

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

"CAROL DAVILA", BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

GASTROENTEROLOGIE

TEZĂ DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. DICULESCU MIHAI MIRCEA

Student-doctorand:

ȚIERANU CRISTIAN GEORGE

2018

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

"CAROL DAVILA", BUCUREŞTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

GASTROENTEROLOGIE

***NOI MARKERI BIOLOGICI, HISTOLOGICI ȘI MOLECULARI
DE ACTIVITATE ÎN BOLILE INFLAMATORII INTESTINALE***

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. DICULESCU MIHAI MIRCEA

Student-doctorand:

ȚIERANU CRISTIAN GEORGE

2018

Mulțumiri

În primul rând vreau să îi mulțumesc domnului Profesor Mircea Diculescu pentru toate cunoștințele medicale pe care le-am dobândit alături de domnia sa, pentru susținerea neîncetată de care am beneficiat din partea domniei sale în toate proiectele pe care le-am întreprins, pentru oportunitatea de a studia domeniul bolilor inflamatorii intestinale într-un centru european de excelență, și pentru oportunitatea de a dezvolta acest proiect în cadrul unei cercetări doctorale, proiect ce va continua și după finalizarea tezei.

Continui prin a mulțumi domnului Conferențiar Gabriel Becheanu pentru propunerea de a participa împreună cu colectivul format din doamna Monica Dobre și doamna Elena Milanesi la proiectul de cercetare desfășurat în cadrul Centrului de Diagnostic al Institutului de Morfopatologie „Victor Babeș” din București, ce mi-a oferit oportunitatea de a studia expresia genică la nivel mucozal la pacienții cu boli inflamatorii intestinale. Mulțumesc în mod special celor două doamne pentru introducerea în domeniul biologiei moleculare și ajutorul cu prelucrarea probelor și analiza statistică a datelor, precum și pentru implicarea în redactarea articolului publicat pe baza rezultatelor obținute.

De asemenea, vreau să mulțumesc domnului Profesor Constantin Bâră și doamnei doctor Olivia Popa din cadrul catedrei de Imunologie și Fiziopatologie a Universității de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București, pentru inițierea în tainele prelucrării probelor sanguine pentru obținerea ADN-ului utilizat pentru studiul polimorfismelor mononucleotidice ale genei TNF-alpha. Mulțumesc în mod special doamnei doctor Popa pentru implicarea și ajutorul oferit în analiza statistică a datelor și tehnoredactarea capitolului respectiv. Totodată, mulțumesc doamnelor laborante care au contribuit activ la procesul de extracție al ADN-ului utilizat pentru analiza polimorfismelor mononucleotidice.

Nu în ultimul rând, vreau să mulțumesc colectivelor de asistente medicale din cadrul cliniciilor de Gastroenterologie ale Institutului Clinic Fundeni – secția Gastroenterologie II, și Spitalului Universitar de Urgență ELIAS, precum și colegelor asistente din cadrul Laboratorului de Endoscopie Digestivă a Spitalului Universitar de Urgență ELIAS, fără de care nu ar fi fost posibilă întocmirea bazei de probe biologice, sanguine și tisulare, necesare prezentului proiect.

Listă articole publicate in extenso

1. **Tieranu C**, Manuc T, Dobre M, Milanesi E, Plesea I-E, Tieranu E, et al. *Gene expression profile of endoscopically active and inactive Ulcerative Colitis: preliminary data*. Rom J Morphol Embriol. 2017;4(58):1301–7.
<http://www.rjme.ro/RJME/resources/files/58041713011307.pdf>
2. **Tieranu C**, Gigea C. *RDW as a novel marker of disease activity in Crohn's disease: testing a hypothesis in an IBD tertiary care center in Romania*. Res Sci Today. 2014;Supplement:100–7.

Listă comunicări(postere/prezentări orale)

1. **Tieranu C.**, Dobre M., Becheanu G., Tieranu I., Gologan S., Arbanas T., Andrei M., Diculescu M., Nicolaie T., Ionescu M., *Gene expression profiles in Crohn's disease: case to case comparison of endoscopically active versus inactive disease*, JGLD, June 2017, Vol 26, Suppl. 3 pp. 31., prezentare sub formă de poster la Congresul Național de Gastroenterologie, Hepatologie și Endoscopie Digestivă, Cluj 2017
2. **Tieranu C.**, Dobre M., Becheanu G., Tieranu I., Gologan S., Arbanas T., Andrei M., Diculescu M., Nicolaie T., Ionescu M., *Gene expression profiles in ulcerative colitis: case to case comparison of endoscopically active versus inactive disease*, JGLD, June 2017, Vol 26, Suppl. 3 pp. 31., prezentare sub formă de poster la Congresul Național de Gastroenterologie, Hepatologie și Endoscopie Digestivă, Cluj 2017
3. **Tieranu C.**, Popa O., Dutescu M., Bojinca M., Tieranu I., Ionescu M., Diculescu M., *TNF-alpha gene polymorphisms in Romanian population with Inflammatory Bowel Diseases*, Prezentare Orală Premiată cu **premiul I** la 9th National Symposium on Inflammatory Bowel Diseases Septembrie 2017 București.
4. **Tieranu C.**, Manuc T., Dobre M., Milanesi E., Plesea I.E., Manuc M., Tieranu I., Preda C.M., Diculescu M.M., Ion D., Ionescu M.E., Becheanu G., Gene expression profile of endoscopically active and inactive ulcerative colitis: Preliminary data, FALK Symposium 210 „Crossing New Borders in IBD: Thoughts and Demands – From Mechanisms to Treatment” Abstract Book, prezentare sub formă de poster, Aprilie 2018, Lisabona

CUPRINS

INTRODUCERE	9
I.PARTEA GENERALĂ.....	14
1.Bolile inflamatorii intestinale – noțiuni generale	15
1.1.Introducere	15
1.2.Epidemiologie	16
1.3.Factori de risc	19
1.4.Diagnostic.....	28
1.5.Diagnostic diferențial.....	35
1.6.Tratament	38
2.Markeri biologici de activitate în bolile inflamatorii intestinale	45
2.1. Markeri serologici	45
2.2. Markeri fecali	49
3.Remisiunea histologică în bolile inflamatorii intestinale.....	51
3.1.Definirea vindecării histologice în bolile inflamatorii intestinale.....	51
3.2.Valoarea prognostică a remisiunii histologice in bolile inflamatorii intestinale	52
3.3.Discuții și direcții de cercetare	53
4.Polimorfismele genei TNF-α.....	55
4.1. Reglarea biologică a producerii și funcției TNF-α	57
4.2. Polimorfismele genei TNF- α și sinteza citokinei TNF- α	58
4.3. Polimorfisme genetice și susceptibilitatea de boală inflamatorie digestivă	58
5.Expresia genică la nivel mucozal.....	59
II.CONTRIBUȚII PERSONALE	62
6.Ipoteza de lucru și obiectivele generale ale lucrării	63
7. Red cell distribution width (RDW) – un nou marker biologic de activitate în bolile inflamatorii intestinale.....	65
7.1. Introducere	65
7.2. Materiale și metode	66
7.3.Rezultate	72
7.4.Discuții	92
7.5.Concluzii	94
8.Rolul polimorfismelor mononucleotidice ale genei TNF-α în populația din România cu boli inflamatorii intestinale	95
8.1. Introducere	95
8.2. Materiale și metode	97
8.3.Rezultate	107
8.4.Discuții	117

8.5. Concluzii	119
9. Profilul expresiei genice la nivel mucozal în bolile inflamatorii intestinale	120
9.1. Introducere	120
9.2. Materiale și metode	123
9.3. Rezultate	140
9.4. Discuții	193
9.5. Concluzii	197
III. CONCLUZII GENERALE ȘI CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	198
BIBLIOGRAFIE	201
ANEXE	241

Listă abrevieri

- ADN - Acid dezoxiribonucleic
- AIEC - Escherichia coli aderent-invaziv
- ANCA - Anticorpii anticitoplasma neutrofilică
- ASCA - Anticorpii antiSacharomyces cerevisiae
- ATG16L1 - Autophagy-related protein 16-1
- CD - Boala Crohn
- CDAI - Crohn Disease Activity Index
- CMV - Citomegalovirus
- CRP - Proteina C reactivă
- CT - Tomografie computerizată
- DEFA - Defensine
- ECCO - European Crohn's and Colitis Organisation
- FDA - Food and Drug Administration
- FIT - Testul imunochimic fecal
- GHAS - Global Histologic Disease Activity Score
- GWAS - Studii de asociere genomică
- Hb - Hemoglobina
- HSP-70 - Heat-shock protein 70
- HWE - Echilibrul Hardy-Weinberg
- IBD - Boli inflamatorii intestinale
- IGNg - Interferon-gamma
- IGRA - Interferon gamma release assay
- IL-1 - Interleukina-1
- IL-10 - Interleukina-10
- IL-12 - Interleukina-12
- IL-19 - Interleukina-19
- IL-19 - Interleukina-19

IL-20 - Interleukina-20
IL-22 - Interleukina-22
IL-23 - Interleukina-23
IL-24 - Interleukina-24
IL-26 - Interleukina-26
IL-2R - Receptorul interleukinei-2
IL-6 - Interleukina-6
ILC - celulele limfoide înnăscute
IRM - Imagistica prin rezonanță magnetică
LPS - Lipopolizarid
LYZ - Lizozim
MAP - Mycobacterium avium subspecia Paratuberculosis
MHC - Complexul major de histocompatibilitate
MMP - matrix-metaloproteinaze
NOD2 - Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
RDW - Red cell distribution width
SAA - proteina amiloidului seric A
SNP - Polimorfism mononucleotidic
TNFR1 - TNF- α receptor 1
TNFR2 - TNF- α receptor 2
TNF- α - Tumor Necrosis Factor alpha
UC - Colita ulcerativă
VSH - Viteza de sedimentare a hematiilor
WGO - World Gastroenterology Organization

Introducere

Susținerea diagnosticului de boală Crohn necesită corelarea datelor clinice și paraclinice – biologice, endoscopice, histologice și imagistice, obținute de la pacienții cu sindrom diareic cronic. Nu există o investigație considerată gold standard pentru diagnostic. În practica clinică este necesară integrarea datelor paraclinice în context clinic. Totuși, de multe ori investigațiile recomandate sunt limitate de fenotipul bolii cum ar fi în cazul stenozelor digestive ce nu pot fi depășite endoscopic pentru obținerea materialului bioptic, sau cazul leziunilor endoscopice severe care necesită intreruperea procedurii endoscopice din cauza riscului crescut de perforație iatrogenă. Date fiind prevalența crescută a acestei boli în populația activă economic, prezența bolii implică costuri ridicate pentru societate.

Red cell distribution width (RDW) este un parametru care evaluează cantitativ anizocitoza, care se definește ca variabilitatea în dimensiune a eritrocitelor circulante. Este un parametru de rutină furnizat de analizoarele de hematologie.[1]

RDW evaluează procesul de hematopoieză ce poate fi influențat de mai mulți factori cum ar fi deficitul de fier, vitamin B12, folați, hemoliză, transfuzii repetitive sau inflamația cronică. [1]

Creșterea RDW sugerează o variabilitate crescută a dimensiunilor eritrocitare, iar asocierea cu MCV scăzut sugerează deficitul de fier. [2]. Pe de altă parte, valorile normale ale RDW în contextul unui MCV redus sugerează prezența unei thalasemii. [3] Există date în literatură care au demonstrat utilitatea RDW ca factor de prognostic pentru morbiditatea și mortalitatea de cauza cardiovasculară în insuficiența cardiacă, la pacienții cu antecedente de infarct miocardic, ipoteza sugerată fiind legată de prezența unui sindrom inflamator cronic cu implicații asupra riscului crescut de boală cardiovasculară. [4]. De altfel, utilitatea RDW în bolile inflamatorii intestinale(IBD) a fost deja dovedită pentru diferențierea între boala Crohn(CD) și colita ulcerativă(UC), pentru diagnosticul de boala inflamatorie comparativ cu pacienții sănătoși și pentru diferențierea între boala Crohn activă și boala în remisiune. [5–8]

Din aceste considerente, prima parte a prezentei cercetări a avut drept obiectiv principal determinarea rolului RDW pentru evaluarea activității în boala Crohn. Ca și obiective secundare, am efectuat evaluarea comparativă a sensibilității și specificității RDW ca marker de inflamație

activă cu cea a proteinei C reactive(CRP), vitezei de sedimentare a hematiilor(VSH) și fibrinogenului, evaluarea asocierilor dintre RDW și diferențele aspecte fenotipice ale bolii Crohn, precum și integrarea comparativă a datelor obținute în literatura de specialitate disponibilă până în momentul de față. Intervalul de referință pentru RDW-SD a fost între 39 și 46 FL.

A doua parte a cercetării doctorale s-a concentrat pe investigarea unor elemente de biologie moleculară la pacienții cu IBD, care, conform datelor actuale din literatura de specialitate, nu au mai fost studiate în populația din România.

Rolul geneticii în bolile inflamatorii intestinale este deja un subiect de interes în literatura de specialitate. Aceste boli sunt considerate a fi rezultatul interacțiunii dintre modificările microbiomului intestinal – disbioza, și sistemul imun intestinal cu răspuns modificat, contribuind la propagarea inflamației la nivel mucozal. Această interacțiune determină sinteza diferențelor citokine proinflamatorii dovedite a fi implicate în apariția bolilor inflamatorii intestinale, dintre care, de departe cea mai studiată este Tumor Necrosis Factor alpha(TNF- α). [9–11]

Efectul TNF- α la nivel tisular se realizează prin legarea acestuia de receptorii săi - TNF- α receptor 1(TNFR1) și TNF- α receptor 2 (TNFR2), cu activarea secundară a unor fenomene de proliferare și diferențiere celulară, semnalizare proinflamatorie și apoptoză a celulelor epiteliale intestinale, toate aceste fenomene contribuind la apariția leziunilor observate în timpul endoscopiei. [11]

Din acest motiv toate moleculele studiate ca tratament pentru bolile inflamatorii intestinale s-au concentrat pe contracararea efectului TNF-alpha și altor molecule cunoscute a fi implicate în propagarea fenomenului inflamator, dar marele minus al acestei strategii de dezvoltare a fost reprezentat de ideea că "one drug suits all", acesta fiind probabil și motivul pentru care există o mare vairiabilitate în răspunsul pacienților la aceste tratamente. [10]

Acste observații au reprezentat punctul de plecare pentru introducerea noțiunii de medicină personalizată în domeniul bolilor inflamatorii intestinale cu scopul de a identifica factori clinici, biologici, fenotipici, endoscopici, imagistici, histologici și moleculari, predictivi pentru evoluția naturală, și sub tratament, a acestor boli, având drept țintă finală stratificarea pacienților pe baza unor criterii, pentru a obține o eficacitate a tratamentului maximală. [12–16]

Studiile de farmacogenetică au drept scop identificarea pacienților care ar putea beneficia de pe urma unui anumit tratament, oferind totodată informații importante despre profilul genetic al pacienților care nu răspund la tratament pentru a putea înțelege mecanismele implicate în dezvoltarea bolii la aceștia din urmă, și identificând astfel alte posibile ținte terapeutice specifice acestui grup de pacienți. În general, în farmacogenetică, atât polimorfismele la nivel farmacodinamic (acțiunea unei anumite molecule) cât și cele la nivel farmacokinetic (evoluția moleculei) pot avea implicații relevante în prezicerea răspunsului la un anumit tratament. De altfel, este bine cunoscut, ca exemplu, rolul polimorfismului mononucleotidic(SNP) al interleukinei 28 în prezicerea răspunsului la tratamentul cu Peg-interferon la pacienții cu hepatită cronică virală C. [10]

În consecință, variabilitatea genetică cu implicații asupra sintezei de TNF- α ar putea avea un rol important în prezicerea răspunsului la tratament cu agenți antiTNF- α , stratificând pe baza criteriilor de eficiență pacienții care ar beneficia de pe urma unui astfel de tratament, limitând totodată expunerea celorlalți la o moleculă cu potențiale efecte adverse notabile și reducând costurile sistemelor de sănătate.

De altfel, există date în literatură care atestă faptul că polimorfismele mononucleotidice ale genei TNF sunt responsabile de evoluția mai agresivă a bolilor cu mecanism imun, de răspunsul mai slab la tratament biologic cu agenți antiTNF, și pot fi folosite ca markeri de diferențiere între cele două boli inflamatorii intestinale acolo unde diagnosticul este dificil datorită trăsăturilor clinico-biologice, endoscopice și histologice superpozabile. [17–20]

Pentru acest studiu am folosit un număr total de 283 subiecți, dintre care 123 de pacienți cu IBD, și 160 de martori sănătoși la care am investigat într-o serie de studii de tip caz-control polimorfisme mononucleotidice aparținând genei TNF-alpha în relație cu susceptibilitatea de a dezvolta boala inflamatorie intestinală. Pe lângă aceste obiective principale, am urmărit și câteva obiective secundare cum ar fi implicația acestor polimorfisme mononucleotidice în riscul de a dezvolta o boală mai severă/extensivă precum și rolul posibil predictiv al acestor polimorfisme pentru răspunsul la tratament cu agenți biologici antiTNF.

Această cercetare a constituit, de asemenea, oportunitatea colaborării Departamentului de Gastroenterologie al Spitalului Universitar de Urgență ELIAS, unde îmi desfășor activitatea clinică, cu Departamentul de Imunologie și Fiziopatologie din cadrul Facultății de Medicină,

Universitatea de Medicină și Farmacie "Carol Davila", București, și cu Institutul Național de Transfuzii Sanguine "Prof. Dr. C.T. NICOLAU", București.

Ultima parte a cercetării doctorale s-a desfășurat în colaborare cu Centrul de Diagnostic din cadrul Institutul de Morfopatologie "Victor Babes" unde au fost analizate din punct de vedere histopatologic și molecular probele biопtice prelevate în timpul colonoscopiei de la 19 pacienți cu IBD diagnosticați și urmăriți în Clinica de Gastroenterologie a Spitalului Universitar de Urgență ELIAS.

Acest proiect a urmărit identificarea corelațiilor existente între scorurile histologice propuse în literatură pentru uniformizarea rezultatelor histopatologice, care încă nu sunt recomandate pentru uz în practica clinică, și aspectul endoscopic evaluat pe baza scorurilor endoscopice de severitate clar statuate în recomandările societăților internaționale de profil. Suplimentar am efectuat analiza moleculară pe piesele biопtice, aceasta urmărind evaluarea expresiei cantitative la nivel tisular a unui panel de 84 de gene implicate în bolile inflamatorii intestinale contribuind la dezvoltarea mai multor procese imunologice, cu scopul de a identifica o "semnătură" specifică pentru anumite situații. Am efectuat analize comparative între multiple situații particulare identificând gene diferențial exprimate în toate aceste analize. [21–23]

Rezultatele primei cercetări au confirmat faptul că RDW este un parametru ce se modifică notabil în boala Crohn în perioadele de activitate clinică, fiind corelat semnificativ cu aceasta, și totodată fiind capabil să diferențieze între boala și simpla prezență a unor manifestări funcționale sugestive, precum și între diferitele grade de severitate ale puseului clinic. Totuși, nu are calitate suficientă, din punct de vedere al sensibilității și specificității, pentru a fi utilizat ca marker independent pentru diagnosticul acestei boli.[24]

În continuare, analiza datelor rezultate din studiul polimorfismelor mononucleotidice ale genei TNF a oferit rezultate intereseante. Astfel, am observat asociere între susceptibilitatea de a dezvolta boala inflamatorie intestinală și prezența alelei minore în cazul SNP-ului -238G/A, riscul de a dezvolta manifestări extraintestinale asociate acestor boli a fost mai mare la purtătorii alelei minore pentru același SNP dar și pentru SNP -308G/A.

În final, ultima parte a cercetării doctorale a confirmat corelația bună a scorurilor histologice analizate cu cele endoscopice larg utilizate, cu limitele studiului legate de numărul

mic de pacienți ce nu a permis analiza semnificației statistice a acestei corelații observate, iar analiza expresiei genice la nivel mucozal a oferit o imagine de ansamblu a modificărilor survenite în expresia celor 84 de gene studiate ca urmare a influenței mai multor factori clinico-endoscopici mergând până la efectul diferitelor molecule de tratament asupra expresiei genice și evaluarea în dinamică la același pacient după modificarea tratamentului pentru a evita eventualele bias-uri legate de criterii particulare ce țin de individ. Aceste date de expresie genică rămân, deocamdată, greu de încadrat în practica cotidiană, nu permit încă asocieri clinico-evolutive sau predictive, fiind necesară confirmarea datelor pe loturi mai mari de pacienți.

I. PARTEA GENERALĂ

1. Bolile inflamatorii intestinale – noțiuni generale

1.1. Introducere

Bolile inflamatorii intestinale reprezintă afecțiuni cronice ale tubului digestiv, ce cuprind două entități clinice reprezentate de colita ulcerativă și boala Crohn. Colita ulcerativă afectează exclusiv colonul, cu debutul procesului inflamator de la nivelul rectului și evoluție către proximal în absența tratamentului, în timp ce boala Crohn poate să afecteze întreg tubul digestiv de la gură la anus, cu fenomene inflamatorii dispuse intermitent la diferitele niveluri ale tubului digestiv.

Primele noțiuni despre IBD reprezintă o sursă de discuții în literatură deoarece, deși există raportări încă din Grecia antică despre diaree sanguinolentă cronică, primul caz raportat sub denumirea de colită ulcerativă a aparținut lui Sir Samuel Wilkins (1824-1911) care a folosit acest termen pentru a descrie o condiție clinică similară cu ceea ce înțelegem astăzi prin UC[25].

Boala Crohn a fost recunoscută ca o entitate diferită de colita ulcerativă pentru prima dată în anul 1932 într-o lucrare publicată de Crohn et al. [26] Chiar dacă există lucrări publicate anterior acesteia ce făceau referire la condiții similare bolii Crohn denumite enterite regionale sau ileite regionale, articolul definitoriu pentru boala Crohn a rămas cel din anul 1932, așa cum pentru colita ulcerativă a rămas articolul lui Wilkins[27,28].

De la prima referință literară a celor două entități clinice și până în prezent cunoștințele legate de aceste boli au evoluat exponențial atât în ceea ce privește factorii de risc – de mediu, genetici – cât și în ceea ce privește moleculele utilizate în tratamentul bolilor. Astfel, prima genă asociată bolii Crohn a fost în descoperită în 2001 confirmând natura familială a acestor boli.[29,30] Ulterior, s-a observat că predispoziția genetică nu este suficientă pentru dezvoltarea bolii, fiind necesară o interacțiune cu factori de mediu externi dar și cu factori interni reprezentați de microbiom. Practic, dezvoltarea bolilor inflamatorii intestinale necesită o interacțiune complexă la nivelul acestor trei sfere, contribuind astfel la complexitatea patogenezei acestor boli dar oferind totodată multiple căi de intervenție pentru tratamentul acestor boli(figura 1.1.). [31]

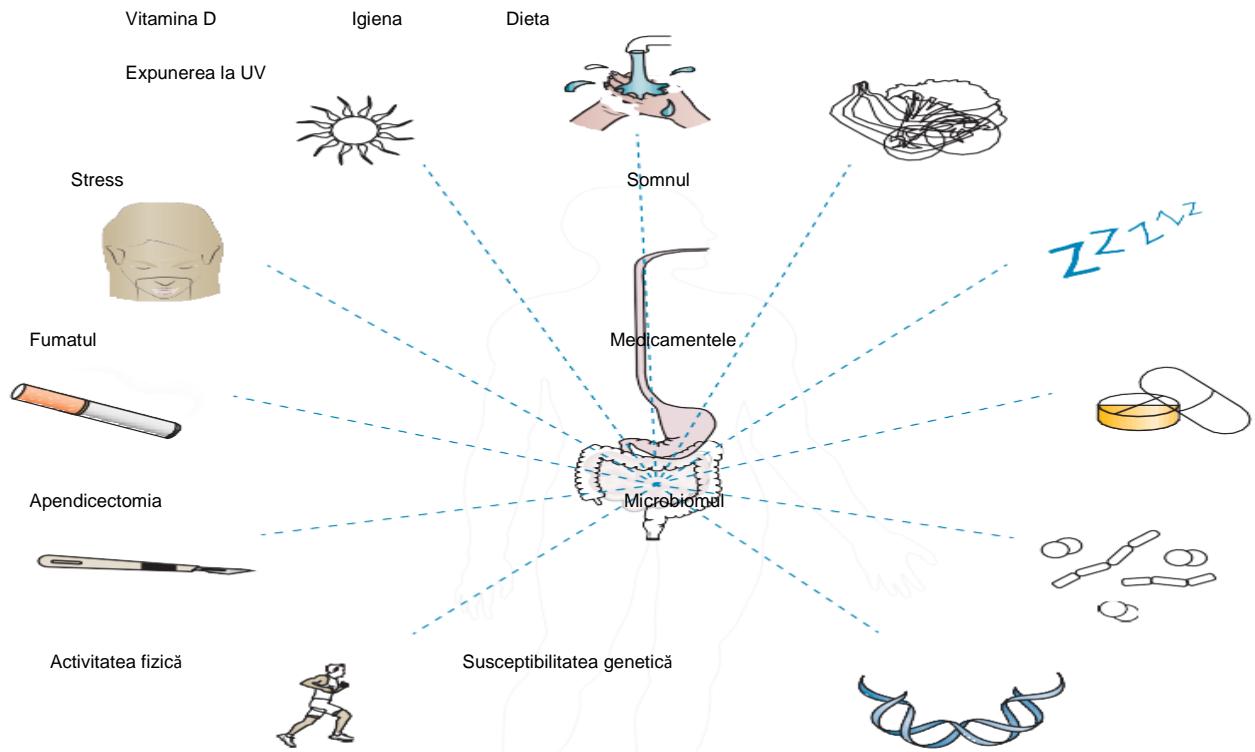


Figura 1.1. Factorii de risc genetici, de mediu și microbiom implicați în dezvoltarea bolilor inflamatorii intestinale – imagine schematică. Imagine preluată din Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. Nat Rev Gastroenterol Hepatol [Internet]. 2015;12:205–17. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84926416641&partnerID=40&md5=84b01f9055cfc17d9f4a4c4109e4e133> [31]

1.2. Epidemiologie

În general, studiile de epidemiologie în bolile inflamatorii intestinale au probleme metodologice cauzate de dificultatea stabilirii diagnosticului definitiv de boala inflamatorie intestinală în ciuda tuturor mijloacelor diagnostice endoscopice, imagistice și histologice disponibile în prezent, și, totodată, datorită diferențelor cauzate de înregistrarea cazurilor în funcție de diferitele sisteme de sănătate la care se face referire datorită cărora pot apărea

diferențe în includerea în studiile epidemiologice a cazurilor mai puțin severe care de obicei sunt manageriate în spitale de rang mai mic ce nu sunt incluse în astfel de analize.

Cele mai mari rate ale incidenței și prevalenței bolii Crohn și colitei ulcerative au fost raportate în Europa de Nord, Regatul Unit și America de Nord ceea ce sugerează posibilitatea existenței unei factori etiologici comuni în aceste populații.[32–36] În general, incidența colitei ulcerative este mai mare decât cea a bolii Crohn cu excepția Canadei și a câtorva zone din Europa, în timp ce cea mai mare incidență din lume se notează în Canterbury County din Noua Zeelandă(16,5/100.000 locuitori). [33,37–43]

Există un trend de apariție a acestor boli în zone în care astfel de boli erau raportate rar cum ar fi Coreea, Thailanda, Liban, Iran, cu apariția colitei ulcerative ce a precedat boala Crohn cu aproximativ 10 ani, iar în Japonia, se observă o incidență în creștere în ultimii ani. Per total, datele de incidență pot fi împărțite pe zone geografice astfel: zone cu incidență crescută, moderată, scăzută dar cu creștere recentă, scăzută, și zone fără date încă(figura 1.2.). [44–47]

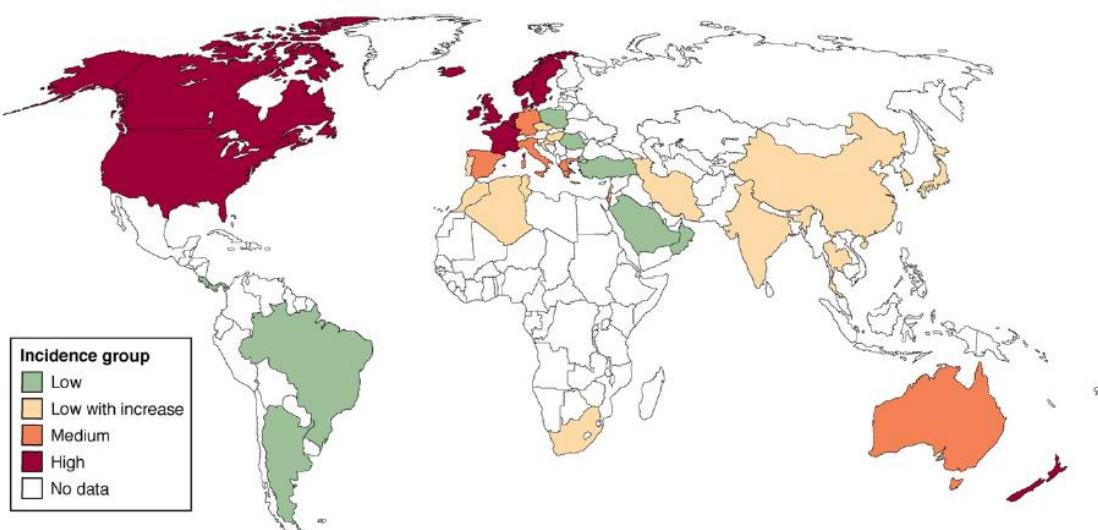


Figura 1.2. Hartă globală a incidenței bolilor inflamatorii intestinale: roșu se referă la o incidență mai mare de 10/100.000, portocaliu se referă la o incidență de 5-10/100.000, verde la o incidență mai mică de 4/100.000, galben la zone cu incidență scăzută dar în creștere progresivă. Absența culorii reprezintă lipsa informațiilor epidemiologice .

Imagine preluată din Cosnes J, Gowerrousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology

and natural history of inflammatory bowel diseases. Gastroenterology. 2011;140:1785–94 .[48]

Un review sistematic care a sumarizat trendurile la nivel populațional a demonstrat o creștere a incidenței în trei sferturi din studiile pe boală Crohn și în aproximativ două treimi din studiile pe colită ulcerativă. [49]

În cadrul unei zone geografice bine stabilite, există o incidență mai mare în mediul urban decât în mediul rural iar incidența din mediul urban a precedat-o pe cea din mediul rural în medie cu aproximativ 10 ani. [50,51]

De asemenea, a fost deja bine stabilit un gradient nord-sud al incidenței bolilor inflamatorii intestinale, cu predominanța bolii Crohn în zonele de latitudine nordică. [52,53]

În ceea ce privește vârsta la diagnostic, există o incidență maximă a bolilor inflamatorii intestinale între decadele doi și patru, cu unele cohorte sugerând un al doilea vârf de incidență în decadele șase și șapte de viață dar cu valoare mult redusă față de primul.[48,49,54]

Incidența pe sexe în populațiile bine stabilite într-un areal geografic nu diferă, dar este influențată de alți parametrii cum ar fi rasa și etnia. Astfel, riscul de boală inflamatorie intestinală este de trei ori mai mare la evrei, iar în cadrul aceleiași etnii anumite subpopulații prezintă un risc crescut de boală, un exemplu fiind evreii Ashkenazi în comparație cu cei Sepharzi. Un alt aspect interesant este reprezentat de faptul că populațiile de evrei din America și Europa dezvoltă boala mai frecvent decât populațiile de evrei rezidenți în Israel. [33]

Suportul pentru implicarea factorului genetic în patogeneza bolilor inflamatorii intestinale a fost observat în studiile de agregare familială și pe populații de gemeni, care au demonstrat că la pacienții cu boală Crohn există un istoric familial de boală inflamatorie intestinală în 2% până la 14%, iar în colita ulcerativă între 8%-14%. De notat, istoricul familial de boală inflamatorie atât pentru Crohn cât și pentru colită a fost preponderent cu aceeași boală. [44,55–61] Tot studiile pe populații de gemeni au oferit și informații referitoare la riscul mai mare de apariția a bolii la gemenii monozigoți decât dizigoți, acest risc fiind mai mare în cazul bolii Crohn decât al colitei ulcerative. Un aspect interesant observat în perechile de gemeni cu boală inflamatorie intestinală a fost că fenotipul bolii și chiar diagnosticul de boală pot fi diferite, acest lucru fiind posibil influențat de factorii de mediu cum ar fi fumatul care ar putea determina

la un frate boala Crohn față de fratele nefumător care va dezvolta colită ulcerativă. [57,58,60–62]

1.3.Factori de risc

1.3.1 Factori genetici

Multiple locusuri genetice au fost demonstate a fi asociate cu riscul crescut de dezvoltare a bolilor inflamatorii intestinale, primul astfel de locus fiind pus în evidență prin studii de tip linkage la nivelul cromozomului 16.[63] Ulterior, acest locus a fost identificat a fi gena Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2(NOD2) cu trei variante diferite ce influențează riscul de apariție a bolii Crohn. Statusul homozigot la nivelul genei NOD2 predispune pacientul la un risc de aproximativ 20-40 ori mai mare decât populația generală de a dezvolta boala, pe când statusul heterozigot exercită un risc mult mai scăzut dar totuși mai mare de 2-4 ori decât în populația generală. [29,30]

Ulterior, studii pe cohorte mari de pacienți, într-un efort internațional de colaborare, au identificat 163 locusuri de risc diferite, întocmînd o hartă mult mai extinsă a genelor potențial implicate în apariția bolilor inflamatorii intestinale. Majoritatea locusurilor de risc identificate sunt superpozabile pentru cele două boli iar o minoritate de locusuri sunt mai degrabă factor de risc pentru o boală sau cealaltă, cum ar fi exemplul genelor autofagiei NOD2 și Autophagy-related protein 16-1(ATG16L1) care sunt asociate în mod specific cu boala Crohn. Toate aceste gene implicate în patogeneza bolilor inflamatorii intestinale pot fi împărțite în funcție de efectul indus la nivelul imunității în gene care influențează răspunsul imun înăscut, gene care modulează răspunsul imun adaptativ, genele care interferă cu procesul de autofagie, gene care contribuie la menținerea integrității barierei epiteliale intestinale, gene implicate în procesul de regenerare secundar unei injurii, gene implicate în răspunsul la stress-ul oxidativ, gene implicate în procesul de apoptoză și gene care asigură activitatea antimicrobiană.[59,64]

Fenotipurile extreme reprezentate de bolile cu debut extrem de precoce și cele foarte debilitante cu afectare perianală complexă, caracterizate prin rezistență la multiple tratamente, este posibil legată de o afectare monogenetică cum ar fi mutația la nivelul receptorului de IL-10. Prin contrast cu majoritatea bolilor inflamatorii intestinale care prezintă o patogeneză

pologenică, acest tip de boală inflamatorie intestinală extremă ar putea beneficia de pe urma transplantului de celule stem. [65]

În ciuda tuturor acestor informații genetice, modificările la nivelul acestor locusuri de risc sunt responsabile doar pentru un sfert din transmisibilitatea acestor boli sugerând implicarea altor factori ambientali în apariția bolilor. [64]

1.3.2. Microbiota

Implicarea căilor inflamației asociate cu răspunsul microbian și răspunsul imun înnăscut în patogeneza bolilor inflamatorii intestinale observată pe bază studiilor genetice din ce în ce mai avansate și aprofundate a condus la dezvoltarea unui interes deosebit legat de rolul microbiotei în aceste boli. Multiple review-uri detaliate pe tema asocierilor între microbiom și bolile inflamatorii intestinale au fost publicate în ultimii ani, dar câteva aspecte necesită aprofundare raportat la implicarea mediului în apariția acestor boli. [66–70]

Câteva studii epidemiologice au atras atenția asupra unei posibile afectări a microbiotei gazdei ca factor de risc pentru dezvoltarea bolilor inflamatorii intestinale, iar aceste suspiciuni au fost întărite pe baza rezultatelor unor studii de cohortă și caz-control care au demonstrat relația invers proporțională între riscul de dezvoltare a bolilor și numărul mare de membri ai familiei, interacțiunea cât mai precoce cu animalele domestice, numărul mare de frați, precum și rolul protector al alăptării asupra riscului de boală. Toți acești parametri legăți interacțiunea precoce cu mediul sunt determinanți dovediți ai microbiotei în perioada de adult, implicarea acestora în riscul de apariție a bolii sporind suspiciunea legată de relația dintre microbiom și bolile inflamatorii intestinale. [71–73]

Pacienții cu boli inflamatorii intestinale prezintă o dezorganizare a microbiotei intestinale în sensul reducerii diversității speciilor bacteriene la nivel mucozal comparativ cu pacienții sănătoși. Diferența de diversitate a speciilor bacteriene este mai accentuată în boala Crohn decât în colita ulcerativă al cărei profil bacterian intestinal nu este foarte diferit de cel al pacienților sănătoși. Suplimentar, studiile pe populațiile de gemeni sugerează că microbiota diferă între rudele sănătoase și cele afectate de boală. [66–70,74]

Chiar dacă nu au fost identificate specii bacteriene patogenice specific implicate în diferite scenarii, probabil că anumite fenotipuri de boală inflamatorie intestinală sunt asociate

cu anumiți triggeri bacterieni. Pentru a susține această afirmație voi face referire la studiul lui Darfeuille-Marchaud et al. care a identificat o specie de Escherichia coli aderent-invaziv(AIEC) la 22% din pacienții cu boala Crohn cu localizare ileală față de 6,2% la pacienții sănătoși. Implicarea acestei specii de E. Coli ar putea fi explicată prin faptul că acesta prezintă abilitatea de a invada epitelul și de a persista la nivelul macrofagelor. Prin contrast, anumite specii ar putea prezenta un efect protector împotriva bolii Crohn, cum ar fi speciile de Firmicutes phylum care au fost găsite în cantitate mult redusă la acești pacienți. În mod particular, o bacterie producătoare de butirat la nivel intestinal – *Faecalibacterium prausnitzii*, aparținând familiei Firmicutes, a fost găsită în cantități reduse la pacienții cu boli inflamatorii intestinale comparativ cu pacienții sănătoși și s-a observat o corelație invers proporțională cu riscul de recurență postoperatorie a bolii Crohn. Mai mult, s-a observat o ameliorare a colitei pe modele murin după administrarea per os a acestei bacterii prin inducerea sintezei de IL-10 și supresia IL-17. [67,70,75–78]

Dieta poate afecta microbiota iar modul în care dietele pe termen scurt sau de durată afectează compoziția microbiană mediază de fapt influența dietei asupra incidenței bolilor inflamatorii intestinale. Dietele pe termen lung organizează microbiomul sub forma a două enterotipuri diferite, primul fiind dominat de speciile *Bacteroides* spp. Care este asociat cu dieta de tip vestic bogată în proteine animale și grăsimi saturate, iar al doilea fiind dominat de *Prevotella* spp. Care este întâlnit în asociere cu diete bogate în carbohidrați și fibre. O observație interesantă este legată de faptul că modificările pe termen scurt ale dietei afectează, de asemenea, microbiota intestinală, întărind astfel rolul dietei în patogeneza bolilor inflamatorii intestinale. [79,80]

Efectul microbiotei asupra incidenței bolilor inflamatorii nu se referă doar la influența populațiilor bacteriene dezechilibrate, ci și la efectul virusurilor și fungilor cum s-a observat, pe de-o parte, în lucrarea lui Norman et al. care a demonstrat implicarea în ambele boli inflamatorii intestinale a unor bacteriofage aparținând familiei Caudovirales, și pe de altă parte în modelul murin al lui Iliev et al. care a demonstrat un răspuns imun alterat al gazdei la fungi endogeni mediat prin receptorul Dectin-1. [81,82]

1.3.3. Factori de mediu

1.3.3.1. Fumatul

Prima asociere din lietartură între fumat și bolile inflamatorii intestinale a fost descrisă de Harries et al. care a observat o prevalență redusă a fumatului în cohorta pacienților cu colită ulcerativă comparativ cu pacienții sănătoși. O meta-analiză a cuantificat intensificarea riscului de boală asociat fumatului obținând un risc de două ori mai mare pentru boala Crohn. [83] Același nivel de risc a fost identificat și la pacienții fost-fumători pentru a dezvolta colită ulcerativă dar nu și la fumătorii activi. De altfel, s-a observat un risc crescut de a dezvolta colită ulcerativă între 2-5 ani de la întreruperea fumatului, risc care persistă până la 20 de ani, datele provenind dintr-o cohortă de asistente medicale femei. Fumatul la vârste tinere și fumatul pasiv par să aiba același efect. [84–86]

Plecând de la observația că fumatul nu a fost reținut ca factor de risc în toate studiile care au analizat acest parametru, deși a fost intens studiat, s-a emis ipoteza faptului că variațiile interetnice și de sex pot contribui la influența fumatului asupra incidenței bolii prin complexitatea relației dintre genotip, fenotip și mediu. În sprijinul acestor afirmații, citez un studiu israelian care a observat asocierea dintre întreruperea fumatului și apariția colitei ulcerative, dar nu și a bolii Crohn. Mai departe, Jacques Cosnes et al. a asociat fumatul activ cu instalarea mai tardivă a colitei ulcerative și riscul mai redus de a necesita tratamente imunomodulatoare la bărbați dar nu și la femei. În același studiu, în antiteză cu observațiile de mai sus, fumatul a fost asociat cu o vârstă mai redusa de apariție a bolii Crohn și cu risc crescut de a necesita tratamente imunosupresoare în special la femei. De altfel, plecând de la aceste prime observații, studii ulterioare au confirmat asocierea dintre fumat și evoluția bolii Crohn cu risc crescut de complicații. Sumarizând aceste date, pacienții cu boală Crohn prezintă un risc crescut de intervenții chirurgicale, necesar crescut de tratamente imunosupresoare și risc crescut de recurență postoperatorie după rezecții intestinale. În contrast, la pacienții cu colită ulcerativă, fumatul activ predispune la o evoluție mai benignă a bolii, cu necesar chirurgical și medicamentos redus, iar întreruperea fumatului crește riscul de recădere a bolii până la 1 an. [87–92]

Mai multe ipoteze au fost emise în încercarea de a explica această asociere divergentă dintre fumat și cele două boli inflamatorii intestinale, pornind inițial de la suspiciunea că nicotina reprezintă factorul trigger lucru infirmat atât prin studii pe colită ulcerativă cu terapie de substituție nicotinică cât și pentru boala Crohn prin studii cu administrare de tutun oral care au oferit rezultate contradictorii, sugerând o posibilă sursă trigger la nivelul fumului de țigară. Au fost propuse mai multe mecanisme de acțiune prin care fumatul afectează tractul digestiv, printre care alterarea tonusului mușchiului neted, alterarea funcției endoteliale prin producție de oxid nitric sau afectarea barierei mucozale printr-un mecanism mediat de stress-ul oxidativ, dar cel care a descris complet un mecanism a fost Bergeron et al. care a demonstrat că celulele mononucleare de la pacienții cu boala Crohn fumători activi sunt mai puțin responsive la necesarul de acțiune antiinflamatorie locală împotriva radicalilor liberi de oxigen datorită unei sinteze reduse de heat-shock protein 70 (HSC-70). Câteva observații interesante sunt legate de faptul că efectele fumatului ar putea fi influențate și de polimorfismele genetice ale genelor ce codează proteinele implicate în metabolismul nicotinei iar fumatul exercită un rol asupra microbiomului cu posibile implicații asupra apariției colitei ulcerative. [91–98]

1.3.3.2 Apendicectomia

Similar cu fumatul, apendicectomia a demonstrat efecte divergente în relația cu incidența bolilor inflamatorii intestinale, fapt analizat atent într-o cohortă de peste 200,000 unde s-a observat că în grupul pacienților care au fost operați pentru apendicită perforată cu limfadenită mezenterică sub vîrstă de 50 de ani, riscul de a dezvolta colită ulcerativă a fost mai redus decât la pacienții operați pentru durere abdominală sugestivă de apendicită, fapt ce sugerează că rolul protector este dat de inflamația per se a organului și nu de înlăturarea acestuia. În aceeași cohorte s-a observat un risc crescut de dezvoltare a bolii Crohn până la 20 de ani după apendicectomie. Totuși, riscul de dezvoltare a bolii Crohn după apendicectomie trebuie interpretat cu scepticism deoarece unele intervenții ar fi putut fi efectuate de fapt, pentru dureri cauzate de boala Crohn la debut. [99–101]

1.3.3.3. Igiena

Ipoteza igienei ca factor de risc pentru dezvoltarea bolilor inflamatorii intestinale a fost propusă pentru prima dată de Strachan et al. în încercarea de a explica incidența crescută a acestor boli în țările dezvoltate, idee susținută ulterior de date care au observat asocierea dintre numărul mare de membrii ai familiei, viața în mediul rural și expunerea la animale domestice precoce în copilărie cu riscul de a dezvolta una din cele două boli. Totuși, toate aceste studii au fost de tip caz-control și nu pot exclude posibilității factori confundatori. Pe lângă acești factori au fost analizați și alții care ar putea influența microbiota și dezvoltarea sistemului imun intestinal precum alăptarea și modul delivrenței. Astfel, deși alăptarea a fost invers asociată cu riscul de a dezvolta boală inflamatorie intestinală, corelație susținută în special pentru colita ulcerativă, datele provenite din mai multe studii au fost contradictorii. [33,73,102–104]

În ceea ce privește modul delivrenței datele din literatură sunt extrem de succinte și nu pot servi pentru a emite concluzii pertinente.

