Yanaga K. Clinical significance of Rho GDP dissociation inhibitor 2 in colorectal carcinoma. *Int J Clin Oncol*. abril de 2012;17(2):137-42.
134. Kettritz R, Xu YX, Faass B, Klein JB, Müller EC, Otto A, et al. TNF-alpha-mediated neutrophil apoptosis involves Ly-GDI, a Rho GTPase regulator. *J Leukoc Biol*. agosto de 2000;68(2):277-83.
135. Menon D, Innes A, Oakley AJ, Dahlstrom JE, Jensen LM, Brüstle A, et al. GSTO1-1 plays a pro-inflammatory role in models of inflammation, colitis and obesity. *Sci Rep*. 19 de diciembre de 2017;7(1):17832.
136. Kang HJ, Jung SK, Kim SJ, Chung SJ. Structure of human α -enolase (hENO1), a multifunctional glycolytic enzyme. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1 de junio de 2008;64(6):651-7.
137. Petrak J, Ivanek R, Toman O, Cmejla R, Cmejlova J, Vyoral D, et al. Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics*. mayo de 2008;8(9):1744-9.
138. Miles LA, Dahlberg CM, Plescia J, Felez J, Kato K, Plow EF. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of α -enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry*. febrero de 1991;30(6):1682-91.
139. Roozendaal C, Zhao MH, Horst G, Lockwood CM, Kleibeuker JH, Limburg PC, et al. Catalase and α -enolase: two novel granulocyte autoantigens in inflammatory bowel disease (IBD). *Clinical and Experimental Immunology*. 25 de diciembre de 2001;112(1):10-6.
140. Vermeulen N, Arijs I, Joossens S, Vermeire S, Clerens S, Van Den Bergh K, et al. Anti- α -enolase Antibodies in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Chemistry*. 1 de marzo de 2008;54(3):534-41.

141. Hu H, Juvekar A, Lyssiotis CA, Lien EC, Albeck JG, Oh D, et al. Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Glycolysis through Mobilization of Aldolase from the Actin Cytoskeleton. *Cell*. enero de 2016;164(3):433-46.
142. Cioffi M. Laboratory markers in ulcerative colitis: Current insights and future advances. *WJGP*. 2015;6(1):13.
143. Yuan B, Zhou S, Lu Y, Liu J, Jin X, Wan H, et al. Changes in the Expression and Distribution of Claudins, Increased Epithelial Apoptosis, and a Mannan-Binding Lectin-Associated Immune Response Lead to Barrier Dysfunction in Dextran Sodium Sulfate-Induced Rat Colitis. *Gut Liver*. 23 de noviembre de 2015;9(6):734.
144. Sekine H, Takahashi M, Iwaki D, Fujita T. The Role of MASP-1/3 in Complement Activation. En: Lambris JD, Holers VM, Ricklin D, editores. *Complement Therapeutics* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2013 [citado 2 de octubre de 2023]. p. 41-53. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 735). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-4118-2_3
145. Degn SE, Jensen L, Hansen AG, Duman D, Tekin M, Jensenius JC, et al. Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Protease (MASP)-1 Is Crucial for Lectin Pathway Activation in Human Serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 Is Required for Alternative Pathway Function. *The Journal of Immunology*. 15 de octubre de 2012;189(8):3957-69.
146. Stadnicki A, Mazurek U, Plewka D, Wilczok T. Intestinal tissue kallikrein-kallistatin profile in inflammatory bowel disease. *International Immunopharmacology*. julio de 2003;3(7):939-44.
147. Stadnicki A, Mazurek U, Gonciarz M, Plewka D, Nowaczyk G, Orchel J, et al. Immunolocalization and expression of kallistatin and tissue kallikrein in human inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences*. 2003;48(3):615-23.
148. Quadro L, Gamble MV, Vogel S, Lima AAM, Piantedosi R, Moore SR, et al. Retinol and Retinol-Binding Protein: Gut Integrity and Circulating Immunoglobulins. *J INFECT DIS*. septiembre de 2000;182(s1):S97-102.
149. Valentini L, Wirth EK, Schweizer U, Hengstermann S, Schaper L, Koernicke T, et al. Circulating adipokines and the protective effects of hyperinsulinemia in inflammatory bowel disease. *Nutrition*. febrero de 2009;25(2):172-81.
150. Roma E, Krini M, Hantzi E, Sakka S, Panayiotou I, Margeli A, et al. Retinol Binding Protein 4 in children with Inflammatory Bowel Disease: a negative correlation with the disease activity. *Hippokratia*. octubre de 2012;16(4):360-5.
151. Schaffer T, Flogerzi B, Schoepfer AM, Seibold F, Müller S. Increased titers of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in Crohn's disease patients with reduced H-ficolin levels but normal MASP-2 activity. *Journal of Crohn's and Colitis*. febrero de 2013;7(1):e1-10.

Bibliografía

152. Seow CH, Newman A, Irwin SP, Steinhart AH, Silverberg MS, Greenberg GR. Trough serum infliximab: a predictive factor of clinical outcome for infliximab treatment in acute ulcerative colitis. *Gut*. 1 de enero de 2010;59(01):49-54.
153. Sasaki LY, Magro DO, Saad-Hossne R, Baima JP, Flores C, Correia LM, et al. Anti-TNF therapy for ulcerative colitis in Brazil: a comparative real-world national retrospective multicentric study from the Brazilian study group of IBD (GEDIIB). *BMC Gastroenterol*. diciembre de 2022;22(1):268.
154. Swaminath A, Ullman T, Rosen M, Mayer L, Lichtiger S, Abreu MT. Early clinical experience with adalimumab in treatment of inflammatory bowel disease with infliximab-treated and naïve patients. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. febrero de 2009;29(3):273-8.
155. Roda G, Jharap B, Neeraj N, Colombel JF. Loss of Response to Anti-TNFs: Definition, Epidemiology, and Management. *Clinical and Translational Gastroenterology*. enero de 2016;7(1):e135.

ANEXOS



Article

Development of a Prediction Model for Short-Term Remission of Patients with Crohn's Disease Treated with Anti-TNF Drugs

Rosario Medina-Medina ¹, Eva Iglesias-Flores ¹, Jose M. Benítez ¹ , Sandra Marín-Pedrosa ¹, Isabel Salgueiro-Rodríguez ¹, Clara I. Linares ¹, Sandra González-Rubio ¹, Pilar Soto-Escribano ¹, Beatriz Gros ¹ , Manuel L. Rodríguez-Perálvarez ^{1,2} , José L. Cabriada ³ , María Chaparro ^{2,4} , Javier P. Gisbert ^{2,4} , Eduardo Chicano-Gálvez ⁵ , Ignacio Ortea ⁵, Gustavo Ferrín ^{1,2,*}, Valle García-Sánchez ^{1,2} and Patricia Aguilar-Melero ^{1,2}

¹ Gastroenterology Unit, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Hospital Universitario Reina Sofía, Universidad de Córdoba, 14004 Córdoba, Spain; rmedina@soportevital.es (R.M.-M.); p.aguilar.melero@gmail.com (P.A.-M.)

² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), 28029 Madrid, Spain

³ Gastroenterology Unit, Hospital Universitario de Galdakao, 48960 Galdakao, Spain

⁴ Gastroenterology Unit, Hospital Universitario de La Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IIS-IP), Universidad Autónoma de Madrid, 28006 Madrid, Spain

⁵ Proteomics Unit, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Hospital Universitario Reina Sofía, Universidad de Córdoba, 14004 Córdoba, Spain; eduardo.chicano@imibic.org (E.C.-G.)

* Correspondence: gustavo.ferrin@imibic.org



Citation: Medina-Medina, R.; Iglesias-Flores, E.; Benítez, J.M.; Marín-Pedrosa, S.; Salgueiro-Rodríguez, I.; Linares, C.I.; González-Rubio, S.; Soto-Escribano, P.; Gros, B.; Rodríguez-Perálvarez, M.L.; et al. Development of a Prediction Model for Short-Term Remission of Patients with Crohn's Disease Treated with Anti-TNF Drugs. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 8695. <https://doi.org/10.3390/ijms24108695>

Academic Editors: Alfredo Papa and Loris Riccardo Lopetuso

Received: 28 March 2023

Revised: 4 May 2023

Accepted: 10 May 2023

Published: 12 May 2023



Copyright: © 2023 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Therapy with anti-tumor necrosis factor (TNF) has dramatically changed the natural history of Crohn's disease (CD). However, these drugs are not without adverse events, and up to 40% of patients could lose efficacy in the long term. We aimed to identify reliable markers of response to anti-TNF drugs in patients with CD. A consecutive cohort of 113 anti-TNF naive patients with CD was stratified according to clinical response as short-term remission (STR) or non-STR (NSTR) at 12 weeks of treatment. We compared the protein expression profiles of plasma samples in a subset of patients from both groups prior to anti-TNF therapy by SWATH proteomics. We identified 18 differentially expressed proteins ($p \leq 0.01$, fold change ≥ 2.4) involved in the organization of the cytoskeleton and cell junction, hemostasis/platelet function, carbohydrate metabolism, and immune response as candidate biomarkers of STR. Among them, vinculin was one of the most deregulated proteins ($p < 0.001$), whose differential expression was confirmed by ELISA ($p = 0.054$). In the multivariate analysis, plasma vinculin levels along with basal CD Activity Index, corticosteroids induction, and bowel resection were factors predicting NSTR.

Keywords: inflammatory bowel disease; Crohn's disease; SWATH proteomics; predictive biomarkers; anti-TNF-a therapy; vinculin

1. Introduction

Crohn's disease (CD) is a chronic inflammatory bowel disease (IBD) that results from an abnormal immune response to enteric microbes in genetically-predisposed individuals and may affect any location of the gastrointestinal tract. As with other immune-mediated disorders, gender-specific differences influence the onset, course, and therapy of IBD. In particular, women suffering from IBD have a worse quality of life than men; because of this, gender medicine could help address gender-specific issues that arise in the management of IBD patients [1]. The classic therapy of CD consists of different combinations of corticosteroids, immunosuppressive agents, and in some cases, surgery. However, new therapeutic approaches have been proposed or developed in recent years. Diet can play a fundamental role in the treatment of CD by modulating metabolic pathways, stimulating

gene expression, and modifying the composition of the microbiota. In addition, diet can increase the positive effects of biological therapies by preventing the relapse of the disease after remission [2]. Among novel biologic drugs, tumor necrosis factor alpha (TNF- α) inhibitors (or anti-TNF agents) such as infliximab, adalimumab, and biosimilars have become a paramount therapeutic modality in CD [3,4]. TNF- α is a ubiquitous cytokine whose blood levels significantly increase during the inflammation process occurring in IBD. Anti-TNF agents bind to soluble TNF- α and its transmembrane precursor, thereby blocking the interaction between TNF- α and type 1 and 2 TNF receptors and the subsequent pro-inflammatory cell signaling. The use of anti-TNF agents promotes mucosal healing, avoids the need for steroids, and reduces the need for surgery and hospitalizations, thus, improving quality of life in IBD patients [5]. However, its effectiveness in patients with CD is heterogeneous. Primary non-response to anti-TNF therapy occurs in up to 40% of IBD patients in randomized trials and in 10–20% of patients in real-life series. Secondary loss of response is also frequent in CD patients, with its incidence ranging from 23% to 46% at 12 months after anti-TNF initiation [6,7]. In addition, the chronic use of TNF- α inhibitors is expensive and carries a significant risk of infections, paradox autoimmune events, lymphoproliferative disorders, demyelinating disease, and heart disease [4].

The identification of non-invasive predictors of response to anti-TNF therapy would result in a more efficient prescription of these drugs, thereby optimizing indications and minimizing side effects and costs [8]. This is particularly attractive in CD given the availability of other biological therapies targeting different molecular pathways (e.g., anti- $\alpha 4\beta 7$ integrin, the anti-p40 subunit of interleukin-12, and interleukin-23) [9]. Several studies have aimed to identify reliable biomarkers of response to anti-TNF agents, most of them focused on pharmacogenomics. Genetic variations involving the Fc receptor, apoptosis, TNF signaling, and autophagy have been identified. Other studies have focused on mRNA abundance in peripheral blood and intestinal tissue, microbiota analysis, or on protein markers [8]. However, none of them was sufficiently accurate to be implemented in routine clinical practice.

Proteomics has shown utility in discovering biomarkers related to IBD [10]. However, no study has found definite proteomic predictors of the primary response to anti-TNF agents in CD hitherto [11]. Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra (SWATH) is one of the most promising approaches in proteomics. It consists of using the information available in fragment ion spectral libraries to mine the complete fragment ion maps generated using a data-independent mass spectrometry acquisition method [12]. The aim of the present study was to identify biomarkers using SWATH proteomics to predict short term clinical remission (STR) after initiating anti-TNF drugs in patients with CD.

2. Results

2.1. Descriptive Study and Clinical Predictors of Non-Short-Term Remission

One hundred and thirteen patients were clinically analyzed to determine their short-term clinical response to anti-TNF therapy; of these, 85.8% of patients showed STR and 14.2% NSTR. Table 1 shows the baseline features of patients according to their clinical response to therapy. Regarding the anti-TNF agent prescribed, 50.4% were treated with infliximab or biosimilar, and 49.6% received adalimumab without statistical differences in terms of therapeutic response. Younger patients (NSTR: 53.5 (43.0–59.3) years old vs. STR: 39.0 (27.5–50.0) years old, $p = 0.005$) and with a more recent diagnosis of CD (NSTR: 22.0 (2.5–26.0) vs. STR: 4.0 (1.0–13.0), $p = 0.021$), were more likely to have an STR to anti-TNF drugs. Conversely, corticosteroids induction (NSTR: 50.0% vs. STR: 16.5%, $p = 0.006$), previous bowel resection (NSTR: 62.5% vs. STR: 20.6%, $p = 0.001$), and increased CDAI at baseline (NSTR: 235.5 (149.3–310.0) vs. STR: 91.2 (54.9–166.0), $p = 0.000$) were positively associated with NSTR (Table 1).

Table 1. Relationship between demographic and clinical characteristics and patient response to anti-TNF therapy. Univariate analysis for patients with short-term remission (STR) and patients with non-STR.

| Variable | Missing Values | Univariate Analysis | | | |
|--|----------------|---------------------|---------------------|------------------------------|----------|
| | | NSTR (16) | STR (97) | OR (95% CI) | <i>p</i> |
| Gender (% male) | - | 11 (68.8%) | 53 (54.6%) | 0.5 (0.2–1.7) | 0.296 |
| Age (years, median, IQR) | - | 53.5 (43.0–59.3) | 39.0 (27.5–50.0) | 1.1 (1.0–1.1) | 0.009 * |
| Smoking habit (%) | 8 (7.1%) | | | | |
| No | | 9 (69.2%) | 46 (50.0%) | 1 (Ref.) | |
| Yes | | 4 (30.8%) | 32 (34.8%) | 0.6 (0.2–2.3) | 0.486 |
| Former | | 0 (0.0%) | 14 (15.2%) | 0.0 (0.0-) | 0.999 |
| Anti-TNF | - | | | | |
| Infliximab/biosimilar (%) | | 9 (56.3%) | 48 (49.5%) | 1 (Ref.) | |
| Adalimumab (%) | | 7 (43.8%) | 49 (50.5%) | 0.8 (0.3–2.2) | 0.617 |
| Treatment indication | - | | | | |
| Luminal disease (%) | | 15 (93.8%) | 84 (86.6%) | 1 (Ref.) | |
| Perianal disease (%) | | 1 (6.3%) | 8 (8.2%) | 0.7 (0.1–6.0) | 0.745 |
| Both (%) | | 0 (0.0%) | 5 (5.2%) | 0.0 (0.0-) | 0.999 |
| Immunomodulatory therapy | - | | | | |
| None (%) | | 2 (12.5%) | 17 (17.5%) | 1 (Ref.) | |
| Azathioprine (%) | | 13 (81.3%) | 74 (76.3%) | 1.5 (0.3–7.2) | 0.619 |
| Methotrexate (%) | | 0 (0.0%) | 3 (3.1%) | 0.0 (0.0-) | 0.999 |
| Other (%) | | 1 (6.3%) | 3 (3.1%) | 2.8 (0.2–42.0) | 0.449 |
| Corticosteroids induction (yes, %) | - | 8 (50.0%) | 16 (16.5%) | 5.1 (1.7–15.5) | 0.004 * |
| Basal BMI (Kg/m ²) (median, IQR) | 10 (8.8%) | 23.0 (20.8–24.9) | 22.4 (20.5–26.0) | 1.0 (0.8–1.1) | 0.838 |
| Disease duration (years, median, IQR) | 8 (7.1%) | 22.0 (2.5–26.0) | 4.0 (1.0–13.0) | 1.1 (1.0–1.2) | 0.006 * |
| Montreal (age at diagnosis) | 11 (9.7%) | | | | |
| <17 (%) | | 0 (0.0%) | 7 (7.8%) | 1 (Ref.) | |
| 17–40 (%) | | 9 (75.0%) | 64 (71.1%) | 2.3 × 10 ⁸ (0.0-) | 0.999 |
| >40 (%) | | 3 (25.0%) | 19 (21.1%) | 2.6 × 10 ⁸ (0.0-) | 0.999 |
| Montreal location | 3 (2.7%) | | | | |
| Ileal (%) | | 8 (53.3%) | 39 (41.1%) | 1 (Ref.) | |
| Colonic (%) | | 1 (6.7%) | 16 (16.8%) | 0.3 (0.0–2.6) | 0.281 |
| Ileocolonic (%) | | 6 (40.0%) | 37 (38.9%) | 0.8 (0.3–2.5) | 0.689 |
| Isolated upper disease (%) | | 0 (0.0%) | 3 (3.2%) | 0.0 (0.0-) | 0.999 |
| Behavior | 8 (7.1%) | | | | |
| Inflammatory (%) | | 5 (38.5%) | 56 (60.9%) | 1 (Ref.) | |
| Stricturing (%) | | 1 (7.7%) | 16 (17.4%) | 0.7 (0.1–6.4) | 0.753 |
| Fistulizing (%) | | 7 (53.8%) | 18 (19.6%) | 4.4 (1.2–15.4) | 0.023 * |
| Fistulizing and Stricturing (%) | | 0 (0.0%) | 2 (2.2%) | 0.0 (0.0-) | 0.999 |
| Perianal disease (yes, %) | 1 (0.9%) | 2 (12.5%) | 32 (33.3%) | 0.3 (0.1–1.3) | 0.111 |
| Extraintestinal manifestation (yes, %) | 8 (7.1%) | 2 (15.4%) | 14 (15.2%) | 1.0 (0.2–5.1) | 0.987 |
| Appendectomy (yes, %) | 8 (7.1%) | 1 (7.7%) | 8 (8.7%) | 0.9 (0.1–7.6) | 0.904 |
| Bowel resection (yes, %) | - | 10 (62.5%) | 20 (20.6%) | 6.4 (2.1–19.8) | 0.001 * |
| Perianal surgery (yes, %) | - | 0 (0.0%) | 18 (18.6%) | 0.0 (0.0-) | 0.998 |
| Basal CDAI score (AU, median, IQR) | - | 235.5 (149.3–310.0) | 91.2 (54.9–166.0) | 1.0 (1.0–1.0) | 0.000 * |
| Basal hemoglobin (g/L, mean ± SD) | 9 (8.0%) | 12.7 ± 1.0 | 13.0 ± 1.5 | 0.8 (0.6–1.3) | 0.384 |
| Basal WBC (10 ³ /μL, median, IQR) | 9 (8.0%) | 7.5 (5.5–11.7) | 7.6 (5.6–10.4) | 1.1 (0.9–1.2) | 0.561 |
| Basal platelets (10 ³ /μL, median, IQR) | 10 (8.8%) | 304.0 (223.0–356.5) | 312.5 (263.5–363.5) | 1.0 (1.0–1.0) | 0.235 |
| Basal albumin (g/dL, mean ± SD) | 22 (19.5%) | 4.0 ± 0.4 | 4.0 ± 0.5 | 0.9 (0.2–3.8) | 0.940 |
| Basal ferritin (ng/mL, median, IQR) | 19 (16.8%) | 119.5 (51.2–187.3) | 55.0 (26.0–114.9) | 1.0 (1.0–1.0) | 0.449 |
| Basal CRP (mg/L, median, IQR) | 14 (12.4%) | 2.3 (0.6–3.4) | 4.4 (0.6–14.6) | 1.0 (0.9–1.0) | 0.253 |
| Basal ESR (mm/h, median, IQR) | 34 (30.1%) | 35.0 (10.8–85.8) | 27.0 (11.0–37.0) | 1.0 (1.0–1.0) | 0.121 |
| Basal ENOA (μg/mg protein) | 1 (0.9%) | 0.1 (0.0–0.2) | 0.1 (0.0–0.2) | 0.1 (0.0–4.7) | 0.199 |
| Basal VINC (pg/mg protein) | - | 0.8 (0.2–1.2) | 1.2 (0.6–2.0) | 0.7 (0.4–1.2) | 0.171 |

* BMI, body mass index; CDAI, Crohn's Disease Activity Index; WBC, white blood cells; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; ENOA, alpha-enolase; VINC, vinculin; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

2.2. Proteomic Markers of Short-Term Remission

Three hundred plasma proteins were quantified in proteomic analysis. As potential primary response biomarkers, we identified 18 differentially expressed proteins ($p \leq 0.009$ and fold change ≥ 2.4): ENOA, VINC, PDZ, and LIM domain protein 1 (PDLI1), Rho

GDP-dissociation inhibitor 2 (GDIR2), Zyxin (ZYG), Fructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA), moesin (MOES), glutathione S-transferase omega-1 (GSTO-1), alpha-actinin-1 (ACTN1), Transgelin-2 (TAGL2), serum deprivation-response protein/caveolae-associated protein 2 (SDPR), Rab GDP dissociation inhibitor beta (GDIB), cofilin-1 (COF1), protein S100-A4 (S10A4), Ras suppressor protein 1 (RSU1), pleckstrin (PLEK), 14-3-3 protein zeta/delta (1433Z), and triosephosphate isomerase (TPIS) (Table 2). The functional pathway analysis showed that 17 of these 18 identified proteins are regulated by acetylation. In addition, 14 of these potential biomarkers of response to anti-TNF participate in hemostasis/platelet function (VINC, ALDOA, MOES, ACTN1, TAGL2, SDPR, COF1, and PLEK) and/or are involved in the organization of the cytoskeleton and/or cell adhesion (VINC, PDLI1, GDIR2, ZYG, ALDOA, MOES, ACTN1, TAGL2, SDPR, COF1, S10A4, RSU1, PLEK, and 1433Z), 3 of them are related to the inflammatory response (GSTO1, GDIB, and S10A4) and 3 proteins are involved in the glycolytic process (ENOA, ALDOA, and TPIS).