1.3.3.4. Agenți infecțioși și antibiotice

Asocierea dintre patogeni intestinali și bolile inflamatorii intestinale a fost și este în continuare de interes. Dintre multiplii agenți patogeni studiați, cel mai mare interes a fost stârnit de *Mycobacterium avium* subspecia *Paratuberculosis* (MAP) implicat în etiologia bolii Johne la bovine. O frecvență crescută a acestui patogen a fost inconstant identificată la pacienții cu boala Crohn, motiv pentru care a fost elaborat un studiu randomizat controlat placebo care a evaluat eficiența tratamentului antimicrobian cu agent specific dar rezultatele au fost dezamăgitoare. Date de cohortă din Danemarca au asociat riscul crescut de boală inflamatorie intestinală cu infecția cu *Campylobacter* și *Salmonella*, pe când date din Statele Unite ale Americii și Marea Britanie au observat o asociere între episoadele de gastroenterită fără factor etiologic evidențiat și riscul de boală inflamatorie. [105–111]

Referitor la virusuri s-a observat pe modele murine de șoareci deficienți în autofagie o reacție inflamatorie similară bolii Crohn declanșată de infecția cu Norovirus, prin anomalii induse la nivelul celulelor Paneth. Acest efect nu a fost observat la șoareci fără deficiențe la

nivelul autofagiei sugerând relația complexă dintre factorii de mediu și susceptibilitatea genetică a gazdei. [112]

Infecțiile reprezintă cauze bine cunoscute de recădere la pacienții cu boli inflamatorii intestinale, unul din cei mai frecvenți implicați agenți patogeni fiind Clostridium Difficile care se asociază cu recăderi frecvente, în special la pacienții spitalizați, și care se asociază cu o morbiditate și mortalitate crescută în această populație de pacienți chiar și la mai mult de un an după episodul infecțios inițial.[113]

Privind consumul de antibiotice, este cunoscut faptul că acestea interferă cu microbiota intestinală în general, iar interferența aparută în perioada copilăriei când microbiota suferă un proces de stabilizare poate contribui la un dezechilibru cronic, cu alterarea mecanismelor de răspuns imun la nivel intestinal și creșterea predispoziției de a dezvolta boala. Asocierea a fost observată mai degrabă cu boala Crohn decât cu colita ulcerativă și este mai puternică pentru utilizarea antibioticelor în primul an de viață existând totodată și o relație de tip doză-răspuns în sensul creșterii riscului pentru mai multe cure de antibiotice utilizate. [114–116]

1.3.3.5. Medicamente

Există și alte medicamente separate de antibiotice care au fost dovedite să se asocieze cu riscul crescut de recădere a acestor boli mai degrabă decât de a induce bolile per se: antiinflamatoarele non-steroidiene, aspirina, contraceptivele orale, terapia hormonală postmenopauză. Antiinflamatoarele pot declanșa boala cu un risc direct proporțional cu doza și durata tratamentului, efectul este similar pentru colita ulcerativă și pentru boala Crohn, putând declanșa recăderi la aproximativ o treime din pacienți, mecanismul fiind probabil legat de inhibiția non-selectivă a ciclooxygenazei. Referitor la anticoncepționalele orale, acestea conferă un risc crescut de recădere a bolii pe durata tratamentului, cu reducerea progresivă a riscului odată cu întreruperea tratamentului. [117–121]

1.3.3.6. Dieta

Majoritatea studiilor ce au urmărit implicațiile dietei în apariția bolii Crohn au avut un design de tip caz-control ce a dus la scăderea calității informațiilor oferite, dar în ciuda heterogenității lor marcate, au susținut la unison ideea implicării fibrelor alimentare în patogenia bolii Crohn într-o corelație invers proporțională legată de cantitatea de fibre ingerate. Astfel, pacienții pediatrici nou-diagnosticati cu boala Crohn au avut un aport semnificativ mai mic de fibre alimentare decât pacienții fără boală. De asemenea, într-o cohortă de femei cu ingestie crescută de fibre s-a observat o reducere cu 40% a riscului de a dezvolta boala Crohn. Acest efect a fost observat în special la fibrele vegetale din fructe și legume, nu și din cereale. Mecanismul posibil implicat în acest fenomen ar putea fi legate de metabolizarea fibrelor solubile la acizi grași cu lanț scurt de către bacteriile intestinale, aceștia din urmă având un efect antiinflamator prin inhibiția transcripției mediatorilor proinflamatori. În plus, fibrele sunt utile în menținerea integrității barierii mucozale, împiedicând translocarea E. Coli în plăcile Peyer, și nu în ultimul rând, activarea receptorului aryl-hydrocarbon ce s-a dovedit a fi implicat în remiterea colitelor la modele animale. [122–125]

Studiile referitoare la dietele bogate în acizi grași și hidrați de carbon sunt multiple, atât umane cât și murine, cu rezultate contradictorii și fără a stabili o legătură clară între acești factori de mediu și riscul de apariție sau recădere a acestor boli, motiv pentru care nu voi detalia rezultatele acestora.

Mergând mai departe, puține studii s-au concentrat pe micronutrienți ca factori de risc pentru bolile inflamatorii intestinale, dintre aceștia cel mai intens studiat fiind vitamina D.

Observația implicării vitaminei D în patogenia și evoluția acestor boli a plecat de la studii murine cu șoareci defectivi de receptorul vitaminei D care au prezentat un risc crescut de colită, iar aceasta s-a ameliorat după administrarea de vitamina D prin reducerea expresiei de citokine proinflamatorii inclusiv TNF α . Valori scăzute ale vitaminei D serice sunt diagnosticate mai frecvent în populația pacienților cu boala Crohn decât în populația generală, aceste valori scăzute fiind asociate cu riscuri crescute asociate chirurgiei și de spitalizare, riscuri care s-au normalizat după corecția deficitului. [126–132]

Un alt micronutrient cu efecte antiinflamatorii cunoscute este zincul. Este cunoscut efectul acestuia de modulare a celulelor imune cum ar fi macrofagile, neutrofilele și celulele natural killer T. De asemenea, zincul interferă cu transcriția factorilor căii NF-kB, iar în contextul bolii Crohn în mod specific, implicarea acestuia în procesul de autofagie și clearance bacterian poate conduce la un risc scăzut de recădere. [133–135]

1.3.3.7. Stil de viață – stress, somn și exercițiu fizic

Stressul poate afecta tubul digestiv prin promovarea procesului inflamator pe calea axului hipotalamo-hipofizo-adrenal și a sistemului nervos autonom cu producție crescută de citokine proinflamatorii, activarea macrofagelor, creșterea permeabilității intestinale și alterare microbiotei. Studii murine pe șoareci la care s-a indus depresia prin injectare de rezerpină au demonstrat risc crescut de dezvoltare a unor colite severe care s-au ameliorat după administrarea de desmetil-imipramină – un antidepresiv. Interesant, în același tip de studii, expunerea la factori stresanți a dus la modificarea în sensul diminuării diversității florei bacteriene cu producție crescută de interleukina-6(IL-6), proces ameliorat după administrarea de antibiotice. La pacienții cu boală deja diagnosticată stressul este cvasiunanim acceptat ca factor de risc pentru agravarea bolii, iar anxietatea și depresia sunt asociate cu evoluția debilitantă a bolii, răspunsul la tratament, spitalizări multiple și neesar chirurgical, dar aceste asociieri sunt greu de interpretat deoarece relația cauză-efect poate fi bidirectională. [136–138]

Aceleși aprecieri sunt valabile și pentru deprivarea de somn fiind de așteptat ca un pacient cu boală activă să sufere de reducerea duratei și alterarea calității somnului, pe când cantitatea redusă de somn pentru o perioadă prelungită a fost asociată cu riscul crescut de a dezvolta colită ulcerativă. [139]

Referitor la efortul fizic, deși datele sunt limitate, se observă un trend pentru dezvoltarea de boli inflamatorii intestinale asociat cu lipsa activității fizice, lucru sugerat de studii murine și ulterior confirmat într-un studiu de cohortă prospectiv care a demonstrat reducerea riscului de dezvoltare a bolii Crohn cu 44% în lotul subiecților cu activitate fizică riguroasă.[140]

1.4.Diagnostic

Noțiunile de diagnostic și tratament în bolile inflamatorii intestinale fac obiectul unor ghiduri detaliate a căror relatare amănunțită ar ocupa un spațiu mult prea întins motiv pentru care voi face un rezumat succint al celor mai importante aspecte de diagnostic și tratament având ca sursă unică bibliografică pentru acest capitol ghidul Organizației Mondiale de Gastroenterologie.[141]

1.4.1. Anamneza și examen clinic

Simptomatologia în bolile inflamatorii intestinale depinde de localizarea segmentului afectat, fiind de multe ori nespecifică și mimând sindromul de intestin iritabil ducând uneori la întârzierea diagnosticului cu luni sau chiar ani aşa cum a demonstrat Zaharie R. Et al. într-un studiu efectuat pe populația de pacienți cu boli inflamatorii intestinale din Romania.[142] Cele mai frecvente simptome digestive la pacienții cu boala Crohn sunt durerile abdominale colicative și diareea, pe când la pacienții cu colită ulcerativă predomină ca simptom principal diareea urmată de hemoragie digestivă inferioară manifestată ca hematochezie sau rectoragii, toate aceste simptome intrunind condiții de cronicitate.

Pe lângă simptomatologia digestivă, acești pacienți prezintă și simptome sistemice cum ar fi scăderea ponderală, febră, transpirații, fatigabilitate. Recidivele sunt frecvente, inclusiv sub tratament, și contribuie la afectarea calității vieții. Aceste recurențe pot fi precipitate de stress emoțional, alimentație, infecții, sarcină, utilizarea de laxative sau antibiotice, și de lipsa aderenței la tratamentul de menținere a remisiunii.

În ambele boli poate fi prezentă diareea atunci când sunt afectate segmente întinse de intestin subțire sau colon, dar pacienții pot prezenta și scaune formate. Emisia de sânge evident la nivelul scaunului este mult mai frecvent întalnită în colita ulcerativă. O mare parte din pacienții cu boala Crohn pot prezenta încă de la diagnostic patologie perianală de tipul fistulelor și abceselor. Durerea abdominală colicativă localiată în fosa iliacă dreaptă asociind febră, sugestive pentru apendicită, pot reprezenta tabloul clinic la debut al unei boli Crohn. Scăderea ponderală este mult mai frecventă în boala Crohn decât în colita ulcerativă secundar sindromului

malabsorbtiv impus de inflamația segmentelor de intestin subțire pe de o parte, și prin limitarea autoindusă a aportului alimentar în încercarea de a controla simptomele, pe de altă parte.

Organizația Mondială de Gastroenterologie (World Gastroenterology Organization – WGO) a specificat câteva simptome care sunt frecvent asociate cu injurie mucozală:

- Diaree: cu mucus sau sânge, ce poate apărea și noaptea fiind asociată cu incontinență fecală.
- Constipația: poate reprezenta un prim simptom al colitei ulcerative atunci când boala este localizată la rect.
- Modificări ale tranzitului intestinal: scaune de consistență fluctuantă, asociind tenesme rectale și defecație imperioasă.
- Dureri abdominale colicative: frecvent localizate în fosa iliacă dreaptă în boala Crohn, periombilical și în fosa iliacă stângă în colita ulcerativă moderat-severă.
- Greăță și vărsături: mult mai frecvent întâlnite în boala Crohn secundar durerilor abdominale intense, sindromului subocluziv sau afectării tubului digestiv superior în contextul bolii.

Din istoric trebuie notate antecedentele familiale de cancer colo-rectal, boală celiacă, boală inflamatorie intestinală la rude de gradul I, precum și istoricul de tratamente antibiotice repetitive și uzul de molecule anti-inflamatorii non-steroidiene pentru perioade îndelungate.

De asemenea, pacienții pot prezenta simptome legate de prezența manifestărilor extraintestinale musculo-scheletale (artropatie axială și/sau periferică), cutanate (eritem nodos și/sau pyoderma gangrenosum), oculare (uveită, episclerită) sau hepato-biliare (colangita sclerozantă primitivă).

Complicațiile intestinale ce pot fi întâlnite la acești pacienți au fost organizate în scop didactic tot de WGO:

- Afectarea de tub digestiv proximal – este mai frecvent întâlnită la anumite etnii (africanii) și la copii, dar acest lucru poate fi influențat și de faptul că la copii gastroscopia este mai frecventă ca primă investigație decât la adult. [143]
- Hemoragia digestivă inferioară masivă este mult mai frecvent întâlnită în colita ulcerativă.

- Perforația intestinală este o complicație mai frecvent asociată cu boala Crohn dar poate apărea și în colita ulcerativă atunci când este prezent megacolonul toxic.
- Abcesele intraabdominale în boala Crohn
- Stenozele intestinale care pot fi secundare inflamației acute sau cronice, fibroase, cicatriciale, de obicei sunt mai lungi decât în colita ulcerativă. Acestea din urmă trebuie considerate maligne până la dovedirea contrariului.
- Fistulele și leziunile perianale: pot fi fistule simple sau complexe, fistule digestivo-urinare sau –vaginale ce necesită tratament complex medico-chirurgical. De menționat abcesele, hemoroizii și fisurile anale.
- Megacolonul toxic – mult mai frecvent întâlnit în colita ulcerativă decât în boala Crohn, fiind o urgență medico-chirurgicală ce necesită tratament intensiv medicamentos și intervenție chirurgicală urgentă în caz de absență a ameliorării la 24h.
- Riscul de transformare malignă: crescut la pacienții cu colită ulcerativă cu inflamație persistentă, durată a bolii mai mare de 8 ani și/sau prezența colangitei sclerozante primitive. Riscul există și în boala Crohn dar de o magnitudine mult mai scăzută. Adenocarcinomul intestinal poate apărea în boala Crohn de intestin subțire cu o incidență mai mare decât în populația generală, dar riscul rămâne totuși redus.

Complicațiile extraintestinale trebuie diferențiate de manifestările extraintestinale, acestea putând fi secundare evoluției bolii sau efectelor adverse ale moleculelor utilizate pentru tratament: artropatii induse medicamentos (corticoizi, agenți antiTNF), complicații oculare induse de cortizon (cataractă, glaucom), complicații hepato-biliare (ficat gras non-alcoholic, litiază biliară veziculară), complicații osoare (osteoporoză), anemia (deficit de vitamina B12, deficit de fier, citopenie indușă de tiopurine), complicații renale (nefrite tubulointerstitionale induse medicamentos), evenimente tromboembolice și tulburări psihologice de tip anxietate și depresie.

Diagnosticul bolilor inflamatorii intestinale la adulți necesită corelarea datelor de istoric, examen clinic, examinări paraclinice – biologice, endoscopice, imagistice, cu rolul de a exclude alte patologii și de a confirma diagnosticul. De menționat, nu există o examinare gold-standard pentru diagnostic.

Din punct de vedere al istocului pacientului, trebuie obținute informații despre simptome – debut, durată, periodicitate, distribuția circadiană, prezența manifestărilor extraintestinale, statutul de fumător, istoricul chirurgical și medicamentos, istoric de călătorii în zone endemice pentru infecții cu germeni intestinali, precum și istoric familial de boală inflamatorie intestinală.

Examenul clinic trebuie să urmărească aspecte generale – paloare, cașexie, hipocratism digital, status nutrițional, alură ventriculară și tensiune arterială, modificări la nivelul regiunii abdominale – mase palpabile, distensie abdominală, sensibilitate/durere/apărare musculară la palpare, zgomote intestinale accentuate, hepatosplenomegalie, modificări ale regiunii perianale – fisuri, fistule, abcese, precum și prezența manifestărilor extraintestinale la nivelul cavității bucale (afte), tegumentelor, ochilor și articulațiilor.

1.4.2. Teste de laborator

1.4.2.1. Teste fecale

Testele din materii fecale fac parte din bilanțul oricărui sindrom diareic și pot exclude infecțiile cu tropism digestiv cauzate de virusuri, bacterii și paraziți. Astfel, coprocultura și examenul coproparazitologic fac parte din examenele de rutină recomandate la acești pacienți. Pe lângă acestea, trebuie exclusă infecția cu Clostridium Difficile chiar și în absența istoricului de consum de antibiotice. Calprotectina fecală este un test fecal suplimentar care poate confirma/infirma prezența inflamației intestinale, eventual în completare cu alfa-antitripsina, lactoferonina și coprocitograma, putând astfel diferenția între pacienții care necesită colonoscopie.

1.4.2.2. Teste sanguine

Acestea vor fi detaliate în capitolul de biomarkeri de activitate în bolile inflamatorii intestinale. Totuși, consider utilă o trecere în revistă succintă cu scop didactic deoarece, pe lângă biomarkeri, sunt necesare analize de rutină cu scopul de a exclude anumite infecții.

Astfel, orice pacient trebuie să beneficieze de o hemogramă completă, teste de inflamație sistemică – proteina C reactivă, viteza de sedimentare a hematilor, orosomucoid, dozarea

electrolițiilor serici, albumina, feritina, vitamina B12 și teste functionale hepatice. Pe lângă acestea, testarea serologică pentru infecția HIV și profilul funcțional tiroidian fac parte din bilanțul sindroamelor diareice și consumtive. Pentru diferențierea între cele două boli poate fi utilă testarea anticorpilor anti- *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA - sugestivi pentru boala Crohn în caz de rezultat pozitiv) și anticitoplasmă neutrofilică perinucleari (pANCA – sugestivi pentru colită ulcerativă în caz de rezultat pozitiv).

Nu în ultimul rând, testarea pentru infecții oportunistice de tip hepatită cronică cu virus B și virus C, infecția cu virusul varicelo-zoosterian, Ebstein-Barr și citomegalovirus, pot fi utile în eventualitatea confirmării diagnosticului de boală inflamatorie intestinală și necesarului de tratament imunosupresor, pentru a alege molecule potrivite fiecărui pacient.

Testarea serologică pentru boala celiacă nu trebuie neglijată, mai ales în prezența unui sindrom diareic cronic asociat cu malabsorbție.

Un aspect foarte important de menționat, în țările cu prevalență crescută a infecțiilor bacilare Koch, este necesară excluderea tuberculozei active pulmonare și/sau intestinale. Pentru aceasta se pot folosi teste cutanate, probe interferon gamma release assay (IGRA) precum și radiografie pulmonară, dar chiar și cu ajutorul acestor teste, diagnosticul diferențial este uneori imposibil de efectuat.

1.4.3. Examenul histopatologic

Poate oferi informații importante pentru:

- Caracterul cronic al leziunilor identificate – dezorganizarea arhitecturală cu rarefierări criptelor și prezența plasmocitozei bazale sunt aspecte utilizate pentru diagnosticul diferențial cu colitele acute infecțioase.
- Prezența granuloamelor non-cazeoase sugestive pentru boala Crohn sau cazeoase care ar trebui să alerteze medicul asupra unei etiologii bacilare a leziunilor.
- Poate identifica un aspect înalt sugestiv pentru infecție cu Citomegalovirus(CMV) întâlnit la pacienții aflați sub tratament cronic cu corticoid sistemic sau imunosupresor.

- Poate depista displazia sau malignitatea la pacienții cu boli inflamatorii vechi în special colită ulcerativă.
- Poate identifica colita limfocitară sau colagenă la pacienții cu boala Crohn de intestin subțire și ar trebui cautată dacă pacienții prezintă diaree.
-

1.4.4. Imagistică și endoscopie

- ❖ *Radiografia abdominală simplă*
 - Exclude megacolonul toxic
 - Utilă atunci când există suspiciunea unei perforații sau obstrucții intestinale
- ❖ *Cisma baritată cu dublu contrast/ tranzitul baritat al intestinului subțire (proba Pansdorf)*
 - Nerecomandate în formele severe
 - Pot fi utile pentru evaluarea fistulelor interne entero-colonice
 - Poate oferi o cuantificare lezională în cazul bolii Crohn de intestin subțire
- ❖ *Sigmoidoscopia/Colonoscopia*
 - Oferă cele mai bune imagini ale leziunilor la nivelul mucoasei
 - Oferă posibilitatea prelevării biopsiilor
 - Se recomandă limitarea examinării în formele de colită severă pentru că pot precipita apariția megacolonului toxic
 - Poate fi utilizată în cazul formelor refractare la tratament pentru excluderea infecției CMV sau diagnosticul unei colite cu Clostridium Difficile atunci când celelalte teste sunt echivoce
 - Utilizată de rutină în screening-ul cancerului colorectal la pacienții cu boli inflamatorii intestinale mai vechi de 8 ani
- ❖ *Endoscopia digestivă superioară*
 - Recomandată pentru evaluarea simptomelor asociate de tipul greață, vărsături, dureri abdominale
 - Utilă pentru bilanțul lezional în boala Crohn care poate afecta tubul digestiv superior
- ❖ *Endoscopia cu videocapsulă*

- Utilă pentru evaluarea intestinului subțire la pacienți cu suspiciune înaltă de boală Crohn ileală dar rezultate negative la bilanțul endoscopic standard.
- Utilizată pentru evaluare vindecării mucozale la pacienții cu boală Crohn de intestin subțire cunoscută
- Nu are rol clar în colita ulcerativă iar prețul prohibitiv o face o investigație nu foarte frecvent utilizată în managementul acestor boli
- ❖ *Enteroscopia cu dublu balon/ monobalon/ spirală*
 - Pentru evaluarea leziunilor de intestin subțire distal de aria ce poate fi examinată cu metodele endoscopice standard, oferind și posibilitatea prelevării de biopsii.
 - Utilă pentru proceduri terapeutice în cazul stenozelor din boala Crohn.
- ❖ *Alte metode endoscopice recente*
 - Cromoendoscopia și magnificația sunt două tehnici endoscopice cu implicații în principal în screening-ul cancerului colo-rectal la acești pacienți.
- ❖ *Colangiopancreatografia prin rezonanță magnetică*
 - În cazul prezenței colestaziei pentru diagnosticul unei eventuale colangite sclerozante primitive asociată.
- ❖ *Imagistica cross-secțională*
 - Utilă pentru evaluarea extensiei bolii, severității leziunilor și eventualelor complicații ale perforației intestinale.
 - Se preferă ecografia abdominală și imagistica prin rezonanță magnetică având în vedere faptul că, de cele mai multe ori, este vorba de pacienți tineri ce vor avea nevoie în mod repetat de investigații imagistice.
 - Ecografia abdominală are o acuratețe diagnostica înaltă pentru diagnosticul bolii Crohn de intestin subțire și pentru leziunile perianale, fără expunere la radiații și cu costuri reduse de procedură. [144]
 - Imagistica prin rezonanță magnetică are nivelurile înalte de sensibilitate și specificitate pentru diagnosticul bolii Crohn de intestin subțire și reprezintă gold-standard-ul pentru evaluarea afectării perianale asociate bolii. [145]
- ❖ *Absorbtiometria duală cu raze X (DEXA)*
 - Utilă pentru evaluarea densității minerale osoase la acești pacienți care frecvent necesită cure repetitive de tratament cortizonic în evoluție.

❖ *Radiografia pulmonară*

- Folosită pentru excluderea tuberculozei pulmonare și eventual vizualizarea pneumoperitoneului acolo unde este cazul. [141]

1.5. Diagnostic diferențial

Diagnosticul diferențial este important a se face inițial între cele două entități – colita ulcerativă și boala Crohn, și ulterior cu alte entități clinice similare. Astfel, am grupat în tabelul 1.1. diagnosticul diferențial între cele două boli, iar în tabelul 1.2. diagnosticul diferențial cu alte boli din afara acestui grup.

Tabelul 1.1. Diagnostic diferențial între colita ulcerativă și boala Crohn

	Trăsături sugestive colită ulcerativă	Trăsături sugestive boală Crohn
Clinice	<ul style="list-style-type: none"> - Diaree cu emisii de volum scăzut asociind defecație imperioasă - Predominanța hematocheziei 	<ul style="list-style-type: none"> - Diaree asociată de dureri abdominale colicative și malnutriție - Masă abdominală palpabilă - Leziuni perianale
Endoscopice	<ul style="list-style-type: none"> - Inflamație difuză, continuă, superficială la nivelul colonului - Afectarea rectală ce poate fi uneori focală - Ulcerații superficiale, pleomorfe și eroziuni - Sângerare spontană 	<ul style="list-style-type: none"> - Leziuni asimetrice, discontinue, transmurale - Afectare mai frecvent a colonului drept și ileonului terminal - Aspectul de "piatră de pavaj" - Ulcere longitudinale
Histologice	<ul style="list-style-type: none"> - Inflamație difuză în mucoasă și submucoasă - Distorsiunea arhitecturală a criptelor 	<ul style="list-style-type: none"> - Inflamație focală, uneori cu aspect granulomatos - Afectare transmurală cu vizualizarea de eroziuni ale suprafetei
Serologice	<ul style="list-style-type: none"> - Anticorpi anticitoplasmă neutrofilică 	<ul style="list-style-type: none"> - Anticorpi antiSaccharomyces cerevisiae și alți anticorpi împotriva unor antigene microbiene

Tabelul 1.2. Diagnostic diferențial cu alte entități clinice

Colită ulcerativă	Boală Crohn
<ul style="list-style-type: none"> • Colita acută autolimitată • Colita amoebiană • Schistosomiază • Boala Crohn • Cancerul colo-rectal • Colopatia indusă de antiinflamatoare nonsteroidiene • Tuberculoza colonică • Colita ischemică • Colita radică • Colita microscopică 	<ul style="list-style-type: none"> • Tuberculoza intestinală • Boala Behcet • Enteropatia indusă de antiinflamatoare nonsteroidiene • Sindromul de intestin iritabil • Colita ulcerativă • Boala celiacă • Enterita eosinofilică • Colita microscopică • Enterita radică • Limfomul intestinal • Cancerul colo-rectal

Un diagnostic diferențial de o importanță extremă este reprezentat de diferențierea între boala Crohn și tuberculoza intestinală, mai ales în țările cu prevalență crescută a infecției bacilare cum este Romania. Din acest considerent, ghidul WGO tratează în mod detaliat această diferențiere în tabelul de mai jos.

Tabelul 1.3. Diagnosticul diferențial între tuberculoza intestinală și boala Crohn

Trăsături	Tuberculoza intestinală	Boala Crohn
Clinice	Istoric de TBC sau bală activă Istoric de contact TBC pozitiv Frecvența redusă a abceselor intraabdominale, leziunilor perianale Radiografie pulmonară anormală (nu întotdeauna) Afecțează rar rectul	Abcese și fistule perianale Abcese la nivelul peretelui intestinal Hemoragie digestivă inferioară Perforație intestinală posibilă Recurență după rezecție intestinală
Endoscopice	Ulcere superficiale, transverale cu afectare segmentară Pseudopolipi Afecțare cec>ileon	Ulcere longitudinale, ulcerații aftoide, aspect de "piatră de pavaj" Afecțare ileon>cec

	Valva ileo-cecală afectată - beantă	Valva ileo-cecală stenoziată sau ulcerată
Histopatologice	<p>Granuloame de mari dimensiuni, dense</p> <p>Necroză cazeoasă în peretele intestinal și la nivelul ganglionilor limfatici adiacenți</p> <p>Teste pozitive pentru bacili acid-alcool rezistenți (BAAR)</p> <p>Benzi de histiocite epitelioide ce delimitizează ulcerele</p>	Granuloame non-cazeoase
Teste specifice	<p>Analiză ADN TB cu primer specific</p> <p>Cultură Ziehl-Nilssen</p> <p>Test cutanat la tuberculină</p> <p>Teste IGRA</p> <p>Radiografie pulmonară</p> <p>ASCA ar putea fi util pentru diagnosticul bolii Crohn în detrimentul TBC intestinal</p>	
Imagistică cross-secțională	<p>Afectare cec>ileon</p> <p>Îngroșare parietală asimetrică</p> <p>Prezența ascitei</p> <p>Ganglioni pericecali</p> <p>Adenopatii mezenterice>1cm diametru cu necroză centrală(atenuare a semnalului)</p> <p>Semnul "fat-wrapping" rar întâlnit</p>	<p>Afectare ileon>cec</p> <p>Îngroșare parietală simetrică</p> <p>Semnul "fat-wrapping" frecvent</p> <p>Adenopatii mezenterice<1cm diametru</p> <p>Dilatații vasculare parietale – semnul Comb</p>

1.6. Tratament

Managementul acestor boli necesită, de cele mai multe ori, combinații de medicamente pentru a induce un control complet asupra bolii. Din acest motiv, pacienții trebuie informați asupra bolilor, asupra complicațiilor posibile atât legate de boală cât și secundare tratamentului, și trebuie încurajați să participe activ la deciziile terapeutice. [141]

Tratamentul bolilor inflamatorii intestinale trebuie adaptat în funcție de câțiva parametri:

- Diagnostic colită ulcerativă vs. Boală Crohn
- Localizarea bolii și fenotip
- Severitatea puseului
- Comorbidități și complicații
- Răspuns individual la un anumit tratament
- Intoleranțe medicamentoase cunoscute
- Istoricul de evoluție al bolii – de exemplu, pusee repetitive în ultimul an

Scopurile tratamentului la acești pacienți sunt de a ameliora simptomatologia și secundar de a crește calitatea vieții, din perspectiva pacientului, și de a vindeca mucoasa, de a permite o perioadă de remisiune fără necesar de corticoizi cât mai lungă, de a evita spitalizările, intervențiile chirurgicale și complicațiile, din perspectiva medicului. [141]

1.6.1. Modificările dietei și ale stilului de viață

- Reducerea conținutului de fibre din dietă în perioadele de activitate clinică poate ameliora diareea.
- Evitarea produselor lactate dacă acestea provoacă disconfort, altfel ele nefiind contraindicate.
- Regimul hidric, a jeun sau cu formule hidrolizate pot ameliora simptomatologia obstructivă asociată bolii Crohn. De altfel, nutriția enterală cu formule speciale poate fi utilizată ca primă terapie în boala Crohn formele ileale cu severitate ușoară-moderată.

- Renunțarea la fumat are implicații bine stabilite în evoluția pe termen lung a bolii Crohn, pe când fumatul activ poate ameliora evoluția unei colite ulcerative.[141]

1.6.2. Aminosalicilații

Derivații de acid 5-aminosalicilic(5-ASA) sunt utili atât în puseele de boală cât și pentru tratamentul de menținere a remisiunii. Datele din literatură susțin categoric utilitatea acestora în managementul colitei ulcerative, datele pentru boala Crohn fiind succinte. Astfel, pentru menținerea remisiunii colitei pot fi utilizati atât agenții orali cât și cei topici precum și combinații între cele două metode de administrare, cu o doză ce nu trebuie să fie mai mică de 2grame/zi. De altfel, combinația 5-ASA topic și oral s-a dovedit superioară celorlalte căi de administrare luate individual pentru menținerea remisiunii în colita ulcerativă ușoară-moderată.[146]

Indicația acestor agenți în boala Crohn este una limitată la boala cu afectare a colonului drept, formele ușoare, care nu tolerează, nu doresc sau la care sunt contraindicații corticosteroizii, și care nu au avut mai mult de un puseu în ultimul an. [147]

1.6.3. Corticosterozii

Reprezintă agenții de elecție folosiți în formele moderat-severe de boală inflamatorie datorită potențialului de ameliorare clinică rapidă printr-o supresie eficientă a inflamației sistemice. Totuși, spectrul larg de efecte adverse limitează utilizarea acestor agenți pe termen îndelungat, ei nefiind indicați pentru menținerea remisiunii. Pentru afectarea localizată ileală, ileocecală sau de colon drept cu intoleranță la corticoid sistemic, care refuză tratamentul sau cu contraindicații pentru acest tratament, se poate utiliza budesonidul, un corticoid topic cu profil de efecte adevarse mai restrâns decât al corticoizilor sistemici, dar cu eficiență mai redusă motiv pentru care nu poate fi utilizat în formele moderat-severe de boală. Ruta de administrare a acestor agenți depinde de localizarea bolii și de severitatea puseului astfel: în formele severe se preferă administrarea intravenoasă, în formele moderate administrarea orală iar în formele ușoare administrarea topicală. [147,148]

1.6.4. Imunomodulatoarele

Clasa imunomodulatoarelor înglobează mai multe molecule cu mecanisme de acțiune diferită cum ar fi tiopurinele, inhibitorii de calcineurină și metotrexatul. [141]

În general, există câteva indicații comune ale acestor molecule în tratamentul bolilor inflamatorii intestinale. Astfel, imunomodulatoarele sunt utile pentru a reduce sau elimina necesarul de corticosteroizi, pentru a menține remisiunea atunci când derivații 5-ASA au fost ineficienți, pentru tratamentul fistulelor asociate bolii Crohn, precum și pentru a reduce imunogenicitatea agenților biologici. Aceste molecule prezintă o acțiune lentă, cu atingerea efectului maxim după mai mult de 3 săptămâni de la inițierea motivului pentru care nu pot fi folosite la inducerea remisiunii. Excepție de la această afirmație face Ciclosporina A care acționează rapid și reprezintă o variantă de tratament pentru colită acută severă non-responsivă la corticoizi sistemici. [141]

O atenționare specială trebuie făcută pentru clasa tiopurinelor legată de efectul toxic hematologic al acestora. Astfel, se recomandă genotiparea enzimei tiopurin-metiltransferaza pentru a selecta pacienții cu risc crescut de toxicitate medulară a acestui tratament. Acolo unde nu este disponibil testul se recomandă monitorizarea hemogramei la două și patru săptămâni de la inițierea tratamentului, și ulterior la fiecare trei luni. [141]

Important de notat este faptul că deși tiopurinele se asociază cu un risc de infecții redus, totuși se recomandă o monitorizare atentă mai ales la pacienții vîrstnici. [149] De asemenea, utilizarea îndelungată a tiopurinelor predispune la cancer de piele non-melanoma precum și la dezvoltarea de limfoame, chiar dacă acest risc crescut este dificil de apreciat. [141]

În mod particular, tiopurinele sunt asociate cu riscul de dezvoltare al sindroamelor de activare macrofagică cel mai probabil prin mecanism de promovare a reactivării virale secundar inhibiției limfocitelor natural killer și citotoxice de tip T. [150]

Referitor la inhibitorii de calcineurină trebuie notat faptul că indicațiile ciclosporinei A sunt limitate la formele de colită acută severă non-responsivă la tratament corticoid sistemic parenteral, ca și alternativă la agenții biologici, cu rate de răspuns similare, dar totuși cu risc crescut de colectomie la 12 luni. De asemenea, tacrolimusul are indicații doar în boala Crohn,

ăn absența altor variante de tratament, cu durată limitată la 6 luni datorită riscului de nefrotoxicitate. [141]

Metotrexatul reprezintă o variantă viabilă la tiopurine pentru boala Crohn la pacienții care prezintă intoleranță la aceștia sau activitate scăzută a tiopurin-metiltransferazei cu risc de efecte adverse crescut. Indicațiile sunt similare tiopurinelor: corticodependență, tratamentul fistulelor perinale, comboterapia cu agenții antiTNF pentru reducerea imunogenicității. În ceea ce privește utilitatea în colta ulcerativă datele din studiul francez METEOR nu recomandă utilizarea metotrexatului din lipsa de eficacitate, deși studiul a avut câteva bias-uri ce ar putea duce la o interpretare greșită a rezultatelor. Se recomandă contracepția pe perioada tratamentului datorită riscului de teratogenitate, precum și monitorizarea testelor funcționale hepatice pentru supravegherea riscului de hepatotoxicitate care dacă apare este reversibilă la întreruperea tratamentului. [141,151–153]

1.6.5. Agenții antiTNF

Agenții antiTNF alfa reprezintă ultima treaptă de tratament în ordinea crescătoare a potenței într-o piramidă de tip step-up. Ei sunt indicați încă de la început în cazul pacienților cu factori de risc de evoluție debilitantă pentru prevenția dezvoltării complicațiilor. De asemenea, pot fi folosiți de primă intenție la pacienții cu afectare perianală. Aceste molecule prezintă rezultate superioare placebo în termeni de vindecare mucozală, răspuns clinic și menținere a remisiunii pe termen lung, fără un risc crescut de efecte secundare. [154] În caz de răspuns suboptimal inițial, sau pierdere de răspuns secundar, se poate opta pentru optimizarea acestor tratamente fie prin dublarea dozei, fie prin scurtarea intervalului între administrări.

Imunogenicitatea acestor agenți se referă la riscul de reacții adverse de tip infuzional – alergic, cu spectru de severitate variabil de la simple reacții urticariene până la șoc anafilactic. Asocierea tiopurinelor la tratamentul antiTNF s-a dovedit utilă pentru prevenția acestor reacții, dar această asociere crește riscul de limfom hepatosplenic cu celulă T în special la pacienții bărbați tineri. În ciuda acestui risc, datele din trialuri mari randomizate susțin superioritatea tratamentului combinat tiopurine cu antiTNF alfa comparativ cu fiecare dintre cele două clase de molecule separat – SONIC, UC-SUCCES. În ceea ce privește asocierea metotrexatului datele

sunt insuficiente pentru a face aprecieri, dar extrapolând de la datele despre artrita reumatoidă, poate fi util cel puțin pentru reducerea imunogenicității dacă nu și pentru superioritatea eficienței tratamentului. [141,155]

Din grupul acestor molecule, doar Infliximabul a fost studiat prospectiv pentru eficiență asupra fistulelor asociate bolii Crohn, cu efect superior placebo – ACCENT II. Din acest motiv, este indicat de primă intenție în cazul acestor complicații. Despre celelalte molecule – Adalimumab, Certolizumab Pegol, nu există decât date de subgrup obținute din trialurile de fază III, insuficiente pentru a recomanda aceste molecule pentru tratamentul fistulelor asociate bolii Crohn. [141]

Pentru bolile inflamatorii în general aceste molecule s-au dovedit utile în reducerea riscului de spitalizare și chirurgie în acest fel reducând costurile asociate bolii, cu prețul unui risc ușor crescut de malignități, dar cu un risc serios de infecții oportunistice dintre care cele mai importante sunt infecția TBC și reactivarea unei hepatite B latente, patologii frecvent întâlnite în țările în dezvoltare. [156–158]

Nu există încă date comparative despre eficiența acestor agenți, trialurile clinice având design-uri diferite, iar compararea rezultatelor acestora putând duce la erori de interpretare. În orice caz, toți agenții biologici disponibili s-au dovedit superioiri placebo pentru tratamentul acestor boli, iar lipsa de răspuns la un agent biologic poate fi contracarată cu înlocuirea cu alt agent biologic și posibilitatea obținerii unui răspuns după tratament cu acesta din urmă.