Table 2. Differentially expressed proteins identified in plasma samples of Crohn’s disease patients with STR to anti-TNF. Statistical significance by *t*-test ($p \leq 0.01$).

| Protein ID | Protein | <i>p</i> | Fold Change | Biological Process | Molecular Function |
|------------|---------|----------|-------------|--|---|
| P06733 | ENOA | 0.0001 | 3.9 | Glycolysis/Plasminogen activation/Transcription regulation | DNA binding/Lyase/Repressor |
| P18206 | VINC | 0.0007 | 4.6 | Cell adhesion/Cytoskeleton; Hemostasis/Platelet function | Actin binding |
| O00151 | PDLI1 | 0.0013 | 2.4 | Cell adhesion/Cytoskeleton | Actin binding |
| P52566 | GDIR2 | 0.0013 | 4.9 | Cell adhesion/Cytoskeleton | GTPase activity |
| Q15942 | ZYG | 0.0014 | 5.5 | Cell adhesion/Cytoskeleton | Metal binding/RNA binding |
| P04075 | ALDOA | 0.0021 | 3.3 | Glycolysis; Cell adhesion/Cytoskeleton; Hemostasis/Platelet function | Actin binding/Fructose-bisphosphate aldolase activity |
| P26038 | MOES | 0.0023 | 2.5 | Cell adhesion/Cytoskeleton; Hemostasis/Platelet function | Actin binding |
| P78417 | GSTO1 | 0.0025 | 3.2 | Inflammatory response | Oxidoreductase/Transferase |
| P12814 | ACTN1 | 0.0025 | 3.2 | Cell adhesion/Cytoskeleton; Hemostasis/Platelet function | Actin binding |
| P37802 | TAGL2 | 0.0027 | 6.4 | Cell adhesion/Cytoskeleton; Hemostasis/Platelet function | Cadherin binding |
| O95810 | SDPR | 0.0027 | 4.2 | Cell adhesion/Cytoskeleton; Hemostasis/Platelet function | Lipid binding |
| P50395 | GDIB | 0.0028 | 3.0 | Inflammatory response | GTPase activation |
| P23528 | COF1 | 0.0029 | 3.0 | Cell adhesion/Cytoskeleton; Hemostasis/Platelet function | Actin binding |
| P26447 | S10A4 | 0.0031 | 3.3 | Cell adhesion/Cytoskeleton; Inflammatory response | Actin binding |
| Q15404 | RSU1 | 0.0037 | 3.9 | Cell adhesion/Cytoskeleton | Positive regulation of GTPase activity |
| P08567 | PLEK | 0.0048 | 5.7 | Cell adhesion/Cytoskeleton; Hemostasis/Platelet function | Protein binding |
| P63104 | 1433Z | 0.0078 | 4.2 | Cell adhesion/Cytoskeleton | Protein binding |
| P60174 | TPIS | 0.0093 | 3.6 | Glycolysis | Isomerase/Lyase |

2.3. Validation of ENOA and VINC as Potential Markers of Short-Term Remission

ENOA and VINC were selected to perform the validation of proteomic results through ELISA tests due to their higher level of significance (Table 2). According to ELISA, both proteins showed a non-significant increase in plasma samples from STR patients. However, in the case of VINC, the differential expression bordered on statistical significance when NSTR and STR groups were compared (NSTR: 0.8 (0.2–1.2) vs. STR: 1.2 (0.6–2.0), $p = 0.054$).

(Table 1 and Figure 1A). Moreover, when patients in the STR group were stratified into patients with sustained remission (SR) and patients with loss of response (LR) after 12 months of therapy, we found statistically significant differences in plasma levels of VINC between the SR (1.3 (0.8–2.1)) and LR groups (0.7 (0.2–1.8)) ($p = 0.019$), and between the SR and NSTR groups (0.8 (0.2–1.2)) ($p = 0.014$) (Figure 1B). These differences were consistent with previous results obtained in the proteomic analysis for VINC, only for SR ($492,127.1 \pm 219,002.2$) and NSTR groups ($106,569.3 \pm 65,803.9$) ($p = 0.001$).

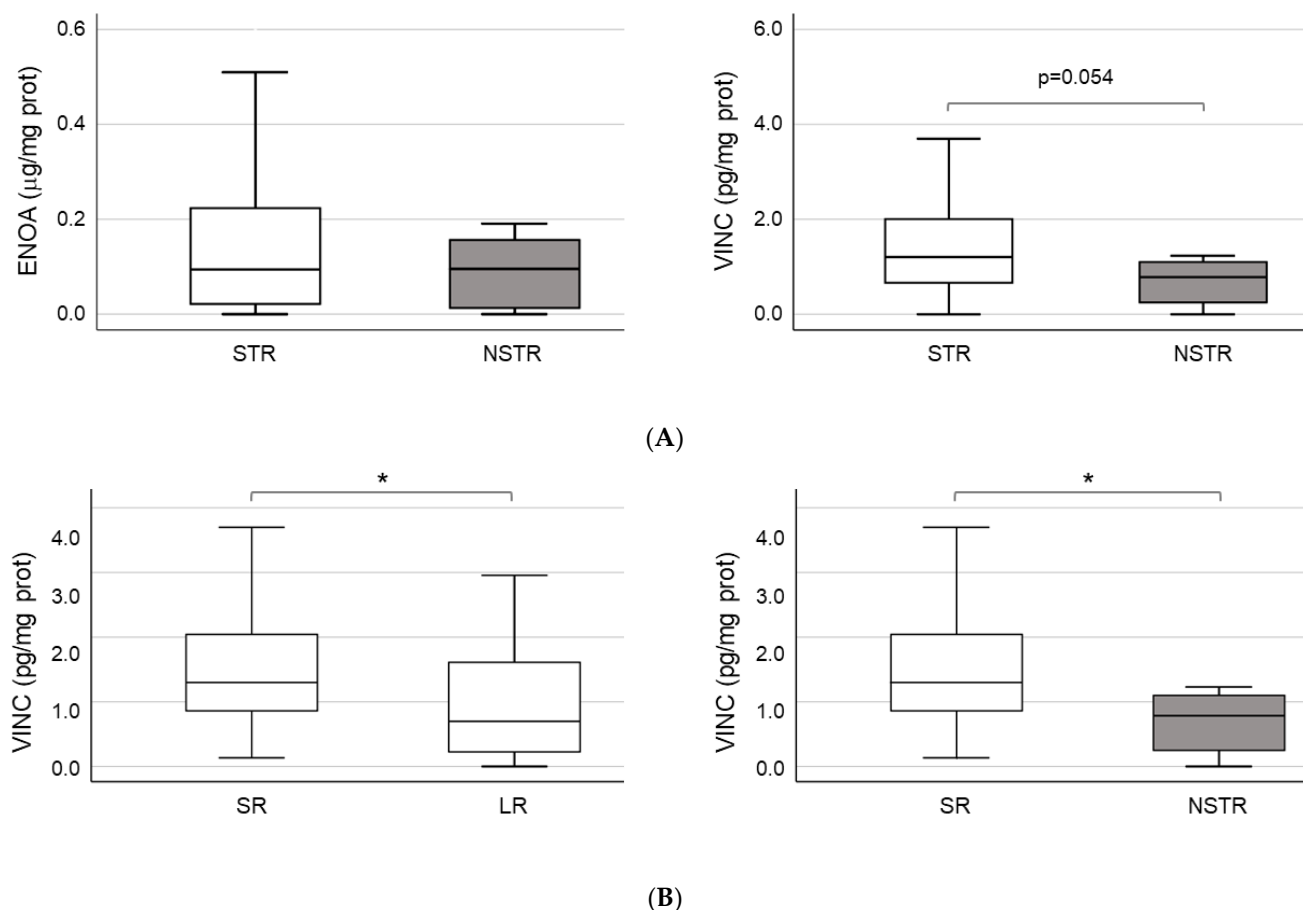


Figure 1. Validation of proteomics results. (A) Quantification of plasma concentration of alpha-nolase (ENOA) and vinculin (VINC) by ELISA. The sample size was 97 for the short-term remission (STR) group and 16 for the non-STR (NSTR) group. (B) Comparison of plasma levels for VINC by ELISA, between the subgroups of STR patients with sustained remission (SR; $n = 75$), or loss of response (LR; $n = 22$) after 12 months of therapy, and the NSTR group. Statistical significance between groups (*).

2.4. Prognostic Value of ENOA and VINC in CD Patients Undergoing Anti-TNF Therapy

Next, we evaluated the prognostic value of clinical and pathological parameters to predict the patient's response to anti-TNF treatment. Age (OR: 1.1 (1.0–1.1), $p = 0.009$), disease duration (OR: 1.1 (1.0–1.2), $p = 0.006$), corticosteroids induction (OR: 5.1 (1.7–15.5), $p = 0.004$) and mainly, bowel resection (OR: 6.4 (2.1–19.8), $p = 0.001$) and basal CDAI score (OR: 1.0 (1.0–1.0), $p = 0.000$), were independent factors of NSTR (Table 1). In a multivariate analysis, corticosteroids induction (OR: 8.6 (1.7–43.5), $p = 0.009$), bowel resection (OR: 10.5 (2.1–52.0), $p = 0.004$), and basal CDAI score (OR: 1.0 (1.0–1.0), $p = 0.003$) were factors predicting NSTR. The inclusion of basal VINC levels, but not ENOA levels, in the analysis increased the predictive capacity of the model (Table 3). A good discriminant capacity of the adjusted model was obtained (AUC (95% CI) = 0.919 (0.862–0.977)) (Table 4 and Figure 2).

Table 3. Multivariate analysis to predict NSTR to anti-TNF therapy in Crohn’s disease. The analysis was performed separately, including exclusively clinical variables (without -w/o- VINC or ENOA), and including clinical variables together with (w/) ENOA or VINC.

| Variable | Multivariate Analysis | | | | | |
|-------------------------------|-----------------------|----------|-----------------|----------|-----------------|----------|
| | w/o VINC/ENOA | | w/ ENOA | | w/ VINC | |
| | OR (95% CI) | <i>p</i> | OR (95% CI) | <i>p</i> | OR (95% CI) | <i>p</i> |
| Age (years) | - | - | x | x | x | x |
| Corticosteroids induction (%) | 8.6 (1.7–43.5) | 0.009 * | 12.8 (2.4–68.8) | 0.003 * | 14.3 (2.6–77.7) | 0.002 * |
| Disease duration (years) | - | - | x | x | x | x |
| Bowel Resection (%) | 10.5 (2.1–52.0) | 0.004 * | 13.2 (2.5–68.9) | 0.002 * | 14.8 (2.8–78.0) | 0.001 * |
| Basal CDAI score (AU) | 1.0 (1.0–1.0) | 0.003 * | 1.0 (1.0–1.0) | 0.001 * | 1.0 (1.0–1.0) | 0.002 * |
| Basal ENOA (µg/mg protein) | x | x | 0.0 (0.0–1.7) | 0.067 | x | x |
| Basal VINC (pg/mg protein) | x | x | x | x | 0.5 (0.3–0.9) | 0.032 * |

(*) Statistically significant as a predictor in the multivariate analysis.

Table 4. Area under the receiver operating characteristic curve (AUROC) of the multivariate models in Figure 2. The table shows the comparison of AUROC obtained for the single parameters included in the adjusted model and for their combination w/ or w/o vinculin.

| Variable | AUROC | <i>p</i> | 95% CI |
|---------------------------|-------|----------|---------------|
| Basal VINC (pg/mg) | 0.651 | 0.054 | (0.500–0.802) |
| Corticosteroids induction | 0.668 | 0.032 | (0.511–0.824) |
| Bowel resection | 0.709 | 0.007 | (0.562–0.857) |
| CDAI score | 0.829 | 0.000 | (0.718–0.940) |
| Adjusted model (w/o VINC) | 0.904 | 0.000 | (0.838–0.970) |
| Adjusted model (w/ VINC) | 0.919 | 0.000 | (0.862–0.977) |

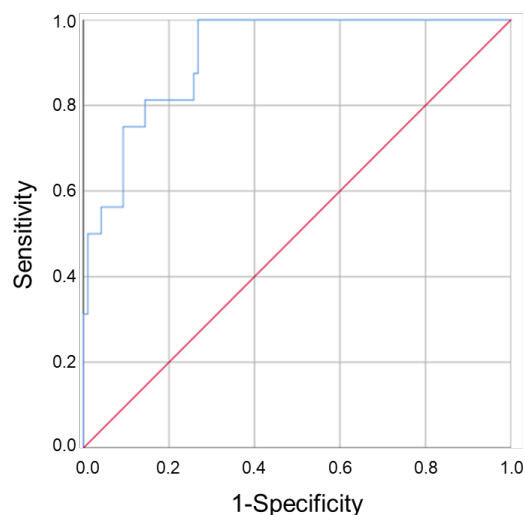


Figure 2. The role of vinculin in the prognostic assessment of CD patient’s response to anti-TNF drugs. The ROC curve showed that the regression model constructed using plasma levels of VINC in combination with clinico-pathological parameters could predict the patient’s response to therapy.

3. Discussion

The present pilot study illustrated the utility of SWATH proteomics to identify potential plasma biomarkers associated with a differential therapeutic response to anti-TNF agents in CD. In a recent prospective, multicentre, UK-wide study (PANTS study), younger age was associated with an increased likelihood of therapeutic response to infliximab in patients with CD [13]. Moreover, an increased CDAI score at baseline was strongly associated with NSTR. In addition, the earlier prescription of anti-TNF could save bowel resection, which has also been related to NSTR. Aligning with these data, we found that NSTR was

more frequent in older patients and with a longer evolution of the disease. Early anti-TNF therapy may improve the natural history of CD, supporting the currently recommended top-down therapeutic approach according to disease severity and patient characteristics. Patients with aggressive behavior of the disease may not benefit from the traditional step-up approach, which could delay an effective suppression of mucosal inflammation, which, in turn, could evolve to increased disease activity and resistance to other drugs [14]. However, the top-down approach, including the use of biological therapy of CD is not without risks, particularly the severe adverse events associated with the widespread use of biologic drugs. Therefore, the identification of non-invasive biomarkers to predict response to anti-TNF agents would allow a more rational and efficient prescription of biological therapies in clinical practice.

The SWATH proteomics identified plasma proteins involved in the organization of the cytoskeleton and cell junction, hemostasis/platelet function, carbohydrate metabolism, and immune response as potential biomarkers of STR. The cytoskeleton is involved in a number of different cellular functions, such as scaffolding, adhesion, migration, and signaling [15]. It exerts key regulatory functions in the maintenance of cellular barriers by cell-to-cell and cell-to-matrix adhesions. Together with the mucosal layer and the cellular immune system, the epithelial cell layer of the gastrointestinal tract forms the first physical barrier against external factors, including an aberrant intestinal microbiome, and allows for the absorption of nutrients and immune detection. Therefore, the integrity of the cytoskeleton is paramount to maintaining the epithelial barrier integrity, and its disruption is thought to play a critical role in the pathogenesis of CD [16]. In immune-mediated inflammatory diseases, pro-inflammatory mediators can induce cytoskeletal rearrangements that cause inflammation-dependent defects in the intestinal barrier's function [17]. It is not surprising that maintaining the structure of the cytoskeleton was the biological process that accounts for the largest number of proteins differentially expressed between patients with and without therapeutic response to anti-TNF in the present study. Aligning with the role of TNF- α in damaging cell junctions [18], our results show that the response to anti-TNF agents can be affected by proteins involved in these cellular structures. COF1 is a major actin-polymerization factor that controls the opening of tight junctions in the epithelial barrier and participates in the invasion process of the colonic epithelia by the enteric pathogen *Shigella* [19]. Moreover, increased expression of phospho-COF1 has been associated with the migratory ability of dendritic cells [20], which are the most potent type of antigen-presenting cells and play a central role in the pathogenesis of IBD [21]. 1433Z is a cadherin-binding protein that is involved in cell-to-cell adhesion. Although 1433Z is implicated in the regulation of a large number of signaling pathways, this protein has not been previously associated with CD. VINC [22] is an actin filament-binding protein that, like RSU1 [23], colocalizes at focal adhesions and is involved in cell-matrix adhesion. Decreased expression of VINC has been described in quiescent and inflamed IBD, suggesting that its abundance change is a primary structural feature of the IBD epithelial layer and is not influenced by the inflammatory process. VINC inhibition could imply a decrease in cytoskeletal stiffness and the alteration of the mechanical properties of the epithelial layer, thus increasing the risk of exposure to bacterial invasion [24]. In our study, VINC was the second more differentially expressed protein and one of the five most overexpressed proteins identified by SWATH proteomics. ELISA test partially confirmed this result, reaching statistical significance when SR patients were compared with LR patients within the STR group, or with patients in the NSTR group, in a larger cohort. Thus, VINC analysis at baseline could be useful to identify SR patients and differentiate them from both LR patients and NSTR patients.

Other proteins related to the actin cytoskeleton that were found to be differentially expressed in our proteomic analysis were GDIR2 [25], TAGL2 [15,26], ZYX [27], PDLI1 [28], SDPR, MOES, PLEK, and ACTN1 [29]. Upregulation of GDIR1 (another member of the Rho GDI family that regulates reorganization of the actin cytoskeleton) in primary intestinal epithelial cells isolated from patients with CD has been associated with the destruction of epithelial homeostasis under chronic intestinal inflammation [30]. SDPR is a protein

involved in signal transduction that has been physically associated with PLEK in platelets. ACTN1 and MOES have been proposed to indirectly associate PLEK with actin [29]. This is particularly interesting because all of them have been previously associated with hemostasis/platelet function, probably due to platelets' cellular physiology, which requires actin polymerization [31]. Indeed, platelet metabolism has been associated with therapeutic response to infliximab in patients with CD [32]. Platelets are potent immune modulators and effectors which directly recognize and kill pathogens, allow to recruit leukocytes at sites of infection and inflammation, and to facilitate their immune activity [33]. Platelets may induce the differentiation of monocytes into dendritic cells and could stimulate the activation of dendritic cells [34,35]. PLEK activation can be detected early after platelet stimulation [36] and has been associated with actin polymerization and related processes such as cytoskeletal reorganization, platelet aggregation, granule secretion, or cell spreading [29,37,38]. SDPR [39] and MOES [40] may participate in different cytoskeletal reorganization processes and platelet biology processes, such as endocytosis, adhesion, locomotion, and signaling. Moreover, MOES activity is associated with lipopolysaccharide-mediated signal transduction in monocytes/macrophages through the induction of TNF- α secretion [40].

S10A4 is a promising therapeutic target in IBD because, similar to other cytoskeleton-related proteins described above, it also amplifies an inflammatory microenvironment [41]. A prospective study with 118 patients identified serum S10A4 protein as a candidate marker to distinguish between IBD and non-IBD population and between CD subgroups [42]. Moreover, some members of the S-100 protein family, such as S10A8 and S10A9, were identified within the top five differentially expressed genes in mucosal biopsy samples from CD patients, able to predict infliximab response with 100% accuracy [43]. The remaining proteins related to the inflammatory response identified in this study were GDIB and GSTO1. The expression of GDIB has been associated with the reduction of inflammation in the tumor microenvironment [44] and the suppression of metastasis [45], being a predictor of relapse-free survival in colorectal cancer [46]. In addition, GDIB is involved in TNF- α -mediated polymorphonuclear neutrophil apoptosis [47]. According to our results, GSTO-1 deficient mice show a more severe inflammatory response and increased escape of bacteria from the colon to the lymphatic system in a preclinical model of IBD [48].

ENOA is a multifunctional enzyme that is involved in many diseases, including inflammatory disorders [49], being identified as the second most differentially expressed protein in human pathologies [50]. In hematopoietic cells, ENOA serves as a receptor of plasminogen [51], which is upregulated in CD patients who show primary non-response to infliximab [52]. Although the ELISA test could not confirm the results obtained for ENOA, other proteins related to glycolysis, such as ALDOA and TPIS, were also identified by proteomics as low-abundance proteins in NSTR patients. In general, IBD patients show strong seroreactivity against glycolytic enzymes. Autoantibodies against ENOA have been identified in ulcerative colitis and CD [53,54]. Therefore, the decrease in glycolytic enzymes in IBD patients could be associated with a higher production of antibodies against enzymes of this pathway, coinciding with more severe disease. Curiously, the cytoskeleton can also impact the glycolytic pathway since full activation of glycolysis requires remodeling of the actin cytoskeleton [55].