1.6.6. Alte molecule

În tratamentul acestor boli au fost întrebuițate și alte molecule cu mecanisme de acțiune diferite cum ar fi antibioticele din clasa fluorochinolonelor și Metronidazolul, în special pentru complicațiile perianale asociate bolii Crohn unde, deși nu există trialuri randomizate, s-a observat o eficiență superioară în inducerea vindecării în special în asociere cu Infliximab. [159] Referitor la colita ulcerativă, rolul antibioticelor este limitat la colitele fulminante pentru profilaxia complicațiilor secundare perforației digestive și în cazul pouchitei unde antibioticele sunt prima linie de tratament.

În practica clinică au intrat recent și alți agenți biologici ce țințesc alte molecule implicate în propagarea inflamației care sunt încă indisponibili pe piața din România cum sunt Vedolizumab – anticorp monoclonal orientat împotriva unei integrine, și Ustekinumab – anticorp monoclonal orientat împotriva fracțiunii p40 din interleukina-12(IL-12) și interleukina-23(IL-23). Multe alte molecule biologice și non-biologice se află în trialuri clinice în acest moment.

Despre probiotice nu există date consistente în literatură cu excepția VSL#3, care este o combinație de opt tulpini probiotice și care poate induce și menține remisiunea în colita ulcerativă forma ușoară cu aceeași eficacitate ca și derivații de 5-ASA. De asemenea, este util în tratamentul pouchitei cronice refractare sau dependente de antibiotice. [160]

Nu în ultimul rând, trebuie menționate tratamentele ce țințesc motilitatea la acești pacienți cum este Loperamidul, care trebuie folosit cu atenție, putând oferi o ameliorare simptomatică semnificativă și colestiramina la cei cu diaree coleretică indusă de rezecția ileală extensivă, tratamentele antialgice și antispastice, suplimentarea vitaminei B12 la cei cu deficit, suplimentarea vitaminei D la cei cu deficit și la cei cu tratament cortizonic pe perioada îndelungată, și tratamentul anemiei feriprive cu produși de fier parenteral datorită intoleranței digestive frecvente indusă de produșii de fier per os.

1.6.7. Chirurgia în bolile inflamatorii intestinale

Pentru boala Crohn este cunoscut faptul că 70-75% din pacienți vor necesita o intervenție chirurgicală în evoluția bolii fie pentru pierderea răspunsului la tratament biologic, fie pentru a corecta niște complicații deja existente și ireversibile sub tratament medical. De altfel, chirurgia ar trebui considerată o variantă de tratament la pacienții cu boala Crohn ileală localizată. Totuși, cunoscut fiind faptul că boala Crohn recidivează postoperator, chirurgia nu reprezintă niciodată o variantă curativă, iar pacienții necesită întotdeauna postoperator tratament de profilaxie a recurenței bolii la nivel anastomotic. Din punct de vedere tehnic, se recomandă abordul laparoscopic datorită morbidității postoperatorii reduse precum și a restrângerii perioadei de convalescență. Indicațiile chirurgicale în boala Crohn sunt drenajele abceselor, rezecțiile

segmentare, stricturoplastiile și ileo/colostomele de diversie temporare pentru tratamentul afectării perianale severe non-responsive la tratament. [147,161,162]

Pentru colita ulcerativă, necesarul de chirurgie este mai restrâns, în jur de 25-30% din pacienți necesitând acest tip de tratament. Indicațiile, de asemenea, sunt mai puține fiind reprezentate de boala non-responsivă la tratament și de prezența displaziei sau cancerului pe biopsiile prelevate în cursul colonoscopiilor de screening. Din punct de vedere al opțiunilor de tratament chirurgical se poate recurge la proctocolectomie totală restaurativă cu rezervor și anastomoza pouch-anală, proctocolectomie totală cu ileostomă permanentă și, mai rar, la pacienții vîrstnici sau cu comorbidități severe, rezecții segmentare pentru displazie sau cancer.

2. Markeri biologici de activitate în bolile inflamatorii intestinale

Markerii biologici de inflamație au fost studiați și în bolile inflamatorii intestinale cu scopul, pe de o parte, de a evalua activitatea bolii și severitatea puseului de activitate, iar pe de altă parte, de a prezice recăderile de boala în timpul perioadelor de remisiune clinică. Se cunoaște deja faptul că în bolile inflamatorii intestinale se discută de remisiune pe mai multe planuri: clinică, biologică, endoscopică, histologică și chiar moleculară. Cu toate acestea, absența simptomatologiei și, în speță, scoruri clinice de activitate reduse, nu se corelează întotdeauna cu aspectul endoscopic sau histologic. Pe de altă parte, endoscopia însorită de biopsii ca și metodă de evaluare a remisiunii reprezintă o investigație invazivă deseori nedorită de pacienți. În acest context, s-a încercat identificarea unor markeri biologici care să se coreleze cu statusul inflamator al pacientului, care să poate fi larg disponibili și, preferabil, cu costuri reduse.[163]

2.1. Markeri serologici

2.1.1. Reactanți de fază acută

2.1.1.1. Viteza de sedimentare a eritrocitelor

Viteza de sedimentare a eritrocitelor reprezintă o măsură indirectă a expresiei cantitative a proteinelor de fază acută, fiind influențată de morfologia eritrocitară și de constituenții plasmatici precum imunoglobulinele. Datorită fluctuațiilor cantitative ale diferitelor proteine la nivel serologic la pacienții cu boli inflamatorii intestinale, unele din aceste proteine având un timp de înjumătărire mai lung, viteza de sedimentare a proteinelor se poate menține mai mult timp la valori crescute chiar în condițiile unei evoluții clinice bune evidente și rapide, acest lucru făcând inutilă utilizarea acestui marker de inflamație pentru urmărirea evoluției sub tratament. În ceea ce privește utilitatea acestui marker în bolile inflamatorii intestinale, s-a observat o corelație cu severitatea bolii în colita ulcerativă atunci când evaluarea a fost efectuată complet cu ajutorul scorurilor clinice și endoscopice. În boala Crohn s-a observat, de asemenea, o asociere cu activitatea bolii preponderent în afectarea colonică. [163–165]

2.1.1.2. Orosomucoid

Orosomucoidul ($\alpha 1$ glicoproteina acidă) reprezintă un alt reactant de fază acută, sintetizat de asemenea la nivel hepatic ca răspuns la inflamație sau infecție, având un rol imunomodulator probabil. S-a observat o corelație între nivelurile circulante de orosomucoid și scorurile clinice de activitate folosite pentru evaluarea puseelor de boală inflamatorie intestinală, însă din cauză duratei de viață de aprox. 5 zile a acestei proteine, ea nu este utilă în supravegherea evoluției bolii sub tratament.[166,167]

2.1.1.3. Proteina C reactivă

Proteina C reactivă reprezintă un alt reactant de fază acută sintetizat de asemenea la nivel hepatic secundar stimulului induc de interleukinele(IL)-6 și 1β și de TNF- α provenite de la situsul inflamației. Sinteza hepatică de proteină C reactivă este singurul determinant al valorilor serice ale acestei proteine, valori scăzute fiind întâlnite în consecință în insuficiență hepatică. Ca răspuns la stimulul inflamator, sinteza hepatică de proteină C reactivă este inițiată rapid iar, odată cu eliminarea stimulului, se înregistrează o scădere rapidă a valorilor acestui marker datorită duratei de viață de aproximativ 19h, ceea ce face ca acesta să fie un marker util în supravegherea evoluției sindromului inflamator la interval de zile. Valorile serice ale proteinei C reactive se coreleză cu activitatea bolii atât în boala Crohn cât și în colita ulcerativă cu observația că valorile medii întâlnite în boala Crohn sunt mai mari decât cele din colita ulcerativă. Un studiu recent a demonstrat asociere semnificativă a valorilor serice ale proteinei C reactive cu activitatea clinică moderat-severă în boala Crohn pe baza scorurilor clinice, cu prezența leziunilor endoscopice la ileo-colonoscopie și cu severitatea inflamației din punct de vedere histologic, dar nu s-a observat corelație cu modificările parietale observate prin mijloace imagistice la pacienții cu afectare de intestin subțire. Aceeași corelație redusă între proteina C reactivă și activitatea bolii a fost confirmată și de Florin TH et al. Care au observat valori scăzute ale proteinei C reactive la pacienții cu boala ileală exclusivă probabil datorită faptului că acești pacienți prezintă deseori și denutriție care ar putea explica sinteza hepatică redusă a markerului. În colita ulcerativă, titrul seric crescut al proteinei C reactive se asociază cu activitate clinică severă a bolii, cu prezența leziunilor la colonoscopie dar nu și cu severitatea histologică a

inflamației. Totuși, într-un scor compozit conținând numărul de scaune în ziua 3 de la inițierea terapiei cortizonice, proteina C reactivă cu valori mai mari de 45mg/dl are rol predictiv pentru colectomie în colita acută severă. [163,165,168–170]

De asemenea, prin comparații cu alți markeri de activitate, s-a observat o bună corelație a proteinei C reactive cu scorul de activitate clinică a bolii Crohn (Crohn Disease Activity Index – CDAI) și cu markerii fecali de inflamație cum ar fi calprotectina fecală și excreția fecală a granulocitelor marcate radioactiv. [171,172]

În ceea ce privește riscul de recădere și capacitatea de predicție a proteinei C reactive, datele provin din trialurile clinice ale moleculelor biologice care au urmărit acest parametru în evoluție, dar și din studiile thiopurinelor în bolile inflamatorii intestinale. Astfel, în două studii care au urmărit riscul de recădere după întreruperea thiopurinelor, proteina C reactivă cu valori crescute a fost identificată ca factor de risc independent pentru recădere clinică, lucru confirmat și de trialul STORI în care pacienți tratați cu terapie combinată cu agent biologic și thiopurină au întrerupt agentul biologic și au continuat thiopurina.[173–175]

2.1.2. ANCA și ASCA

Anticorpii anticitoplasma neutrofilică (ANCA) au fost pentru prima dată asociati cu colita ulcerativă în 1990. Fracțiunea perinucleară a acestor anticorpi a fost întâlnită la 64% dintr-o cohortă de pacienți cu boala inflamatorie intestinală neclasificată la debut care ulterior au fost urmăriți prospectiv și care au dezvoltat în evoluție colită ulcerativă. Similar, Dotan și colaboratorii au analizat 152 pacienți cu colită ulcerativă, 54 cu boala Crohn și 60 cu boala inflamatorie neclasificată, raportând o specificitate pentru diagnosticul de colită ulcerativă de 96.3% și o sensibilitate de 43.3% față de grupul control. [176–178]

Anticorpii antiSacharomyces cerevisiae (ASCA) reprezintă alături de ANCA cei mai mulți și totodată cei mai bine caracterizați markeri serologici de diagnostic, ASCA fiind asociat bolii Crohn, iar ANCA, colitei ulcerative.[176,179,180]

2.1.3. Alți markeri

Atât leucocitoza cât și trombocitoza ca markeri de activitate în bolile inflamatorii intestinale s-au dovedit inutili datorita multiplelor interferențe din practica zilnică ce pot modifica valorile acestor parametrii fără legătură cu boala inflamatorie. De exemplu, leucocitoza poate fi secundară tratamentului corticoid sistemic precum și unui abces, pe când trombocitoza poate fi secundară unei anemii prin deficit de fier ca și epifenomen[31,32].

2.1.4. Citokinele proinflamatorii

2.1.4.1. TNF α și receptorul solubil al TNF α

Factorul de necroză tumorală alfa este o citokină proinflamatorie produsă de macrofagele și monocitele activate în contextul procesului inflamator. Deși s-au observat niveluri serice crescute ale acestei proteine la pacienții cu boli inflamatorii intestinale, totuși această observație a fost inconstantă, motiv pentru care TNF α este folosit ca marker de activitate a bolii în practica clinică curentă. Același lucru se poate spune și despre nivelurile de TNF α din materiile fecale sau despre nivelurile serice ale receptorului solubil al TNF α . Datele existente în literatură despre utilitatea TNF α ca marker de activitate în bolile inflamatorii intestinale nu recomandă această proteină ca țintă de interes pentru cercetări ulterioare. [181–186]

2.1.4.2. Interleukinele, receptorii interleukinelor și antagoniștii receptorilor de interleukine

Interleukina-1(IL-1) este cunoscută pentru rolul proinflamator efectiv din cascada inflamației alături de antagonistul receptorului său (IL-1RA), raportul dintre cele două molecule IL-1RA/IL-1 fiind corelat invers proporțional cu activitatea bolii inflamatorii intestinale. [187,188]

Receptorul interleukinei-2(IL-2R) se găsește la nivelul celulelor T activate circulante împreună cu IL-2 iar, datorită stabilității superioare față de cea a ligandului său, poate fi mai ușor cuantificată la nivel seric, fiind totodată și un marker mai fiabil al severității procesului

inflamator. IL-2R este format din trei subunități care se comportă diferit în raport cu inflamația din boala Crohn și colita ulcerativă, doar nivelul seric al receptorului alfa fiind corelat cu severitatea activității inflamatorii. [189,190]

Interleukina-6(IL-6) este o moleculă cu efect potențial dual fiind capabilă de a exercită atât efecte proinflamatorii cât și efecte antiinflamatorii. Titrul seric al acestei interleukine a fost demonstrat să se asocia cu inflamația din boala Crohn dar nu și cu cea din colita ulcerativă.[83]

Interleukina-10(IL-10) se referă, de fapt, la o familie de interleukine (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26) care au fost pentru prima dată identificate în 2001, fiind implicate în menținerea integrității homeostaziei barierei mucozale prin promovarea răspunsului imun înnăscut la nivel epitelial cu scopul de a limita injuria cauzată de agenți infectioși de tip bacterian sau viral. Totodată, aceeași familie de citokine intervine și în procesul de vindecare prin reparare tisulară ce urmează injuriei inflamatorii. Rolul major antiinflamator al familiei IL-10 a fost demonstrat în studiile murine cu animale knock-out pentru IL-10 care dezvoltă colită spontan datorită absenței căii de semnalizare dependentă de IL-10.[191–193]

Interleukina-19(IL-19) este un membru al familiei IL-10, fiind exprimată de keratinocite, celule epiteliale, monocite și limfocite B, și este indusă de lipopolizirid (LPS), IL-6 și TNF α . Azuma și colaboratorii au demonstrat că IL-19 intervine cu rol regulator atât în inflamațiile acute cât și în cele cronice și induce vindecarea mucoasei pe un model murin de colită. [194]

Interleukina-22(IL-22) este un alt membru al familiei IL-10, fiind o proteină derivată din limfocitele T. Sugimoto et al. au observat că inducerea expresiei genei IL-22 a dus la ameliorarea procesului inflamator la modele murine de colită indusă prin administrarea de dextran – sulfat de sodiu. Datele din literatură sugerează un rol al genei IL-22 în patogenia colitei ulcerative, mecanismul postulat fiind acela al alterării mecanismelor de barieră mucozală prin reducerea sintezei de mucus [195,196]

2.2. Markeri fecali

Biomarkerii fecali – calprotectina fecală și lactoferina, au apărut ca răspuns la necesitatea identificării de markeri pentru activitatea inflamatorie intestinală superioră în termeni de

sensibilitate și specificitate celor serologici evitând totuși invazivitatea investigațiilor endoscopice. Acești biomarkeri s-au dezvoltat inițial ca unealtă de diagnostic diferențial între bolile inflamatorii intestinale și sindromul de intestin iritabil pentru a diferenția pacienții care ar putea beneficia din punct de vedere diagnostic de pe urma colonoscopiei, utilitatea lor fiind ulterior extinsă pe baza observațiilor care au arătat valori diferite ale biomarkerilor fecali în funcție de caracteristicile fenotipice ale bolii (localizare, pattern evolutiv), de statusul de activitate endoscopică, putând astfel servi la evaluarea non-invazivă a răspunsului la tratament și, conform datelor mai recente, putând prezice recăderile clinice oferind astfel timp pentru intervenție terapeutică precoce. Totuși, acești markeri au și niște limitări, valoarea acestora fiind influențată de consumul de antiinflamatoare non-steroidiene, infecții gastrointestinale, alergii alimentare, consumul de inhibitori de pompă de protoni. [197,198]

Calprotectina fecală este o proteină fixatoare de calciu și zinc localizată în citosolul neutrofilelor și macrofagelor de la nivelul epitelului intestinal, ce se elimină la nivelul lumenului odată cu procesul de apoptoză a acestora. Nivelele acestei proteine pot fi evaluate cu două tipuri de teste – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay și dispozitive de detecție rapidă, într-un mod simplu și neinvaziv. [197]

Lactoferrina fecală este o glicoproteină fixatoare de fier secretată de celulele epiteliale glandulare fiind regăsită la nivelul straturilor de mucus de pe diferite mucoase. Are rol antimicrobian prin sechestrarea fierului, limitând disponibilitatea acestui element necesar metabolismului energetic bacterian. Este, totodată, o componentă majoră a neutrofilelor fiind depozitată la nivelul granulelor acestora, astfel valorile crescute detectate fiind un marker indirect al activării neutrofilelor. [198]

Testul imunochimic fecal(FIT) detectează nivelurile de hemoglobină fecală prin anticorpi direcționați împotriva hemoglobinei umane. Poate detecta pierderi occulte de sânge la nivel fecal, fenomen întâlnit frecvent în colita ulcerativă. De altfel, au fost stabilite și valori cut-off pentru rezultate negative la 100ng/ml, cu sensibilitate de aprox. 90% și specificitate de aprox. 70% pentru detecția vindecării mucozale definite ca scor Mayo endoscopic 0. Acest test pare a avea câteva avantaje asupra calprotectinei fecale, fiind mai ușor de efectuat, mai ieftin, cu o valoare prag mai stabilă, dar are și dezavantajul major de a nu se corela cu activitatea inflamatorie din boala Crohn. [199,200]

3. Remisiunea histologică în bolile inflamatorii intestinale

Evoluția moleculelor utilizate în tratamentul bolilor inflamatorii de-a lungul timpului a dus la stabilirea de noi ținte terapeutice pornind de la ameliorarea simptomatică, continuând cu normalizarea probelor inflamatorii și terminând cu vindecarea mucozală care reprezintă la momentul actual standardul atât în practica clinică cât și în trialurile clinice.[201–206]

Vindecarea mucozală a fost definită ca dispariția inflamației vizibile în timpul endoscopiei și a ulcerățiilor mucozale, fiind asociată cu perioade prelungite de remisiune clinică și cu risc scăzut de spitalizări, și colectomie în cazul colitei ulcerative. Cu toate acestea, nu există suficiente date în literatură privind utilitatea suplimentară a vindecării mucozale la nivel microscopic în ceea ce privește evoluția pe termen lung a bolilor inflamatorii intestinale, motiv pentru care s-a ridicat întrebarea dacă există vreun interes în introducerea acestui parametru pentru evaluarea diferitelor molecule de tratament. [207–214]

Vindecarea endoscopică mucozală nu reflectă întotdeauna absența inflamației la nivel microscopic, aceasta din urmă fiind dovedită a se asocia, cel puțin pentru colita ulcerativă, cu un risc crescut de recădere, spitalizări cauzate de boală, colectomie și cancer colo-rectal. Totuși, la nivel intuitiv, acest parametru de eficiență ar putea fi util, plecând de la datele publicate de Sydney Truelove în urma cu aproximativ 50 ani, care a utilizat aceasta ținta de eficiență terapeutică pentru prima dată în istoria bolilor inflamatorii când a demonstrat că efectul benefic al sulfasalazinei este datorat acidului 5-aminosalicilic și nu sulfapiridinei, diferențiind astfel cele două componente și contribuind astfel la dezvoltarea ulterioară a derivațiilor de acid 5-aminosalicilic ca și molecule de tratament în colita ulcerativă. [215,216,225,226,217–224]

3.1.Definirea vindecării histologice în bolile inflamatorii intestinale

Până în prezent nu există o definiție unanim acceptată a remisiunii histologice pentru niciuna din cele două boli inflamatorii intestinale, termenul de vindecare mucozală fiind deocamdată rezervat criteriilor endoscopice de absență a leziunilor, fără a face referire la tipul celulelor prezente în mucoasă, numărul sau proporția lor. În colita ulcerativă au fost descrise mai multe scoruri histologice de activitate și, ca și corolar, aceasta a dus la definiții variind de

la inflamație reziduală cu persistența modificărilor arhitecturale până la normalizarea mucoasei colonice din punct de vedere histologic, având totuși un numitor comun reprezentat de absența infiltratului inflamator acut cu polimorfonucleare neutrofile. [201,227–232]

Pentru boala Crohn, Global Histologic Disease Activity Score(GHAS) reprezintă singura unealtă utilă în evaluarea activității histologice a bolii, dar nu a fost validat pe loturi mari de pacienți.

De altfel, o opinie a unui panel de experți publicată în 2009 ce a discutat țintele terapeutice în trialurile clinice din bolile inflamatorii intestinale nu a notat recomandări pentru scoruri histologice ale remisiunii. [216,220,241,242,233–240]

Ultimul review pe tema rolului remisiunii histologice în bolile inflamatorii intestinale publicat de Bryant et al., plecând de la datele amintite mai sus, propune ca țintă terapeutică histologică atât în boala Crohn cât și în colita ulcerativă: inducerea dispariției neutrofilelor atât la nivelul criptelor cât și la nivelul lamei propria, dispariția plasmocitozei bazale, reducerea celularității lamei propria la normal și reducerea numărului eosinofilelor din lamina propria la normal. [214]

3.2. Valoarea prognostică a remisiunii histologice în bolile inflamatorii intestinale

Studiile princeps care au vizat pacienți cu colită ulcerativă efectuate de Wright și Truelove au propus vindecarea histologică drept un predictor superior aspectului endoscopic pentru evaluarea riscului de recăderi ale bolii, aspect confirmat în anii ce au urmat de multiple alte echipe.

Riley et al. au demonstrat că persistența inflamației la nivel histologic prezice recăderea clinică la 12 luni de urmărire superior aspectului endoscopic de vindecare mucozală – mucoasă normală sau eritem – la intrarea în studiu. Ratele de recădere au fost mai mari la pacienții care prezintau: infiltrat inflamator acut, abcese criptice, depleție de mucus și epiteliu ulcerat. Bitton și colaboratorii au identificat ca unic predictor de recădere la pacienții cu colită ulcerativă în remisiune clinico-endoscopică prezența plasmocitozei bazale, indiferent de terapia de menținere a remisiunii utilizată. Azad et al. au descris asocierea dintre numărul crescut de neutrofile și

eozinofile în lamina propria și riscul crescut de recădere la pacienți cu colita ulcerativă în remisiune endoscopică în timp ce Bessissow et al. au observat corelația dintre scorul Geboes>3.1 (prezența abcesului criptic plus număr crescut de neutrofile și eozinofile în lamina propria) și riscul crescut de recădere clinică pe baza scorului clinic Mayo care a suferit modificări de la 0 la mai mult de 3, confirmând totodată separat de acest scor și utilitatea prezenței plasmocitozei bazale (care nu face parte din scor) ca factor predictiv de recădere. Mai mult, prezența inflamației la nivel histologic (valori mai mari ale scorurilor de activitate histologică) reprezintă un predictor pentru necesitatea colectomiei la acești pacienți, iar remisiunea histologică se corelează cu scăderea riscului de cancer colo-rectal în această populație. [216,218,220–224,241]

În ceea ce privește boala Crohn, a fost un singur studiu care a analizat utilitatea scorului de activitate histologică la acești pacienți care nu a demonstrat asocieri semnificativ statistice cu riscul de recădere, riscul de formare de stricturi asociate bolii sau riscul de necesar chirurgical. Totuși, aceste date necesită interpretare atentă deoarece există bias-ul legat de faptul că inflamația în boala Crohn este neuniformă și distribuită. [243]

3.3.Discuții și direcții de cercetare

Conceptul de vindecare histologică a apărut ca urmare a observațiilor că persistența inflamației la nivel microscopic predispune la recăderi mai frecvente, distrucție progresivă a peretelui intestinal și dizabilitate accentuată prin creșterea riscului de spitalizare, colectomie și cancer colo-rectal. Se teorețizează deocamdată că tratamentul eficient și la nivel cât mai profund al inflamației ar putea preveni dezvoltarea complicațiilor legate de boală și oferi perioade mai prelungite de remisiune pacienților prin analogie cu alte boli cu mecanism imun cum ar fi poliartrita reumatoidă.[244,245]

Vindecarea histologică nu reprezintă încă o țintă terapeutică nici în trialurile clinice și nici în practica clinică. De altfel, nici vindecarea endoscopică nu este unanim utilizată ca deziderat final al tratamentului în bolile inflamatorii intestinale. Totuși cele două noțiuni sunt diferite din punct de vedere al profunzimii, datele sugerând faptul că remiterea inflamației microscopice ar putea fi de valoare suplimentară în ceea ce privește evoluția acestor boli pe

termen lung și limitarea complicațiilor legate de boala. De aceea este nevoie de standardizarea scorurilor de evaluare histologică în bolile inflamatorii intestinale făcând aceste scoruri ușor reproductibile și, ulterior, validarea acestora în studii perspective.[214]

Chiar dacă remisiunea histologică poate părea, la început, un deziderat greu de atins, necesitatea modificării tratamentelor cu scopul de atinge aceasta țintă necesită menținerea totuși a unor reguli de bun simț medical și evitarea măsurilor extreme. De exemplu, a iniția tratament biologic la un pacient în remisiune clinico-endoscopică doar pentru a obține dispariția unui abces criptic reprezintă o atitudine extremistă și momentan nesușinută de suficiente date științifice. Mai degrabă, aspectul histologic ar putea asista decizia clinică de reducere a dozelor de tratament sau de dezescaladare între diferitele molecule. De asemenea, prezența inflamației reziduale la un pacient aflat în remisiune clinico-endoscopică sub un anumit tratament (moleculă și doză) ar putea oferi indicii asupra riscului de recădere crescut în caz dedezescaladare moleculă/scădere doză.

Vindecarea histologică rămâne deocamdată departe de gândirea tradițională a gastroenterologilor implicați în dezvoltarea moleculelor utilizate în tratamentul acestor boli, lucru evidențiat de altfel și în design-ul trial-urilor clinice. Totuși, autoritățile regulatoare în materie de medicamente, cum ar fi FDA (Food and Drug Administration), ar putea reprezenta catalizatorul necesar pentru această schimbare de paradigmă prin criteriile impuse în procesul de evaluare a diferitelor molecule. [214]

4. Polimorfismele genei TNF- α

Tumor necrosis factor (TNF) a fost inițial descris ca fiind implicat în inducerea morții celulare programate. Actualmente, se cunoaște faptul că această moleculă are multiple implicații fiziopatologice la nivelul reglării mai multor procese celulare cum ar fi proliferarea, diferențierea, maturarea celulară, dar și în răspunsul imun. [246]

Am demonstrat mai sus, pe baza a multiple studii din literatură, că patogeneza bolilor inflamatorii rămâne încă neclară, fiind probabil multifactorială bazată pe relația dintre factorii de mediu și gazda susceptibilă din punct de vedere genetic. Descoperirea recentă a polimorfismelor genei TNF α a oferit noi idei pentru înțelegerea predispoziției genetice pentru a dezvolta astfel de boli.

Gena TNF este localizată pe cromozomul 6p21.3 cuprins în zona ce codifică complexul major de histocompatibilitate (MHC)(figura). Se regăsește în așa numita regiune a clasei I, între genele ce codează moleculele antigenice de suprafață ale celulelor ce aparțin clasei II și de antogenele leucocitare umane (HLA – DP, DQ și DR), și antogenele aparținând MHC de clasă I (HLA-A, B, C). Regiunea marginală 5' conține multiple situri cu potențial reglator care sunt implicate în răspunsul inflamator la diferiși stimuli. [247]

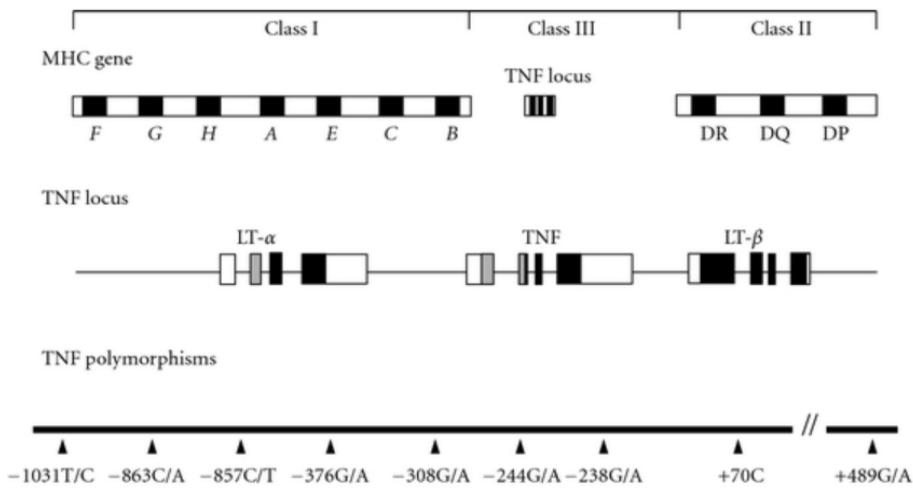


Figura 1.4. Reprezentare schematică a genei TNF în cadrul genei MHC. Este indicată și poziția celor mai importante polimorfisme mononucleotidice (SNP)

Factorii genetici pot influența nivelul expresiei serice de TNF α atât în studii in vivo cât și in vivo, diferențele de expresie putând fi atribuite diferitelor SNP-uri la nivelul genei corespondente. Au fost descrise cel puțin 12 SNP-uri pentru gena TNF, unele dintre ele fiind implicate în rata de transcripție și producție a citokinei. [248,249]

Cel mai studiat SNP este -308G/A denumit și TNF 1/2 (rs1800629 [MAF: CEU 0.22 HCB 0.03, JPT 0.02, YRI 0.06]). [250] Prezența alelei mutante -308A a fost asociată cu producția crescută de TNF α atât în mod spontan cât și ca răspuns la diferenți stimuli. [251] Este posibil ca proteina care leagă preferențial -308A să fie un activator al transcripției, dar datele existente sunt insuficiente pentru o caracterizare completă a fenomenului. [248,252] Alela mutantă -308A este puternic asociată cu haplotipurile HLA – A1 – B8 și DR3 ale MHC care, la rândul lor, sunt asociate cu multiple boli autoimune prin producție crescută de TNF α .[253] Studiile in vivo au demonstrat o transcripție crescută a TNF α la indivizii purtători ai aleii -308A comparativ cu alela -308G, totuși aceste observații au fost inconstante între studii, probabil diferitelor tipuri celulare și stimuli utilizate în aceste studii. [254–256]

Un alt SNP cu posibilă funcție de promovare transcripțională este -238G/A (rs361525 [MAF: CEU 0.07 HCB 0.04, JPT 0.00, YRI 0.01]) localizat la nivelul situsului de expresie a TNF α , dar și acesta a demonstrat funcții contradictorii. Unele lucrări științifice au demonstrat asocierea dintre prezența aleii mutante -238A și producția crescută de TNF α comparativ cu alela -238G dar, de asemenea, și aceste rezultate au fost inconstante în literatură. [252]

Un SNP mult mai rar întâlnit este -376G/A (rs1800750 [MAF: CEU 0.01 HCB 0.00, JPT 0.00, YRI 0.01]) care reprezintă un situs de legare pentru factorul transcripțional OCT-1, proces de legare ce nu se realizează în prezența aleii G. Pe de altă parte, prezența aleii mutante -376A a fost asociată cu producția crescută de TNF α cu 35% mai mult decât în cazul aleii G pe o linie celulară de monocite. [257,258]

Studiile ce au analizat SNP-urile -863C/A (rs1800630 [MAF: CEU 0.16 HCB 0.18, JPT 0.14, YRI 0.12]) și -857C/T (rs1199724 [MAF: CEU 0.05 HCB 0.18, JPT 0.11, YRI 0.03]) au demonstrat că prezența alelor mutante A și T conferă o activitate promotorie și producție secundară crescute de TNF α . [250,259]

Multe alte SNP-uri în zona promotorie a genei TNF au fost analizate în literatură: +489, +386, -1301, -419, -376, -244, dar acestea sunt rar întâlnite mai ales în populația caucasană, datele fiind extrem de succinte în literatură cu privire la rolul acestora. [250,253,259]

4.1. Reglarea biologică a producerii și funcției TNF- α

Funcțiile biologice ale proteinei TNF- α sunt multiple și complexe, pe de o parte contribuind la rezistența la tratament a bolii, iar pe de altă parte cauzând complicații în evoluție. Rolul contradictoriu pe care îl joacă TNF- α în evoluția bolilor inflamatorii poate fi legat de polimorfismele existente la nivelul genei ce codifică sinteza citokinei. Este clar efectul benefic al acesteia în scenariul inflamațiilor acute, când prin activarea moleculelor de adeziune recrutează celule imune din circulație către locul incriminat în acest fel contribuind la apărarea imună la nivelul locului injuriei infecțioase. Totuși, expunerea cronică la această moleculă poate fi dăunătoare, ea fiind implicată în șocul septic cauzat de endotoxemia cauzată de diferite bacterii. [260]

Molecula de TNF- α însăși poate avea proprietăți reglatorii asupra sa, putând supresa sinteza prin legarea de receptorii de suprafață TNFR1 și TNFR2, lucru confirmat în studii murine cu modele manipulate genetic, deficiente în TNFR1 și TNFR2 producând substanțial mai puțină citokină circulantă. Proteina este sintetizată inițial ca o moleculă atașată membranei de 26kD din care se eliberează sub acțiunea unei enzime de clivaj intitulată TACE – TNF- α converting enzyme, moleculă circulantă activă de 17kD. Interesant este faptul că această enzimă de clivaj acționează și asupra TNFR2 în același fel, putând crește cantitatea acestuia circulantă, în acest fel adăugând un nou mecanism reglator la cel descris anterior prin faptul că nivelul e receptor circulant influențează efectul moleculei. [260]

Date experimentale sugerează importanța căilor lipooxygenazei și fosfolipazei A2 în procesul de activarea leucocitară și stimularea sintezei de TNF- α . Mecanismul reglator de supresie a expresiei pare a fi mai bine înțeles, observându-se o implicare a AMPc în acest proces, la rândul lui acesta fiind stimulat de prostaglandina E2. Proteinele de șoc termin par a fi și ele implicate în reglarea efectului TNF- α prin sechestrarea moleculei, aspect observat în studii pe macrofage alveolare stimulate cu lipopolizaharid(LPS) bacterian.[260]

4.2. Polimorfismele genei TNF- α și sinteza citokinei TNF- α

Mai multe SNP-uri au fost studiate la nivelul zonei promotoare pentru sinteza TNF-α ele fiind poziționate, raportat la situsul inițierii transcriptiei, -1031 (T→C), -863 (C→A), -857 (C→A), -851 (C→T), -419 (G→C), -376 (G→A), -308 (G→A), -238 (G→A), -162 (G→A), și -49 (G→A), multe dintre ele fiind însă rar întâlnite în populația caucasană. Dintre toate, de departe cel mai studiat SNP este cel de la poziția -308, mutația la nivelul unei singure baze azotate la această poziție (inlocuirea guaninei cu adenozina) putând contribui la apariția unei alele care în stare homozigotă a fost demonstrată a se asocia cu sinteză crescută de citokină atât in vitro cât și in vivo. [260]

4.3. Polimorfisme genetice și susceptibilitatea de boală inflamatorie digestivă

Inflamația sistemică face parte din patogenia multor boli cu mecanism imun, dar dată fiind tema cercetării prezente, ne vom limita la discutarea implicațiilor acestor polimorfisme doar în patologia imun-mediată la nivel digestiv.

Există date deja în literatură legate de implicațiile alelei minore -308A în susceptibilitatea crescută de a dezvolta colangită sclerozantă primitivă și colangită biliară primitivă. De asemenea, pentru patologia tubului digestiv, s-au descris relații cu boala celiacă și boala Crohn, ultima având totuși putere statistică redusă. Prin contrast, se pare că prezența alelei minore reprezintă un factor de protecție în ceea ce privește dezvoltarea colitei ulcerative.[260]

5. Expresia genică la nivel mucozal

Așa cum s-a discutat mai sus, colita ulcerativă și boala Crohn reprezintă două boli inflamatorii intestinale cronice similare dar totuși diferite. Datorită complexității patogenice a celor două boli, studiile genetice și moleculare s-au concentrat pe analiza genelor diferitelor citokine implicate în procesul inflamator. Totuși, această abordare restrânsă a eșuat în a oferi explicațiile așteptate legate de implicarea diferitelor gene în patogenia bolii. În acest context, un studiu elegant al lui Lawrence et al. a analizat expresia genică globală la nivelul mucoasei colonice la pacienții cu boli inflamatorii intestinale comparativ cu subiecți sănătoși utilizând microprobe de acid dezoxiribonucleic(ADN), observând diferențe notabile care pot separa cele două boli ca entități moleculare diferite. Rezultatele acestui studiu au scos în evidență faptul că cele două boli prezintă multe trăsături comune dar au și câteva profile moleculare diferite. O altă observație a fost că există un număr egal de gene supraexprimate și, respectiv, supresate în cele două boli, sugerând că această expresie genică nu definește direct cele două boli, lucru confirmat și de faptul că nu a existat o anumită genă care să diferențieze prin expresia proprie cele două entități. Astfel, autorii au grupat genele diferențiat exprimate în clustere care au scos în evidență mai multe diferențe între cele două boli. [261]

În primul cluster, s-a observat o supraexpresie a genei HLA-II și a genelor imunoglobulinelor asociată cu colita ulcerativă. [261]

O altă diferență reprezentativă pentru colita ulcerativă comparativ cu boala Crohn a fost observată în clusterele II și III, punându-se în evidență o supraexpresie a genelor diferitelor citokine, chemokine și mediatori ai inflamației care reflectă, de fapt, un proces inflamator acut asociat colitei ulcerative prin intermediul genelor lipocalinelor (LCN2, HNL), sintetazei de oxid nitric, superoxid dismutazei, fosfolipazei A2, proteinei amiloidului seric A (SAA) și lizozimului (LYZ). [261]

În clusterul IV, rezervat genelor implicate în oncogeneză, oarecum așteptat, cunoscut fiind riscul de transformare malignă în colita ulcerativă, s-au observat diferențe notabile între cele două boli prin supraexpresia mai multor oncogene în colita ulcerativă comparativ cu boala Crohn, cum ar fi: DD96 cunoscută a fi asociată cu cancerul pulmonar, cancerul de sân și cancerul

colorectal, MXI1 un supresor ale genei myc, DRA a cărei absență este asociată cu proliferarea neoplazică a epitelului criptelor glandulare. [262–264]

Alte diferențe notabile au fost observate la nivelul genelor ce codifică expresia matrix-metaloproteinazelor (MMP -1, -3, -9 și -12), factorul von Willebrand (vWF), fibronectina și colagenul. [261]

Pentru boala Crohn, o diferență notabilă a fost reprezentată de expresia mult crescută a genelor ce codifică defensinele (DEFA5 și DEFA6), peptide ce sunt implicate în răspunsul antimicrobian la nivel intestinal. [261]

În final, autorii studiului concluzionează că este imposibilă interpretarea unor date de o asemenea amploare, dar fără discuție că acestea servesc la diferențierea câtorva mecanisme fiziopatologice între cele două entități. Astfel, supraexpresia genelor HLA II sugerează mai degrabă o activare excesivă a sistemului imun intestinal decât un deficit în colita ulcerativă. În continuare, profilul expresiei genice în colita ulcerativă sugerează o proliferare celulară excesivă cu predispoziție spre transformare malignă. Pe de altă parte, expresia unor gene implicate în metabolismul celular proteic, lipidic și glucidic, precum și a câtorva gene implicate în transportul ionic transmembranar, sugerează o alterare importantă a homeostaziei celulare și un consum energetic major la nivelul mucoasei intestinale în colita ulcerativă. Această afectare extensivă a metabolismului celular la nivel intestinal susține ipoteze mai vechi legate de implicarea deficitului energetic al mucoasei colonice în patogeneza colitei ulcerative. [265,266]

Boala Crohn prezintă în mod notabil o supraexpresie a genelor defensinelor care, prin implicarea lor în apărarea mucozală împotriva diferiților patogeni luminali, asigură păstrarea integrității barierei mucozale. Aceste rezultate vin ca suport suplimentar pentru teoria conform căreia microflora intestinală joacă un rol pivotal în patogenia bolii Crohn. De altfel, defensinele au și rol chemotactic contribuind la recrutarea limfocitelor T la nivelul mucoasei în boala Crohn. [265,267]

Nu în ultimul rând, acest studiu oferă informații valoroase despre diferențele între mecanismele injuriei tisulare existente în cele două boli inflamatorii intestinale. Astfel, o posibilă explicație a faptului că în colita ulcerativă nu apar complicațiile fibrostenotice observate în boala Crohn, deși există o expresie crescută a genelor ce codează proteinele matrixului

extracelular, ar putea fi legată de faptul că asociat acestora există și un turnover celular important ce nu permite depunerea de colagen la nivelul peretelui, spre deosebire de boala Crohn unde procesul de remodelare este mai accentuat pe fondul unei regenerări celulare cu ritm mai scăzut.

Până în prezent, există un singur studiu efectuat în România de Gologan et al. care a analizat prin metoda RT-MLPA (reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification) care a analizat expresia unui set de 40 de gene ce codifică citokine, chemokine, receptori, molecule implicate în semnalizarea celulară și factori de transcripție în bolile inflamatorii intestinale. Rezultatele au pus în evidență o supraexpresie a IL-12p35 și IL-4 în boala Crohn comparativ cu colita ulcerativă, precum și o supraexpresie a SCYA-3, SCYA-4, IL-8 și GSTP1 în colita ulcerativă comparativ cu boala Crohn. [268]

Recent, un studiu efectuat de Velikova et al. a evaluat efectul diferitelor clase de molecule utilizate în tratamentul bolilor inflamatorii intestinale asupra expresiei genice la nivel mucozal observând profiluri diferite de expresie în funcție de molecula de tratament utilizată. Din păcate, în lotul studiat nu a fost niciun pacient cu tratament biologic, ci doar pacienți în tratament cu derivați de acid 5-aminosalicilic (5-ASA) sau imunosupresoare. Concluzia a fost că moleculele imunosupresoare sunt mai eficiente decât 5-ASA în supresia expresiei genelor implicate în procesul inflamator. [269]

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

6. Ipoteza de lucru și obiectivele generale ale lucrării

Prezentul studiu a urmărit, pe de-o parte, evaluarea unui parametru simplu, larg disponibil, prezent pe buletinul de rezultat al unei hemoleucograme – RDW, ca marker de activitate non-invaziv în bolile inflamatorii intestinale, iar pe de altă parte pe niște analize de genetică și biologie moleculară cu scopul de a identifica corelații cu susceptibilitatea crescută de a dezvolta IBD, cu evoluția și prognosticul acestor boli, cu răspunsul la tratament și cu riscul de recădere. Niciunul din aceste cercetări nu a mai fost publicat anterior în literatură pe populația de pacienți cu IBD din România.

Prima ipoteză de lucru a fost că valoarea RDW crescut poate reprezenta un marker de activitate în boala Crohn, plecând de la premiza că fenomenul inflamator cronic interferă cu homeostasia fierului în organism, contribuind la apariția unei false feriprivii ce determină dezvoltarea anizocitozei. Obiectivul acestei cercetări a fost de a analiza corelațiile RDW cu diferențele stadii de activitate a bolii Crohn și diferențele existente la nivelul valorilor acestui parametru între sindromul de intestin iritabil și boala Crohn.

A doua ipoteză de lucru a fost reprezentată de posibila asociere între prezența alelor minore ale SNP-urilor -308G/A și -238G/A și riscul de dezvoltare a bolilor inflamatorii intestinale precum și asocierea cu alte caracteristici fenotipice ale acestor boli sau cu răspunsul la tratament. Obiectivul a fost de a identifica dacă aceste SNP-uri pot prezice riscul de dezvoltare a bolilor inflamatorii intestinale.

A treia ipoteză de lucru a fost reprezentată de ideea că analiza expresiei genice la nivel mucozal poate identifica gene implicate în procesul inflamator local la pacienții cu boală activă ce pot deveni ținte terapeutice în viitor, ce pot servi drept substrat pentru dezvoltarea de probe biologice de tip fecal pentru evaluarea activității inflamatorii, ce pot identifica pacienții cu risc de recădere scăzut și care ar putea să mențină un răspuns susținut și după intreruperea, chiar și temporară, a tratamentului biologic, cu implicații economice importante pentru societate.

Analiza statistică a datelor obținute a condus la concluzii interesante, unele publicate pentru prima dată în literatură, cu creșterea vizibilității literare a colectivului de cercetare. Astfel, RDW s-a dovedit util pentru diferențierea între boala Crohn și boli cu manifestări funcționale sugestive pentru aceasta, care alături de ceilalți markeri noninvazivi existenți poate contribui la

selecționarea pacienților care efectuează colonoscopie, cu reducerea numărului de colonoscopii inutile. În ceea ce privește analiza genetică, polimorfismele genei TNF- α se corelează atât cu susceptibilitatea de a dezvolta boala Crohn, cât și cu riscul de a dezvolta manifestări extraintestinale asociate IBD în populația pacienților din România. Prin analiza expresiei genice la nivel mucozal am observat un fond de expresie diferit între subiecții sănătoși și țesutul aparent normal al pacienților cu IBD fapt ce ar putea sugera că la acești pacienți fenomenele inflamatorii la nivel molecular se declanșează mult înaintea obiectivării leziunilor endoscopice. Mai mult, profilul de expresie diferă semnificativ între pacienții cu boală Crohn operați și neoperați sugerând existența unor alte căi de activare a inflamației după intervenții chirurgicale.

Rezultate din aceste cercetări doctorale au fost prezentate sub formă de comunicări orale și postere la congrese naționale și internaționale, și publicate în reviste indexate în baze de date internaționale.

Nu în ultimul rând, la realizarea acestui proiect au contribuit mai multe instituții, această lucrarea oferind posibilitatea unei colaborări instituționale între Departamentul de Gastroenterologie al Spitalului ELIAS unde îmi desfășor activitatea și Centrul de Diagnostic din cadrul Institutului de Morfopatologie „Victor Babeș”, Catedra de Fiziopatologie și Imunologie din cadrul Universității de Medicină și Farmacie „Carol Davila” și Institutul Național de Tranfuzii Sanguine „Prof. Dr. C. T. Nicolau”.

7. Red cell distribution width (RDW) – un nou marker biologic de activitate în bolile inflamatorii intestinale

7.1. Introducere

Bolile inflamatorii intestinale (IBD) sunt afecțiuni cronice inflamatorii de origine încă necunoscută, ce afectează diferite segmente ale tubului digestiv. Această familie de boli înglobează două mari entități – boala Crohn (CD) și colita ulcerativă (UC). Aceste boli se caracterizează prin perioade recurente de remisiune și exacerbări frecvente.

Boala Crohn rezultă din interacțiunea complexă între factori de mediu și substratul genetic al individului afectat, observându-se totuși o predominanță a acestor boli în țările dezvoltate.[270]

S-a observat un gradient de prevalență nord-sud în interiorul Europei, cu o creștere a incidenței în țările din estul Europei înregistrată în ultimii ani. [271]

Pentru diagnosticul de boală și evaluarea severității bolii Crohn se utilizează markeri biologici non-invazivi, proceduri endoscopice (cum ar fi ileocolonoscopia) și tehnici imagistice – imagistica prin rezonanță magnetică (IRM) și tomografia computerizată (CT), pentru ambele utilizându-se protocoale specifice pentru fiecare segment de tub digestiv urmărit. Spre exemplu, enterografia CT sau IRM are cea mai mare acuratețe diagnostică pentru detectarea bolii Crohn limitate la intestinul subțire proximal de zona de diagnostic a ileocolonoscopiei, putând totodată să diagnosticeze și eventualele complicații extramurale, pe când videocapsula endoscopică rămâne rezervată pacienților cu suspiciune clinică de boală ridicată dar cu rezultate negative la investigațiile descrise mai sus. [270]

Totuși, datorită invazivității și costurilor asociate cu investigațiile endoscopice și, respectiv, cu investigațiile imagistice, au fost validați cățiva markeri de laborator utili în determinarea inflamației și activității bolii cum ar fi: proteina C reactivă (CRP), viteza de sedimentare a hematiilor (VSH), valoarea hemoglobinei (Hb), numărul de trombocite (PLT), împreună cu biomarkeri de generație mai nouă cum sunt: calprotectina fecală, factorul de creștere vascular și endotelial (VEGF), micro-ARN, factorul XIII, feritina și saturatia

transferinei, ANCA și ASCA, interleukinele serice și receptorii solubili ai acestora, dozarea serică a moleculelor de adeziune. [6,272–277]

În final, niciunul din aceste teste nu prezintă o sensibilitate sau specificitate suficientă pentru a putea fi utilizată individual, de obicei fiind necesară cumularea mai multor astfel de markeri pentru a crește sensibilitatea și specificitatea fiecărui în ceea ce privește evaluarea activității inflamatorii în boala Crohn și colita ulcerativă. Aceste probleme au dus la necesitatea căutării de markeri ai inflamației ieftini și non-invazivi pentru monitorizarea activității acestor boli. Există deja în literatură câteva studii care au evaluat și demonstrel posibila utilitate a măsurării lățimii distribuției eritrocitare(RDW) ca și marker de diagnostic și monitorizarea a activității bolii în IBD. [5–8,278]

7.2. Materiale și metode

Selecția pacienților

Prezentul proiect de cercetare s-a efectuat pe 2 loturi de subiecți : un lot de 51 de pacienți denumit grup control, diagnosticați cu sindrom de intestin iritabil, și un lot de 148 de pacienți cu boală Crohn, denumit grup de studiu, diagnosticul fiind susținut pe criterii clinice, endoscopice, imagistice și histologice. [24]

Actualul studiu a reprezentat o analiză de tip observațional analitic retrospectiv/descriptiv și a înrolat pacienți diagnosticați cu boală Crohn în Clinica de Gastroenterologie a Institutului Clinic Fundeni din București între anii 2008-2013, urmărind parametric clinici, biologici și endoscopici cu utilitate cunoscută în evaluarea activității bolii.

Subiecții din grupul control au fost evaluați clinic și biologic, adresându-se consultului pentru simptomatologie nespecifică sugerând o patologie funcțională. Acești pacienți nu prezintau anomalii biologice – fără inflamație sistemică, fără anemie, fără deficit de fier, și doar o parte din ei au beneficiat de examinare endoscopică – colonoscopie, ce nu a pus în evidență modificări macroscopice. Toți acești pacienți au fost diagnosticați cu sindrom de intestin iritabil. [24]

În ceea ce privește grupul de studiu, s-au utilizat mai mulți parametrii pentru evaluarea bolii Crohn. Scorul CDAI a fost întrebuințat la evaluarea activității bolii pe criterii clinice clasificând pacienții în 4 categorii: boală în remisiune, cu un scor CDAI<150, puseu ușor de activitate cu scor CDAI între 150 și 250, puseu moderat de activitate cu scor CDAI între 250-450, și puseu sever de activitate cu scor CDAI>450. Mai departe, boala Crohn a fost clasificată fenotipic în funcție de patternul evolutiv în formă inflamatorie, stenozantă și fistulizantă, și de extensia lezională în boală cu afectare ileală, colonică și ileo-colonica. S-a notat și prezența sau absența manifestărilor perianale și, respectiv, a celor extraintestinale, ca marker de încărcătură inflamatorie sistemică crescută. [24]

Toți pacienții înrolați în studiu au semnat consimțământul de participare.

Criteriile de includere în studiu:

- Prezența tuturor datelor necesare unui diagnostic cert de boală Crohn – obligatoriu examen histologic cu trăsături sugestive de boală inflamatorie intestinală, și colonoscopie cu leziuni sugestive, date integrate în context clinic suportiv pentru diagnostic.
- Disponibilitatea în foaia de observație a pacienților a tuturor parametrilor evaluați.

Evaluarea activității pe criterii clinice s-a efectuat folosind scorul CDAI(Crohn Disease Activity Index, tabel II), fiind clasificată în 4 stadii: remisiune(scor CDAI<150), puseu ușor de activitate(scor CDAI=150-250), puseu moderat de activitate(scor CDAI=250-450) și puseu sever de activitate(scor CDAI>450).

Definirea extensiei și patternului evolutiv al bolii s-a efectuat utilizând clasificarea Montreal unde L1=localizare ileală, L2=localizare colonică, iar L3= localizare ileo-colonica, iar B1=pattern inflamator, B2=pattern stenozant și B3=pattern fistulizant[279]

Prelucrarea statistică a datelor

Pentru analiza statistică a datelor s-a utilizat programul SPSS 20.0 pentru Windows.

Pentru cele două loturi studiate am considerat că înregistrările sunt independente dat fiind faptul că parametrii de evaluare provin de la pacienți diferiți, iar lotul inițial îndeplinește condițiile de randomizare impuse de metodele statistice utilizate.[24]

Pentru testarea semnificației statistice, se evaluează diferențele între ceea ce ne așteptăm, pe baza ipotezei noastre, și ceea ce observăm, dar numai în raport cu un criteriu, probabilitatea(p) ca aceste diferențe ar putea să fie întâmplătoare. Factorii întâmplători, sau aleși aleatoriu, sunt cei asociați cu modul în care au fost alese observațiile utilizate la testarea ipotezei.[24]

Pentru a testa semnificația statistică, avem două ipoteze: ipoteza nulă este adevărată și numai factori întâmplători pot da rezultate diferite de ipoteza emisă. Apoi obținem o distribuție a rezultatelor posibile, frecvența lor relativă de apariție și probabilitatea(probabilitatea) ca orice altă observație aparte să aibă loc. Valoarea p reprezintă rezultatul principal al unui test de semnificație statistică și ne permite să evaluăm importanța dovezilor împotriva ipotezei nule. Valoarea p , care are valori cuprinse între 0.00 și 1, face rezumatul dovezilor în datele despre ipoteza nulă. O valoare p mare, cum ar fi 0.54 sau 0.75, sugerează că datele observate nu ar fi neobișnuite dacă ipoteza nulă ar fi adevărată. O valoare p mică, precum 0.001, sugerează că aceste date ar fi neobișnuite dacă ipoteza nulă ar fi adevărată. Această furnizează dovezi puternice împotriva ipotezei nule. În astfel de cazuri, rezultatele pot fi declarate „semnificative la nivelul de 0.001, sugerând că un rezultat de acest fel se poate obține numai odată din 1000 de cazuri.[24]

Pragul semnificației statistice p reprezintă riscul sau probabilitatea de a respinge ipoteza nulă atunci când aceasta este adevărată. În domeniul medicină, pragul semnificației are valoarea $p = 0,05$. Astfel, atunci când afirmăm că respingem ipoteza nulă ca fiind falsă, la pragul de $p \leq 0,05$ ne asumăm greșală în mai puțin de 5% din cazuri.[24]

Pentru analiză am utilizat ca variabile parametrii biologici măsurabili (CRP, VSH, fibrinogen, hemoglobina, RDW-SD), iar în rest, datorită necesității surprinderii unor fenomene sau caracteristici calitative s-au introdus valori categoriale binare. La variabilele cu mai mult de două valori(stadiul bolii, formele de boală, etc), s-a luat în vedere și transformarea lor în variabile primare.[24]

Pentru parametrii sau variabilele utilizate în lucrarea de față au fost prezentate valorile extreme, media și deviația standard, coeficientul de variație, eroarea standard. De asemenea, am utilizat și teste nonparametrice precum testul T Student și testul Mann-Whitney U pentru a verifica existența posibilelor diferențe între două grupuri independente

în ceea ce privește mediile unor parametrii cu și fără distribuție normală. Analiza varianței valorilor între cele două grupuri a fost realizată prin intermediul testului Kruskal-Wallis.[24]

Pentru a compara mediile am utilizat **testul T al lui Student**. Acesta este un test parametric, utilizat în cazul datelor măsurabile rezultate din eșantioane mici și se aplică pentru compararea celor două eșantioane atunci când se cunosc media și abaterea standard.[24]

În cazul în care valoarea t calculată este mai mare sau egală cu valoarea t din tabelele teoretice, ipoteza nulă este respinsă ca fiind falsă și se admite ipoteza alternativă, prin aceasta afirmând faptul că mediile pe care le comparăm diferă statistic semnificativ la nivelul $p \leq 0,05$. Când valoarea t calculată este mai mică decât cea rezultată din tabele, atunci se respinge ipoteza alternativă ca fiind falsă și se admite ipoteza nulă conform căreia între mediile evaluate nu există diferențe semnificative.[24]

Testul Chi pătrat este un test neparametric și este util mai ales în cazul datelor nenumerice(nemăsurabile), ordonale și nominale, a căror distribuție nu poate fi determinată, cum e cazul datelor măsurabile cu distribuție necunoscută. Acest test este utilizat pentru a evalua asociația dintre două variabile. Prințipiu lui se bazează pe compararea frecvențelor absolute(numărul de apariții) rezultate din observații cu frecvențele absolute așteptate sau teoretice.[24]

După ce fost calculată valoarea Chi pătrat pe baza frecvențelor observate, aceasta este comparată cu valorile teoretice din tabelele statistice. În cazul în care valoarea Chi pătrat obținută este mai mare sau egală cu valoarea Chi pătrat din tabele, atunci se respinge ipoteza nulă și se acceptă ipoteza alternativă la nivelul pragului de semnificație statistică de $p \leq 0,05$. Când valoarea Chi pătrat obținută este mai mică decât cea din tabele atunci se respinge ipoteza alternativă și se acceptă ipoteza nulă, afirmând că nu putem stabili nici o legătură semnificativă statistică între variabile.[24]

Testul ANOVA, sau analiza de varianță, este o tehnică parametrică, utilizată pentru a stabilit dacă mediile a două sau mai multe grupuri de date independente sunt diferite sau nu din punct de vedere statistic. Testul se utilizează pentru variabilele cantitative (măsurabile, discrete sau continue). În primul rând, pentru luarea deciziei, se calculează statistica F, aceasta fiind raportul dintre varianța între mediile grupurilor și varianța în interiorul grupurilor(eroarea datorată varianței interindividuale din interiorul fiecărui grup).[24]

În funcție de valorile observate se calculează valoarea F care apoi va fi comparată cu valorile critice din tabelele statistice teoretice, pentru un anumit număr de grade de libertate. În cazul în care valoarea F calculată este mai mare sau egală cu valoarea F din tabelele teoretice, ipoteza nulă se respinge ca fiind falsă și este admisă ipoteza alternativă, specificând că mediile grupurilor diferă semnificativ statistic cu o semnificație statistică de $p \leq 0,05$. Dacă valoarea F obținută este mai mică decât cea din tabele, atunci ipoteza alternativă este respinsă ca fiind falsă și se admite ipoteza nulă, care afirmă că între medii nu există diferențe semnificative statistic.[24]

În lucrarea de față, testul ANOVA a fost utilizat pentru a stabili diferențele de asociere a valorilor biologice și stadiul de activitate a bolii și patternul evolutiv al bolii. [24]

Testul Mann-Whitney U este echivalentul neparametric al testului T al lui Student și este utilizat pentru a compara diferențele între două grupuri independente atunci când variabila dependentă este ori ordinală ori un interval, în orice caz nu e normal distribuită. Testul are 4 ipoteze care trebuie îndeplinite: variabila dependentă trebuie să fie ordinală sau un interval; variabila independentă trebuie să fie constituită din două grupuri independente, categorizate; observațiile trebuie să fie independente, adică să nu existe nici o relație între observațiile din cadrul grupurilor sau între grupuri; variabilele evaluate nu trebuie să fie normal distribuite, iar ambele distribuții trebuie să aibă aceeași formă.[24]

Testul Kruskal-Wallis este un test neparametric echivalent cu ANOVA și o extensie a testului Mann-Whitney U care permite comparația a mai mult de două grupuri independente. Este utilizat atunci când dorim să comparăm trei sau mai multe seturi de scoruri care provin de la grupuri diferite. Este cel mai adesea utilizat atunci când avem o variabilă nominală și o variabilă măsurabilă care nu îndeplinește condiția de normalitate a testului ANOVA. Kruskal-Wallis nu face presupuneri legate de normalitate, deci nu are aceeași limite ca ANOVA, care atunci când datele sunt foarte departe de o distribuție normală poate da valori p inexacte. Testul se face pentru datele ordinaționale, astfel observațiile sunt convertite la ordinea lor din setul de date: cea mai mică valoare primește rangul 1, următoarea rangul 2 și aşa mai departe.[24]

Curbele ROC (Receiver operating characteristic) sunt utilizate în medicină pentru a determina valoarea prag pentru un test de laborator (ex: valoarea prag de 4 ng/ml a fost găsită

pentru testul PSA pentru cancerul de prostată, o valoare sub 4 e considerată normală și peste 4, anormală). Scopul analizei curbei ROC este de a determina această valoare prag.[24]

Curba ROC este un grafic pentru sensibilitate (axa y) și specificitate (axa x). O sensibilitate maximă corespunde unei valori y mari pe curba ROC. O specificitate mare corespunde unei valori x mici pe curbă. Astfel, o valoare prag inițială bună este acea valoare care corespunde punctului de pe curba ROC care e cel mai aproape de colțul din stânga sus a graficului ROC. Însă aceasta nu este întotdeauna valabilă, cum ar fi de exemplu în procedurile de screening în care e mai important să detectezi o valoare anormală, deci să ai sensibilitate maximă (valori fals negative cât mai puține), decât să ai o specificitate maximă. În aceste cazuri punctul de valoare prag cel mai bun de pe curba ROC se va muta de la colțul din stânga sus spre cel din dreapta sus.[24]

O măsură importantă a exactității testului clinic este zona de sub curba ROC. Dacă această zonă are valoarea egală cu 1.0 atunci curba e alcăuită din două linii drepte, una verticală de la 0,0 la 0.1 și următoarea orizontală de la 0.1 la 1.1. Un astfel de test ar avea o exactitate de 100% deoarece și sensibilitatea și specificitatea lui sunt la 100%, deci nu există rezultate fals pozitive sau fals negative. Pe de altă parte, un test care nu poate face diferență între normal și anormal corespunde unei curbe ROC care e o linie pe diagonală de la 0.0 la 1.1. Zona ROC pentru această linie este de 0.5. Zonele de sub curbele ROC au de obicei valori între 0.5 și 1.0.[24]

Curba poate fi utilizată pentru a compara două sau mai multe teste prin evaluarea și comparația statistică zonelor ROC pentru fiecare test. Testele pot fi corelate deoarece provin de la mai multe măsurători asupra aceluiași individ, sau nu pot fi corelate deoarece provin de la măsurători realizate pe indivizi diferiți.[24]

Corelația între variabile este o măsură a asociației dintre variabile. Cea mai utilizată metodă statistică de evaluare a corelațiilor este **corelația Pearson** (Pearson Product Moment Correlation). Ea arată relația liniară între două variabile. Este reprezentată de două litere: litera grecească ρ (rho) pentru o populație și litera „ r ” pentru un lot.[24]

Rezultatele au valori între -1 și 1 . O valoare de -1 arată că este o corelație negativă (invers proporțională) perfectă între cele două variabile, pe când o valoare de 1 îndeamnă că există o corelație pozitivă (direct proporțională) perfectă între variabile. Un rezultat egal cu

0 înseamnă că nu există o relație liniară între cele două variabile. Foarte rar se va putea obține o corelație de 0, -1, 1. De obicei rezultatul e între aceste valori. Cu cât valoarea r este mai aproape de zero, cu atât e mai mare variația punctelor de date în jurul liniei de relație perfectă. O corelație bună are valorile cuprinse între 0.5 și 1 sau -0.5 și -1; o corelație mediocru are valorile între 0.3 și 0.5, respectiv -0.3 și -0.5, iar o corelație slabă are valori între 0.1 și 0.3, sau -0.1 și -0.3.[24]

Punctul slab al corelației Pearson e că nu face diferență între variabilele dependente și cele independente, putând apărea erori de corelație dacă variabilele nu sunt alese cu grijă.[24]

7.3. Rezultate

7.3.1. Date demografice și fenotipice

Vârsta medie a pacienților cu boală Crohn este de 38.8 ± 6.458 ani, cu extreme între 20 de ani și 73 de ani. Datele demografice și fenotipice ale pacienților sunt prezentate în tabelul 7.1.

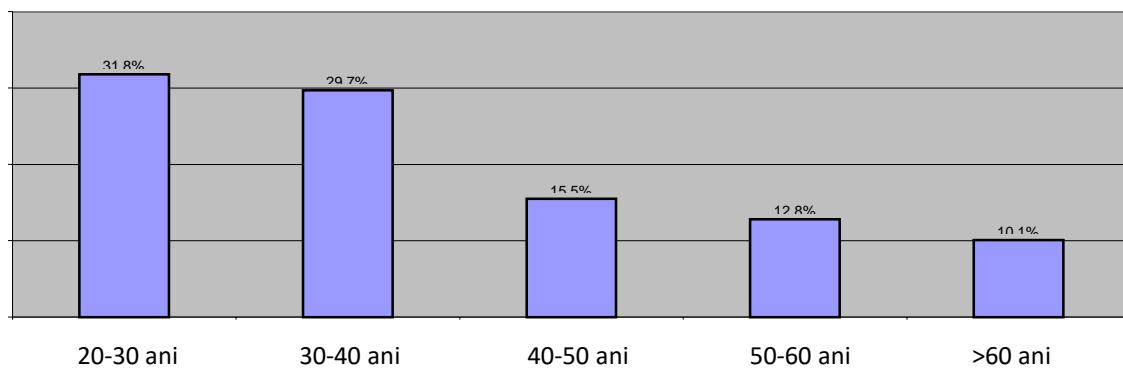
Diagnostic	Boală Crohn (n=148)	Sindrom de intestin iritabil (n=51)
Vârstă la diagnostic	38.8 (20-73)	57 (30-77)
Raport pe sexe(F/B)	79/69	39/12
Clasificarea Montreal		
Localizarea(CD)	L1: 29 (20%) L2: 90 (60%) L3: 29 (20%)	-
Pattern evolutiv(CD)	B1: 93 (63%) B2: 24 (16%) B3: 31 (21%)	-

Severitate puseu (scor CDAI)		
Remisiune	48 (32%)	-
Puseu ușor	50 (34%)	-
Puseu moderat	41 (28%)	-
Puseu sever	9 (6%)	-
Manifestări perianale		
Da	26 (17.6%)	-
Nu	122 (82.4%)	-
Manifestări extraintestinale		
Da	49 (30%)	-
Nu	99 (70%)	-

Tabel 7.1. Caracteristicile demografice și fenotipice ale loturilor studiate.

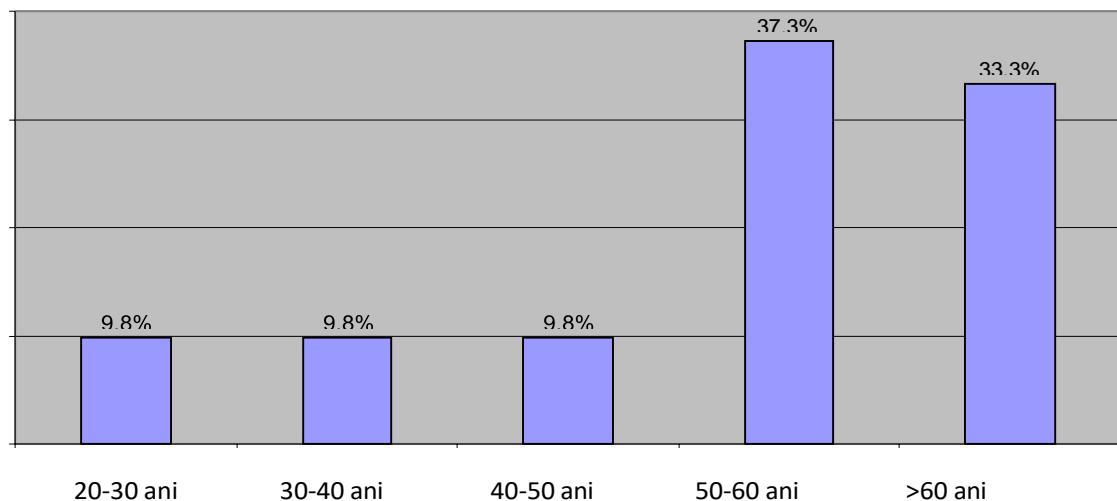
În lotul de studiu se observă o frecvență crescută a incidenței bolii Crohn la vârstele tinere, cea mai mare parte a pacienților fiind cuprinsă în decadele 2-3 de viață (31,8%), respective 3-4 (29,7%). Mai mult de jumătate din pacienții lotului studiat (61,5%, 91 de pacienți) s-au încadrat între 20 și 40 de ani. La celelalte grupe de vîrstă se observă o descreștere progresivă a prevalenței pe măsura înaintării în vîrstă, respectiv 15,5% în decada 4-5, 12,8% la 50-60 ani și 10,1% la >60 ani (Figura 7.1.).

Figura 7.1.: Distribuția pacienților în funcție de vîrstă.



Comparativ cu lotul de studiu, în acest grup majoritatea pacienților se situează peste decada 5 de viață, distribuția pe decade de vîrstă sub aceasta fiind uniformă, respectiv 9,8% în fiecare caz. (Figura 7.2.).

Figura 7.2. Categorii de vîrstă în lotul de IBS



Distribuția pe sexe în lotul de studiu a fost aproximativ egală, cu un ușor trend către predominanța bolii la femei (52%, 79 cazuri), raportul bărbați-femei fiind de 0.87:1, comaprativ cu lotul control unde raportul bărbați-femei a fost de 1:3.

În lotul de studiu câte o treime din pacienți se aflau, respectiv, în remisiune sau prezintau puseu ușor sau moderat de activitate, cu doar 9 pacienți (6%) care prezintau puseu sever de boală.

Din punct de vedere al patternului evolutiv marea majoritate a pacienților au prezentat boală Crohn inflamatorie, localizarea cea mai frecventă fiind cea colonică.

Manifestări perianale precum fistule, abcese, fisuri anale, hemoroizi prolabiați au fost întâlnite la mai puțin de 20% din cazuri.

Afectarea perianală a fost prezentă cel mai frecvent la pacienții cu boală severă, respectiv 33% din pacienții cu scor CDAI peste 450, la doar 9,75% din cei cu activitate moderată și la 18% din cei cu activitate ușoară. Totodată, 21% din pacienții aflați în remisiune prezintau leziuni perianale inactive (Figura 7.3.).

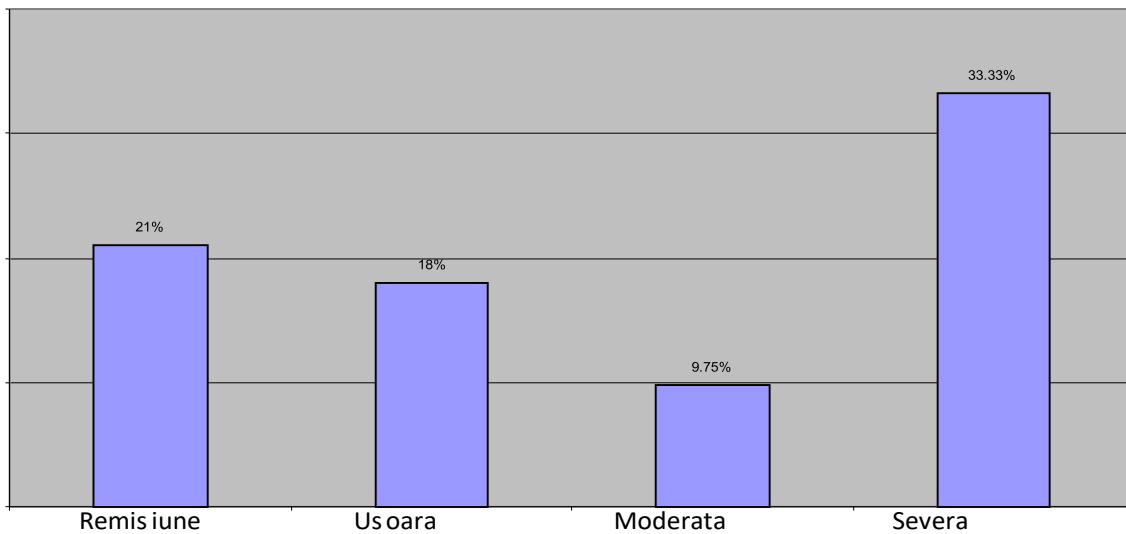


Figura 7.3.: Frecvența afectării perianale în funcție de stadiul bolii

Manifestările extraintestinale asociate bolii Crohn sunt reprezentate de manifestările articulare (artrită, spondilită anchilozantă, sacroileită), cutanate (pyoderma gangrenosum, eritem nodos), ocular (uveită, episclerită), hepatobiliare (colangită sclerozantă primitivă), reno-urinare (amilidoza renală, litiază oxalică, ureterohidronefroză).

Raportat la patternul bolii Crohn, 26,6% din pacienții cu manifestări extraintestinale prezintau boala Crohn inflamatorie, 43,5% pattern stenozant și 29% pattern fistulizant (Figura 7.4.).

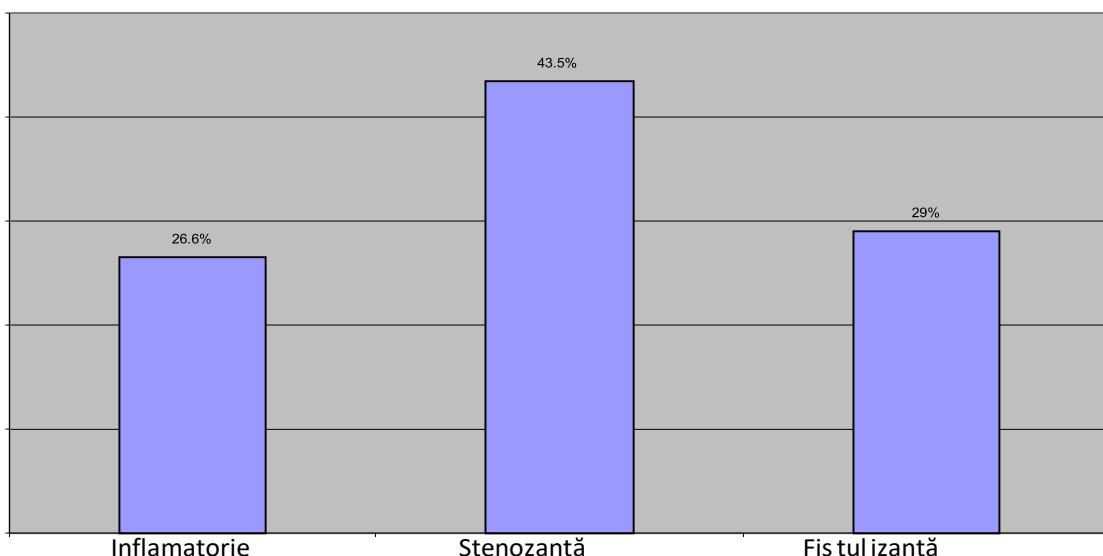


Figura 7.4.: Frecvența manifestărilor extraintestinale în funcție de patternul bolii

În relație cu statusul de activitate a bolii prezența manifestărilor extraintestinale a fost observată la 16,7% aflați în remisiune clinică, la 40% din cei cu puseu ușor, la 31,7% din cei cu activitate clinică moderată și la 33,3% din pacienții cu boală severă. (Figura 7.5.).

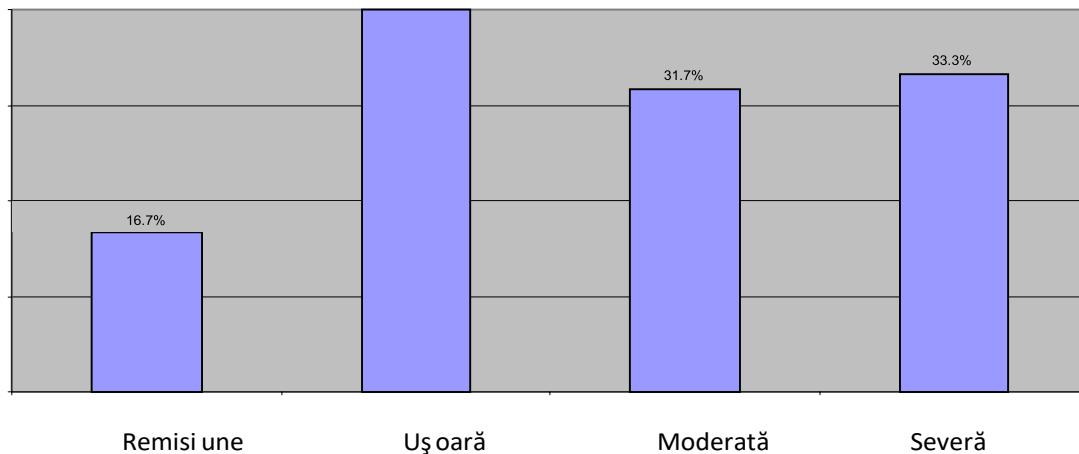


Figura 7.5.: Frecvența manifestărilor extraintestinale în funcție de stadiul de activitate clinică al bolii

7.3.2. Corelațiile RDW cu parametrii fenotipici și biologici

Anemia a fost depistată la 32,4%(48 de pacienți) din cazuri, cu valori ale hemoglobinei variind între 12 si 6 g/dl, clasificată ca anemie ușoară(12-10 g/dl) în 61,4% dintre cei cu anemie și anemie moderată-severă (10-6 g/dl) în 38,6% dintre pacienții cu anemie. După cum se observă, anemia severă este rar întâlnită în grupul pacienților cu boală Crohn (Figura 7.6.).

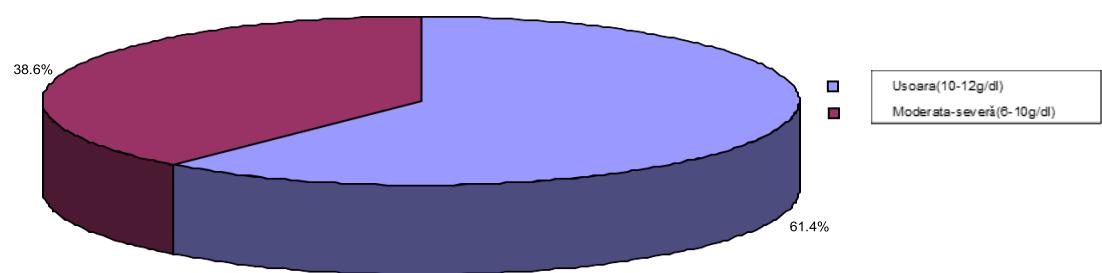


Figura 7.6.: Severitatea anemiei

Proteina C reactivă (CRP) la pacienții din lotul de studiu a prezentat valori variind între 0(nedetectabilă) și 259, media fiind de 23.24 ± 43.72 . Repartitia lotului de pacienți în funcție de valoarea CRP s-a făcut împărțind intervalele numerice în mai mic

de 2mg/dl, între 2-10mg/dl, între 10-50mg/dl și peste 50mg/dl, fiind prezentată grafic în figura 20. Majoritatea pacienților, respectiv 68.2% (101 cazuri) au prezentat valori >2 mg/dl considerate patologice conform laboratorului. Dintre aceștia, cei mai mulți s-au încadrat în intervalul valori 2-50mg/dl, respectiv 33.8% pentru intervalul 2-10 mg/dl și 20.3 % pentru intervalul 10-50 mg/dl, existând totuși și pacienți cu valori de peste 50 mg/dl, respectiv 14.2%(21 de pacienți) (Tabel 7.2., Tabel 7.3., Figura 7.7).

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
CRP(mg/dl)	148	0	259	23.2475	43.72

Tabel 7.2.: Valorile CRP

Categ CRP		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	<2 mg/dl	47	31.8	31.8	31.8
	2-10 mg/dl	50	33.8	33.8	65.5
	10-50 mg/dl	30	20.3	20.3	85.8
	>50 mg/dl	21	14.2	14.2	100
Total		148	100	100	100

Tabel 7.3.: Categoriile de valori ale CRP

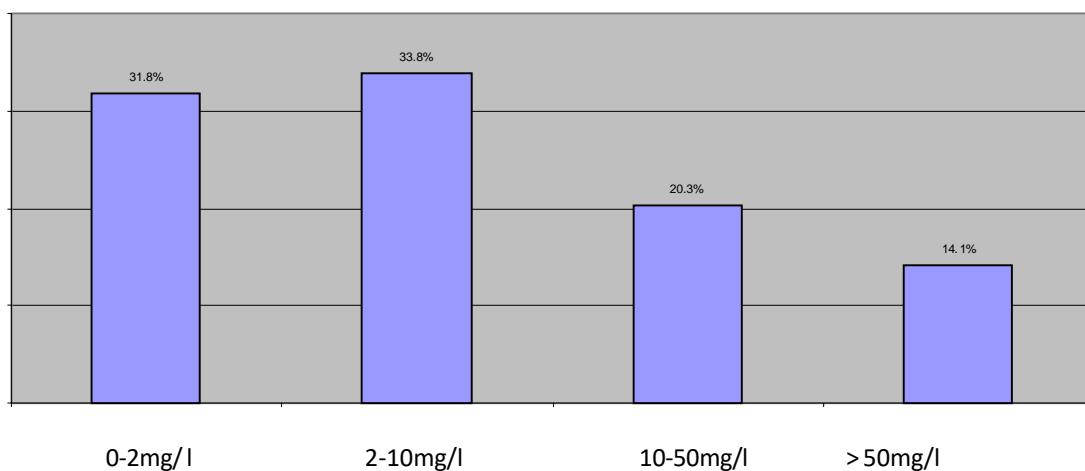


Figura 7.7.: Distribuția lotului de studiu în funcție de valoarea CRP

Viteza de sedimentare a hematiilor (VSH) în lotul de studiu a variat între 2 mm/h și 130 mm/h, cu o medie de 32.17 ± 18.86 . Distribuția pacienților din acest lot în funcție de valoarea VSH este reprezentată grafic în figura 6.8. Majoritatea pacienților au prezentat valori crescute ale acestui parametru, respectiv 83.1% (123 de pacienți), restul de 16,9% prezentând VSH în limite normale conform laboratorului. (Tabel 7.4. și 7.5., Figura 7.8.)