In combination with well-known clinical predictors, the biomarkers identified in this study could help to better select CD patients who are candidates for anti-TNF therapy. The measurement of plasma levels of VINC added value to the multivariate model when combined with clinical parameters (basal CDAI score, bowel resection, and corticosteroid induction) to predict the response to anti-TNF drugs. In this way, anti-TNF drugs could be prescribed more safely, choosing those patients with an increased likelihood of therapeutic response. Conversely, patients with expected adverse events and/or poor therapeutic response to anti-TNF could be allocated to other biologic agents using different targets, thus allowing for personalized medicine in CD.

4. Materials and Methods

4.1. Study Design

We conducted a multicentre, observational, and prospective study of patients with CD who started anti-TNF treatment (infliximab, adalimumab, or biosimilar infliximab). The choice of the anti-TNF agent was at the discretion of the responsible physician, and drugs were prescribed according to the licensed dosing schedule. The study protocol was conducted according to the ethical principles contained in the Declaration of Helsinki, and the research protocol was approved by the Andalusian Biomedical Ethics Committee (record number 225, reference 2421). All the patients were informed and provided written consent to participate.

4.2. Study Population

One hundred and thirteen adult patients suffering from CD, naïve to anti-TNF drugs and with indication to anti-TNF therapy due to clinical, endoscopic, or radiological activity, were enrolled at three academic hospitals: Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, Spain), Hospital Universitario de la Princesa (Madrid, Spain) and Hospital Universitario de Galdakano (Bizkaia, Spain). Therapeutic response was evaluated 12 weeks after the initiation of the anti-TNF drug, and patients were then classified as patients with STR or patients with non-STR (NSTR). The primary outcome of the study was the absence of clinical response, evaluated according to the Crohn's Disease Activity Index (CDAI) in luminal disease and to the Fistula Drainage Assessment in perianal disease. The criteria to consider the absence of response were: CDAI > 150; endoscopic or radiologic activity; purulent drainage after a gentle finger compression; new fistula; dose escalation; switch to a different drug; addition of other immunosuppressants; surgery or endoscopic dilation [56,57]. STR patients were additionally stratified into patients with SR and patients with LR after 12 months of therapy.

4.3. Plasma Samples

Plasma samples were collected within 2 days prior to the first dose of the anti-TNF agent in EDTA-K3 9 mL tubes (K3E VACUETTE[®], Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). All samples were spun within the first hour after collection, at 3000 rpm and 4 °C for 10 min. Plasma was immediately recovered and stored at −80 °C until analysis.

4.4. Sample Preparation for LC-MS Analysis

The proteomic analysis was performed on a subset of 20 patients randomly selected and classified according to the primary outcome of the study as STR patients ($n = 16$; 8 SR and 8 LR) or NSTR patients ($n = 4$). The 14 most abundant proteins in the blood were depleted using the Hu-14 Multiple Affinity Removal System kit (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) following the manufacturer's instructions. Non-depleted proteins were concentrated using 5000 molecular weight cut-off spin concentrators (Agilent Technologies). Samples were then cleaned to remove any contaminant by protein precipitation with TCA/acetone and solubilized in 50 μ L of 0.2% RapiGest SF (Waters, Milford, MA, USA) in 50 mM ammonium bicarbonate. The total protein content was measured using the Qubit Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and 50 μ g of protein was digested with trypsin following a protocol adapted from Vowinckel et al. [58]. Briefly, protein samples were incubated with 5 mM dithiothreitol at 60 °C for 30 min and then with 10 mM iodoacetamide at room temperature and in darkness for 30 min. Sequencing Grade Modified Trypsin (Promega, Madison, WI, USA) was added at a 1:40 trypsin:protein ratio and incubated at 37 °C for 2 h; the same amount of trypsin was again added and incubated at 37 °C for another 15 h. RapiGest was then precipitated by centrifugation after incubating with 0.5% trifluoroacetic acid at 37 °C for 1 h. The final volume was adjusted with milli-Q water and acetonitrile to a final concentration of 0.5 μ g peptide/ μ L, 2.25% acetonitrile, and 0.2% trifluoroacetic acid.

4.5. Creation of the Spectral Library

In order to build the MS/MS spectral libraries, the peptide solutions were analyzed by a shotgun data-dependent acquisition (DDA) approach using nano-LC-MS/MS. To obtain a good representation of the peptides and proteins present in all 20 samples, pooled vials were prepared that consisted of equivalent mixtures of the original samples. One μg of each pooled sample (2 μL) was separated into a nano-LC system Ekspert nLC415 (Eksigent, Dublin, CA, USA) using an Acclaim PepMap C18 column (75 $\mu\text{m} \times 25 \text{ cm}$, 3 μm , 100 \AA) (Thermo Fisher Scientific) at a flow rate of 300 nL/min. Water and acetonitrile, both containing 0.1% formic acid, were used as solvents A and B, respectively. The gradient run consisted of 5% to 30% B for 120 min, 10 min at 90% B, and finally 20 min at 5% B for column equilibration, for a total run time of 150 min.

Once the peptides were eluted, they were directly injected into a hybrid quadrupole-TOF mass spectrometer Triple TOF 5600+ (Sciex, Redwood City, CA, USA), operated with a "top 65" data-dependent acquisition system in positive ion mode. A NanoSpray III ESI source (Sciex) was used for the interface between nLC and MS, with a voltage application of 2600 V. The acquisition mode consisted of a 250 ms survey MS scan from 350 to 1250 m/z , followed by an MS/MS scan from 230 to 1700 m/z (60 ms acquisition time, rolling collision energy) of the top 65 precursor ions from the survey scan, for a total cycle time of 4.2 s. The fragmented precursors were then added to a dynamic exclusion list for 15 s. Any singly charged ions were excluded from the MS/MS analysis.

Peptide and protein identifications were performed using Protein Pilot software (version 5.0.1, Sciex) with a human Swiss-Prot concatenated target-reverse decoy database (downloaded in March 2016), which contains 20,200 target protein sequences, specifying iodoacetamide as Cys alkylation. The false discovery rate (FDR) was set to 0.01 for both peptides and proteins. The MS/MS spectra of the identified peptides were then used to generate the spectral library for SWATH peak extraction using the add-in for PeakView Software (version 2.1, Sciex) MS/MSALL with SWATH Acquisition MicroApp (version 2.0, Sciex). Peptides with a confidence score above 99% (as obtained from the Protein Pilot database search) were included in the spectral library.

4.6. Relative Quantification by SWATH Acquisition

Individual samples were analyzed using a Data-Independent Acquisition method. Each sample (2 μL) was analyzed using the LC-MS equipment and LC gradient described above for building the spectral library instead of using the SWATH-MS acquisition method. The method consisted of repeating a cycle with 60 TOF MS/MS scans (300 to 1600 m/z , high sensitivity mode, 90 ms acquisition time) of overlapping sequential precursor isolation windows of variable width (1 m/z overlap) covering the 350 to 1250 m/z mass range with a previous TOF MS scan (350 to 1250 m/z , 50 ms acquisition time) for each cycle. The total cycle time was 5.5 s. The width of the 60 variable windows was optimized according to the ion density found in the previous DDA runs using a SWATH variable window calculator worksheet from Sciex.

4.7. SWATH Data Analysis

The targeted data extraction of the fragment ion chromatogram traces from the SWATH runs was performed by PeakView (version 2.1) using the MS/MSALL with SWATH Acquisition MicroApp (version 2.0). This application processed the data using the spectral library created from the shotgun data. Up to 10 peptides per protein and 12 fragments per peptide were selected, based on signal intensity; any shared and modified peptides were excluded from the processing. Ten-minute windows and 20 ppm widths were used to extract the ion chromatograms; SWATH quantitation was attempted for all proteins in the ion library that were identified by ProteinPilot with an FDR below 1%. The retention times from the peptides that were selected for each protein were realigned in each run according to 118 endogenous peptides from the Apolipoprotein B-100, eluted along the whole time axis. The extracted ion chromatograms were then generated for each selected fragment

ion; the peak areas for the peptides were obtained by summing the peak areas from the corresponding fragment ions. PeakView computed an FDR and a score for each assigned peptide according to the chromatographic and spectra components; only peptides with an FDR below 1% were used for protein quantitation. Protein quantitation was calculated by adding the peak areas of the corresponding peptides. MarkerView (version 1.2.1, Sciex) was used for signal normalization; differential abundance was tested by applying the T-test at the protein level, using SPSS version 25.0 (IBM, Chicago, IL, USA).

4.8. Functional Pathways Analysis

Functional pathways from the identified candidate biomarkers were analyzed by DAVID Bioinformatics Resources 6.7 [59,60].

4.9. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test was used to quantify the protein concentration of human alpha-enolase (ENOA) (Abnova, Taipei, Taiwan) and vinculin (VINC) (Antibodies-online, Aachen, Germany) in plasma samples from 113 patients (97 STR and 16 NSTR). The assay was carried out following the manufacturer's instructions, and the obtained data were used to validate the proteomics results.

4.10. Statistical Analysis

Categorical variables were displayed in frequency tables, whereas continuous variables were expressed as mean and standard deviation, or as median and interquartile ranges (IQR) for those with asymmetric distribution. The Kolmogorov–Smirnov test was used to check the normal distribution. The Chi-square test was used for frequencies, Student's T- or ANOVA tests for quantitative variables with normal distribution, and Mann–Whitney's U or Kruskal–Wallis for asymmetric distributions. A *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant. All analyses were performed by using SPSS version 25.0.

5. Conclusions

To our knowledge, this is the first study that applied a SWATH proteomics approach to identify potential biomarkers to predict therapeutic response to biologic agents in CD. Identified plasma proteins were involved in critical hallmarks of the disease. In this sense, depletion of cytoskeletal proteins in CD may trigger disruption of the intestinal epithelial barrier and inflammation, which could translate into more severe disease and resistance to therapy. VINC was a promising biomarker identified in the study, and its differential expression was partially confirmed by ELISA. The combination of plasma VINC levels and clinical data related to corticosteroid induction, bowel resection, and basal CDAI score showed the best predictive value. The validation of candidate biomarkers identified in this proteomic approach in a larger cohort is needed in order to select the appropriate combination of them that, along with clinical features and other inflammatory markers, allow for a more rational and efficient use of anti-TNF agents in clinical practice.

6. Patents

A patent application has been submitted to the Spanish Patent and Trademark Office to protect the intellectual property of the results derived from this study (application number P202330350; registration date 5 April 2023).