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
VSH(mm/h)	148	2	130	32.17	18.862

Tabel 7.5.: Valorile VSH

Categ VSH					
	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent	
Valid	5-15 mm/h	18	12.4	12.4	12.4
	<5 mm/h	7	4.5	4.5	16.9
	>15 mm/h	123	83.1	83.1	100.0
	Total	148	100.0	100.0	

Tabel 7.6.: Categoriile de valori ale VSH

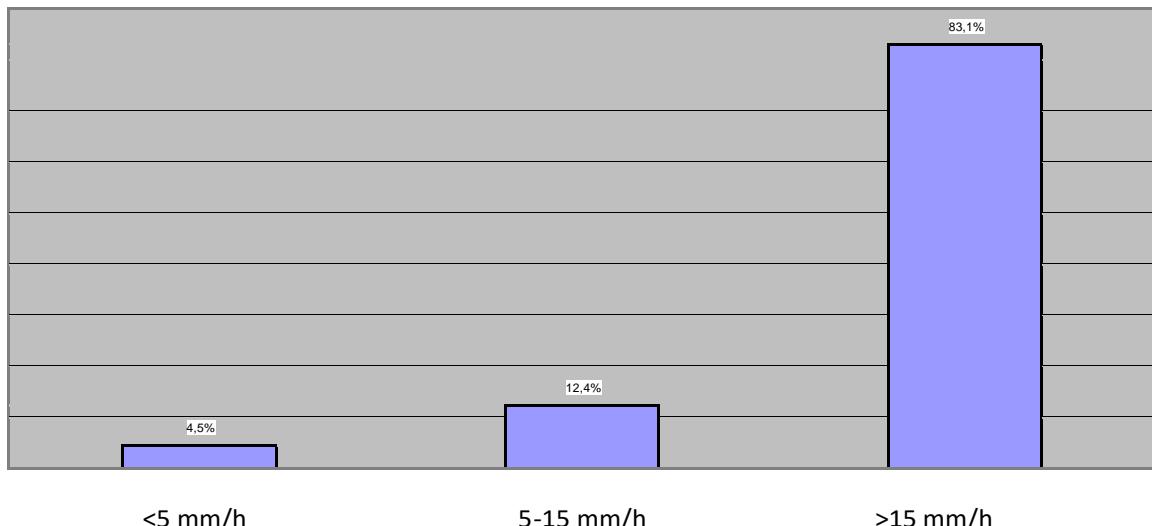


Figura 7.8.: Distribuția lotului în funcție de valorile ESR

În ceea ce privește *fibrinogenul*, acest parametru a prezentat valori variabile în intervalul 157-817.2mg/dl, media fiind de 412.2 ± 139.14 . 50% din pacienți au prezentat valori normale și 46.9% au prezentat valori crescute, cu o mică parte din pacienți, respectiv 3.1% (5 pacienți) prezentând valori sub limita inferioară a intervalului de referință oferit de laborator, fără a putea identifica o cauză pentru acest fenomen. Distribuția lotului în funcție de valorile fibrinogenemiei se regăsește în tabelul 7.7., tabelul 7.8 și figura 7.9.

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Fibrinogen	148	157	817.2	412.234	139.1432

Tabel 7.7.: Valorile fibrinogenului

atcg_FBG					
	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent	
Valid	200-400 mg/dl	74	50.0	50.0	
	<200 mg/dl	5	3.1	3.1	53.1
	>400 mg/dl	69	46.9	46.9	100.0
	Total	148	100.0	100.0	

Tabel 7.8.: Categoriile de valori ale fibrinogenului

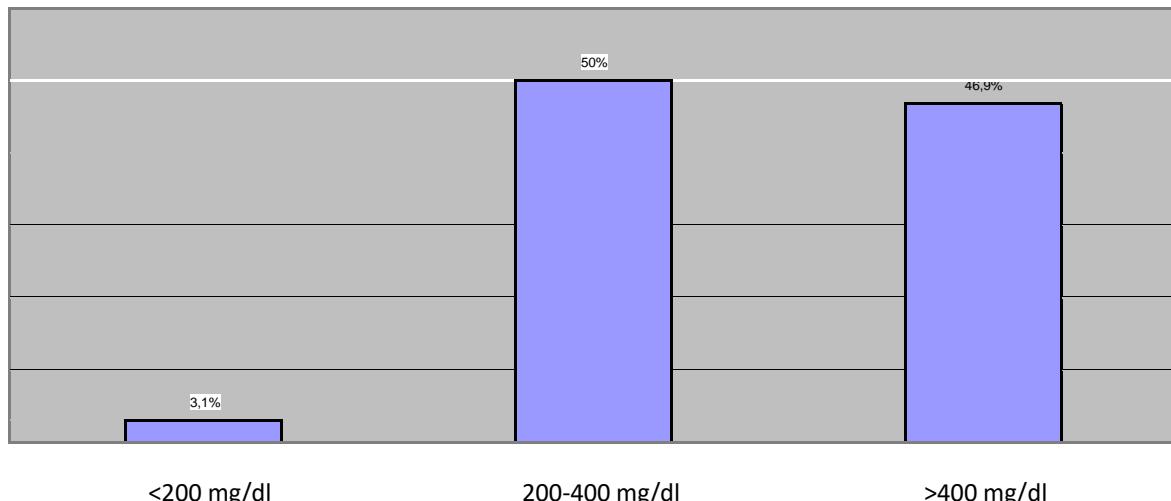


Figura 7.9.: Distribuția lotului în funcție de valorile fibrinogenului seric

Analiza variației *red-cell distribution width(RDW)* în lotul de studiu s-a efectuat prin raportare la statusul de activitate a bolii. Astfel, pentru început, am împărțit lotul în pacienți aflați în remisiune și pacienți cu boală activă. Pacienții cu boală activă au reprezentat 68,24%(101 pacienți). Media valorilor pentru RDW la acești pacienți indifferent de stadiul de activitate a bolii – ușoară, moderată sau severă, a fost de 46fL. Valoare crescută a fost observată la 37.6% din pacienții cu boală activă, respectiv 38 de subiecți. (Tabel 7.9., Tabel 7.10)

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
RDW-SD(FL)	101	36	69	46	6.458

Tabel 7.9.: Valorile RDW-SD la pacienții cu boală activă pe criterii clinice

Categ_RDW					
	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent	
Valid	39-46 FL	56	55.4	55.4	55.4
	<39 FL	7	6.9	6.9	62.4
	>46 FL	38	37.6	37.6	100.0
	Total	101	100.0	100.0	

Tabel 7.10.: Categoriile de valori ale RDW-SD la pacienții cu boală activă pe criterii clinice

Raportat la subgrupul pacienților cu boală Crohn activă, la pacienții aflați în remisiune, media RDW pentru a fost de 45.5. (Tabel 7.11.). Distribuția comparativă a subgrupurilor cu boală activă vs. remisiune în funcție de valorile RDW se regăsește în figura 7.10.

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
RDW-SD(FL)	148	35	66	45.50	5.808

Tabel 7.11.: Categoriile de valori ale RDW-SD pentru lotul de studiu

Valoarea RDW în grupul de control a fost mai mică decât media din grupul de studiu, respectiv 42.51 ± 3.114 . (Tabel 7.12., Tabel 7.13.).

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
RDW-SD(FL)	51	37	51	42.51	3.114

Tabel 7.12.: Valorile RDW-SD la lotul control

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	39-46 FL	83	56.1	56.1	56.1
	<39 FL	13	8.8	8.8	64.9
	>46 FL	52	35.1	35.1	100.0
Total		148	100.0	100.0	

Tabel 7.13.: Categoriile de valori ale RDW-SD la lotul control

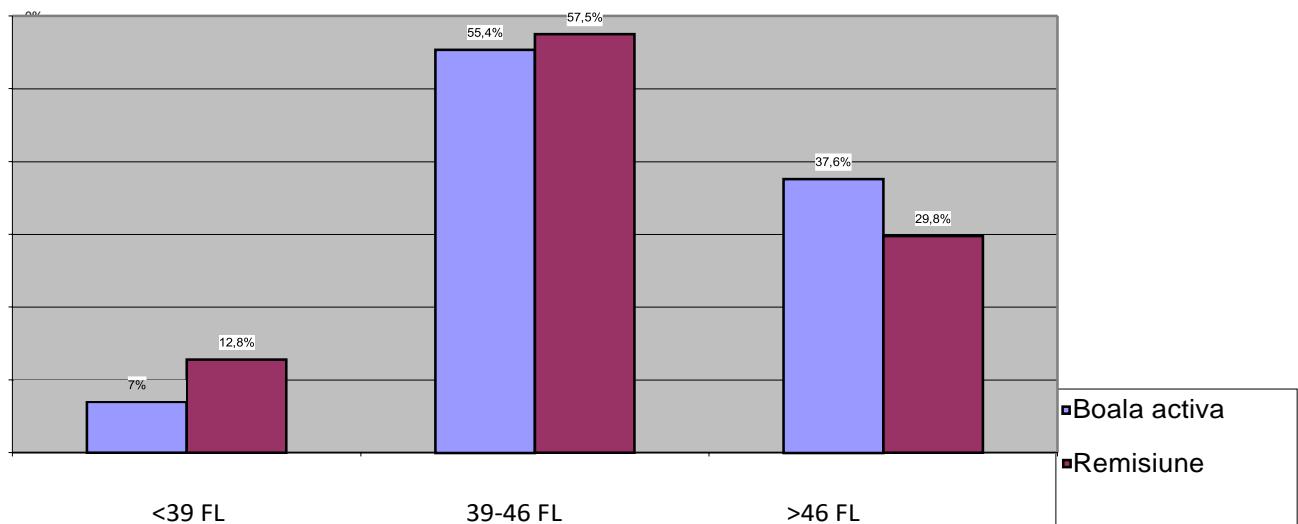


Figura 7.10.: Distribuția lotului de studiu pe subgrupuri de boală activă și remisiune în funcție de valoarea RDW

Pentru evaluarea asocierii dintre RDW și ceilalți markeri biochimici ai inflamației analizați, am folosit corelația Pearson. Cu excepția CRP, unde semnificația statistică a fost marginală (Pearson $r = 0.15$, $p = 0.059$), toți ceilalți parametrii evaluați s-au asociat semnificativ statistic cu valorile RDW, astfel că, pentru VSH s-a obținut Pearson

$r = 0.28$, $p = 0.005$, pentru fibrinogen s-a obținut Pearson $r = 0.23$, $p = 0.002$ iar pentru Hb s-a obținut $r = -0.4$, $p < 0.001$ (corelație invers proporțională cu RDW-SD) (Tabel 7.14.).

Parametru	Corelația Pearson	P
CRP(mg/dl)	0.15	0.059
VSH(mm/h)	0.28	0.005
Fibrinogen(mg/dl)	0.23	0.002
Hb(g/dl)	-0.4	<0.001

Tabel 7.14.: Corelațiile între RDW-SD și ceilalți markeri biologici analizați - preluat din Tieranu C, Gigea C. RDW as a novel marker of disease activity in Crohn's disease: testing a hypothesis in an IBD tertiary care center in Romania. Res Sci Today. 2014;Supplement:100–7.[24]

Afectarea perianală s-a notat la 26 (17.57%) de pacienți, media RDW-SD la acest subgroup fiind de 46.74 ± 6.23 FL. Pentru restul pacienților, respectiv 122 de pacienți(82.43%), media RDW-SD a fost de 46.24 ± 5.71 FL, fără a se înregistra diferențe semnificativ statistice. (F statistic = 1,43, $p=0.023$).

În acest subgrup de pacienți, doar o minoritate de 12 pacienți (23%) au prezentat valori crescute ale RDW-SD, cu o medie RDW-SD de 51,625. Nici în acest caz nu s-a obținut o corelație semnificativă statistică ($p=0.89$) (Figura 7.11.).

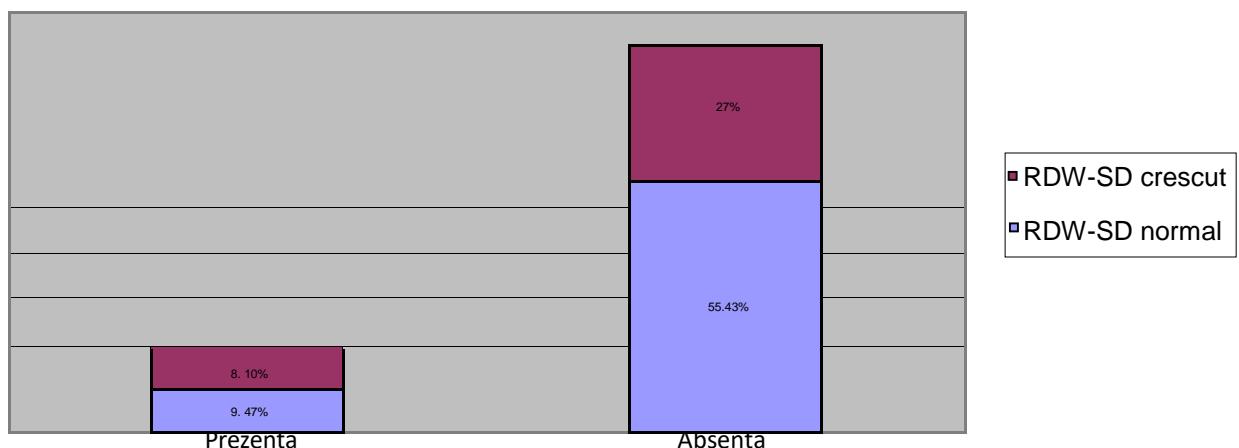


Figura 7.11. Procente de pacienți cu RDW-SD crescut în funcție de prezența afectării perianale

Anemia a fost clasificată în absență pentru $Hb > 12$ g/dl, anemie ușoară pentru Hb între 12-10 g/dl și anemie moderat-severă pentru Hb între 10-6 g/dl. Marea majoritate a pacienților din grupul de studiu nu au prezentat anemie, respectiv 104 (70.27%),

valoarea medie a RDW-SD în acest subgrup fiind de 44.38 ± 4.86 FL. La pacienții cu anemie, atât cei cu formă ușoară cu RDW mediu de 47.9 ± 6.23 FL, cât și cei cu formă moderat-severă cu RDW mediu de 49.58 ± 8.18 FL, s-a obținut o corelație semnificativ statistică cu valorile RDW ($p=0.001$, F statistic=7.22).

Creșteri peste normal ale RDW-SD au fost identificate la 32(30.77%) din pacienții fără anemie, media RDW-SD fiind de 50.15 ± 3.4 FL, la 14(50.85%) din pacienții cu anemie ușoară, media RDW-SD fiind de 52.43 ± 5 FL și la 7(41.18%) din pacienții cu anemie moderat-severă, media RDW-SD fiind de 56.3 ± 6.42 FL, și de această dată corelația atingând semnificația statistică, cu o valoare $p = 0.004$, F statistic=6.22(figura 7.12).

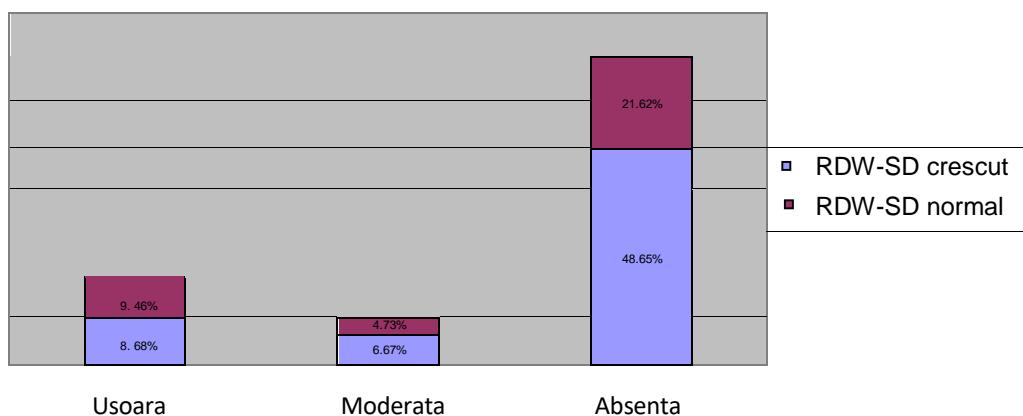


Figura 7.12.: Procente de pacienți cu RDW-SD crescut în funcție de prezența anemiei

Diferitele patternuri evolutive ale bolii Crohn nu au diferit notabil din punct de vedere al variației mediei RDW-SD, respectiv patternul inflamator 1 a 94(63.51%) de cazuri, cu o medie a RDW-SD de 45.17 ± 5.92 FL, patternul stenozant la 23(15.54%) de cazuri, cu o medie a RDW-SD de 45.32 ± 5.11 FL și patternul fistulizant cu o medie a RDW-SD de 46.65 ± 5.97 FL, aceste valori nefiind semnificative din punct de vedere statistic, $p = 0.46$, F statistic=0.78 (Figura 7.13.)

Valori RDW-SD crescute s-au înregistrat la 30(31.91%) de subiecți cu pattern inflamator, cu o valoarea medie a RDW-SD de 51.91 ± 5 FL, la 9(39.13%) din subiecți cu pattern stenozant, cu o valoare medie a RDW-SD de 50.24 ± 2.73 FL și la 13(41.94%)

subiecți cu pattern fistulizant, cu o valoare media a RDW- SD de 52.1 ± 5.2 FL, fără a se atinge semnificația statistică, valoarea $p = 0.61$, F statistic = 0.5.(Tabel 7.15).

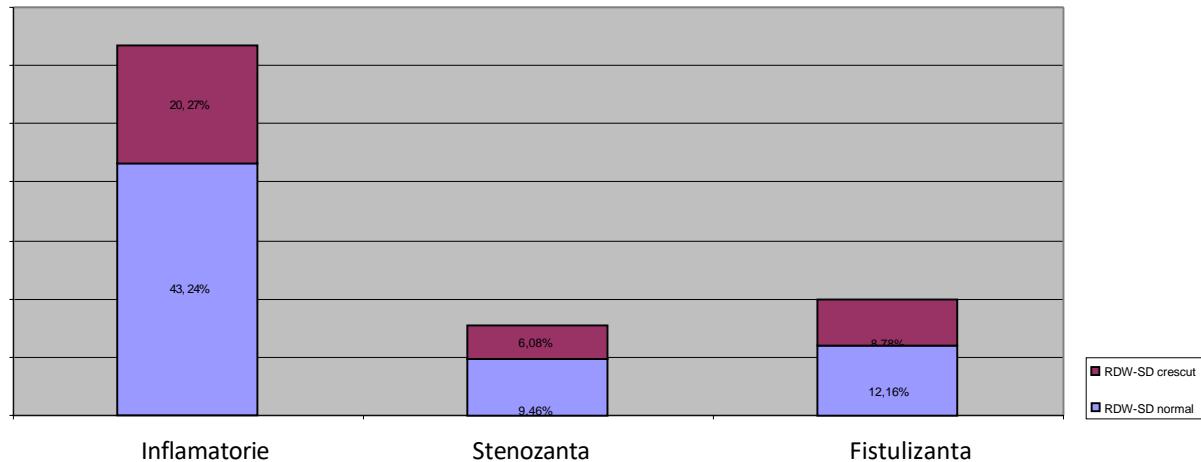


Figura 7.13.: Procente de pacienți cu RDW-SD crescut în funcție de patternul evolutiv al bolii

	Parametru	Valoare medie	Valoare P
Localizare	Ileală	44,77	0,66
	Colonică	45,83	
	Ileo-colonică	45,25	
Formă	Inflamatorie	45,17	0,46
	Stenozantă	45,31	
	Fistulizantă	46,65	

Tabel 7.15: Valorile medii ale RDW-SD în funcție de fenotipul bolii Crohn

În funcție de extensia lezională, pacienții au fost grupați 3 categorii, cu afectare ileală, cu afectare colonică și afectare ileo-colonică. Nici aceste subgrupuri nu au prezentat variații notabile ale valorilor medii ale RDW-SD, aceasta fiind de 44.77 ± 4.8 FL pentru localizarea ileală, de 45.83 ± 6.4 FL pentru localizarea colonică și de 45.25 ± 4.88 FL pentru localizarea ileo-colonică, fără a prezenta semnificație statistică, valoarea p fiind de 0.66, F statistic = 0.41. (figura 7.14.)

Extrăgând doar pacienții cu valori crescute ale RDW-SD, 7(23,33%) pacienți cu afectare ileală din cei cu boală ileală au avut RDW-SD ridicat, media de 51.6 ± 5.09 FL, 35(39,77%) pacienți cu afectare colonică, cu o medie de 51.91 ± 5.16 FL și 10(33.33%) pacienți cu boală localizată ileo-colonic, cu o media a RDW- SD de 50.86 ± 2.54 FL, cu o valoare $p=0.83$, F statistic = 0.19, deci nesemnificativă.

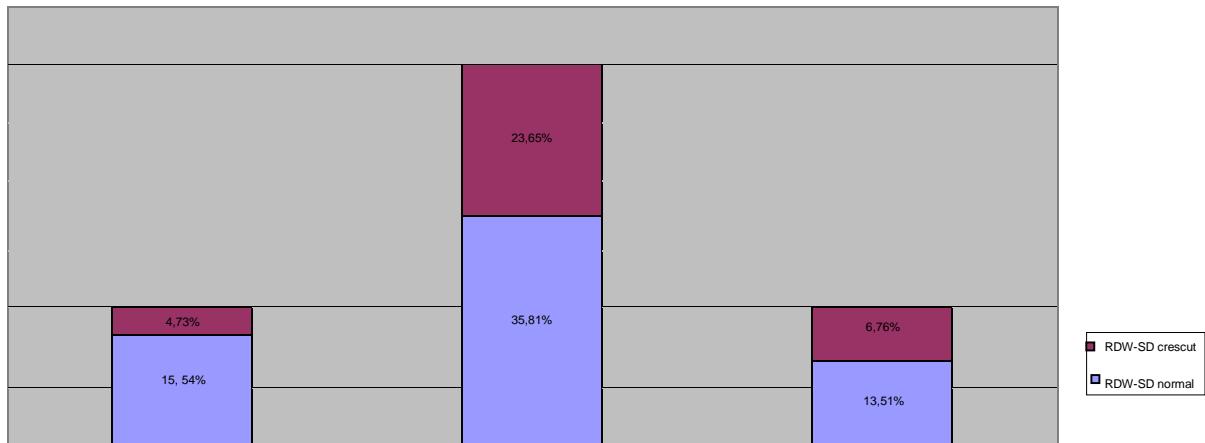


Figura 7.14.: Procente de pacienți cu RDW-SD crescut în funcție de localizarea bolii

Manifestările extraintestinale asociate bolii Crohn au fost raportate la 44(29.73) dintre pacienți, aceștia prezentând o valoare medie a RDW-SD de 46.47 ± 6 FL. Restul pacienților fără manifestări extraintestinale au prezentat o valoarea medie a RDW-SD a fost de 45.09 ± 5.7 FL. Ipoteza nulă a fost valabilă, valoarea p fiind de 0.19, F statistic=1.74. (figura 7.15).

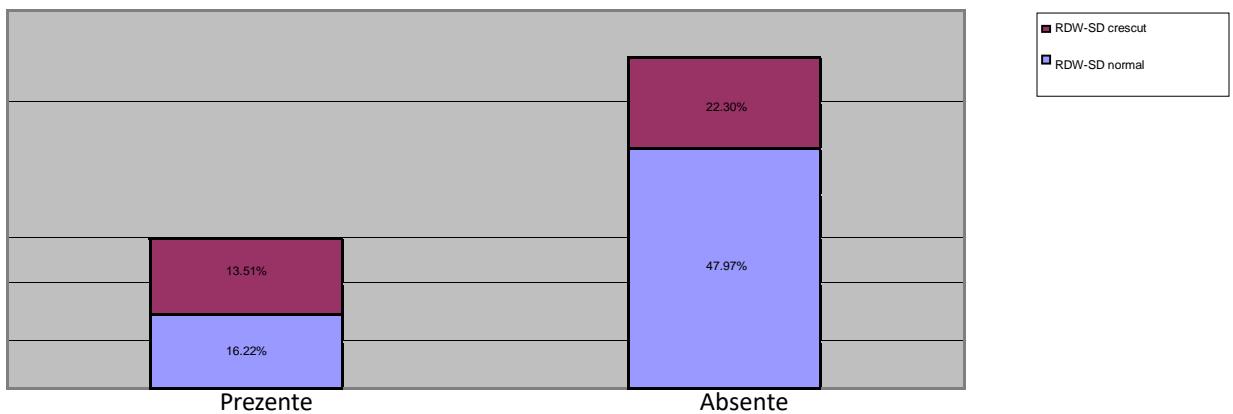


Figura 7.15.: Procente de pacienți cu RDW-SD crescut în funcție de prezența manifestărilor extraintestinale

Testul ANOVA a fost utilizat pentru compararea valorilor medii ale RDW(FL) în cazul diferitelor stadii de severitate a bolii conform criteriilor clinice și pentru lotul control (Tabel 7.16.).

Valoarea RDW(FL)								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Martor	51	42.51	3.114	.436	41.63	43.39	37	51
Remisiune	47	44.44	4.913	.717	43.00	45.88	35	59
Ușoară	51	44.84	5.342	.748	43.34	46.35	36	62
Moderată	41	46.43	5.846	.913	44.58	48.27	37	62
Severă	9	50.58	9.433	3.144	43.33	57.83	36	66
Total	199	44.74	5.404	.383	43.98	45.49	35	66

Tabel 7.16: Mediile RDW-SD în funcție de severitatea puseului și lot control

Tabelul 7.18 prezintă rezultatele analizei ANOVA ce demonstrează o diferență cu semnificație statistică între valorile medii ale RDW în diferitele grupuri de mai sus, valoarea p fiind p<0.001.

Pentru o analiză mai amănunțită a semnificației diferențelor între grupuri, am utilizat *testul post-hoc al lui Tukey* (Tabelul 7.17) care a evidențiat diferențe semnificative statistic între lotul martor și subgrupurile cu puseu moderat și sever de boală, precum și între subgrupul pacienților aflați în remisiune și cel cu activitate severă de boală. Nu s-au observat diferențe semnificative din punct de vedere statistic între grupul control și subgrupul pacienților aflați în remisiune, și respectiv, cu puseu ușor de activitate. De asemenea, nu există diferențe semnificative statistic între subgrupul pacienților cu activitate moderată și cei cu activitate severă.

Testul Mann-Whitney U a fost utilizat pentru a compara valoarea RDW-SD între lotul de studiu și lotul control, plecând de la ipoteza nulă conform căreia medianele sunt egale în cele două grupuri, verificând ipoteza că există o valoare mai mare a mediei

RDW la pacienții boala Crohn decât în populația generală. S-a obținut semnificație statistică puternică pentru această observație cu o valoare $p < 0.001$. Rangul mediu al lotului de studiu a fost de 108.4, comparativ cu lotul control de 75.64 (Tabel 7.19, Tabel 7.20).

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Valoarea RDW(FL)

	(I) Activitate	(J) Activitate	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
	boală	boală				Lower Bound	Upper Bound
Martor	Remisiune	Remisiune	-1.928	1.037	.343	-4.78	.93
		Ușoară	-2.333	1.015	.150	-5.13	.46
		Moderată	-3.919*	1.076	.003	-6.88	-.96
	Remisiune	Severă	-8.068*	1.854	.000	-13.17	-2.96
		Martor	1.928	1.037	.343	-.93	4.78
		Ușoară	-.405	1.037	.995	-3.26	2.45
Tukey HSD	Ușoară	Moderată	-1.991	1.096	.367	-5.01	1.03
		Severă	-6.139*	1.866	.010	-11.28	-1.00
		Martor	2.333	1.015	.150	-.46	5.13
		Remisiune	.405	1.037	.995	-2.45	3.26
		Moderată	-1.586	1.076	.580	-4.55	1.38
		Severă	-5.735*	1.854	.019	-10.84	-.63
	Moderată	Martor	3.919*	1.076	.003	.96	6.88
		Remisiune	1.991	1.096	.367	-1.03	5.01
		Ușoară	1.586	1.076	.580	-1.38	4.55
		Severă	-4.149	1.887	.185	-9.35	1.05
		Martor	8.068*	1.854	.000	2.96	13.17
		Remisiune	6.139*	1.866	.010	1.00	11.28
	Severă	Ușoară	5.735*	1.854	.019	.63	10.84
		Moderată	4.149	1.887	.185	-1.05	9.35

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tabel 7.17: Analiza diferențelor mediei RDW-SD între stadiile de boală

ANOVA

Valoarea RDW(FL)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	682.195	4	170.549	6.487	.000
Within Groups	5100.522	194	26.291		
Total	5782.717	198			

Tabel 7.18.: Testul ANOVA pentru diferențele mediilor RDW-SD între lotul de studiu și lotul martor

Ranks

	B. Crohn	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Absenta		51	75.64	3857.50
Valoarea RDW(FL)	Prezentă	148	108.40	16042.50
Total		199		

Tabel 7.19: Calculul rangurilor pentru cele două loturi

Test Statistics^a

	Valoarea RDW(FL)
Mann-Whitney U	2531.500
Wilcoxon W	3857.500
Z	-3.504
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000

Tabel 7.20.: Semnificația statistică a diferenței medianelor valorilor RDW-SD între cele două loturi

Ranks

	Boala_activa	N	Mean Rank
Boala in remisiune		47	99.63
Boala activa		101	112.58
Valoarea RDW(FL)	Martor	51	75.42
Total		199	

Tabel 7.21.: Calculul rangurilor medii pentru cele 3 grupuri de activitate

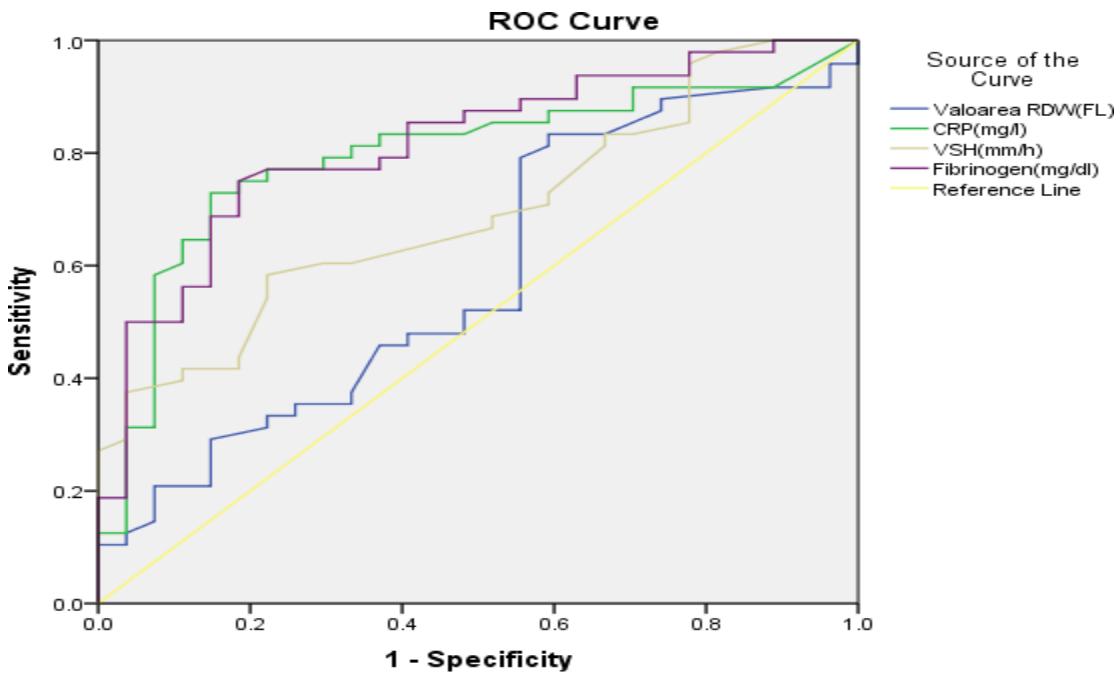
Test Statistics ^{a,b}	
	Valoarea RDW(FL)
Chi-Square	14.119
df	2
Asymp. Sig.	.001

Tabel 7.22.: Semnificația statistică a diferenței mediilor valorilor RDW-SD între cele 3 grupuri

Pentru *testul Kruskal-Wallis* pacienții au fost grupați astfel: lotul martor a fost nemodificat, lotul de studiu fiind subgrupat în pacienți aflați în remisiune și pacienți cu boală activă (figura 7.17)

Ipoteza nulă în acest caz a fost considerate ca egalitate între rangurile celor 3 grupuri.

Testul Kruskal-Wallis a demonstrat diferență semnificativ statistică atât între grupul control și subgrupul pacienților în remisiune, cât și între subgrupul pacienților în remisiune și cel al pacienților cu boală activă, pentru un nivel de semnificație de 0.05. (Tabel 7.21., Tabel 7.22.).



Diagonal segments are produced by ties.

Figura 7.16: Curba ROC de evaluare a specificității și sensibilității RDW-SD pentru detectarea activității inflamatorii asociate bolii Crohn, comparativ cu ceilalți markeri ai inflamației (CRP, ESR, Fibrinogen)

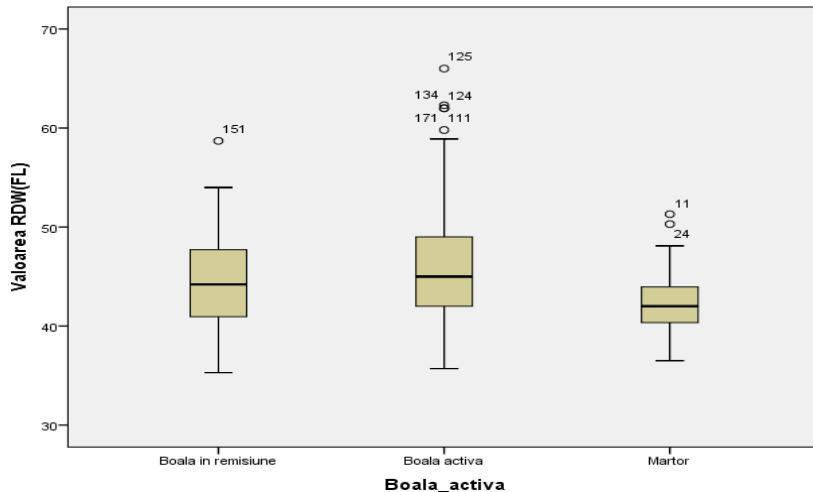


Figura 7.17.: Distribuția valorilor RDW-SD între cele 3 grupuri.

Area Under the Curve

Test Result Variable(s)	Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Valoarea RDW(FL)	.584	.069	.229	.448	.720
CRP(mg/l)	.794	.054	.000	.687	.901
VSH(mm/h)	.694	.060	.005	.576	.813
Fibrinogen(mg/dl)	.815	.050	.000	.717	.913

Tabel 7.23.: Aria de sub curba ROC pentru fiecare din markerii inflamației analizați.

Parametru	AUC(95% CI)	Valoarea prag	Sensibilitate(%)	Specificitate(%)	Valoarea p
RDW-SD(FL)	0.584(0.448-0.720)	46	48	63	0.229
		46.5	37	66	
		47	35.4	66	
CRP(mg/dl)	0.794(0.687-0.901)	0.85	87.5	33	<0.001
		1.05	87.5	41	
		1.5	83	52	
VSH(mm/h)	0.694(0.576-0.813)	15	85	22	0.005
		16.5	83	30	
		19	81	33	
Fibrinogen(mg/dl)	0.815(0.717-0.913)	400	58	85	<0.001
		410	56	85	
		425	54	89	

Tabel 7.24. : Aria de sub curba ROC, sensibilitatea și specificitatea pentru anumite valori prag și semnificația statistică a markerilor inflamației pentru activitatea bolii Crohn.

AUC=area under curve, CI=interval de încredere

Curba ROC a fost utilizată pentru evaluarea sensibilității și specificității RDW ca marker de inflamație activă în boala Crohn. S-a efectuat o analiză comparativă cu ceilalți marker ai inflamației analizați în cadrul studiului. (Figura 7.16).

Aria de sub curba (AUC) pentru RDW-SD este evident mai mică comparativ cu AUC pentru ceilalți markeri, având o valoare de doar 0.584, cu variații foarte mari între pragul minim și maxim, fapt ce denotă o utilitate scăzută. După cum se poate observa în tabelele 6.23. și 6.24, sensibilitatea RDW a fost de 48% și specificitatea de 63%, fără a atinge semnificația statistică cu o valoare $p=0.229$.

Dintre ceilalți marker evaluați, CRP a performat cu AUC de 0.794, o sensibilitate de 87.5% pentru o valoare mai mare de 0.85mg/dl, dar cu specificitate scăzută de doar 33%, totuși cu o valoare $p<0.001$.

Evaluarea VSH a obținut o AUC de 0.694, cu o sensibilitate de 85% la o valoare cut-off de 15mm/h, dar cu cea mai mică specificitate de 22%, atingând totuși semnificația statistică la o valoare $p=0.005$.

În ceea ce privește fibrinogenul, AUC obținută a fost de 0.815, valoare comparabilă cu a celorlalte două teste amintite. Pentru valoarea cut-off de 400mg/dl, sensibilitatea obținută a fost de doar 58% dar cu o specificitate crescută de 85% și valoare p cu semnificație statistică excelentă $p<0.001$.

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	10.745 ^a	2	.005
Likelihood Ratio	11.994	2	.002
Linear-by-Linear Association	10.664	1	.001
N of Valid Cases	199		

Tabel 7.25: Semnificația statistică a corelației dintre categoriile de valori ale RDW-SD și prezența bolii Crohn

Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Phi	.232			.005
	Cramer's V	.232			.005
Interval by Interval	Pearson's R	.232	.058	3.349	.001 ^c
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	.230	.060	3.317	.001 ^c
N of Valid Cases		199			

Tabel 7.26: Semnificația statistică a corelației dintre categoriile de valori ale RDW-SD și prezența bolii Crohn

Utilizarea testului Chi pătrat a fost aleasă pentru evaluarea eventualelor corelații între categoriile de valori ale RDW- SD (normale, scăzute și crescute) și prezența bolii Crohn. Pentru o valoare a testului Chi pătrat de 10.745, s-a obținut semnificație statistică a asocierii cu $p = 0.005$ (Tabel 7.25).

Astfel, pe baza acestui test, se poate concluziona că există o corelație între categoriile de valori ale RDW-SD și prezența bolii Crohn (Pearson $r = 0.232$, $N=199$, $p = 0.001$, Spearman $r = 0.230$, $N=199$, $p = 0.001$) (Tabel 7.26).

7.4. Discuții

În prezent se încearcă tot mai mult identificarea unor markeri ieftini, non-invazivi și ușor disponibili pentru evaluarea activității inflamatorii asociate bolii Crohn. RDW este un test larg disponibil făcând parte din hemograma standard efectuată în orice laborator.

În acest studiu, am observat o creștere a valorilor RDW la pacienții cu boală Crohn activă comparativ cu cei aflați în remisiune și, respectiv, cu pacienții din grupul control cu sindrom de intestin iritabil. Curba ROC a demonstrat o sensibilitate scăzută dar o specificitate crescută pentru determinarea statusului inflamator sistemic. Totuși, aceste modificări au fost observate doar în cazul pacienților cu boală Crohn pur inflamatorie (boală luminală), rezultatele pentru boala stenozantă și fistulizantă nefiind semnificative statistic. Din acest motiv, în analiza pe întreg

grupul pacienților cu boală Crohn, RDW nu a atins pragul de semnificație statistică pentru utilizarea ca și marker de evaluare a inflamației.

Prezenta cercetare a pus în evidență corelație semnificativ statistică între valoarea RDW-SD și stadiul de activitate al bolii Crohn. Astfel, s-au observat diferențe cu valoare statistică între lotul martor și lotul de studiu (absența și prezența bolii) precum și între pacienții aflați în remisiune și cei cu boală moderată sau severă. Totodată, diferențe semnificative s-au observat și între pacienții cu puseu ușor de activitate și cei cu puseu sever de activitate, dar nu și cu cei cu puseu moderat de activitate.

O altă observație demnă de menționat este relația dintre anemie și RDW-SD ce a fost influențată de valorile hemoglobinei. Corelația observată a prezentat o înaltă semnificație statistică pe baza valorii p , acest rezultat fiind concordant cu datele din literatură. [2]

Pe de altă parte, analiza curbelor ROC comparative între RDW și ceilalți marker de inflamație consacrați analizați în această lucrare a relevat faptul că RDW independent nu reprezintă un parametru insuficient de sensibil și specific pentru detecția bolii.

Până în prezent, sunt doar câteva lucrări în literatură care au analizat rolul RDW în evaluarea pacienților cu CD. [5–8,278]

Studiul lui Cakal et al. a observat o posibilă utilitate a RDW ca marker adițional de inflamație la pacienții cu boli inflamatorii intestinale. Datele acestui studiu au indicat că o valoare RDW cut-off de 14.1 prezintă 78% sensibilitate și 68% specificitate pentru depistarea bolii Crohn active. Totuși, merită menționat că lotul pacienților cu CD a fost de doar 22 subiecți. [278]

Plecând de la premisa că anemia modifică valorile RDW, Song et al. au evaluat abilitatea RDW de a depista boala Crohn activă la pacienții cu CD fără anemie. S-a observat că RDW la o valoare cut-off de 14.1 prezintă o sensibilitate de 82% și o specificitate de 83% pentru detecția pacienților cu boală activă fără anemie. Totuși, datorită faptului că anemia poate influența parametrii din scorul CDAI și implicit scorul total, nu am exclus acești pacienți din analiza noastră. [8]

Mecanismul prin care RDW se modifică în inflamația sistemică și implicit în boala Crohn activă nu sunt foarte clare. Câteva motive au fost postulate în literatură, începând cu faptul că acești pacienți prezintă pierdere cronică de sânge la nivel intestinal, prezintă deficite

nutriționale asociate, și, totodată, necesită transfuzii periodice, toate acestea contribuind la creșterile RDW. Apoi, inflamația însăși poate influența valoarea RDW, acesta din urmă fiind un nou marker studiat pentru asocierea cu inflamația sistemică. Suplimentar, există date în literatură care sugerează că citokinele proinflamatorii circulante inhibă maturarea eritrocitară mediată de eritropietină ce ar putea, de asemenea, contribui la valori crescute ale RDW. Nu în ultimul rând, nu trebuie uitată interferența diferitelor molecule utilizate în tratamentul CD cu procesul eritropetic. [21][280–284]

Studiul nostru a avut și limitări cauzate de natura monocentrică a colectării datelor, precum și de numărul limitat de pacienți împreună cu heterogenitatea loturilor studiate. Categoric este nevoie de studii mai ample, multicentrice pentru a analiza și confirma datele obținute în studiul nostru.

7.5. Concluzii

Pe baza datelor din acest studio putem concluziona că RDW este un parametru de laborator ieftin, larg disponibil și poate fi util pentru selectarea pacienților cu simptomatologie sugestivă de boală inflamatorie care necesită alte investigații de confirmare endoscopice sau imagistice, și posibile manifestări funcționale încadrabile în sindromul de intestin iritabil la care aceste investigații ar fi inutile. În acest fel, RDW se adaugă altor investigații paraclinice ce au același rol cum ar fi calprotectina fecală, CRP, ESR.

De asemenea, o altă utilitate a acestei determinări ar putea fi reprezentată de diferențierea între puseu de boală la un pacient cunoscut cu boală în remisiune, la care se pot suprapune, de asemenea, manifestări clinice de cauză funcțională.

Nu trebuie uitat că datele obținute în acest studiu au la bază analiza comparative a două loturi neomogene, cu număr relativ mic de pacienți și trebuie interpretate cu precauție, motiv pentru care consider de utilitate extrapolarea ideii de cercetare în loturi de studiu mai mari, în cadrul unor studii multicentrice, ce pot aduce o confirmare cu valoare științifică superioară pentru aceste concluzii.

8. Rolul polimorfismelor mononucleotidice ale genei *TNF-alfa* în populația din România cu boli inflamatorii intestinale

8.1. Introducere

TNF-α este o proteină produsă la nivelul mai multor linii celulare dintre care amintim macrofagele, monocitele, neutrofilele, celulele T și celulele natural killer (NK). Gena responsabilă pentru sinteza de *TNF-α* se găsește în regiunea clasei III a complexului major de histocompatibilitate, la nivelul cromozomului 6 între locusurile genelor HLA-B și HLA-DR.[285]

TNF își determină efectul la nivel periferic prin legarea de două tipuri de receptori aflați pe suprafața celulelor țintă, TNFR1 și TNFR2, având ca efect supraviețuirea celulară cu activarea NF-κB și MAP kinazelor cu rol proinflamator. [286]

Practic, molecula *TNF* activează fagocitele stimulând procesul de fagocitoză a agenților infecțioși și detritusurilor celulare, și, totodată, crește expresia moleculelor de adeziune celulară la nivelul endoteliului vascular pentru a permite pasajul transmural al celulelor imune, în mod particular neutrofile și macrofage, contribuind la migrarea acestor celule către locul inflamației.[260]

Modificările reglării sintezei de *TNF-α* în sensul supraproducției au fost asociate unei varietăți de simptome întâlnite în bolile autoimune, inclusiv în bolile inflamatorii intestinale, mai ales în boala Crohn. Dintre acestea, menționez doar cele mai frecvent întâlnite în boala Crohn cum ar fi anorexia și scăderea ponderală, acestea fiind asociate cu niveluri circulante crescute de *TNF-α*.[287]

De altfel, cea mai nouă generație de molecule utilizate pentru tratamentul acestor boli este reprezentată de clasa anticorpilor monoclonali ce țintesc molecula de *TNF-α*. Infliximabul, Adalimumabul și Certolizumabul pegol au primit aprobarea US Food and Drug Administration(FDA) pentru utilizarea în tratamentul bolilor inflamatorii intestinale non-responsive la medicațiile standard, primul fiind de asemenea indicat și în boala Crohn fistulizantă. Totuși, în trialurile clinice de fază 3 premergătoare punerii pe piață a acestor

molecule, s-au observat diferențe notabile în răspunsul obținut la pacienți differiți. Un lucru extrem de important ar fi dacă s-ar reuși stabilirea unor factori predictivi clinico-biologici, endoscopici, histologici sau genetici pentru identificarea pacienților cu șanse de răspuns maximale la aceste tratament, pentru a evita eșecurile terapeutice ale unor molecule scumpe. Plecând de la această idee, există un raport recent ce a pus în evidență asocierea dintre polimorfismele receptorului de TNF și răspunsul la tratament în populația japoneză. [288]

Referitor la bolile inflamatorii intestinale, s-a observat deja că SNP-ul-238G/A se asociază cu o producție scăzută de *TNF-α* la pacienții cu colită ulcerativă, pe când alela -308A se asociază cu o producție crescută atât in vitro cât și in vivo la pacienții cu boala Crohn. [289–291]

Datele din literatură sunt totuși contradictorii, în special în ceea ce privește rolul SNP-ului -308G/A și -238G/A, articolele mai recente venind în contrast cu datele mai vechi asupra implicațiilor acestor polimorfisme în susceptibilitatea pentru a dezvolta boala inflamatorie intestinală. În plus, o metaanaliză recentă a pus în evidență faptul că variantele SNP-ului -308G/A se asociază și cu colită ulcerativă în populația asiatică, pe când un studiu indian ce a evaluat mai mult alte SNP-uri (-1031T > C, -863C > A și -857C > T) a arătat faptul că genotipul producător de *TNF-α* (-863AA) s-a asociat cu riscul crescut de a dezvolta boala inflamatorie intestinală, în mod special colită ulcerativă. Consecutiv, analiza haplotipurilor a demonstrat un risc adițional crescut de a dezvolta boala inflamatorie. [292–295]

În orice caz, este nevoie de studii suplimentare în acest domeniu, pe loturi mai mari de pacienți, eventual investigând și alte SNP-uri pentru a putea stratifica pacienții în funcție de răspunsul prezis la tratament.

Obiectivul studiului de față este investigarea polimorfismelor mononucleotidice rs361525 (-238G/A) și rs1800629 (-308G/A) ale genei *TNF-alpha* în raport cu riscul de a dezvolta boli inflamatorii intestinale în populația din România. S-a analizat și relația acestor polimorfisme cu diferite caracteristici clinice ale pacienților.

Acest studiu reprezintă prima cercetare ce a urmărit implicațiile acestor polimorfisme mononucleotidice în bolile inflamatorii intestinale din România.

8.2. Materiale și metode

8.2.1. Stabilirea bazei de date și selecția pacienților

Pentru acest proiect baza de date a fost constituită din 132 de pacienți internați și diagnosticați cu boli inflamatorii intestinale – colită ulcerativă și boală Crohn, în Clinica de Gastroenterologie a Spitalului Universitar de Urgență ELIAS din București în perioada 2014-2018. Pentru lotul martor s-a folosit Colecția de ADN a Disciplinei de Imunologie și Fiziopatologie din cadrul Facultății de Medicină, UMF "Carol Davila," București inițiată în anul 2006, constituită din probe sanguine prelevate de la 160 subiecți sănătoși. Aceștia sunt potențiali donatori de organe aflați în baza de date a Institutului Național de Transfuzii Sanguine "Prof Dr. C.T. Nicolau", București. Aceștia au semnat un formular de consimțământ informat privind studiile de investigație genetică. Subiecții selecționați în lotul martor nu au prezentat istoric personal sau semne și simptome de boli reumatice inflamatorii, inclusiv boli inflamatorii intestinale.

Pacienții cu boli inflamatorii intestinale au fost incluși în studiu dacă au îndeplinit criteriile clinice, biologice, imagistice, endoscopice și histologice necesare pentru diagnostic conform recomandărilor ghidului de diagnostic și tratament propus de Organizația Europeană pentru Colită și Crohn (European Crohn's and Colitis Organisation ECCO). [21,296]

Datele clinice au fost obținute din bazele de date a Spitalului Universitar de Urgență ELIAS.

Pentru fiecare pacient s-a precizat vîrstă, sexul, tipul de boală, vîrstă de debut a bolii, extensia leziunilor, prezența sau absența manifestărilor extraintestinale asociate bolii, răspunsul la tratament biologic cu molecule antiTNF-alfa și necesarul de colectomie pentru colita ulcerativă.

Definirea extensiei bolii s-a efectuat utilizând clasificarea Montreal atât pentru colita ulcerativă unde E1=proctită. E2=colită stângă, E3=pancolită, cât și pentru boala Crohn unde L1=localizare ileală, L2=localizare colonică, iar L3= localizare ileo-colonică.[23,279]

Au fost excluse din analiza finală probele neconforme din punct de vedere calitativ și cantitativ pentru extracția ADN. În final, am avut 123 de probe în lotul de studiu și 160 de probe în lotul martor.

Toți subiecții au semnat un formular de consimțământ informat în care le-a fost explicat scopul recoltării probelor de sânge, cvasi-absența riscurilor asociate flebotomiei, respectarea drepturilor pacientului și a normelor deontologice în vigoare precum și confidențialitatea datelor.

8.2.2. Colectarea ADN-ului

Înainte de începerea extracției se realizează următoarele operațiuni:

- Probele vor fi aduse la temperatura camerei (15-29°C).
- Baia de apă va fi încălzită la 56°C pentru a fi utilizată la pasul 4.
- Apa distilată sau soluția tampon AW1 se aduc la temperatura camerei pentru eluarea de la pasul 11.
- În eventualitatea formării unui precipitat în soluția Buffer AL în urma congelării, se dizolvă prin incubare la 56°C.

Probele de ADN au fost obținute în urma extracției din 200-400 µl sânge recoltat pe EDTA (acid etilendiaminotetraacetic – chelator de Ca²⁺ și prin aceasta anticoagulant eficient) cu ajutorul kitului comercial (QIAamp DNA Blood Mini Kit Qiagen, Germany) conform protocolului oferit de producător.(<https://www.qiagen.com/kr/resources/download.aspx?>)

Etapele metodei:

1. 20 microlitri (µl) de soluție QIAGEN Protease (sau Proteinază K) au fost pipetate într-un tub de microcentrifugare de 1,5 ml.
2. 200 µl de sânge integral a fost adăugat în fiecare dintre tuburile de microcentrifugare
3. 200 µl de soluție Buffer AL a fost adăugată în tub; se amestecă prin puls-vortexare timp de 15 secunde. Pentru a fi siguri de eficiența lizei este important să ne asigurăm că mixarea a fost bine realizată și că după vortexare soluția este omogenă.

4. Amestecul a fost incubat 10 minute la temperatura de 56° Celsius; producția de ADN izolat astfel atinge un maxim după 10 minute, iar o durată mai mare de timp nu are niciun efect asupra cantității sau calității ADN-ului izolat.
5. Tuburile cu amestecul au fost centrifugate scurt pentru a îndepărta picăturile care se pot forma în interiorul capacului.
6. 200 µl de etanol (96-100%) au fost adăugate peste fiecare probă după care conținutul tuburilor a fost amestecat prin puls-vortexare pentru 15 secunde.Tuburile cu amestecul au fost apoi centrifugate din nou pentru scurt timp pentru a îndepărta picăturile care se pot forma în interiorul capacului.
7. Amestecul de la pasul 6 a fost transferat cu atenție (fără a uda marginile) într-o coloană ce centrifugare QIAmp Mini plasată într-un tub de colecționare de 2 ml. S-a închis capacul coloanei de centrifugare pentru a evita formarea de aerosoli și s-a centrifugat la 8 000 rpm (6 000 x g) timp de 1 minut. Centrifugarea la viteză maximă 14 000 rpm (20 000 x g) nu afectează cantitatea sau puritatea ADN-ului. Dacă lizatul nu a trecut complet prin membrana de filtrare a coloanei de centrifugare după centrifugare, atunci se poate centrifuga din nou la o viteză superioară până când coloana de centrifugare este goală.
Coloana de centrifugare a fost apoi plasată într-un tub de colecționare nou de 2 ml în timp ce tubul care conține filtratul se aruncă.
8. 500 µl de soluție Buffer AW1 a fost adăugată coloanei de centrifugare QIAmp Mini cu atenție pentru a nu uda marginile după care tubul de colecționare conținând coloana de centrifugare QIAmp Mini a fost centrifugat la 8 000 rpm (6 000 x g) timp de 1 minut.
Coloana de centrifugare QIAmp Mini a fost apoi plasată într-un tub nou de colecționare de 2 ml. Nu este necesară creșterea cantității pentru soluția Buffer AW1 chiar dacă volumul original al probei a fost mai mare de 200µl
9. 500 µl de soluție Buffer AW2 a fost adăugată coloanei de centrifugare QIAmp Mini cu atenție pentru a nu uda marginile după care tubul de colecționare conținând coloana de centrifugare QIAmp Mini a fost centrifugat la viteză maximă de 14 000 rpm (20 000 x g) timp de 3 minute.

10. S-a plasat coloana de centrifugare într-un tub nou de colecționare de 2 ml și s-a mai centrifugat încă 1 minut la viteză maximă. Prin acest pas se asigură eliminarea oricărei contaminări cu soluția Buffer AW2.
11. 200 µl de soluție Buffer AE sau apă distilată a fost adăugată în coloana de centrifugare QIAamp Mini, a fost plasată într-un tub nou de microcentrifugare de 1,5 ml și după 1 minut de incubare la temperatura camerei a fost centrifugată 1 minut la 8 000 rpm (6 000 x g). Repetarea acestui pas cu alte 200 µl soluție Buffer AE crește extracția de ADN cu 15%. Incubarea coloanei de centrifugare încărcate cu soluție Buffer AE sau apă distilată la temperatura camerei înainte de centrifugare timp de 5 minute crește în general cantitatea de ADN care este extrasă.
Pentru păstrarea pe termen lung a ADN-ului extras la -20°C se recomandă ca pasul 11 să fie realizat cu soluție Buffer AE și nu apă distilată, deoarece ADN-ul depozitat în apă este supus hidrolizei acide.

Acest kit este folosit pentru purificarea ADN total (genomic, mitocondrial și viral). Se pot folosi urmatoarele lichide biologice: sânge integral, plasmă, ser, limfocite) utilizând o microcentrifuga. Centrifugările se realizează la temperatura camerei (15-29° C). Din 200 µl de sânge integral se obțin 3-12 µg de ADN.

8.2.3. Cuantificarea concentrației și a puritatei ADN

Pentru a măsura concentrația ADN-ului și puritatea sa a fost folosit spectrofotometrul NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA). Acest spectrofotometru cu un spectru cuprins între 220 nm și 750 nm poate măsura probe de 1 µl cu mare acuratețe și reproductibilitate, utilizând o modalitate patentată de fixare a probei bazată pe tensiunea superficială a probei fără a fi necesare alte cuve sau containere pentru a pune probele în poziție. Poate evalua probe nediluate cu o concentrație de 50 ori mai mare decât probele măsurate de un spectrofotometru cu cuvă cu mare rapiditate (în jur de 30 secunde). Pentru aceasta 1 µl din probă este pipetat la capătul unui cablu de fibra optică (fibra primitoare) iar apoi un alt cablu optic

(cablul sursă) este adus în contract cu proba lichidă astfel încât lichidul se comportă ca o punte între cele două cabluri optice.

Sursa de lumină ultravioletă (UV) o reprezintă lampa pulsată flash xenon iar analizarea luminii care străbate proba este realizată de un spectrofotometru (<http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>).

Acizii nucleici absorb lumina UV cu lungimea de undă de 260 nm. Cu cât mai multă lumină este absorbită cu atât mai mare este concentrația ADN-ului.

Datele sunt apoi prelucrate de către software-ul computerului ce controlează procesul, care furnizează astfel în mod automat concentrația de ADN și arhivează datele obținute.

Pentru genotiparea polimorfismelor mononucleotidice s-au realizat diluții astfel încât ADN-ul utilizat a avut concentrația de 10 ng/µl pentru toate probele folosite (pacienți, martori).

Principiul măsurării puritatei probelor de ADN se bazează pe faptul că în timp ce acizii nucleici absorb lumina UV cu o lungime de undă de 260 nm, aşa cum am văzut mai sus, contaminatorii, în special proteinele și mai ales cele care conțin aminoacizi aromatici, absorb lumina UV cu o lungime de undă de 280 nm. Astfel puritatea ADN-ului poate fi determinată prin aflarea calcularea așa numitului raport 260/280. Un raport 260/280 de 1,8 este acceptat ca pur pentru ADN. Un raport mai scăzut este indicativ pentru prezență de proteine, fenoli sau alți factori de contaminare care absorb lumina UV cu o lungime de undă de 280 nm.

Probele incluse în studiu au avut puritate crescută, permitând genotiparea cu ajutorul tehniciilor de polimerizare în lanț (PCR - polymerase chain reaction) de tip Real Time PCR care în general necesită ADN de înaltă calitate.

8.2.4. Genotiparea polimorfismelor -238G/A și -308G/A ale promotorului genei TNF- α

Genotiparea celor două polimorfisme mononucleotidice ale genei *TNF-alfa* -238G/A (rs361525) și -308G/A (rs1800629) s-a efectuat cu metoda Real-time PCR utilizând aparatul 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA by Life Technologies, USA) aflat în dotarea laboratorului Disciplinei de Fiziopatologie și Imunologie a UMF "Carol Davila", București. [297]

Genotiparea polimorfismelor de interes s-a realizat cu ajutorul a două kituri TaqMan Allelic Discrimination Assay (C_2215707_10,C_7514879_10, Applied Biosystems, USA) în conformitate cu protocolul oferit de producător (https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/TaqMan_SNP_Genotyping_Assays_m_an.pdf) și utilizând aparatul 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems by Life Technologies, USA) aflat în dotarea laboratorului Disciplinei de Fiziopatologie și Imunologie a UMF "Carol Davila", București.

Principiul metodei Real-Time PCR presupune monitorizarea produsului PCR prin utilizarea unor coloranți fluorescenti care sunt atașați de sondele oligonucleotidice și care sunt proporționali cu cantitatea de acizi nucleici formată; în același timp numărul de cicluri de amplificare necesare pentru a obține o anumită cantitate de molecule ADN este înregistrat (figura 8.1.). Deoarece se poate presupune că fiecare ciclu de amplificare duce la dublarea numărului de molecule formate în ciclul anterior, se poate aprecia numărul inițial de molecule prezente în probă inițială cu o sensibilitate și specificitate foarte înalte.

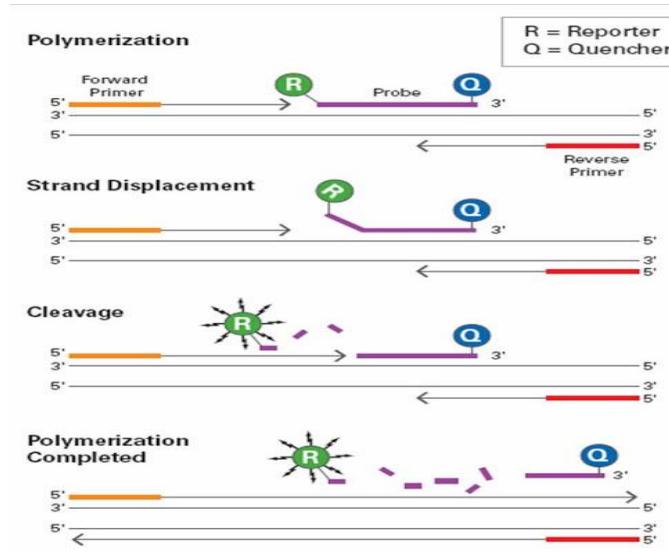


Figura 8.1. Etapele metodei real-time PCR

Metoda Real-Time PCR utilizează primeri specifici secvenței de interes, Taq polimerază, sonde care au atașat un colorant fluorescent la capătul 5' și un quencher (inhibitor / supresor al fluorescentului) la capătul 3' și care se aliniază aceleiași secvențe întă ca și

primerii. Atâtă timp cât sonda este intactă și quencher-ul rămâne în strânsă proximitate cu substanța fluorescentă semnalul luminos nu va fi detectabil. În timpul amplificării, după denaturarea ADN, urmează alinierea primerilor dar și a sondelor cu fluorocromii. Odată cu procesul de extensie Taq polimeraza alungește primerul, iar când atinge capătul 5' al sondelor îndepărtează fluorocromul, semnalul lui putând fi astfel măsurat din moment ce nu mai este supresat de quencher.

Acest proces se repetă cu fiecare ciclu de amplificare ceea ce înseamnă că intensitatea fluorocromului va fi direct proporțională cu cantitatea de produs PCR(figura 8.2.)

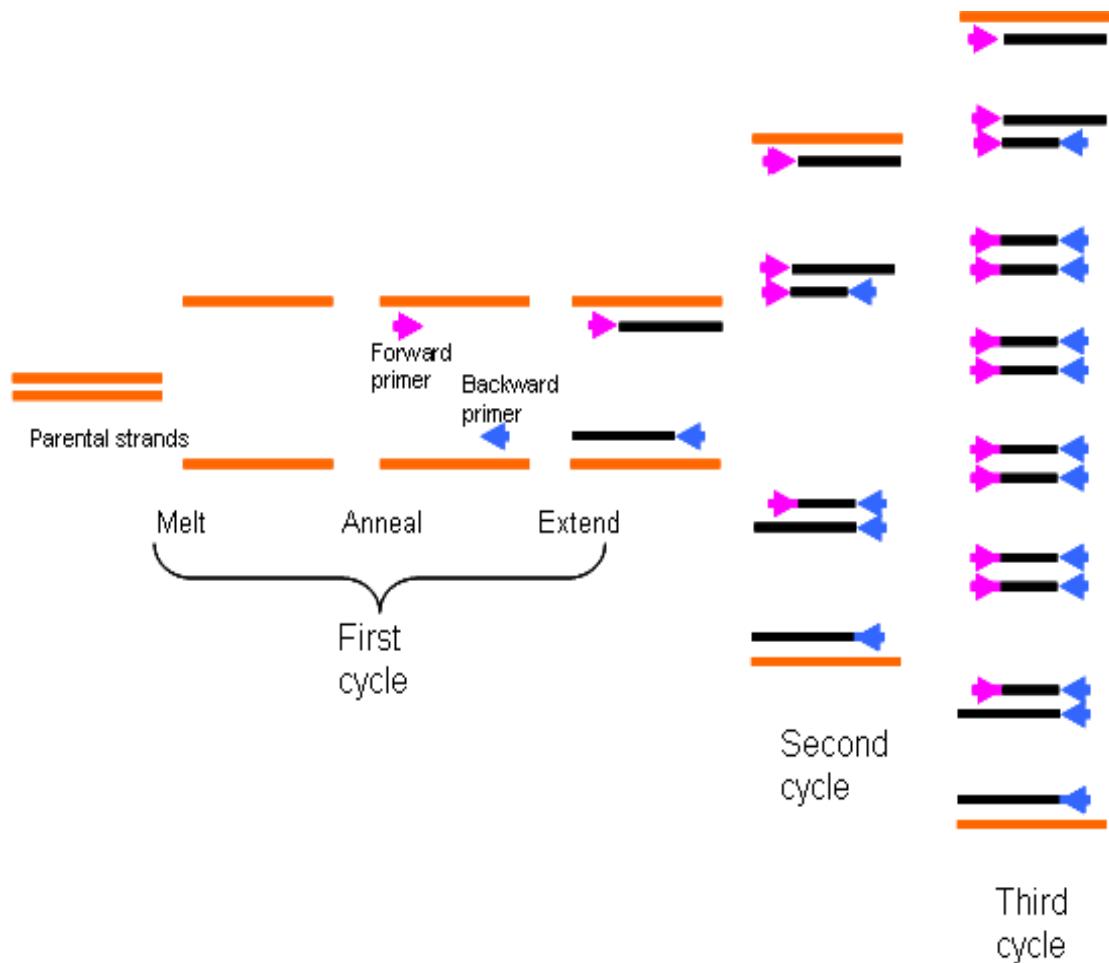


Figura 8.2. Imagine schematică a procesului de amplificare

Pentru genotiparea unor polimorfisme mononucleotidice tehnica Real-Time PCR este adaptată după cum urmează: sondele sunt marcate cu două substanțe fluorescente diferite, una pentru alela comună (wild type) și una pentru alela minoră (mutantă). Dacă rezultatele testului arată că este produsă doar culoarea care a marcat alela comună, atunci subiectul este homozigot pentru alela comună, dacă este produsă doar culoarea care a marcat alela mutantă, atunci subiectul este homozigot pentru alela mutantă, iar dacă ambele culori fluorescente sunt produse, atunci subiectul este heterozigot. (Figura 8.3.)

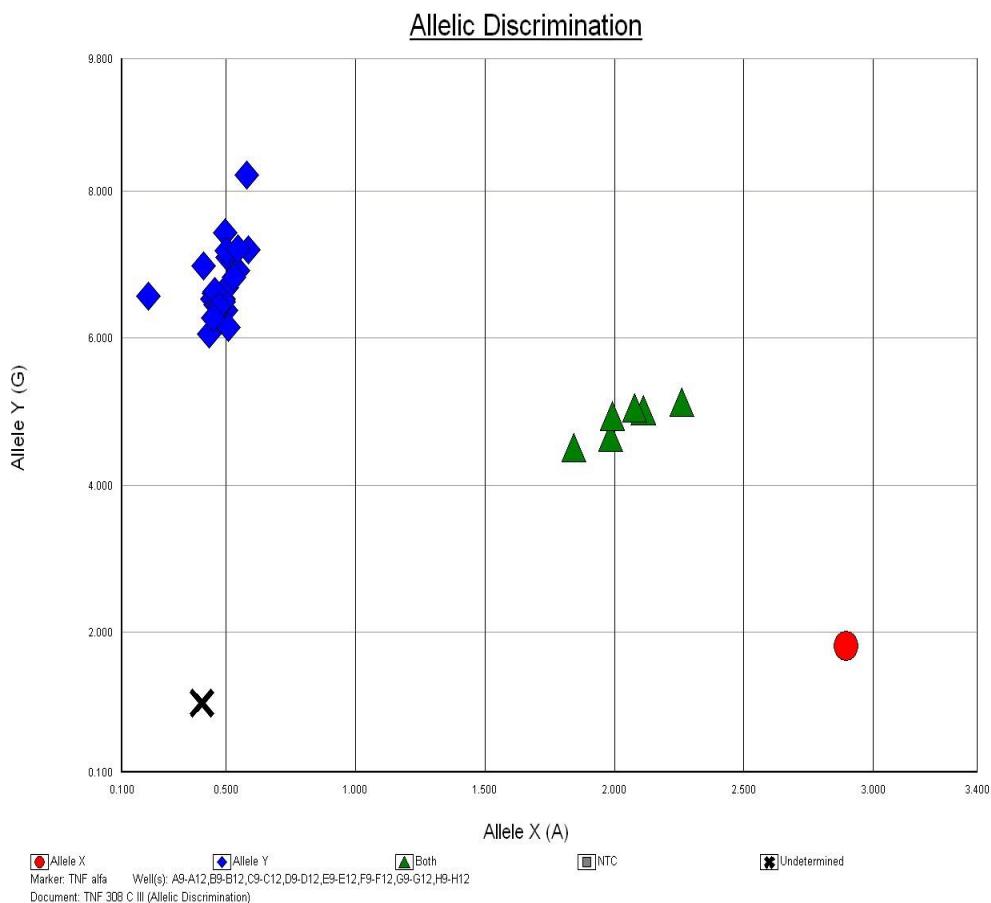


Figura 8.3. Diagramă punctată cu rezultatele reacției TaqMan Real-Time PCR.

Kitul TaqMan Allelic Discrimination Assay folosește sondă TaqMan® ce încorporează tehnologia MGB (minor groove-binding) la capătul 3' capabilă să ofere o discriminare alelică superioară. Molecula MGB stabilizează complexul sonda MGB – template ADN și permite ca sonde scurte de chiar și 13 nucleotide să fie eficiente în îmbunătățirea discriminării între

secvențe variabile. Ele prezintă diferențe mai mari ale temperaturilor de topire dintre sondele complementare unei alele și cele complementare alelei mutante, fapt ce explică discriminarea alelică superioară menționată anterior (*TaqMan® SNP Genotyping Assays User Guide – Pub. No. MAN00009593*). Sondele MGB includ și un quencher non-fluorescent care permite măsurarea fluorescentului cu o precizie superioară, eliminând fluorescența de fond și oferind un excelent raport semnal - zgomot de fond pentru o sensibilitate superioară a testului.

Sondele TaqMan® MGB sunt constituite din oligonucleotide specifice (complementare alelei țintă) marcate la capătul 5' cu două tipuri de fluorocromi: VIC® pentru sonda alela 1 și FAM™ pentru sonda alela 2. (Tabelul 8.1.).

Tabelul 8.1. Corelația dintre semnalul fluorescent și genotipul probei

Semnal Fluorescent	Genotipul probei
Semnal VIC®	Alela 1 homozigot
Semnal FAM™	Alela 2 homozigot
Semnal VIC® și FAM™	Alela 1 și 2 heterozigot

Programarea termocyclerului s-a realizat în conformitate cu indicațiile producătorului. (Tabelul 8.2.)

Tabelul 8.2. Parametrii ciclurilor de amplificare pentru TaqMan Allelic Discrimination Assay.

Pas	Temperatură (°C)	Timp (secunde)	Acțiune
1. 1 ciclu	95°	10 min	Activare enzimatică AmpliTaq Gold®
2. 40 cicluri	92°C 60°C	15 sec. 60 sec.	Denaturare Aliniere primeri și Extensie

După etapa de amplificare s-a realizat citirea plăcii cu ajutorul softwear-ului PC al aparatului 7300 Real-Time PCR.

Utilizând măsurătorile semnalelor fluorescente care au fost făcute în timpul etapei de amplificare, acesta realizează o reprezentare grafică a semnalului fluorescent al fiecărui godeu (deci a fiecărei probe) care permit atribuirea uneia dintre cele trei caracteristici posibile pentru proba în cauză: homozigot alela 1, homozigot alela 2 și heterozigot.

Toate soluțiile supuse reacției au fost preparate prin adăugarea unei mixturi constituite din $2\times$ TaqMan Master Mix (Applied Biosystems, USA) și $20\times$ ready-to-use Genotyping Assay Mix de primeri și probe.

Volumul total de soluție a fost stabilit la $15\ \mu\text{l}$ fiind constituit din următoarele: $7.5\ \mu\text{l}$ TaqMan GenotypingMaster Mix, $0.75\ \mu\text{l}$ $20\times$ Genotyping Assay Mix (primeri nemarcați și probe dye-labeled TaqMan MGB FAM și VIC), $6.75\ \mu\text{l}$ ADN (ADN diluat în apă până la o concentrație între 30-50ng/reacție).

8.2.5. Analiza statistică

Frecvențele alelice și genotipice au fost comparate între grupul pacienților și grupul control, precum și între subgrupurile de pacienți și grupul control în anumite cazuri. Testul Chi pătrat a fost utilizat pentru a testa eventualele deviații genotipice de la echilibrul Hardy-Weinberg (HWE) pentru fiecare polimorfism mononucleotidic studiat, atât pentru grupul control cât și pentru grupul de pacienți. [298]

HWE reflectă situația în care o populație prezintă frecvențe genotipice definite constante de la o generație la alta, acestea fiind cuantificabile pornind de la frecvențele alelice utilizând formula HWE. Aceasta din urmă este o ecuație matematică ce poate fi utilizată pentru a calcula variațiile genetice ale unei populații aflate în echilibru. A fost formulată de G.H. Hardy și Wilhelm Weinberg în 1908, ca metodă de calcul, plecând de la premiza că modificările genetice apărute la nivelul unei populații de la o generație la alta rămân constante în absența factorilor perturbatori. [298]

Pentru o mai bună înțelegere a noțiunilor, voi exemplifica presupunând analiza unui locus genetic la nivelul căruia există două alele A și a. Ecuația HWE se calculează după formula:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

unde p reprezintă frecvența alelei "A" și q reprezintă frecvența alelei minore "a" în populație. În ecuație, p^2 reprezintă, de fapt, frecvența genotipului homozigot AA, q^2 frecvența genotipului homozigot aa, iar $2pq$ este frecvența genotipului heterozigot Aa. Suplimentar, suma frecvenșelor alelice pentru un anumit locus trebuie să fie egală cu 1, adică $p + q = 1$. [298]

Dacă frecvențele alelice p și q sunt cunoscute pentru o populație studiată, atunci frecvențele celor trei genotipuri pot fi calculate utilizând această formulă. În studiile genetice populационale, această formulă are rolul de a măsura dacă o frecvență genotipică observată în populație diferă de frecvența prezisă de ecuație. [298]

Eșecul obținerii echilibrului HWE reprezintă o metodă de deteție a posibilelor erori de genotipare chiar dacă este puțin sensibilă și nespecifică. Marea majoritate a testelor HWE au putere statistică limitată dată de loturile studiale cu subiecți puțini, astfel existând riscul apariției rezultatelor fals negative. Pe de altă parte, atunci când se analizează loturi foarte mari de pacienți, testelet pot detecta minime deviații HWE care nu trebuie interpretate ca erori de genotipare. [298]

Testele de asociere genetică au fost realizate cu programul online DeFinetti (<http://ihg2.helmholtzmuenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) (Strom and Wienker, accesat în 2018). Magnitudinea asocierilor a fost evaluată utilizând odds ratio și am calculat intervalele de confidență de 95% (95% CI).

8.3.Rezultate

Pentru analiza finală am avut la dispoziție două loturi de subiecți. Primul lot de 123 de subiecți a fost reprezentat de pacienții cu boli inflamatorii intestinale, denumit grup de studiu, care, ulterior, a fost divizat pentru analize suplimentare în două subgrupuri în funcție de diagnosticul de boală – colită ulcerativă sau boală Crohn. Al doilea lot de 160 de subiecți a

reprezentat lotul martor, probele fiind prelevate de la pacienți fără patologii cunoscute, potențial donatori de măduvă osoasă. Datele demografice și fenotipice ale grupului de studiu sunt prezentate în tabelul 8.3.

Tabelul 8.3. Caracteristicile clinice și fenotipice ale lotului de studiu (Clasificarea Montreal pentru descrierea fenotipică a bolii Crohn și pentru extensia colitei ulcerative).

Diagnostic	Boală Crohn (n=70)	Colită ulcerativă(n=53)
Vârstă la diagnostic	33.9 (19-52)	33.81 (16-71)
Raport pe sexe(F/B)	34/36	17/36
Clasificarea Montreal		
Vârstă(CD)	A1: 1 (0.01%) A2: 57 (81.42%) A3: 12 (18.57%)	
Localizarea(CD)/Extensie(UC)	L1: 26 (37.1%) L2: 17 (24.3%) L3: 27 (38.6%)	E1: 6 (11.3%) E2: 28 (52.8%) E3: 19 (35.8%)
Pattern evolutiv(CD)	B1: 31 (44.3%) B2: 21 (30.0%) B3: 18 (27.7%)	
Răspuns la tratament antiTNF		
N/A	14 (20%)	32 (60.3%)
Da	42 (60%)	15 (28.3%)
Nu	14 (20%)	6 (11.3%)
Necesar de optimizare tratament		
N/A	70(100%)	32 (60.3%)
Da	-	12 (22.6%)
Nu	-	9 (17.0%)
Efecte adverse ale tratamentului antiTNF		
N/A	14 (20%)	32 (60.3%)
Da	10 (14.3%)	1 (1.9%)
Nu	46 (65.7%)	20 (37.7%)
Manifestări extraintestinale prezente		
Da	20 (28.6%)	10 (18.9%)
Nu	50 (71.4%)	43 (81.1%)
Colectomie		
Da	-	4 (7.5%)
Nu	-	49 (92.5%)

Frecvențele celor 3 genotipuri posibile în cele 4 subgrupuri de subiecți, pentru cele două polimorfisme mononucleotidice analizate sunt ilustrate în figurile 8.4. și 8.5.

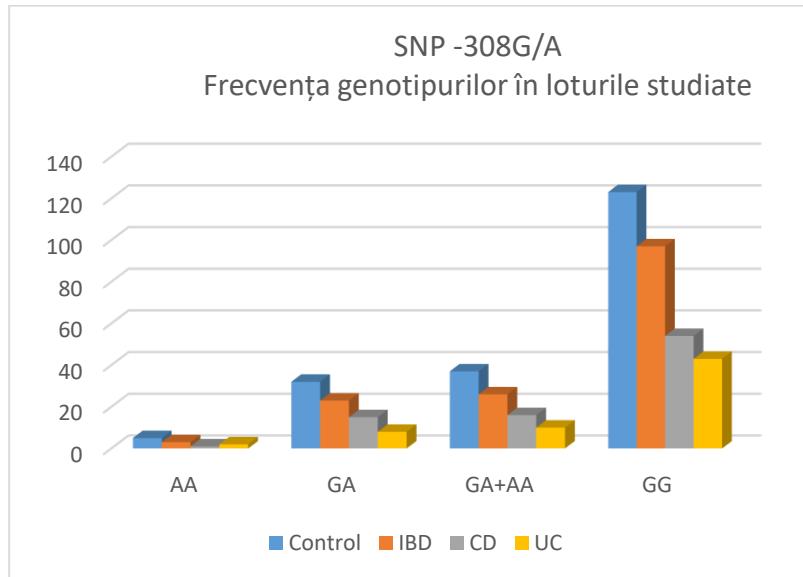


Figura 8.4. Frecvența genotipurilor pentru SNP -308G/A în loturile studiate.

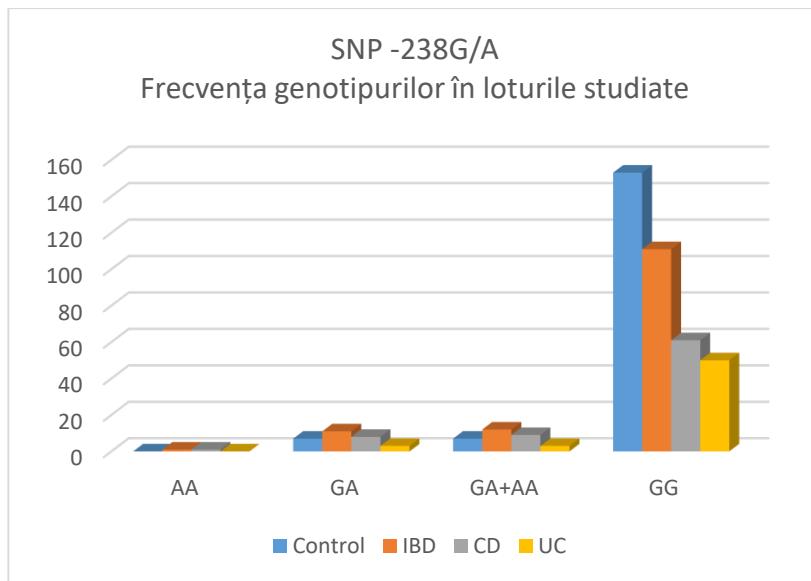


Figura 8.5. Frecvența genotipurilor pentru SNP -238G/A în loturile studiate.

Lotul de martori sănătoși și lotul de pacienți a fost în HWE pentru ambele polimorfisme mononucleotidice investigate.

S-a observat o frecvență semnificativ crescută a alelei minore A pentru SNP -238G/A în subgrupul pacienților cu boală Crohn($p=0.009$, OR 3.440). Această asociere rămâne semnificativă în urma aplicării corecției Bonferroni ($p_{\text{cor.}}=0.01$). Corecția Bonferroni trebuie aplicată atunci când într-un studiu sunt testate mai multe ipoteze pentru același set de date; în cazul nostru sunt testate două ipoteze individuale care se referă la posibilitatea de asociere cu boala a două polimorfisme mononucleotidice investigate în aceleași loturi de martori sănătoși, respectiv, pacienți. Astfel dacă inițial valorile p sunt considerate semnificative statistic dacă sunt mai mici de 0,05, după corecția Bonferroni valoarea p ar trebui să fie mai mică decât $\frac{0.05}{2}$, adică <0.025 .

Tabel 8.4. Rezultatele studiului de asociere a polimorfismelor mononucleotidice(SNP) ale genei TNF- α cu colita ulcerativă(UC).

SNP	Controls N (%)	UC N (%)	Statistics
TNF-α			
rs1800629			
Minor allele			
A	42 (13.1%)	12 (11.3%)	OR 0.845 95% CI 0.42-1.67 $p=0.62$
Genotype			
AA+GA	5+32 (23.1%)	2+8 (18.9%)	OR 0.773
GG	123 (76.9%)	43 (81.1%)	95%CI 0.35-1.68 $p=0.51$
rs361525			
Minor allele			
A	7 (2.2%)	3 (2.8%)	OR 1.302 95%CI 0.33-5.12 $p=0.73$
Genotype			
AA+GA	0+7 (4.3%)	0+3 (5.7%)	OR 1.311
GG	153 (95.7%)	50 (94.3%)	95%CI 0.32-5.26 $p=0.70$

OR, odds ratio; CI, 95% interval de confidență; valorile $p <0.05$ sunt indicate în roșu.