Author Contributions: Conceptualization, P.A.-M., E.I.-F., and V.G.-S.; clinical assessment, diagnosis, and treatment, E.I.-F., J.M.B., S.M.-P., I.S.-R., P.S.-E., B.G., M.L.R.-P., J.L.C., M.C., J.P.G. and V.G.-S.; methodology, R.M.-M., C.I.L., S.G.-R., G.F. and P.A.-M.; SWATH proteomics, E.C.-G. and I.O.; data analysis, R.M.-M., M.L.R.-P., G.F. and P.A.-M.; writing—original draft preparation, R.M.-M., G.F. and P.A.-M.; writing—review and editing, R.M.-M., G.F., and P.A.-M.; supervision, E.I.-F., G.F. and P.A.-M.; funding acquisition, P.A.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by the “Plan Nacional de I + D + I Proyectos de Investigación en Salud of Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Subdirección General de Evaluación and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)” (grant number PI15/01352). R.M-M. was supported by Consejería de Salud y Familias, Junta de Andalucía (PI-0199-2013). G.F. was supported by CIBEREHD (Instituto de Salud Carlos III).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of Reina Sofia University Hospital / IMIBIC (record number 225, reference 2421).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to a patent application.

Conflicts of Interest: J.P.G. has served as a speaker, a consultant, and advisory member for or has received research funding from MSD, Abbvie, Hospira, Pfizer, Kern Pharma, Biogen, Takeda, Janssen, Roche, Sandoz, Celgene, Ferring, Faes Farma, Shire Pharmaceuticals, Dr. Falk Pharma, Tillotts Pharma, Chiesi, Casen Fleet, Gebro Pharma, Otsuka Pharmaceutical, and Vifor Pharma. The rest of the authors declare no competing financial interests. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Lungaro, L.; Costanzini, A.; Manza, F.; Barbalinardo, M.; Gentili, D.; Guarino, M.; Caputo, F.; Zoli, G.; De Giorgio, R.; Caio, G. Impact of Female Gender in Inflammatory Bowel Diseases: A Narrative Review. *J. Pers. Med.* **2023**, *13*, 165. [\[CrossRef\]](#)
2. Caio, G.; Lungaro, L.; Caputo, F.; Zoli, E.; Giancola, F.; Chiarioni, G.; De Giorgio, R.; Zoli, G. Nutritional Treatment in Crohn’s Disease. *Nutrients* **2021**, *13*, 1628. [\[CrossRef\]](#)
3. Danese, S.; Fiocchi, C. Etiopathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *World J. Gastroenterol.* **2006**, *12*, 4807–4812. [\[CrossRef\]](#)
4. Abraham, B.P.; Ahmed, T.; Ali, T. Inflammatory Bowel Disease: Pathophysiology and Current Therapeutic Approaches. In *Gastrointestinal Pharmacology*; Handbook of Experimental Pharmacology; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2017; Volume 239, pp. 115–146. [\[CrossRef\]](#)
5. Gomollón, F.; Dignass, A.; Annese, V.; Tilg, H.; Van Assche, G.; Lindsay, J.O.; Peyrin-Biroulet, L.; Cullen, G.J.; Daperno, M.; Kucharzik, T.; et al. 3rd European Evidence-Based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn’s Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J. Crohn’s Colitis* **2017**, *11*, 3–25. [\[CrossRef\]](#)
6. Gisbert, J.P.; Panés, J. Loss of Response and Requirement of Infliximab Dose Intensification in Crohn’s Disease: A Review. *Am. J. Gastroenterol.* **2009**, *104*, 760–767. [\[CrossRef\]](#)
7. Ben-Horin, S.; Kopylov, U.; Chowers, Y. Optimizing Anti-TNF Treatments in Inflammatory Bowel Disease. *Autoimmun. Rev.* **2014**, *13*, 24–30. [\[CrossRef\]](#)
8. Stevens, T.W.; Matheeuwsen, M.; Lönnkvist, M.H.; Parker, C.E.; Wildenberg, M.E.; Gecse, K.B.; D’Haens, G.R. Systematic Review: Predictive Biomarkers of Therapeutic Response in Inflammatory Bowel Disease—Personalised Medicine in Its Infancy. *Aliment. Pharm.* **2018**, *48*, 1213–1231. [\[CrossRef\]](#)
9. Na, S.-Y.; Moon, W. Perspectives on Current and Novel Treatments for Inflammatory Bowel Disease. *Gut Liver* **2019**, *13*, 604–616. [\[CrossRef\]](#)
10. Gisbert, J.P.; Chaparro, M. Clinical Usefulness of Proteomics in Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review. *J. Crohn’s Colitis* **2019**, *13*, 374–384. [\[CrossRef\]](#)
11. Gisbert, J.P.; Chaparro, M. Predictors of Primary Response to Biologic Treatment [Anti-TNF, Vedolizumab, and Ustekinumab] in Patients With Inflammatory Bowel Disease: From Basic Science to Clinical Practice. *J. Crohn’s Colitis* **2020**, *14*, 694–709. [\[CrossRef\]](#)
12. Gillet, L.C.; Navarro, P.; Tate, S.; Röst, H.; Selevsek, N.; Reiter, L.; Bonner, R.; Aebersold, R. Targeted Data Extraction of the MS/MS Spectra Generated by Data-Independent Acquisition: A New Concept for Consistent and Accurate Proteome Analysis. *Mol. Cell Proteom.* **2012**, *11*, O111.016717. [\[CrossRef\]](#)
13. Kennedy, N.A.; Heap, G.A.; Green, H.D.; Hamilton, B.; Bewshea, C.; Walker, G.J.; Thomas, A.; Nice, R.; Perry, M.H.; Bouri, S.; et al. Predictors of Anti-TNF Treatment Failure in Anti-TNF-Naive Patients with Active Luminal Crohn’s Disease: A Prospective, Multicentre, Cohort Study. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *4*, 341–353. [\[CrossRef\]](#)
14. Hirschmann, S.; Neurath, M.F. Top-down Approach to Biological Therapy of Crohn’s Disease. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **2017**, *17*, 285–293. [\[CrossRef\]](#)
15. Dvorakova, M.; Nenuil, R.; Bouchal, P. Transgelins, Cytoskeletal Proteins Implicated in Different Aspects of Cancer Development. *Expert. Rev. Proteom.* **2014**, *11*, 149–165. [\[CrossRef\]](#)
16. Chelakkot, C.; Ghim, J.; Ryu, S.H. Mechanisms Regulating Intestinal Barrier Integrity and Its Pathological Implications. *Exp. Mol. Med.* **2018**, *50*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)

17. López-Posadas, R.; Stürzl, M.; Atreya, I.; Neurath, M.F.; Britzen-Laurent, N. Interplay of GTPases and Cytoskeleton in Cellular Barrier Defects during Gut Inflammation. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1240. [[CrossRef](#)]
18. Ma, T.Y.; Iwamoto, G.K.; Hoa, N.T.; Akotia, V.; Pedram, A.; Boivin, M.A.; Said, H.M. TNF-Alpha-Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability Requires NF-Kappa B Activation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2004**, *286*, G367–G376. [[CrossRef](#)]
19. Maldonado-Contreras, A.; Birtley, J.R.; Boll, E.; Zhao, Y.; Mumy, K.L.; Toscano, J.; Ayeahunie, S.; Reinecker, H.-C.; Stern, L.J.; McCormick, B.A. Shigella Depends on SepA to Destabilize the Intestinal Epithelial Integrity via Cofilin Activation. *Gut. Microbes.* **2017**, *8*, 544–560. [[CrossRef](#)]
20. Choi, N.-R.; Lee, H.-J.; Jung, S.-H.; Hong, C.Y.; Vo, M.-C.; Hoang, M.-D.; Kim, H.-J.; Lee, J.-J. Generation of Potent Dendritic Cells with Improved Migration Ability through P-Cofilin and Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Transport ATPase 2 Regulation. *Cytotherapy* **2015**, *17*, 1421–1433. [[CrossRef](#)]
21. Ortega Moreno, L.; Fernández-Tomé, S.; Chaparro, M.; Marin, A.C.; Mora-Gutiérrez, I.; Santander, C.; Baldan-Martin, M.; Gisbert, J.P.; Bernardo, D. Profiling of Human Circulating Dendritic Cells and Monocyte Subsets Discriminates Between Type and Mucosal Status in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel. Dis.* **2021**, *27*, 268–274. [[CrossRef](#)]
22. Le Clainche, C.; Dwivedi, S.P.; Didry, D.; Carlier, M.-F. Vinculin Is a Dually Regulated Actin Filament Barbed End-Capping and Side-Binding Protein. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 23420–23432. [[CrossRef](#)]
23. Dougherty, G.W.; Chopp, T.; Qi, S.-M.; Cutler, M.L. The Ras Suppressor Rsu-1 Binds to the LIM 5 Domain of the Adaptor Protein PINCH1 and Participates in Adhesion-Related Functions. *Exp. Cell Res.* **2005**, *306*, 168–179. [[CrossRef](#)]
24. Moriggi, M.; Pastorelli, L.; Torretta, E.; Tontini, G.E.; Capitanio, D.; Bogetto, S.F.; Vecchi, M.; Gelfi, C. Contribution of Extracellular Matrix and Signal Mechanotransduction to Epithelial Cell Damage in Inflammatory Bowel Disease Patients: A Proteomic Study. *Proteomics* **2017**, *17*, 1700164. [[CrossRef](#)]
25. Leffers, H.; Nielsen, M.S.; Andersen, A.H.; Honoré, B.; Madsen, P.; Vandekerckhove, J.; Celis, J.E. Identification of Two Human Rho GDP Dissociation Inhibitor Proteins Whose Overexpression Leads to Disruption of the Actin Cytoskeleton. *Exp. Cell. Res.* **1993**, *209*, 165–174. [[CrossRef](#)]
26. Guo, Z.; Neilson, L.J.; Zhong, H.; Murray, P.S.; Zanivan, S.; Zaidel-Bar, R. E-Cadherin Interactome Complexity and Robustness Resolved by Quantitative Proteomics. *Sci. Signal.* **2014**, *7*, rs7. [[CrossRef](#)]
27. Hirata, H.; Tatsumi, H.; Sokabe, M. Mechanical Forces Facilitate Actin Polymerization at Focal Adhesions in a Zyxin-Dependent Manner. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 2795–2804. [[CrossRef](#)]
28. Kotaka, M.; Kostin, S.; Ngai, S.; Chan, K.; Lau, Y.; Lee, S.M.Y.; Li, H.; Ng, E.K.O.; Schaper, J.; Tsui, S.K.W.; et al. Interaction of HCLIM1, an Enigma Family Protein, with α -Actinin 2. *J. Cell Biochem.* **2000**, *78*, 558–565. [[CrossRef](#)]
29. Baig, A.; Bao, X.; Haslam, R.J. Proteomic Identification of Pleckstrin-Associated Proteins in Platelets: Possible Interactions with Actin. *Proteomics* **2009**, *9*, 4254–4258. [[CrossRef](#)]
30. Shkoda, A.; Werner, T.; Daniel, H.; Gunckel, M.; Rogler, G.; Haller, D. Differential Protein Expression Profile in the Intestinal Epithelium from Patients with Inflammatory Bowel Disease. *J. Proteome. Res.* **2007**, *6*, 1114–1125. [[CrossRef](#)]
31. Bearer, E.L.; Prakash, J.M.; Li, Z. Actin Dynamics in Platelets. *Int. Rev. Cytol.* **2002**, *217*, 137–182. [[CrossRef](#)]
32. Meuwis, M.-A.; Fillet, M.; Lutteri, L.; Marée, R.; Geurts, P.; de Seny, D.; Malaise, M.; Chapelle, J.-P.; Wehenkel, L.; Belaiche, J.; et al. Proteomics for Prediction and Characterization of Response to Infliximab in Crohn’s Disease: A Pilot Study. *Clin. Biochem.* **2008**, *41*, 960–967. [[CrossRef](#)]
33. Jenne, C.N.; Kubes, P. Platelets in Inflammation and Infection. *Platelets* **2015**, *26*, 286–292. [[CrossRef](#)]
34. Nguyen, X.D.; Müller-Berghaus, J.; Kälsch, T.; Schadendorf, D.; Borggreffe, M.; Klüter, H. Differentiation of Monocyte-Derived Dendritic Cells under the Influence of Platelets. *Cytotherapy* **2008**, *10*, 720–729. [[CrossRef](#)]
35. Nishat, S.; Wuescher, L.M.; Worth, R.G. Platelets Enhance Dendritic Cell Responses against *Staphylococcus Aureus* through CD40-CD40L. *Infect. Immun.* **2018**, *86*, e00186-18. [[CrossRef](#)]
36. Tyers, M.; Haslam, R.J.; Rachubinski, R.A.; Harley, C.B. Molecular Analysis of Pleckstrin: The Major Protein Kinase C Substrate of Platelets. *J. Cell Biochem.* **1989**, *40*, 133–145. [[CrossRef](#)]
37. Ma, A.D.; Abrams, C.S. Pleckstrin Induces Cytoskeletal Reorganization via a Rac-Dependent Pathway. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 28730–28735. [[CrossRef](#)]
38. Roll, R.L.; Bauman, E.M.; Bennett, J.S.; Abrams, C.S. Phosphorylated Pleckstrin Induces Cell Spreading via an Integrin-Dependent Pathway. *J. Cell Biol.* **2000**, *150*, 1461–1466. [[CrossRef](#)]
39. Hansen, C.G.; Bright, N.A.; Howard, G.; Nichols, B.J. SDPR Induces Membrane Curvature and Functions in the Formation of Caveolae. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 807–814. [[CrossRef](#)]
40. Iontcheva, I.; Amar, S.; Zawawi, K.H.; Kantarci, A.; Van Dyke, T.E. Role for Moesin in Lipopolysaccharide-Stimulated Signal Transduction. *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 2312–2320. [[CrossRef](#)]
41. Zhang, J.; Hou, S.; Gu, J.; Tian, T.; Yuan, Q.; Jia, J.; Qin, Z.; Chen, Z. S100A4 Promotes Colon Inflammation and Colitis-Associated Colon Tumorigenesis. *Oncimmunology* **2018**, *7*, e1461301. [[CrossRef](#)]
42. Morávková, P.; Kohoutová, D.; Vávrová, J.; Bureš, J. S100A4 Protein in Inflammatory Bowel Disease: Results of a Single Centre Prospective Study. *Acta. Med.* **2017**, *60*, 108–113. [[CrossRef](#)]