De asemenea, purtătorii alelei minore (genotipurile GA+AA) au fost semnificativ mai numeroși la pacienți comparativ cu martorii ($p=0.01$, OR 3.225, tabel 9.5). În lotul pacienților cu colită ulcerativă frecvențele alelei minore și ale genotipurilor GA și AA au fost ușor crescute față de martori, dar fără semnificație statistică. Ca o consecință a acestor rezultate, la analiza comparativă dintre lotul de pacienți cu boli inflamatorii intestinale global și lotul control, s-a observat o frecvență semnificativ crescută a alelei minore a acelaiași SNP ($p=0.04$, $p_{cor}>0.05$), dar fără a se reproduce și frecvența genotipică crescută (tabel 9.6). Aceste date sugerează că purtătorii alelei minore a SNP -238G/A au un risc crescut de a dezvolta boala inflamatorie intestinală în general, și boala Crohn în special, în populația din România.

Tabel 8.5. Rezultatele studiului de asociere a polimorfismelor mononucleotidice(SNP) ale genei TNF- α cu boala Crohn(CD).

SNP	Controls N (%)	CD N (%)	Statistics
TNF-α rs1800629			
Minor allele			
A	42 (13.1%)	17(12.14%)	OR 0.915 95% CI 0.50-1.67 p=0.77
Genotype			
AA+GA	5+32 (23.1%)	1+15 (22.9%)	OR 0.985
GG	123 (76.9%)	54 (77.1%)	95%CI 0.50-1.92 p=0.96
rs361525			
Minor allele			
A	7 (2.2%)	10 (7.14%)	OR 3.440 95%CI 1.28-9.23 p=0.009
Genotype			
AA+GA	0+7 (4.3%)	1+8 (12.9%)	OR 3.225
GG	153 (95.7%)	61 (87.1%)	95%CI 1.15-9.04 p=0.01

OR, odds ratio; CI, 95% interval de confidență; valorile $p <0.05$ sunt indicate în roșu.

Pentru SNP -308G/A am observat o frecvență mai redusă a alelei minore A în toate subgrupurile de pacienți, comparativ cu lotul control. Valorile obținute nu au atins pragul semnificației statistice, dar pot sugera că prezența alelei minore a acestui SNP ar putea reprezenta un factor de protecție împotriva dezvoltării bolilor inflamatorii intestinale, indiferent de tipul bolii, în populația din Romania (tabele 8.4, 8.5 și 8.6).

În ceea ce privește corelarea polimorfismelor investigate cu anumite caracteristici clinice ale pacienților, s-au obținut rezultate foarte interesante legate de prezența manifestărilor extraintestinale. Astfel, după cum se poate observa în tabelele 8.7, 8.8 și 8.9, atât frecvențele alelei minore, cât și frecvențele genotipice pentru polimorfismul -308G/A au fost mult crescute în subgrupul pacienților ce prezintau manifestări extraintestinale față de subgrupul pacienților care nu prezintau aceste complicații, atât pentru colita ulcerativă, cât și pentru boala Crohn și implicit pentru lotul de IBD în ansamblu. Pentru colita ulcerativă s-a observat o asociere similară și pentru polimorfismul -238G/A.

Nu s-au obținut corelații semnificative din punct de vedere statistic cu alte caracteristici fenotipice, cum ar fi vârsta mai mică la debut, deși era așteptată o astfel de asociere având în vedere că acest parametru reprezintă un factor predictiv pentru evoluția debilitantă a bolilor inflamatorii intestinale pe termen lung, cu extensia lezională, cunoscută ca și factor predictiv de evoluție agresivă și răspuns slab la tratament maximal, sau cu pattern-ul de evoluție al bolii Crohn. Ar fi, totuși, de menționat faptul că analiza comparativă a pacienților grupați după localizare ca E2+E3 versus E1 în subgrupul de colită ulcerativă a evidențiat o frecvență alelică și genotipică crescută pentru SNP -238G/A, sugerând o susceptibilitate crescută pentru a asocia o colită ulcerativă mai extensivă, dar lotul pacienților cu E1 a avut doar 6 subiecți, motiv pentru care această observație este, cel puțin pentru moment, lipsită de relevanță (date neprezentate).

Tabel 8.6. Rezultatele studiului de asociere a polimorfismelor mononucleotidice(SNP) ale genei TNF- α cu bolile inflamatorii intestinale(IBD).

SNP	Controls N (%)	IBD N (%)	Statistics
TNF-α rs1800629			
Minor allele			
A	42 (13.1%)	29 (11.7%)	OR 0.885 95% CI 0.53-1.46 p=0.63
Genotype			
AA+GA	5+32 (23.1%)	3+23 (21.1%)	OR 0.891
GG	123 (76.9%)	97 (78.9%)	95%CI 0.50-1.57 p=0.69
rs361525			
Minor allele			
A	7 (2.2%)	13 (5.2%)	OR 2.495 95%CI 0.98-6.35 p=0.04
Genotype			
AA+GA	0+7 (4.3%)	1+11 (9.8%)	OR 2.363
GG	153 (95.7%)	111 (90.2%)	95%CI 0.90-6.19 p=0.07

OR, odds ratio; CI, 95% interval de confidență; valorile p <0.05 sunt indicate în roșu.

De asemenea, nu am observat corelații între polimorfismele studiate și răspunsul la tratamentul cu agenți antiTNF sau efectele adverse ale acestui tratament în cazul ambelor loturi de pacienți.

Tabel 8.7. Rezultatele studiului de asociere a polimorfismelor mononucleotidice(SNP) ale genei TNF- α cu prezența manifestărilor extraintestinale(EIM) asociate colitei ulcerative(UC).

SNP	Pacienți cu UC fără EIM N (%)	Pacienți cu UC cu EIM N (%)	Statistics
TNF-α rs1800629			
Minor allele			
A	6 (5.6%)	6 (30.0%)	OR 5.571 95% CI 1.57-19.77 p=0.015
Genotype			
AA+GA	2+2 (9.5%)	0+6 (60.0%)	OR 14.250
GG	38 (90.5%)	4 (40.0%)	95%CI 2.78-72.84 p=0.0002
rs361525			
Minor allele			
A	0 (0.0%)	3 (15.0%)	OR 33.800 95%CI 1.67-684.04 p=0.01
Genotype			
AA+GA	0+0 (0.0%)	0+3 (30.0%)	OR 39.667
GG	42 (100%)	7 (70.0%)	95%CI 1.85-848.68 p=0.0002

OR, odds ratio; CI, 95% interval de confidență; valorile p <0.05 sunt indicate în roșu.

Tabel 8.8.Rezultatele studiului de asociere a polimorfismelor mononucleotidice(SNP) ale genei TNF- α cu prezența manifestărilor extraintestinale(EIM) asociate bolii Crohn(CD).

SNP	Pacienți cu CD fără EIM N (%)	Pacienți cu CD cu EIM N (%)	Statistics
TNF-α rs1800629			
Minor allele			
A	7 (7.0%)	10 (25.0%)	OR 4.429 95% CI 1.55-12.65 p=0.007
Genotype			
AA+GA	0+7 (14.0%)	1+8 (45.0%)	OR 5.026
GG	43 (86.0%)	11 (55.0%)	95%CI 1.53-16.50 p=0.005
rs361525			
Minor allele			
A	6 (6.0%)	4 (10.0%)	OR 1.741 95%CI 0.46-6.53 p=0.47
Genotype			
AA+GA	1+4 (10.0%)	0+4 (20.0%)	OR 2.250
GG	45 (90.0%)	16 (80.0%)	95%CI 0.53-9.43 p=0.25

OR, odds ratio; CI, 95% interval de confidență; valorile p <0.05 sunt indicate în roșu.

Tabel 8.9. Rezultatele studiului de asociere a polimorfismelor mononucleotidice(SNP) ale genei TNF- α cu prezența manifestărilor extraintestinale(EIM) asociate bolilor inflamatorii intestinale(IBD) – lotul de studiu.

SNP	Pacienți cu IBD fără EIM N (%)	Pacienți cu IBD cu EIM N (%)	Statistics
TNF-α rs1800629			
Minor allele			
A	13 (7.0%)	16 (20.0%)	OR 4.783 95% CI 2.14-10.68 p=0.00005
Genotype			
AA+GA	2+9 (11.9%)	1+14 (50.0%)	OR 7.364
GG	81 (88.1%)	15 (50.0%)	95%CI 2.83-19.10 p=0.00001
rs361525			
Minor allele			
A	6 (3.2%)	7 (11.6%)	OR 3.918 95%CI 1.26-12.16 p=0.02
Genotype			
AA+GA	1+4 (5.4%)	0+7 (23.3%)	OR 5.296
GG	87 (94.6%)	23 (76.7%)	95%CI 1.53-18.23 p=0.004

OR, odds ratio; CI, 95% interval de confidență; valorile p <0.05 sunt indicate în roșu.

8.4.Discuții

TNF-α reprezintă o citokină cheie în procesul inflamator implicat în bolile inflamatorii intestinale, fiind implicată, aşa cum am discutat mai sus, atât în manifestările locale, de organ, cât și în cele sistemiche, ale acestor boli. Cercetarea locusului -308 de la nivelul zonei promotor a genei *TNF-alpha* a pus în evidență o relație cu modul de prezentare clinică a bolii. [299,300] O noutate a acestui studiu o reprezintă asocierea alelei minore în cazul ambelor SNP-uri studiate cu prezența manifestărilor extraintestinale, fapt ce ar putea fi explicat la nivel fiziopatologic prin existența unei încărcături inflamatorii sistemiche crescute la acești pacienți, fapt concordant în final cu observațiile de mai sus legate de manifestări fenotipice mai severe la purtătorii aleiei minore. [301–303]

Câteva polimorfisme mononucleotidice (SNP) în regiunea promotor a genei *TNF-α* au fost studiate și atribuite modificărilor observate în expresia genică (-238G/A și -308G/A). Asemenea variații la nivelul zonei promotor a genei au fost asociate anterior cu susceptibilitatea crescută de a dezvolta o paletă de boli autoimune, astm, psoriazis și artrită reumatoidă.[292,304,305] În ceea ce privește bolile inflamatorii intestinale, polimorfismul -308G/A se asociază cu susceptibilitatea de a dezvolta o astfel de boală în populații diferite din Japonia, China, dar și Europa. Pe de altă parte, există multe date care nu confirmă această asociere provenind din populații caucaziene din Australia, Cehia și Canada, unde nu s-au găsit asocieri semnificative pentru alela minoră a acestui SNP cu susceptibilitatea de a dezvolta boala. [291,306,307] În acest context, o meta-analiză recentă care și-a propus uniformizarea acestor date a concluzionat că aceste discrepanțe în frecvențele alelice și genotipice sunt secundare fondului genetic diferit din aceste populații. [72,295,300,308] Datele prezentului studiu confirmă absența asocierii dintre alela minoră a acestui SNP și susceptibilitatea de boală observată la pacienții caucazieni.

O altă observație interesantă din literatură subliniază asocierea genotipurilor ce conțin alela minoră a SNP -308G/A cu gradul crescut al inflamației sistemiche prin corelație cu valorile proteinei C reactive și *TNF-α* circulante în episoadele de activitate a bolilor inflamatorii, în special la pacienții cu fenotip fistulizant al bolii Crohn. [301,302,309] Mai mult, Kim și colaboratorii au observat o frecvență alelică mai mare a aleiei minore în cazul pacienților cu

anticorpi anticitoplasmă neutrofilică, sugerând asocierea acestui SNP cu comportamentul evolutiv al bolii Crohn. [303] În studiul nostru nu am observat niciuna din corelațiile mai sus discutate legate de caracteristicile fenotipice și evolutive ale bolii Crohn.

Într-un studiu recent pe pacienți cu boli inflamatorii intestinale sub tratament cu agenți biologici antiTNF- α , ce a investigat rolul SNP -308G/A, nu s-au observat diferențe semnificative statistic pentru frecvențele alelice și genotipice între grupurile cu cele două boli inflamatorii studiate – colită ulcerativă și boală Crohn, dar s-a evidențiat o frecvență crescută a alelei minore -308A și a genotipului GA în rândul non-responderilor la tratament, comparativ cu pacienții responderi. De altfel, acest genotip a fost clasificat ca „high-producer” de *TNF- α* , fapt ce ar putea explica răspunsul diferit al pacienților la tratament. Se poate postula că în cazul acestor pacienți ce produc cantități crescute de *TNF- α* care fac ca dozele de tratament să nu fie suficiente pentru a suprima întreaga cantitate de citokină circulantă, astfel contribuind la răspunsul slab observat la nivel clinic. [248,310] În cazul studiului nostru, am obținut o frecvență alelică crescută, dar fără semnificație statistică, a alelei minore a SNP -308G/A în subgrupul pacienților cu răspuns bun la agenți biologici comparativ cu non-responderii. Pe de altă parte, o observație interesantă este reprezentată de frecvența alelică crescută a alelei minore a SNP -238G/A în subgrupul pacienților cu boală Crohn non-responderi la tratament biologic comparativ cu pacienții responderi, ce vine în contradicție cu concluziile unei metaanalize recente ce a urmărit implicațiile mai multor polimorfisme mononucleotidice ale genei *TNF α* în prezicerea răspunsului la această clasă de molecule la pacienții cu spondilartropatii, psoriazis și boală Crohn. Totuși, se poate discuta bias-ul legat de patologia subiacentă, metaanaliza citată evaluând „en-gros” toate bolile studiate producând un posibil efect de „diluție” a rezultatelor, care poate influența răspunsul la tratament prin intermediul parametrilor legați de boala, în mod independent de fondul genetic. [311]

Tot referitor la SNP -238G/A, un studiu iranian al lui Naderi et al. din 2014 a observat o frecvență mai mare a alelei minore în grupul pacienților cu boală Crohn, dar fără a atinge semnificația statistică, concluzie concordantă cu datele existente până atunci în literatură provenite din studii pe populații din Ungaria, Canada, Japonia și China. [295,312–314] Rezultatele noastre confirmă aceste rezultate, atingând totodată și semnificația statistică pentru această asociere, sugerând o susceptibilitate crescută pentru dezvoltarea bolii Crohn la purtătorii

alelei minore A a acestui SNP comparativ cu lotul control. Observația nu a fost validată pentru pacienții cu colită ulcerativă.

8.5. Concluzii

Studiul de față reprezintă primul proiect la nivel național ce a analizat implicațiile polimorfismelor mononucleotidice ale genei TNF- α în domeniul bolilor inflamatorii intestinale din România. Analiza datelor de la cei 123 pacienți comparativ cu cei 160 subiecți control a pus în evidență câteva corelații semnificative din punct de vedere statistic, cu implicații în stratificarea riscului de a dezvolta boală inflamatorie și, respectiv, de a dezvolta complicații extraintestinale ale acestora.

Practic, prezentul studiu confirmă faptul că prezența alelei minore pentru SNP -238G/A reprezintă un factor de risc genetic pentru dezvoltarea bolii Crohn, dar nu și a colitei ulcerative.

De asemenea, prezența alelei minore pentru ambele SNP-uri analizate s-a asociat semnificativ statistic cu riscul de dezvoltare a manifestărilor extraintestinale asociate bolilor inflamatorii intestinale. Totuși, aici trebuie subliniat faptul că afirmația de mai sus este valabilă doar pentru colita ulcerativă, în cazul bolii Crohn fiind vorba doar de alela minoră a SNP - 308G/A care a atins semnificația statistică.

În final, am observat, fără a atinge însă semnificația statistică, câteva trend-uri de asociere între cele două SNP-uri studiate și răspunsul la tratament biologic, ce necesită validare statistică pe un lot mai mare de pacienți.

9. Profilul expresiei genice la nivel mucozal în bolile inflamatorii intestinale

9.1. Introducere

Bolile inflamatorii intestinale (IBD), reprezentate în principal de colita ulcerativă (UC) și boala Crohn (CD), sunt afecțiuni cronice mediate imun a căror etiologie rămâne necunoscută. Ipotezele moderne stipulează faptul că răspunsul imun anormal posibil implicat în etiopatogenia acestor boli este rezultatul interacțiunii dintre factorii de mediu și modificările microbiomului intestinal ce acționează la nivelul unui organism predispus din punct de vedere genetic. Astfel, leziunile endoscopice observate la nivel intestinal sunt rezultatul activării polimorfonuclearelor ce conduce la leziuni mucozale cu abcese criptice ce corespund la nivel macrosopic diferitelor aspecte lezonale observate în cursul endoscopiei cum sunt eritemul, absența patternului vascular, eroziunile și ulceratiile. [23,315]

În ultimii 20 de ani au fost identificate mai mult de 200 de locusuri de risc la nivelul genomului prin câteva studii mici de asociere genetică și, ulterior, prin intermediul studiilor largi de asociere genomică (GWAS), situri ce interesează procese biologice cum ar fi autofagia, apărarea mucozală și semnalizarea pentru diferențierea limfocitelor T. Totuși, prezența variantelor genetice în populație nu explică în totalitate interacțiunile complexe ce duc la apariția acestor boli, fiind necesare abordări moleculare complementare cum este evaluarea expresiei genice. [23,316,317].

Chiar și așa, rezultatele obținute până în prezent sugerează implicarea factorilor de mediu în evoluția bolii, cum ar fi fumatul, folosirea contraceptivelor orale, dieta, infecțiile și vaccinările.[318–322].

O descoperire relativ recentă este reprezentată de celulele limfoide înnăscute(ILCs) care, prin integrarea în contextul fenomenelor de autofagie, stress oxidativ și semnalizare microbiană, au contribuit la o mai bună înțelegere a rolului sistemului imun mucosal și a relației acestuia cu factorii de mediu. [323]

Există deja câteva studii de expresie genică efectuate în domeniul bolilor inflamatorii intestinale, atât în țesut cât și în săngele periferic, ce oferă informații importante referitoare la

răspunsul inflamator local și sistemic. Wu și colaboratorii au analizat global expresiile genice la nivelul mucoasei colonice de la pacienți cu IBD și pacienți cu colită ischemică, pe care i-au comparat cu pacienți sănătoși, observând niște căi distincte de propagare a inflamației între cele două boli, cu un pattern dominat de pierderea homeostaziei la nivel epitelial în UC prin deregularea metabolismului celular și alterarea biosintезei și transportului electrolitilor. [23,324]

Un studiu ulterior s-a concentrat pe coroborarea datelor de expresie genică la nivel mucosal la pacienții cu colită ulcerativă cu analiza genomică cu scopul de a prioritiza anumite seturi de gene și căi de propagare a inflamației specifice pentru UC, observând 87 de căi supraexprimate și 8 subexprimate. Dintre acestea, cele mai importante erau legate de citokine, chemokine și receptorii acestora. Căile de semnalizare cel mai frecvent supraexprimate au fost cele legate de receptorii celulelor T, JAK-STAT și semnalizarea receptorului NOD-like.[23,325]

De altfel, există și un studiu al unei echipe din Romania care a analizat expresia genică la pacienții cu IBD și care a observat expresii crescute ale IL-8, chemokinelor SCYA3/4 și ale glutation S-transferazei P1 în țesutul inflamat, și supraexpresii ale IL-15 și SCYA85 în țesutul neinflamat, la pacienții cu UC.[326]

Practic, la pacienții cu UC au fost descrise multiple mecanisme epiteliale implicate în patogenia bolii cum ar fi depletia de cellule Goblet ce duce la alterarea stratului de mucus, secreție alterată de alfa și beta-defensine ce contribuie la stressul endotelial, în final contribuind la dezvoltarea colitei. [23,327–331].

În ceea ce privește boala Crohn, se pare că există o cascadă inflamatorie inițiată de patogenii intestinali la un individ suscetibil din punct de vedere genetic (variante genetice NOD2, ATG16L1), ce conduce la un clearance deficitar al detritusurilor bacteriene cu activare consecutivă continuă a celulelor Th17 și sinteză crescută de citokine și chemokine ce contribuie mai departe la recrutarea leucocitelor circulante perpetuând astfel procesul inflamator. [23]

În mod traditional, celulele T-helper 1 au fost considerate a fi implicate în procesul inflamator cronic din CD prin supraproducția de interferon-gamma(IFNg), IL17, IL21, IL22,

CXCL8, pe când celulele Th2 au fost atribuite, mai degrabă, UC prin producția crescută de IL-5 și IL-13.[23,55]

Totuși, datele ulterioare din literatură au arătat că dezechilibrul celulelor Th17 regulatoare(Treg) și relația acestora cu Th17 circulante reprezintă o piesă importantă pentru dezvoltarea inflamației la nivel intestinal în general. [23,332].

În mod general, discutăm în patogeneza IBD de o interacțiune strânsă între epitelul intestinal, microbiom și sistemul imun intestinal, atât cel înnăscut cât și cel adaptativ. [23]

Ultimele decade au reprezentat o perioadă înfloritoare pentru dezvoltarea de molecule utilizate în tratamentul bolilor cu mecanism imun, ce au la bază sintetizarea de anticorpi ce țințesc molecule circulante implicate în diferitele căi de propagare a inflamației. Țintele principale pentru evaluarea eficienței acestor molecule în trialurile clinice pentru IBD s-au modificat în timp, pornind de la răspuns clinic și remisiune clinică și avansând în profunzime către remisiune biologică și endoscopică. Acest proces de schimbare a țintelor de eficacitate a avut la bază observația conform căreia riscul de recădere este influențat de profunzimea remisiunii obținute cu o anumită moleculă, un exemplu clar fiind reprezentat de observația că remisiunea endoscopică predispune pacienții la un risc mult redus de recădere comparativ cu pacienții care se află doar în remisiune clinică. Considerând datele de mai sus, putem postula că remisiunea histologică și posibil cea moleculară ar putea reprezenta viitoare ținte terapeutice, dar, până în prezent, datele despre utilitatea acestora în practica clinică sunt insuficiente pentru a face recomandări în acest sens. [23,333]

Obiectivul prezentului studiu este de a obține date preliminare privind semnătura moleculară de activitate și remisiune a colitei ulcerative și bolii Crohn într-o cohortă de pacienți din Romania cu IBD, comparând profilul expresiei genice a acestor pacienți cu profilul de la nivelul mucoasei prelevate de la pacienți sănătoși, cu scopul de a identifica markeri moleculari de activitate sau remisiune prin efectuarea de corelații cu scorurile endoscopice și histologice deja utilizate în evaluarea activității inflamatorii în IBD. [23]

9.2. Materiale și metode

9.2.1. Planul de lucru

Activitățile studiului s-au desfașurat în două instituții din București: Institutul Național de Patologie „Victor Babeș” și Spitalul Universitar de Urgență “ELIAS” din București.

Obiectivul prezentei cercetări a fost reprezentat de evaluarea expresiei genice prin analiză comparativă țesut patologic versus țesut normal recoltat de la același pacient precum și țesut patologic versus țesut normal recoltat de la donatori sănătoși și a cuprins un număr de 20 de cazuri.

9.2.2. Selectarea pacienților

Studiul s-a realizat în conformitate cu normele internaționale (Declarația de la Helsinki) și cele naționale (legea nr. 46/2003) privind drepturile pacientului. Înregistrarea pacienților a fost codificată distinct și nu s-au folosit nume, adrese sau CNP în prelucrările de date din studiu.

Selectia pacienților s-a realizat pe baza diagnosticului de boală inflamatorie intestinală stabilit conform ghidului European ECCO de diagnostic și tratament al bolilor inflamatorii intestinale. [21,202] Datele necesare prelucrării statistice au fost preluate din bazele de date ale Institutului Național de Patologie „Victor Babeș” și Spitalului Universitar de Urgență “ELIAS” din București.

Am înrolat 19 pacienți de la care s-au prelevat 20 de seturi de biopsii, pentru un pacient fiind disponibile probe de țesut în dinamică sub tratamente diferite, și 20 de pacienți sănătoși.

Înrolarea s-a efectuat în mod consecutiv la prezentarea în clinică pentru reevaluare endoscopică.

Toți pacienții au semnat consimțământ informat de participare la studiu înaintea colonoscopiei.

Pentru lotul inițial au fost urmăriți următorii parametri:

- Sex;
- Vârstă;
- Tipul de boală inflamatorie intestinală;
- Extensia bolii;
- Severitatea puseului pe criterii clinice ;
- Severitatea endoscopică a leziunilor;
- Severitatea histologică a leziunilor;
- Tratamentul în curs la momentul prelevării probelor histologice.

9.2.3. Definirea scorurilor utilizate

Pentru definirea severității puseului de boală am utilizat scorul Mayo parțial pentru colita ulcerativă, cu valori numerice cuprinse între 0-9, valoarea mai mare definind o severitate mai mare. Pentru boala Crohn am folosit în evaluarea puseului scorul Crohn's disease activity index of severity (CDAI) cu definirea remisiunii ca scor CDAI<150, puseu ușor de activitate cu scor CDAI=150÷219, puseu moderat de activitate cu scor CDAI=220÷449 și puseu sever cu scor CDAI>450. [270,296,334]

Definirea extensiei bolii s-a efectuat utilizând clasificarea Montreal atât pentru colita ulcerativă unde E1=proctită. E2=colită stângă, E3=pancolită, cât și pentru boala Crohn unde L1=localizare ileală, L2=localizare colonică, iar L3= localizare ileo-colonică. Suplimentar, clasificarea Montreal include și parametrii legați de vârstă la debut (A1<16 ani; A2=16-40 ani și A3>40 ani) și, respectiv, de patternul de evoluție a bolii (B1=pattern inflamator, B2=pattern stenozant, B3=pattern fistulizant), pentru boala Crohn.[279]

Din punct de vedere al leziunilor endoscopice, evaluarea severității s-a efectuat folosind subscorul Mayo endoscopic pentru colita ulcerativă care se calculează însumând parametrii ce evaluatează prezența/absența ulcerațiilor/eroziunilor, eritemul mucoasei, vizibilitatea patternului vascular mucozal și prezența/absența sângerării spontane/provocate, cu valori totale cuprinse între 0-3, scorul mai mare definind leziuni mai severe. Pe de altă parte, un subscor Mayo

endoscopic de 0 sau 1 definește vindecarea mucozală. Referitor la boala Crohn, am optat pentru scorurile Simple Endoscopic Score for Crohn disease (SES-CD) la pacienții neoperați, iar la cei operați am utilizat scorul Rutgeerts de evaluare a recurenței postoperatorii, pentru ambele fiind valabilă observația că un scor mai mare definește o severitate mai crescută. SES-CD evaluează dimensiunea ulcerelor mucozale, suprafața ulcerată, entensia leziunilor endoscopic și prezența stenozelor. Pentru scorul Rutgeerts valorile variază între I0 și I4 în funcție de numărul ulcerărilor, aspectul mucoasei intercalare și prezența stenozei la nivelul anastomozei sau la nivelul ileonului neotermal. O valoare I0 sau I1 se consideră fără recurență postoperatorie.[23,242,296,335,336]

Severitatea histologică a fost evaluată cu scorul Nancy pentru colita ulcerativă care utilizează ca parametrii prezența ulcerăției și infiltratul inflamator acut și cronic pentru a defini pe o scală de la 0-4 severitatea histologică. În ceea ce privește boala Crohn, am folosit scorul Global Histologic Activity index of Severity (GHAS) care încorporează ca parametrii injuria epitelială, modificările arhitecturale, infiltratul inflamator cu mononucleare sau polimorfonucleare din lamina propria și epiteliu, prezența eroziunilor/ulcerărilor și granuloamelor, cu puncte adăugate pentru fiecare parametru identificat. Un scor peste limita de 2 puncte indică prezența activității histologice, fără a exista încă o clasificare clară a severității în funcție de numărul de puncte, dar este logică presupunerea unei severități crescute asociate unui scor mai mare. [23,337–339]

9.2.4. Probe biologice

Pentru identificarea modificărilor genetice și epigenetice, probele biologice au fost reprezentate de fragmente tisulare din mucoasă lezională, din mucoasă neinflamată și de la pacienți sănătoși.

Conservarea fragmentelor tisulare s-a realizat fie prin fixare în formol și includere în parafină, fie prin congelare la -80°C.

Din fiecare fragment tisular, fie că a fost fixat în formol și inclus în parafină fie că a fost congelat, au fost realizate, în serie, secțiuni la microtom cu grosimea de 4 µm pentru colorație cu hematoxilină-eozină.

După obținerea secțiunilor și etalarea pe lame, s-a efectuat colorația histopatologică. Un medic anatomicopatolog specialist a evaluat lamele și a confirmat diagnosticul de boală inflamatorie intestinală conform criteriilor din literatura de specialitate.[338] Pentru fragmentele congelate de țesut neinflamat și normal s-a efectuat câte o secțiune la criotom pentru examenul histopatologic. Secțiunile au fost colorate hematoxilină-eozină și au fost verificate de către medicul anatomicopatolog.

Fragmentele prevăzute pentru extracție de ARN au fost conservate într-un tampon special de inactivare a ARNazelor reprezentat de *RNA later* imediat după recoltare și s-au păstrat la frigider la 4-8°C. După 24 – 48 ore aceste fragmente de țesut au fost scoase din soluția tampon și au fost păstrate la -80°C până la utilizare.

9.2.5.Extragția și evaluarea calității și a cantității acizilor nucleici

9.2.5.1. Extragția ARN

Pentru extragția și purificarea ARN total din suspensia celulară s-a folosit *RNeasy Mini Kit* de la Qiagen. Metoda are la bază capacitatea de legare selectivă a ARN în prezența etanolului, de o membrană de siliciu, în timpul centrifugării. Procedeul presupune, în primul rând, liza și omogenizarea probei de analizat într-un tampon cu tiocianat de guanidină ce inactivează RN-azele și descompune componentele celulei păstrând, totodată, ARN integră, urmat de fixarea ARN în membrana de siliciu. După spălarea cu tampoane speciale pentru îndepărțarea contaminanților chimici, moleculele de ARN (mai mari de 200 de perechi de baze), legate de membrană, sunt apoi diluate în apă lipsită de nucleaze.

Procedeu

Se prepară fragmentul de ţesut fixat în RNA later. Nu se folosesc mai mult 20mg ţesut.

1. Liza celulară cu RLT.

Se adaugă 600 µl RLT cu 2-mercaptoetanol (10 µl 2-mercaptoetanol la 1 ml RLT).

2. Omogenizare la omogenizator.

3. Se adaugă 600 µl etanol 70%; omogenizare prin pipetare.

4. Se transferă 700 µl într-o coloană introdusă într-un tub colector. Se centrifughează 15 secundela 10.000 rpm și se elimină filtratul. Dacă volumul probei depășește 700 µl se repetă centrifugarea în aceeași coloană și se îndepărtează filtratul.

5. Optional! Eliminarea ADN genomic

5.1 Se adaugă 350 µl tampon RW1. Se centrifughează 15 secunde la 10.000 rpm și se elimină filtratul.

5.2 Se adaugă 10 µl ADNază I la 70 µl tampon RDD. Omogenizare prin răsturnarea tubului. Nu se vortexează!

5.3 Se adaugă mixul de ADNază (80 µl) direct pe filtrul din coloană și se incubează 15 min. la temperatura camerei.

5.4 Se adaugă 350 µl tampon RW1. Se centrifughează 15 secundela 10.000 rpm și se elimină filtratul.

6. Se adaugă 500 µl tampon RPE. Se centrifughează 15 secunde la 10.000 rpm și se elimină filtratul.

7. Se adaugă 500 µl tampon RPE. Se centrifughează 2 minute la 10.000 rpm și se elimină filtratul

8. Se poziționează coloana într-un nou tub colector de 2 ml și se centrifughează 1 minut la viteză maximă.

9. Se poziționează coloana într-un nou tub colector de 1,5 ml și se adaugă 30 µl apă fără nucleaze. Se incubează 1 min. la temperatura camerei. Se centrifughează 1 minut la 10.000 rpm pentru eluarea ARN.

10. Se determină spectrofotometric calitatea și cantitatea de ARN obținut.

9.2.5.2. Determinarea calității și a cantității acizilor nucleici

Verificarea calității acizilor nucleici extrași precum și determinarea concentrației acestora reprezintă un punct de control obligatoriu în cadrul experimentelor de biologie moleculară. Acestea sunt realizat prin spectrofotometrie în ultraviolet (UV), utilizând spectrofotometrul NanoDrop-2000, ThermoScientific (Figura 9.1.).

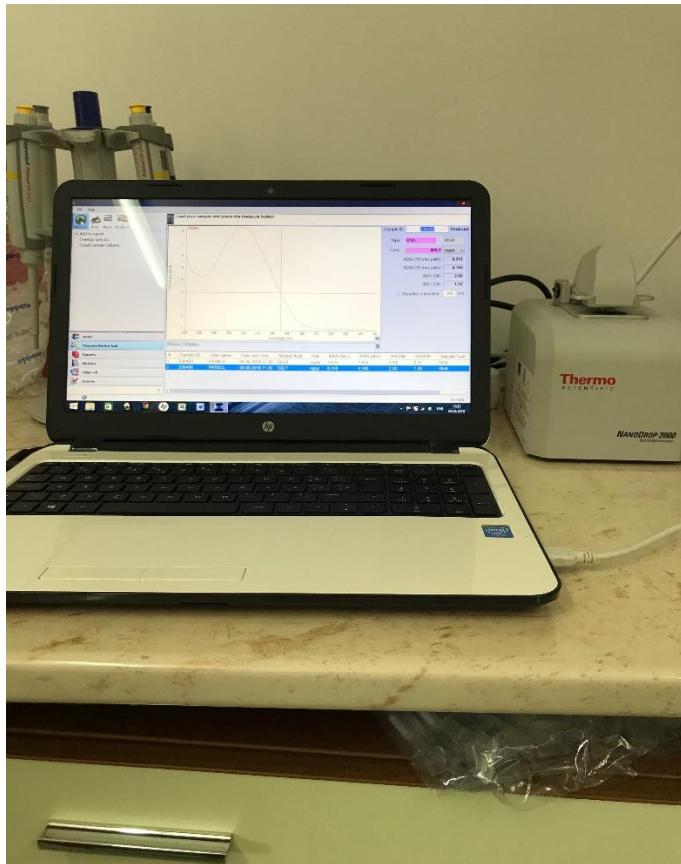


Figura 9.1. Spectrofotometrul NanoDrop-2000, ThermoScientific

Acizii nucleicii absorb lumina UV la lungimi de undă cuprinse între 258-260 nm, proteinele absorb la 280 nm, iar contaminanții de origine chimică la 230 nm. Citirea absorbanțelor la cele trei lungimi de undă determină concentrația acizilor nucleici extrași și puritatea acestora. Raportul dintre valorile absorbanțelor determinate la 260 nm și 280 nm sugerează o posibila contaminare cu proteine restante a acizilor nucleici extrași, valoarea optimă a raportului fiind 1,8-2. O valoare <1,7 a acestuia indică o contaminare proteică semnificativă, extractul necesitând o etapă de purificare suplimentară

premergătoare etapei de amplificare. Prin calcularea raportului A260/A230 putem aprecia prezența contaminanților de origine chimică (fenol, compuși guanidinici și carbohidrați), o valoare <1,8 a acestui raport demonstrând un grad semnificativ de contaminare chimică.

Concentrația acizilor nucleici extrași s-a calculat pe baza valorilor absorbanțelor măsurate la lungimea de undă de 260 nm (A260), astfel: unei absorbanțe (A260) cu valoarea 1 corespunde unei concentrații de 50 µg/ ml ADN dublu catenar sau 40 µg/ ml ARN.

9.2.6. Identificarea expresiei genice

Pentru studiul expresiei genice s-a utilizat metoda PCR array. qPCR array oferă avantajul combinării performanței real-time PCR cu abilitatea microarray de a detecta nivelul de expresie a mai multor gene simultan. Testele sunt concepute pentru a analiza un grup de gene implicate într-o patologie sau cale biologică, de obicei în plăci cu 96 sau 384 godeuri, în fiecare godeu existând primeri specifici unei gene. Fiecare test conține pe lângă primeri pentru genele de interes, primeri pentru gene de referință (housekeeping gene), primeri pentru controlul contaminării cu ADN genomic, primeri pentru controlul reacției de revers-transcriere și primeri pentru controlul performanțelor reacției de amplificare. Pentru fiecare genă de interes rezultatele sunt prelucrate și prezentate sub formă de expresie genică relativă, comparația realizându-se între probele luate în studiu și un lot martor sau control.

Tehnologia real-time PCR aplicată prezintă avantaj major comparativ cu tehnica microarray prin acuratețea sporită a rezultatelor obținute datorită faptului că efectuarea detecției se realizează în **timp real** în fază de creștere exponențială a amplificării. În această fază se realizează o dublare a cantității de amplicon la fiecare ciclu iar rezultatele se coreleză cu nivelul initial al țintei. Utilizarea SYBR Green, fluorocrom capabil să se lege de moleculele de ADN dublu catenare și să emită fluorescentă, permite monitorizarea permanentă a procesului de amplificare, nivelul de fluorescentă crescând proporțional cu cantitatea de amplicon produsă.

Colectarea semnalului fluorescent în fază de amplificare exponențială permite cuantificarea cu precizie a țintei; în această fază eficiența amplificării nu este influențată de epuizarea reactivilor, acumularea de inhibitori sau inactivarea polimerazei. Performanța PCR

array este garantată doar în utilizarea asociată cu truse de revers-transcriere și de amplificare dedicate acestei metode.

Revers-transcrierea presupune sinteza primei catene ADNc pe matriță de ARNm și s-a realizat cu *RT² First Strand Kit, Qiagensi* aparatul Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Singapore) (Figura 9.2.). Este necesar ca în această etapă să se realizeze o eliminare suplimentară a eventualelor resturi de ADN genomic din probele de ARN, resturi care ar putea fi amplificate în timpul PCR determinând semnale fals pozitive. Controlul reacției de revers-transcriere (RTC) poate fi realizat doar cu ajutorul unui ARN extern, sintetizat în cursul reacției de revers-transcriere. Componentele mixului de reacție trebuie să fie perfect compatibile cu componentelete PCR.



Figura 9.2 . Aparat PCR Veriti 96 Well (Applied Biosystems, Singapore)

Protocol de lucru (in acord cu indicațiile producatorului)

1. Eliminarea ADN genomic: într-un tub PCR se pipetează: 25 – 1000ng ARN total, 2 µl Buffer GE și apă fără RNase până la un volum total de 10 µl. Incubare la 42°C, 15 min, urmată de răcire pe gheăță 1 min.
2. Revers-transcrierea: peste amestecul inițial se pipetează: 4 µl 5x Buffer BC3, 1 µl Control P2, 2 µl RE3 Reverse Transcriptase Mix și 3 µl apă fără RNase. Incubare la 42°C, 5 min, urmată de stoparea reacției prin încălzire la 95°C, 5 min. Se adaugă 92 µl apă fără RNase.

ADNc obținut se stochează la -20°C până la efectuarea reacției de amplificare.

Reacția de amplificare necesită utilizarea unei polimeraze înalt specializată (HotStartDNATaqPolymerase) precum și secvențe de primeri care să prevină formarea dimerilor sau ai produșilor de reacție nespecifici și care să asigure eficiență crescută de amplificare chiar și în cazul genelor dificil de amplificat. Dacă aparatul de amplificare nu permite normalizarea semnalelor fluorescente, este necesară utilizarea unui fluorofor de referință în mixul de amplificare. Colorantul de referință este un colorant „pasiv” a cărui fluorescentă nu se modifică în cursul amplificării, dar care corectează sau normalizează diferențele de fluorescentă cauzate de erori de pipetare, transparență neuniformă sau reflexie a capacelor plăcii PCR. Normalizarea se realizează prin raportarea intensității semnalului fluorescent emis de SYBR Green la intensitatea semnalului fluorescent emis de colorantul de referință pentru fiecare ciclu de amplificare și pentru fiecare godeu. În practica curentă cel mai utilizat colorant de referință este ROX.

Experimentul de real time PCR a respectat manualul producătorului - *User Manual of RT2 Profiler PCR Array system (SABioscience)*, utilizand SYBR Green/ROX PCR Master Mix în aparatul StratageneMx3005P(figura 9.3.).