43. Arijs, I.; Quintens, R.; Van Lommel, L.; Van Steen, K.; De Hertogh, G.; Lemaire, K.; Schraenen, A.; Perrier, C.; Van Assche, G.; Vermeire, S.; et al. Predictive Value of Epithelial Gene Expression Profiles for Response to Infliximab in Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel. Dis.* **2010**, *16*, 2090–2098. [[CrossRef](#)]
44. Said, N.; Theodorescu, D. RhoGDI2 Suppresses Bladder Cancer Metastasis via Reduction of Inflammation in the Tumor Microenvironment. *Oncoimmunology* **2012**, *1*, 1175–1177. [[CrossRef](#)]
45. Theodorescu, D.; Sapinoso, L.M.; Conaway, M.R.; Oxford, G.; Hampton, G.M.; Frierson, H.F. Reduced Expression of Metastasis Suppressor RhoGDI2 Is Associated with Decreased Survival for Patients with Bladder Cancer. *Clin. Cancer. Res.* **2004**, *10*, 3800–3806. [[CrossRef](#)]
46. Fujita, A.; Shida, A.; Fujioka, S.; Kurihara, H.; Okamoto, T.; Yanaga, K. Clinical Significance of Rho GDP Dissociation Inhibitor 2 in Colorectal Carcinoma. *Int. J. Clin. Oncol.* **2012**, *17*, 137–142. [[CrossRef](#)]
47. Kettritz, R.; Xu, Y.X.; Faass, B.; Klein, J.B.; Müller, E.C.; Otto, A.; Busjahn, A.; Luft, F.C.; Haller, H. TNF-Alpha-Mediated Neutrophil Apoptosis Involves Ly-GDI, a Rho GTPase Regulator. *J. Leukoc. Biol.* **2000**, *68*, 277–283.
48. Menon, D.; Innes, A.; Oakley, A.J.; Dahlstrom, J.E.; Jensen, L.M.; Brüstle, A.; Tummala, P.; Rooke, M.; Casarotto, M.G.; Baell, J.B.; et al. GSTO1-1 Plays a pro-Inflammatory Role in Models of Inflammation, Colitis and Obesity. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 17832. [[CrossRef](#)]
49. Kang, H.J.; Jung, S.-K.; Kim, S.J.; Chung, S.J. Structure of Human Alpha-Enolase (HENO1), a Multifunctional Glycolytic Enzyme. *Acta Cryst. D. Biol. Cryst.* **2008**, *64*, 651–657. [[CrossRef](#)]
50. Petrak, J.; Ivanek, R.; Toman, O.; Cmejla, R.; Cmejlova, J.; Vyoral, D.; Zivny, J.; Vulpe, C.D. Déjà vu in Proteomics. A Hit Parade of Repeatedly Identified Differentially Expressed Proteins. *Proteomics* **2008**, *8*, 1744–1749. [[CrossRef](#)]
51. Miles, L.A.; Dahlberg, C.M.; Plescia, J.; Felez, J.; Kato, K.; Plow, E.F. Role of Cell-Surface Lysines in Plasminogen Binding to Cells: Identification of Alpha-Enolase as a Candidate Plasminogen Receptor. *Biochemistry* **1991**, *30*, 1682–1691. [[CrossRef](#)]
52. Gazouli, M.; Anagnostopoulos, A.K.; Papadopoulou, A.; Vaiopoulou, A.; Papamichael, K.; Mantzaris, G.; Theodoropoulos, G.E.; Anagnou, N.P.; Tsangaris, G.T. Serum Protein Profile of Crohn's Disease Treated with Infliximab. *J. Crohn's Colitis* **2013**, *7*, e461–e470. [[CrossRef](#)]
53. Vermeulen, N.; Arijs, I.; Joossens, S.; Vermeire, S.; Clerens, S.; Van den Bergh, K.; Michiels, G.; Arckens, L.; Schuit, F.; Van Lommel, L.; et al. Anti-Alpha-Enolase Antibodies in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Clin. Chem.* **2008**, *54*, 534–541. [[CrossRef](#)]
54. Roozendaal, C.; Zhao, M.H.; Horst, G.; Lockwood, C.M.; Kleibeuker, J.H.; Limburg, P.C.; Nelis, G.F.; Kallenberg, C.G. Catalase and Alpha-Enolase: Two Novel Granulocyte Autoantigens in Inflammatory Bowel Disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol.* **1998**, *112*, 10–16. [[CrossRef](#)]
55. Hu, H.; Juvekar, A.; Lyssiotis, C.A.; Lien, E.C.; Albeck, J.G.; Oh, D.; Varma, G.; Hung, Y.P.; Ullas, S.; Lauring, J.; et al. Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Glycolysis through Mobilization of Aldolase from the Actin Cytoskeleton. *Cell* **2016**, *164*, 433–446. [[CrossRef](#)]
56. Best, W.R.; Bechtel, J.M.; Singleton, J.W.; Kern, F. Development of a Crohn's Disease Activity Index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* **1976**, *70*, 439–444.
57. Daperno, M.; D'Haens, G.; Van Assche, G.; Baert, F.; Bulois, P.; Maunoury, V.; Sostegni, R.; Rocca, R.; Pera, A.; Gevers, A.; et al. Development and Validation of a New, Simplified Endoscopic Activity Score for Crohn's Disease: The SES-CD. *Gastrointest. Endosc.* **2004**, *60*, 505–512. [[CrossRef](#)]
58. Vowinkel, J.; Zeleznik, A.; Bruderer, R.; Müller, M.; Reiter, L.; Ralser, M. Cost-Effective Generation of Precise Label-Free Quantitative Proteomes in High-Throughput by MicroLC and Data-Independent Acquisition. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 4346. [[CrossRef](#)]
59. Huang, D.W.; Sherman, B.T.; Lempicki, R.A. Bioinformatics Enrichment Tools: Paths toward the Comprehensive Functional Analysis of Large Gene Lists. *Nucleic. Acids. Res.* **2009**, *37*, 1–13. [[CrossRef](#)]
60. Huang, D.W.; Sherman, B.T.; Lempicki, R.A. Systematic and Integrative Analysis of Large Gene Lists Using DAVID Bioinformatics Resources. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 44–57. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE INDUSTRIA, COMERCIO
Y TURISMO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. De acuerdo con lo dispuesto en el art. 16.1 del Reglamento de ejecución de la Ley 24/2015 de Patentes, se han asignado a su solicitud un número de expediente y una fecha de recepción de forma automática. La fecha de presentación de la solicitud a la que se refiere el art. 24 de la Ley le será comunicada posteriormente.

| | | |
|----------------------------|---|---|
| Número de solicitud: | P202330350 | |
| Fecha de recepción: | 04 mayo 2023, 12:13 (CEST) | |
| Oficina receptora: | OEPM Madrid | |
| Su referencia: | FIBICO-23001 | |
| Solicitante: | Servicio Andaluz de Salud | |
| Número de solicitantes: | 3 | |
| País: | ES | |
| Título: | Método para predecir la respuesta del paciente de enfermedad de Crohn a la terapia anti-TNF-alpha | |
| Documentos enviados: | Reivindicaciones.pdf (3 p.) Dibujos.pdf (3 p.) Resumen.pdf (1 p.) Descripcion.pdf (25 p.) OLF-ARCHIVE.zip FEERCPT-1.pdf (3 p.) | package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf SQLXML26.xml |
| Enviados por: | CN=SAN MARTIN ALARCIA ESTHER - 78911901M,SN=SAN MARTIN ALARCIA,givenName=ESTHER,serialNumber=IDCES-78911901M,C=ES | |
| Fecha y hora de recepción: | 04 mayo 2023, 12:13 (CEST) | |
| Codificación del envío: | 87:ED:A3:AA:40:CB:0E:41:6E:B5:FC:BB:C1:0B:51:02:1A:0B:62:94 | |

AVISO IMPORTANTE

Las tasas pagaderas al solicitar y durante la tramitación de una patente o un modelo de utilidad son las que se recogen en el Apartado "Tasas y precios públicos" de la página web de la OEPM (http://www.oepm.es/es/propiedad_industrial/tasas/). Consecuentemente, si recibe una comunicación informándole de la necesidad de hacer un pago por la inscripción de su patente o su modelo de utilidad en un "registro central" o en un "registro de internet" posiblemente se trate de un fraude.

La anotación en este tipo de autodenominados "registros" no despliega ningún tipo de eficacia jurídica ni tiene carácter oficial.

En estos casos le aconsejamos que se ponga en contacto con la Oficina Española de Patentes y Marcas en el correo electrónico informacion@oepm.es.

ADVERTENCIA: POR DISPOSICIÓN LEGAL LOS DATOS CONTENIDOS EN ESTA SOLICITUD PODRÁN SER PUBLICADOS EN EL BOLETÍN OFICIAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL E INSCRITOS EN EL REGISTRO DE PATENTES DE LA OEPM, SIENDO AMBAS BASES DE DATOS DE CARÁCTER PÚBLICO Y ACCESIBLES VÍA REDES MUNDIALES DE INFORMÁTICA.

Para cualquier aclaración puede contactar con la O.E.P.M.

/Madrid, Oficina Receptora/



Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. De acuerdo con lo dispuesto en el art. 16.1 del Reglamento de ejecución de la Ley 24/2015 de Patentes, se han asignado a su solicitud un número de expediente y una fecha de recepción de forma automática. La fecha de presentación de la solicitud a la que se refiere el art. 24 de la Ley le será comunicada posteriormente.

| | | |
|----------------------------|---|---|
| Número de solicitud: | P201930901 | |
| Fecha de recepción: | 11 octubre 2019, 17:19 (CEST) | |
| Oficina receptora: | OEPM Madrid | |
| Su referencia: | P 2019/46964 | |
| Solicitante: | Servicio Andaluz de Salud | |
| Número de solicitantes: | 1 | |
| País: | ES | |
| Título: | MARCADORES PROTEOMICOS DE RESPUESTA A FÁRMACOS ANTI-TNF EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN | |
| Documentos enviados: | Descripcion.pdf (76 p.) Reivindicaciones.pdf (3 p.) Resumen.pdf (1 p.) OLF-ARCHIVE.zip | package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf |
| Enviados por: | C=ES,O=CLARKE MODET Y CIA | |
| Fecha y hora de recepción: | 11 octubre 2019, 17:19 (CEST) | |
| Codificación del envío: | F5:68:C0:16:29:B3:C2:A8:10:E9:F1:73:C8:F1:EB:41:7E:AF:CE:9E | |

AVISO IMPORTANTE

Las tasas pagaderas al solicitar y durante la tramitación de una patente o un modelo de utilidad son las que se recogen en el Apartado "Tasas y precios públicos" de la página web de la OEPM (http://www.oepm.es/es/propiedad_industrial/tasas/). Consecuentemente, si recibe una comunicación informándole de la necesidad de hacer un pago por la inscripción de su patente o su modelo de utilidad en un "registro central" o en un "registro de internet" posiblemente se trate de un fraude.

La anotación en este tipo de autodenominados "registros" no despliega ningún tipo de eficacia jurídica ni tiene carácter oficial.

En estos casos le aconsejamos que se ponga en contacto con la Oficina Española de Patentes y Marcas en el correo electrónico informacion@oepm.es.

ADVERTENCIA: POR DISPOSICIÓN LEGAL LOS DATOS CONTENIDOS EN ESTA SOLICITUD PODRÁN SER PUBLICADOS EN EL BOLETÍN OFICIAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL E INSCRITOS EN EL REGISTRO DE PATENTES DE LA OEPM, SIENDO AMBAS BASES DE DATOS DE CARÁCTER PÚBLICO Y ACCESIBLES VÍA REDES MUNDIALES DE INFORMÁTICA.

Para cualquier aclaración puede contactar con la O.E.P.M.

/Madrid, Oficina Receptora/

enteric microbial antigens and to disease exacerbation. We examined whether increased faecal proteolytic activity predates endoscopic disease and whether it correlates with disease activity as reflected by faecal calprotectin level in CD patients post ileocecectomy resection. **Methods:** CD patients who underwent ileocecectomy were prospectively recruited between 2010–2017 at the Tel Aviv Medical Center (TLVMC). Inclusion criteria were: clinical remission (CDAI <150) at 45 days post-surgery (Week 0), no residual disease and a non-sticturing-non-penetrating disease phenotype. Patients were evaluated at Weeks 0, 12, 24, 36, and 48 for faecal calprotectin level (CLP), faecal protease activity (PA) and disease activity was also assessed using the CDAI. Faecal PA was assessed using an FITC-casein florescence assay. All patients underwent scheduled colonoscopies at Weeks 24 and 48 to assess for disease recurrence. A Rutgeerts score of ≥ 2 was considered as disease recurrence.

Results: Endoscopic evaluation of disease activity was documented in 33 patients at Week 24 and in 26 patients at Week 48 post screening. Thirteen patients had endoscopic recurrence at Week 24. Seven patients had endoscopic recurrence at Week 48. CLP levels at Week 12 were significantly higher in patients who suffered from disease recurrence at Week 24 (141.2 ± 147.4 vs. 398.0 ± 283.6 , $p = 0.032$). CLP at Week 24 was significantly higher among patients with endoscopic disease recurrence at Week 48, compared with those who remained in remission (912.0 ± 1039.0 vs. 116.7 ± 84.8 , $p = 0.028$). PA was not significantly higher in patients who suffered from endoscopic recurrence, was not elevated prior to disease recurrence and did not correlate with CLP levels at the various time points.

Conclusions: Faecal PA is not associated with CD activity in post-operative patients in contrast to faecal calprotectin level which is associated with post-operative CD recurrence and may be used to non-invasively monitor disease activity. Monitoring mucosal inflammation with better non-invasive techniques is crucial to limit disease progression and complications.

P008

Proteomic markers of response to anti-TNF drugs in patients with Crohn's disease

R. Medina-Medina*, E. Iglesias-Flores, J. M. Benítez, S. Marín-Pedrosa, I. Salgueiro, G. Ferrín, C. I. Linares, S. González-Rubio, P. Soto, B. Gros, C. Moral, F. Alvarez, M. Rodríguez-Perálvarez, E. Chicano-Gálvez, I. Ortea, V. García-Sánchez, P. Aguilar-Melero
 IMIBIC/Hospital Universitario Reina Sofía/Córdoba University, CÓRDOBA, Spain

Background: Therapy with anti-TNF has improved notably the management of Crohn's disease (CD).¹ However, 25–40% of patients treated with these drugs lose response long-term.² In addition, these treatments are expensive and not without risk of adverse events. Therefore, it is essential to identify reliable markers that will select those patients who can benefit of anti-TNF drugs, thus improving their efficacy and safety

Methods: A consecutive cohort of CD patients, who were naïve to anti-TNF therapy, were enrolled and followed up during 12 months. Demographic, analytical, nutritional and physiopathology were recorded. Patients were stratified according to clinical response as follows: (a) Non-primary response (NPR) at 12 weeks post-treatment; (b) loss of response (LR) within 12 months; (c) sustained clinical response (SCR). In addition, plasma samples were collected previously to anti-TNF treatment and further analysed by

SWATH proteomics,³ to identify potential biomarkers of response to anti-TNF. Anova or Kruskal–Wallis tests were used for analysis, according to data distribution. Functional pathways of identified biomarkers was analysed by DAVID Bioinformatics Resources 6.7.⁴ **Results:** In total, 54 CD patients were included. Most of them (77.3%) showed an SCR. However, 4.5% of patients had NPR and 18.2% LR. Patients with recent diagnosis of CD (<12 months) were less likely to achieve SCD. Indeed, the interval from diagnosis to anti-TNF therapy was shorter in patients NPR (0 ± 0) as compared with LR (9.9 ± 5.9 years) and SCR (6.32 ± 8.0 years) ($p = 0.04$). Increased blood leucocytes count before treatment was also associated with NPR (NPR: 13.7 ± 2.1 vs. LR: 8.4 ± 2.3 and SCR: 7.6 ± 2.9) ($p = 0.018$). In addition, we have identified the overweight as a factor of losing response during the first year of treatment (BMI: NPR: 24.5 ± 7.5 , LR: 27.6 ± 4.6 vs. SCR: 23.4 ± 3.6) ($p = 0.036$). As potential biomarkers of primary response we have identified 18 proteins up-regulated, related to hemostasis and metabolism of carbohydrates, all of them with $p \leq 0.009$ and a fold change ≥ 2.4 . Seventeen of these proteins are regulated by acetylation. In addition, 4 proteins were potential biomarkers of loss of response ($p \leq 0.05$ and fold change from 0.5 to 1.4). Two of them related to lipids metabolism.

Conclusions: Early need for anti-TNF and increased blood leucocytes count, probably related to a more severe disease, are associated with NPR. Overweight is associated with secondary loss of response to anti-TNF. In addition, hemostasis, metabolism of carbohydrates and lipids may be involved in the response to anti-TNF in CD.

References

1. Ford AC, Sandborn WJ, Khan KJ, *et al.* Efficacy of biological therapies in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2011;106:644–59.
2. Van Assche G, Vermeire S, Rutgeerts P. Optimizing treatment of inflammatory bowel diseases with biologic agents. *Curr Gastroenterol Rep* 2008;10:591–6.
3. Gillet LC, Navarro P, Tate S, *et al.* Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics* 2012;11:O111.016717.
4. Huang DW, (2009), Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4:44–57. doi:10.1038/nprot.2008.211.

P009

Fluorescence mediated tomography detects and quantifies early intestinal neutrophil infiltration in experimental colitis

T. M. Nowacki*^{1,2}, P. Lenz³, D. Bettenworth², M. Brückner², T. Tepas², A. Becker⁴, M. Wildgruber⁴, M. Eisenblätter⁴

¹Josephs-Hospital Warendorf, Department of Medicine I, Warendorf, Germany, ²University Hospital Münster, Department of Medicine B, Gastroenterology and Hepatology, Münster, Germany, ³University Hospital Münster, Institute of Palliative Care, Münster, Germany, ⁴University Hospital Münster, Translational Research Imaging Center, Department of Clinical Radiology, Münster, Germany

Background: Recruitment, infiltration, and activation of inflammatory cells are crucial steps in the pathogenesis of IBD. The aim of this study was the visualisation of these processes *in vivo* and documentation of the kinetics of infiltration in experimental colitis.