Figura 9.3. Aparat real-time Stratagene Mx3005P (Thermo Fisher Scientific, USA)

S-a utilizat placa de testare RT Profiler PCR Array Human Crohn Disease – PAHS 169Z

- care contine primeri pentru 84 de gene de interes(tabel 9.1 și 9.2) implicate în mai multe procese biologice după cum urmează (specificațiile producatorului):

- a) **Procesul apoptotic:** CASP1 (ICE), CCL2 (MCP1), EGR3, IL1B, IL2RA (CD25), IL6, ITGB2, LCN2 (NGAL), SOD2, TNF
- b) **Procesul inflamator:** C3, CCL11 (eotaxin), CCL2 (MCP1), CCL20 (MIP-3°), CCL25 (TECK), CCL5 (RANTES), CCR1, CCR2, CCR5, CX3CL1, CXCL1 (GRO1, GROa, SCYB2), CXCL3, CXCL9 (MIG), CSCR1 (IL8RA), FPR1, IL13, IL17A, IL1B, IL2RA (CD25), IL23A, IL5, IL6, CXCL8, ITGB2, LTB, LYZ, S100A8, SAA1, SELE, STAT3, TNF
- c) **Imunitatea umorală, innăscută și adaptativă:** CCL2 (MCP-1), IL6, DEFA5, DEFA6, LYZ, C3, C4BPB, CASP1, CD55, CR2, IL1RN, IRF5, ISG15, LCN2, NOD2, NOS2, SAA1, TYK2, CCR2, CCR5, CCR9, CXCR3, HLA-DQA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, IFNG, IL13, IL17A, IL2RA, IL5, IL6, IRF5, STAT1
- d) **Proteinele matrixului extracellular și Molecule de adeziune celulară:** CCL2, CCR1, CCL11, CSTA, CX3CR1, CXCL12, CXCR3, ITGB2, MMP1, MMP10, MMP3, MMP7, PECAM1, SELE, SELL (LECAM-1), TIMP1, VWF
- e) **Proteine neclivate de răspuns:** HSP90B1, HSPA5, UBD
- f) **Proteine de secreție digestivă:** GCG, MUC1 (mucina), REG1A, REG1B, TFF1
- g) **Metabolism proteic:** ALDOB, PCK1, TDO2
- h) **Alte gene asociate bolii Crohn:** ABCB1 (MDR1), ATG16L1, CHI3L1, EDN3, NR3C2

Tabel 9.1. Gene studiate – categoria funcțională și proteina codificată

Genă studiată	Descrierea genei
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1
ALDOB	Aldolase B, fructose-bisphosphate
ATG16L1	ATG16 autophagy related 16-like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)
C3	Complement component 3
C4BPB	Complement component 4 binding protein, beta
CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)
CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2

CCL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20
CCL25	Chemokine (C-C motif) ligand 25
CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
CCR1	Chemokine (C-C motif) receptor 1
CCR2	Chemokine (C-C motif) receptor 2
CCR5	Chemokine (C-C motif) receptor 5
CCR9	Chemokine (C-C motif) receptor 9
CD55	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)
CHI3L1	Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)
CR2	Complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2
CSTA	Cystatin A (stefin A)
CX3CL1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
CX3CR1	Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
CXCL11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11
CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
CXCL3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
CXCR1	Chemokine (C-X-C motif) receptor 1
CXCR3	Chemokine (C-X-C motif) receptor 3
DEFA5	Defensin, alpha 5, Paneth cell-specific
DEFA6	Defensin, alpha 6, Paneth cell-specific
EDN3	Endothelin 3
EGR3	Early growth response 3
FPR1	Formyl peptide receptor 1

GCG	Glucagon
HLA-DQA1	Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1
HLA-DRA	Major histocompatibility complex, class II, DR alpha
HLA-DRB1	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 1
HSP90B1	Heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1
HSPA5	Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)
IFNG	Interferon, gamma
IL13	Interleukin 13
IL17A	Interleukin 17A
IL1B	Interleukin 1, beta
IL1RN	Interleukin 1 receptor antagonist
IL23A	Interleukin 23, alpha subunit p19
IL2RA	Interleukin 2 receptor, alpha
IL5	Interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)
IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
CXCL8	Interleukin 8
IRF5	Interferon regulatory factor 5
ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier
ITGB2	Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)
LCN2	Lipocalin 2
LTB	Lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)
LYZ	Lysozyme
MMP1	Matrix metallopeptidase 1 (interstitial collagenase)
MMP10	Matrix metallopeptidase 10 (stromelysin 2)
MMP3	Matrix metallopeptidase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
MMP7	Matrix metallopeptidase 7 (matrilysin, uterine)
MUC1	Mucin 1, cell surface associated
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2

NOS2	Nitric oxide synthase 2, inducible
NR3C2	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2
PCK1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)
PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
REG1A	Regenerating islet-derived 1 alpha
REG1B	Regenerating islet-derived 1 beta
S100A8	S100 calcium binding protein A8
S100A9	S100 calcium binding protein A9
SAA1	Serum amyloid A1
SELE	Selectin E
SELL	Selectin L
SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
TDO2	Tryptophan 2,3-dioxygenase
TFF1	Trefoil factor 1
TIMP1	TIMP metallopeptidase inhibitor 1
TNF	Tumor necrosis factor
TYK2	Tyrosine kinase 2
UBD	Ubiquitin D
VWF	Von Willebrand factor

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ABCB1 A01	ALDOB A02	ATG16L1 A03	C3 A04	C4BPB A05	CASP1 A06	CCL11 A07	CCL2 A08	CCL20 A09	CCL25 A10	CCL5 A11	CCR1 A12
B	CCR2 B01	CCR5 B02	CCR9 B03	CD55 B04	CHI3L1 B05	CR2 B06	CSTA B07	CX3CL1 B08	CX3CR1 B09	CXCL1 B10	CXCL10 B11	CXCL11 B12
C	CXCL12 C01	CXCL2 C02	CXCL3 C03	CXCL9 C04	CXCR1 C05	CXCR3 C06	DEFA5 C07	DEFA6 C08	EDN3 C09	EGR3 C10	FPR1 C11	GCG C12
D	HLA-DQA1 D01	HLA-DRA D02	HLA-DRB1 D03	HSP90B1 D04	HSPA5 D05	IFNG D06	IL13 D07	IL17A D08	IL1B D09	IL1RN D10	IL23A D11	IL2RA D12
E	IL5 E01	IL6 E02	CXCL8 E03	IRF5 E04	ISG15 E05	ITGB2 E06	LCN2 E07	LTB E08	LYZ E09	MMP1 E10	MMP10 E11	MMP3 E12
F	MMP7 F01	MUC1 F02	NOD2 F03	NOS2 F04	NR3C2 F05	PCK1 F06	PECAM1 F07	REG1A F08	REG1B F09	S100A8 F10	S100A9 F11	SAA1 F12
G	SELE G01	SELL G02	SOD2 G03	STAT1 G04	STAT3 G05	TDO2 G06	TFF1 G07	TIMP1 G08	TNF G09	TYK2 G10	UBD G11	VWF G12
H	ACTB H01	B2M H02	GAPDH H03	HPRT1 H04	RPLP0 H0	HGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

Tabel 9.2. Imaginea unei plăci PCR array. În godeurile A1-G12 există primeri pentru genele de interes (84 gene). Godeurile H1-H5 conțin un panel de gene housekeeping pentru normalizarea rezultatelor(HK1- HK5). Godeul H6 conține controlul pentru contaminarea cu ADN genomic(GDC), godeurile H7- H9 conțin controale ale reacției derevers-transcriere (RTC), iar godeurile H10-H12 conțin controale ale PCR(PPC).

Protocol de lucru (in acord cu indicatiile producatorului)

Mix de reactie: 1350 µl SYBR Green plus ROX Master Mix, 1248 µl apă fără nucleaze și 102 µl ADNc. Se omogenizează întregul mix și se distribuie câte 25 µl în fiecare godeu din placă de reactie. Se acoperă placă, se centrifughează la 400 rpm, timp de 30 s după care urmează amplificarea după protocolul indicat de producător.

Protocolul de amplificare conform Tabelului 9.3 s-a realizat în aparatul Mx3005p (Stratagene, Thermo Fisher Scientific, SUA).

Tabelul 9.3. Programul de amplificare

Temperatura	Timp	Număr de cicluri
95°C	10 min	1
95°C	15 s	40 cicluri
60°C	60 s	
Curba de topire		1

Curba de topire (disociere).

După realizarea amplificării este necesară realizarea curbei de disociere. Prin creșterea treptată a temperaturii ampliconilor are loc disocierea celor două catene de ADN urmată de scăderea intensității fluorescenței (SYBR Green este colorant de intercalare). Softul aparatului PCR este capabil să realizeze curba de topire pentru fiecare godeu prin calcularea primei derivate a fluorescenței funcție de temperatură, iar temperatura la care are loc maximul de disociere reprezintă temperatura de topire (disociere). Existența unei curbe cu mai multe vârfuri denotă existența produșilor de amplificare nespecifici și deci, godeurile în care se constată existența produșilor nespecifici vor fi excluse din analiză.

Analiza rezultatelor.

La aparatele care nu au posibilitatea selectării valorii prag automat, aceasta se realizează manual prin plasarea acesteia în prima treime din porțiunea liniară a curbei exponențiale de amplificare. Este important ca valoarea prag să fie aceeași pentru toate probele din cadrul unui studiu. Prin trasarea valorii prag se obțin valorile C_T (threshold cycle) care reprezintă numărul ciclului la care valoarea prag intersectează curba de amplificare.

Controlul de calitate.

- Orice valoare a $C_T \geq 35$ este considerată ca lipsă a amplificării

- Controlul de contaminare cu ADN genomic (GDC). Dacă valoarea $C_T \geq 35$, nu există contaminare iar rezultatele obținute sunt corecte. La o valoare $C_T \leq 35$ contaminarea este evidentă iar experimentul se repetă.
- Controlul performanței amplificării (PPC). Dacă valoarea medie a $C_T = 20 \pm 2$, rezultatele obținute sunt corecte. Valori mai mari indică prezența inhibitorilor în reacția de amplificare ceea ce înseamnă necesitatea purificării probei de ARN.
- Controlul reacției de revers-transcriere (RTC). Se realizează calculând diferența dintre media C_T a RTC și media C_T PPC. Dacă aceasta valoare este ≤ 5 , revers-transcrierea s-a realizat eficient.

Se exportă rezultatele obținute într-un document Excel, iar în cazul godeurilor cu $C_T \geq 35$ sau cu curbe de topire multivârf valorile vor fi înlocuite cu specificația not detected sau N/A.

Calculul nivelului de expresie genică relativă se realizează prin compararea valorii C_T a unei gene de interes în anumite condiții cu valoarea C_T a aceleiași gene în condiții de referință (de ex. o genă la un bolnav versus aceeași genă la un lot cu subiecți sănătoși, sau compararea valorilor C_T la diferite momente ale unei terapii pentru monitorizarea acesteia).

Calculul se poate efectua automat utilizând softuri dedicate puse la dispoziție de către firmele producătoare ale reactivilor utilizați.

Manual este mai dificil de realizat, mai ales dacă se dorește calcularea valorii *fold change*. În prima etapă a acestui calcul se realizează normalizarea valorilor C_T prin intermediul genelor de referință, utilizându-se formula:

$$\Delta C_T = C_T^{\text{GOI}} - C_T^{\text{AVG HKG}}$$

Nivelele de expresie ale genelor de referință nu trebuie să fie influențate de condițiile experimentale, ele exprimându-se constant în țesuturi atât în condiții normale cât și în condiții patologice.

Dupa normalizare, se calculează $\Delta\Delta C_T$ pentru identificarea expresiei genice relative.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{probă}) - \Delta C_T (\text{control})$$

Valoarea *fold change* a fiecărei gene de interes comparativ cu aceeași genă din grupul control este dată de valoarea lui $2^{(-\Delta\Delta CT)}$. O valoare supraunitară indică supraexpresie, în timp ce o valoare subunitară indică subexpresie genică. Fiind vorba de fenomene biologice, în cadrul cărora genele pot fi sub- sau supraexprimate, se preferă utilizarea expresiei *fold regulation*, exprimată prin valori pozitive și negative, valoarea lui $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ ramânând aceeași pentru genele supraexprimate și schimbându-se în $(-2^{(\Delta\Delta CT)})$ pentru genele subexprimate.

Rezultatele obținute, exprimate în valori ale C_T s-au exportat într-un document Excel. În condițiile în care controlul de calitate nu este trecut, analiza nu se poate efectua. Valoarea C_T a controlului PPC trebuie să fie 20 ± 2 . Eficiența reverstranscrierii se realizează calculând diferența dintre media C_T a miRTC și media C_T a PPC. Dacă aceasta valoare este ≤ 7 , revers-transcrierea s-a realizat eficient, iar controlul de calitate al testului a fost trecut. Analiza propriu-zisă se efectuează prin calcularea valorii *fold change*. În prima etapă a acestui calcul se realizează normalizarea valorilor C_T prin intermediul celor 6 snRNA, utilizându-se formula:

$$\Delta C_T = C_T^{\text{miRNA}} - \text{AVG } C_T^{\text{snRNA}}$$

Nivelul de expresie a snRNA nu trebuie să fie influențat de condițiile experimentale, ele exprimându-se constant în țesuturi atât în condiții normale cât și în condiții patologice.

Dupa normalizare, se calculează $\Delta\Delta C_T$ pentru identificarea expresiei relative a genei studiate

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{țesut inflamat/patologic/lezional}) - \Delta C_T (\text{țesut neinflamat})$$

Valoarea *fold change* a fiecărei gene în cele două tipuri de țesuturi a fost dată de valoarea lui $2^{(-\Delta\Delta CT)}$. S-a ales *cut-off* (valoare prag) ca fiind valoarea 2. La finalul analizei rezultatele au fost prezentate și sub formă de scatter plot și hartă calorică (heatmap).

9.2.7. Analiza statistică

Variabilele numerice au fost testate utilizând testul Chi pătrat, variabilele continue cu testul t iar corelațiile au fost efectuate folosind testul Pearson, prin intermediul Statistical Package for Social Sciences, Version 17.0 (SPSS Inc). Pentru analiza datelor de expresie genică,

am folosit pachetul software ce însوtește kit-ul RT2 Profiler PCR Array. Acest pachet folosește exprimări ale valorilor pe baza fold change calculat în funcție de $\Delta\Delta CT$ iar pentru valorile p folosește testul chi pătrat.

Pentru variabilele continue am utilizat valori medii \pm deviația standard, iar pentru testarea ipotezelor formulate am folosit testele parametrice Student și ANOVA (SPSS v17.0) cu următoarea interpretare a valorilor lui p:

- $p < 0.05$, diferența între cele două medii este semnificativă.
- $p < 0.01$, diferența între cele două medii este înalt semnificativă.
- $p < 0.001$, diferența între cele două medii este foarte înalt semnificativă.
- $p > 0.05$, diferența între cele două medii este nesemnificativă.

Analiza asocierilor dintre două variabile s-a realizat prin utilizarea testului chi pătrat, cu pragul de semnificație statistică $p < 0,05$.

Pentru analiza de corelație endoscopie – histologie, având în vedere lotul mic al pacienților analizați, am folosit coeficientul de corelație Pearson r (Microsoft Excel, Office Pack 2016), cu valori cuprinse între -1 și 1, care se interprează astfel:

- peste 0.5 sau mai mic de -0.5, efectul corelației este crescut.
- Între 0.3-0.5 sau -0.3 și -0.5, efectul corelației este mediu.
- Între 0.1-0.3 sau -0.1 și -0.3, efectul corelației este scăzut.

9.3. Rezultate

Pentru realizarea acestui studiu am prelevat biopsii în timpul colonoscopiei de la 19 pacienți cu boli inflamatorii intestinale din țesut inflamat sau cunoscut a fi fost inflamat, dar actualmente fără leziuni (remisiune endoscopică), din țesut neinflamat în calitate de control intern, și de la 20 pacienți sănătoși ce au efectuat colonoscopie de screening al cancerului colo-rectal. Datele demografice și fenotipice ale loturilor sunt prezentate în tabelul 9.4.

Tabel 9.4. Caracteristicile clinice ale lotului de pacienți (Clasificarea Montreal pentru descrierea fenotipică a bolii Crohn și pentru extensia colitei ulcerative).

Diagnostic	Boală Crohn (n=11)	Colită ulcerativă(n=8)
Vârstă	33.9 (19-52)	35.5 (25-55)
Raport pe sexe(F/B)	5/6	3/5
Clasificarea Montreal		
Vârsta(CD)	A1: 0 (0.0%) A2: 9 (81.8%) A3: 2 (18.18%)	
Localizarea(CD)/Extensie(UC)	L1: 4 (36.36%) L2: 4 (36.36%) L3: 3 (27.27%)	E1: 0 (0.0%) E2: 2 (25%) E3: 6 (75%)
Pattern evolutiv(CD)	B1: 6 (54.54%) B2: 4 (36.36%) B3: 1 (9.09%)	
Istoric chirurgical	3 (27.27%)	0 (0.0%)
Severitatea clinică a puseului		
Remisiune	5 (45.45%)	1 (12.5%)
Ușoară	4 (36.36%)	3 (37.5%)
Moderată	2 (18.18%)	4 (50%)
Severă	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Tratament actual		
Niciun tratament	1 (9.09%)	0 (0.0%)
5-ASA	4 (36.36%)	4 (50%)
Imunomodulator	0 (0.0%)	3 (37.5%)
Anti-TNF	6 (54.54%)	1 (12.5%)

Pentru evaluarea scorurilor endoscopice și histologice, grupul pacienților a fost împărțit în subgrupuri în funcție de diagnosticul inițial, iar pentru subgrupul pacienților cu boală Crohn am subgrupat suplimentar în funcție de istoricul chirurgical în pacienți operați și neoperați.

Statistica descriptivă a celor 3 subgrupuri rezultate se observă în tabelele 9.5, 9.6 și 9.7.

Tabel 9.5. Statistica descriptivă a subgrupului de pacienți cu boală Crohn operați – recurență postoperatorie.

	Mean	Standard Deviation
<i>Severitate puseu – criterii clinice</i>	0	0
<i>Severitate endoscopică (Rutgeerts)</i>	2	1.73
<i>Scor GHAS</i>	7	2.65

Tabel 9.6. Statistica descriptivă pentru subgrupul de pacienți cu boală Crohn fără istoric chirurgical.

	Mean	Standard Deviation
<i>Severitate puseu – criterii clinice</i>	1	0.755928946
<i>Severitate endoscopică (SES-CD)</i>	8.625	9.288049157
<i>Scor GHAS</i>	6.625	2.386719207

Tabel 9.7. Statistica descriptivă a subgrupului pacienților cu colită ulcerativă.

	Mean	Standard Deviation
<i>Severitate puseu – criterii clinice</i>	1.375	0.744023809
<i>Severitate endoscopică (Mayo)</i>	1.625	0.916125381
<i>Scor Nancy</i>	6.375	2.924648941

Ulterior, am testat corelațiile existente între severitatea endoscopică și cea histologică în cele 3 subgrupuri de pacienți. Nu s-a putut verifica semnificația statistică cu valoarea p având în vedere numărul mic de pacienți. Doar pe baza coeficientului de corelație am obținut efect crescut pentru toate cele 3 subgrupuri analizate astfel că, în cazul pacienților cu recurență postoperatorie a bolii Crohn valoarea Pearson r a fost de 0.98, la pacienții cu boală Crohn fără istoric chirurgical am obținut Pearson r de 0.77, iar la pacienții cu colită ulcerativă nivelul

corelației a fost evaluat cu *Pearson r* de 0.91. Corelațiile obținute au fost ilstrate sub forma de scatter plot cu trendline în figurile 9.4, 9.5 și 9.6.

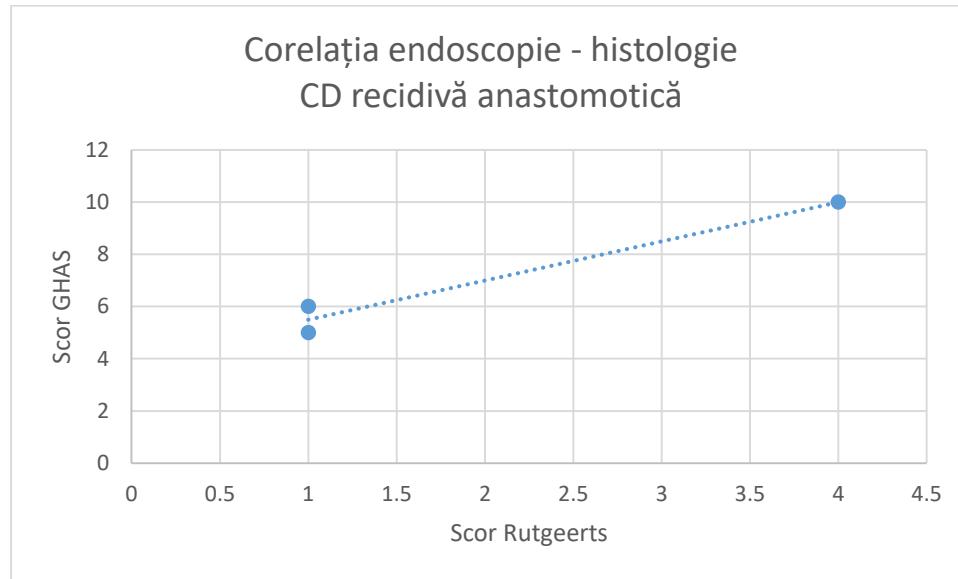


Figura 9.4. Corelație între severitatea endoscopică și histologică în subgrupul pacienților cu recurență postoperatorie.

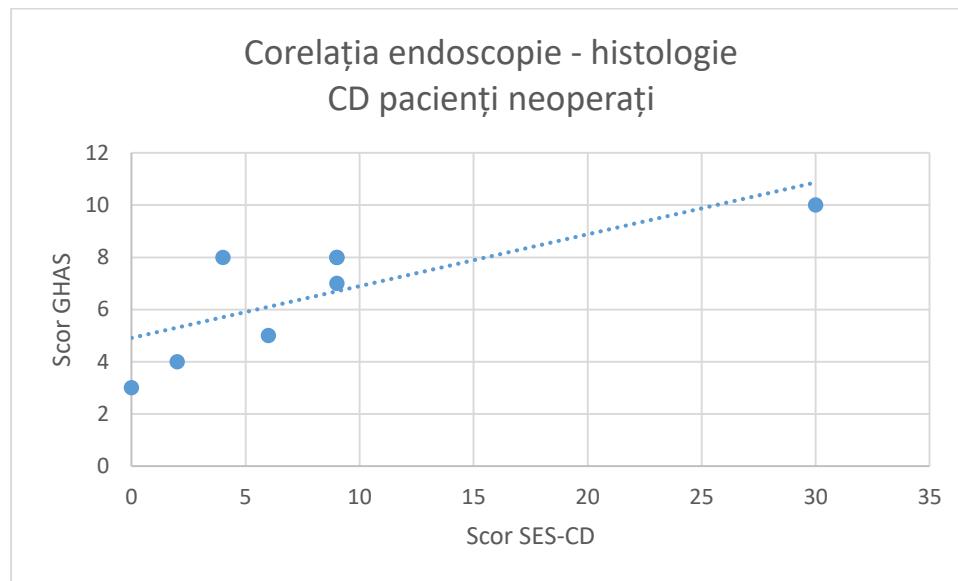


Figura 9.5. Corelație între severitatea endoscopică și severitatea histologică în subgrupul pacienților cu boală Crohn fără istoric chirurgical.

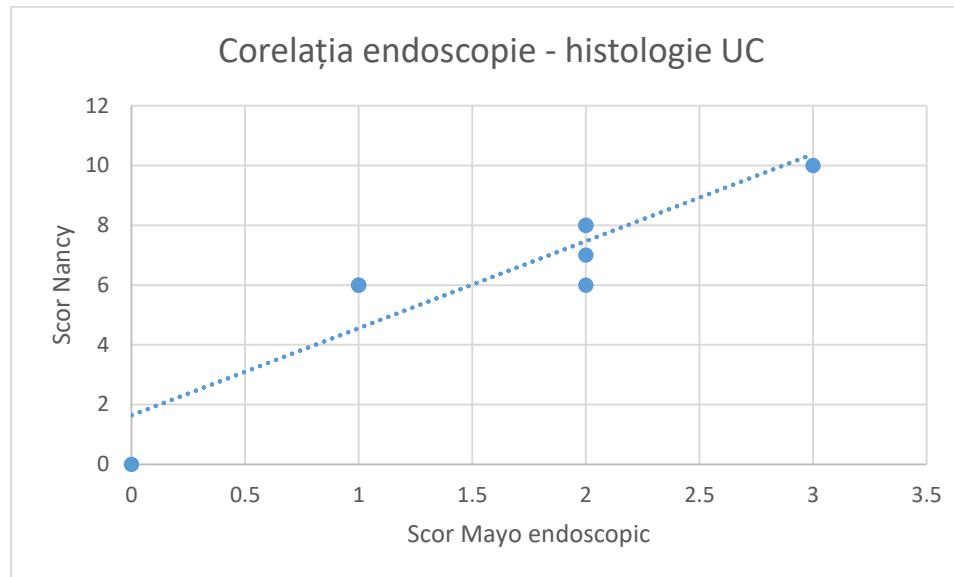


Figura 9.6. Corelație între severitatea endoscopică și severitatea histologică la pacienții cu colită ulcerativă.

Pentru analiza expresiei genice, după procesele de extracție și purificare, s-a efectuat analiza spectrofotometrică a ARN total pentru determinarea cantității și calității acestuia (figurile 9.7 și 9.8)

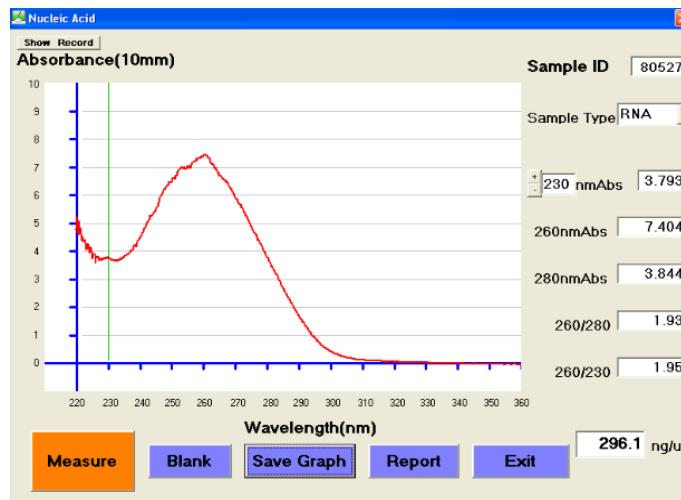


Figura 9.7. Exemplificare a unei verificări spectrofotometrice a calității și cantității ARN total extras din țesut inflamat pe RNAlater și congelat. Concentrația extractului a fost de 296.1 ng/ml. Valorile rapoartelor 260/280 și 260/230 denotă o calitate bună a produsului obținut, fără contaminanți proteici sau chimici.

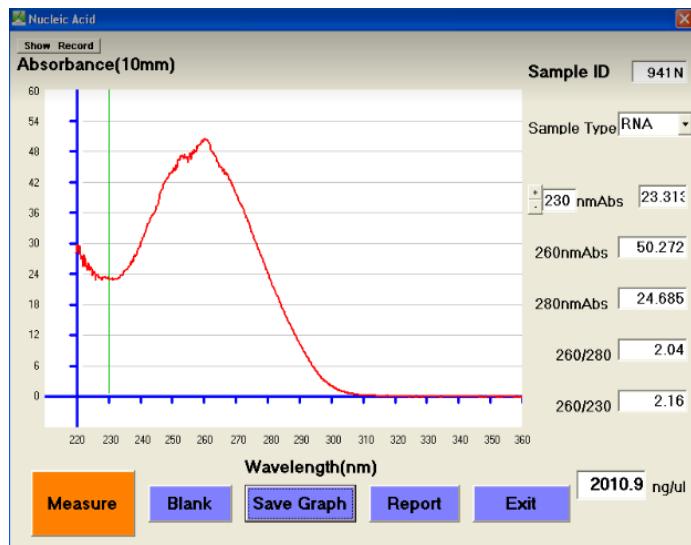


Figura 9.8. Exemplificare a unei verificări spectrofotometrice a calității și cantității ARN total extras din ţesut neinflamat pe RNAlater și congelat. Concentrația extractului a fost de 2010.9 ng/ml. Valorile rapoartelor 260/280 și 260/230 denotă o calitate bună a produsului obținut, fără contaminanți proteici sau chimici.

După revers-transcriere, ADNc a fost verificat spectrofotometric (figura 9.9).

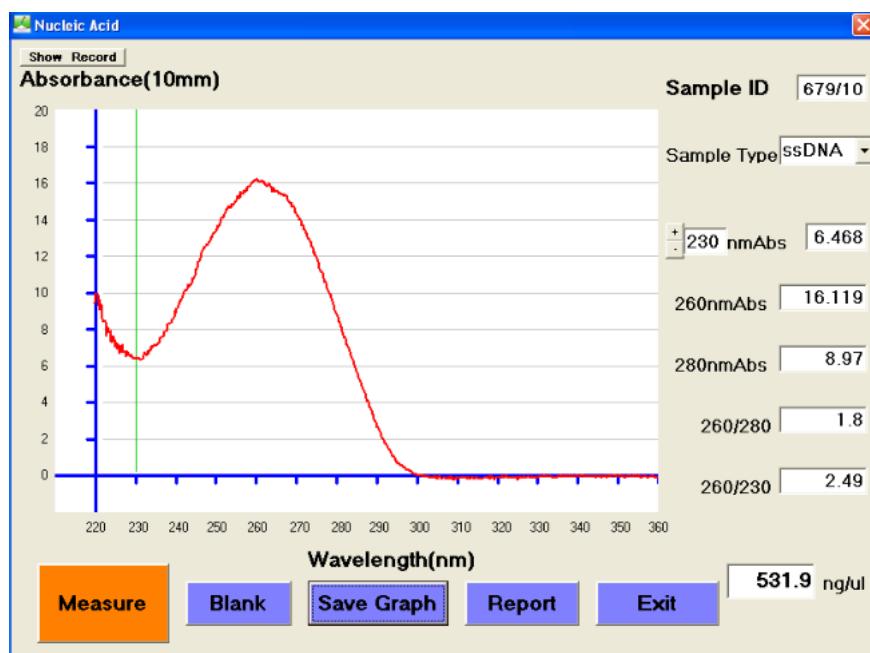


Figura 9.9. Exemplificare a unei verificări spectrofotometrice a calității și cantității ADNc. Concentrația extractului a fost de 531.9 ng/ml. Valorile rapoartelor 260/280 și 260/230 denotă o calitate bună a produsului obținut, fără contaminanți proteici sau chimici.

A urmat procesul de amplificare care s-a desfășurat fără incidente, cu rezultate vizibile de la ciclul 15 (figura 9.10)

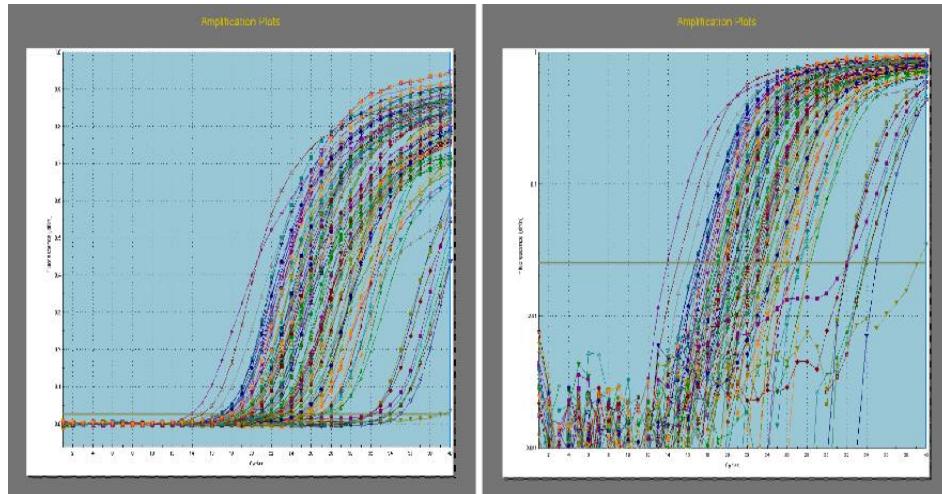


Figura 9.10. Exemple de curbe de amplificare liniară – stânga, și logaritmică – dreapta

După finalizarea procesului de amplificare, rezultatele finale sub forma C_T au fost analizate și prezentate sub formă de tabele, grafice de tip scatter-pot, diagrame și hartă calorică.

Pe harta calorică, culoarea verde reprezintă genele subexprimate, iar culoarea roșu prezintă genele supraexprimate. Pe graficul tip scatter-pot linia centrală indică expresia nemodificată, genele localizate deasupra acestei linii fiind supraexprimate, iar cele localizate inferior fiind subexprimate.

Analiza comparativă a țesutului inflamat provenit de la pacienții cu IBD și cel neinflamat de la aceeași pacienți a evidențiat 32 de gene supraexprimate, toate prezintând semnificație statistică pentru țesutul neinflamat comparativ cu pacienții sănătoși, în timp ce în țesutul inflamat de la pacienții cu IBD am identificat 1 genă subexprimată și 55 de gene supraexprimate toate având nivel de expresie semnificativ statistic (tabelul 9.8, figurile 9.11, 9.12, 9.13, 9.14 și 9.15).

Tabel 9.8. Genele exprimate diferențial între mucoasa neinflamată și cea inflamată la pacienții cu IBD vs. Control cu semnificație statistică p<0.05

Gena studiată	CD Ţesut neinflamat vs. Control (fold regulation)			CD Tesut inflamat vs. Control (fold regulation)		
		p value	Gena studiată		p value	
MUC1	4.7298	0.000756	IL17A	4.9618	0.000006	
TYK2	3.1163	0.00093	LTB	11.6307	0.000009	
IL6	4.066	0.002218	TYK2	2.867	0.000026	
VWF	2.118	0.002356	IL13	4.4998	0.000058	
SOD2	1.9193	0.00414	CXCL11	5.9563	0.000071	
CX3CL1	6.2059	0.004169	UBD	8.0084	0.000103	
TIMP1	2.1351	0.004251	C4BPB	6.0175	0.000107	
IL23A	2.1754	0.006517	REG1A	349.7077	0.000184	
IL13	9.9539	0.006655	STAT3	1.9772	0.000370	
CCL5	2.2169	0.006853	NOD2	3.5532	0.000591	
PECAM1	3.0021	0.008643	TDO2	5.9189	0.000632	
MMP10	5.2768	0.009107	ITGB2	2.5929	0.000657	
CXCR1	7.3957	0.013979	CXCL9	4.2582	0.000773	
IL17A	10.0001	0.014141	CCL11	3.5892	0.001112	
CHI3L1	7.3957	0.014342	CXCL10	2.4606	0.001187	
HSPA5	2.7491	0.0147	CXCL1	7.8994	0.001421	
LTB	2.8727	0.015563	C3	4.8565	0.001438	
NOD2	3.644	0.016487	NOS2	12.098	0.001481	
CSTA	4.6681	0.017914	IFNG	3.3276	0.001977	
SELE	2.4278	0.018354	PECAM1	3.7049	0.002165	
ITGB2	1.6996	0.023357	CCL5	2.8557	0.002168	
NOS2	5.3786	0.023484	CX3CL1	5.18	0.002200	
CX3CR1	2.5836	0.024172	VWF	3.748	0.002339	

NR3C2	1.69	0.028135	SELL	5.3365	0.002584
S100A9	2.3081	0.029243	SOD2	2.3165	0.003357
S100A8	1.936	0.030912	CXCL2	4.627	0.003361
IRF5	1.6464	0.031468	TIMP1	3.5421	0.003668
CCL11	1.8384	0.032419	TNF	2.3257	0.003932
CXCL8	6.1838	0.032589	REG1B	530.3499	0.005198
MMP7	11.0585	0.033125	MMP10	14.8646	0.005641
FPR1	1.5333	0.036453	MMP7	29.0057	0.007447
IL1RN	2.1775	0.038376	IL1RN	12.2078	0.007603
TDO2	1.9192	0.03928	CSTA	3.4237	0.008388
EGR3	5.5621	0.041928	IRF5	1.7975	0.009406
			CCR1	2.3254	0.010086
			IL6	7.9994	0.010615
			S100A9	11.2284	0.011231
			FPR1	9.3362	0.012202
			IL2RA	2.5076	0.013076
			MUC1	2.7727	0.013814
			LYZ	1.7868	0.015349
			IL23A	3.3633	0.015865
			CXCL8	14.6944	0.019958
			CCL25	20.3216	0.023435
			MMP3	41.7204	0.024161
			DEFA5	118.8536	0.024799
			CD55	2.4806	0.025582
			CCL2	2.1903	0.026116
			ISG15	2.0163	0.033973
			CXCR1	44.2663	0.035921

	CXCR3	1.8193	0.037570
	EGR3	6.0175	0.039783
	CCL20	2.4243	0.040237
	DEFA6	40.1567	0.041343
	S100A8	21.9773	0.041762
	SELE	9.8727	0.044350
	CHI3L1	44.2489	0.048768

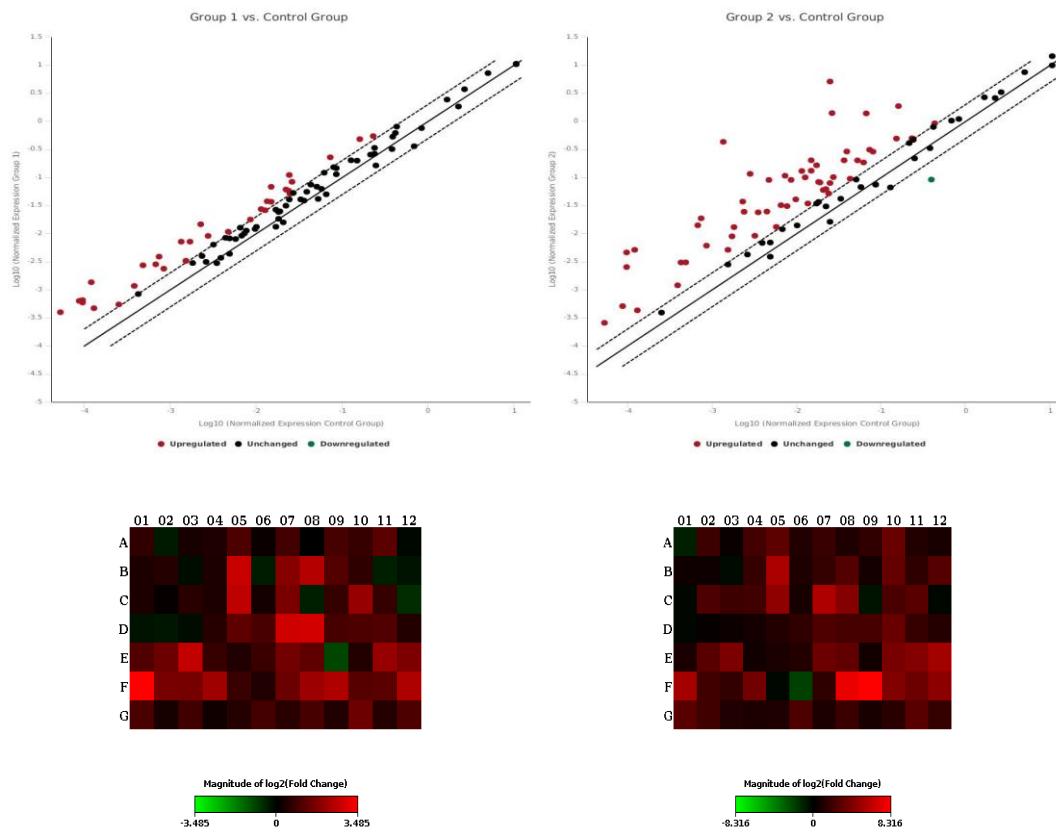


Figura 9.11. Scatter plot și hartă calorică țesut neinflamat și inflamat vs. control

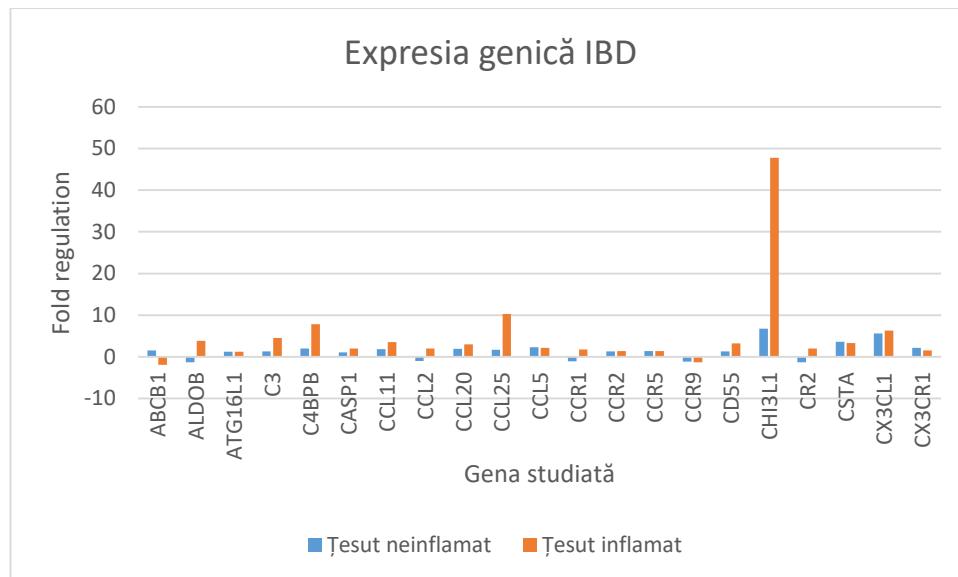


Figura 9.12. Expresia comparativă a primelor 21 gene.

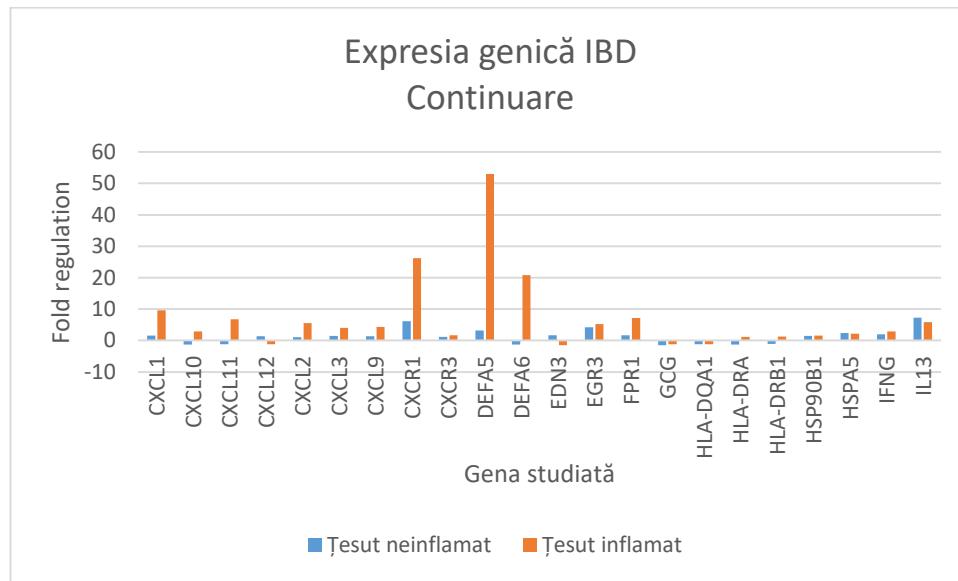


Figura 9.13. Expresia comparativă a genelor 22-42

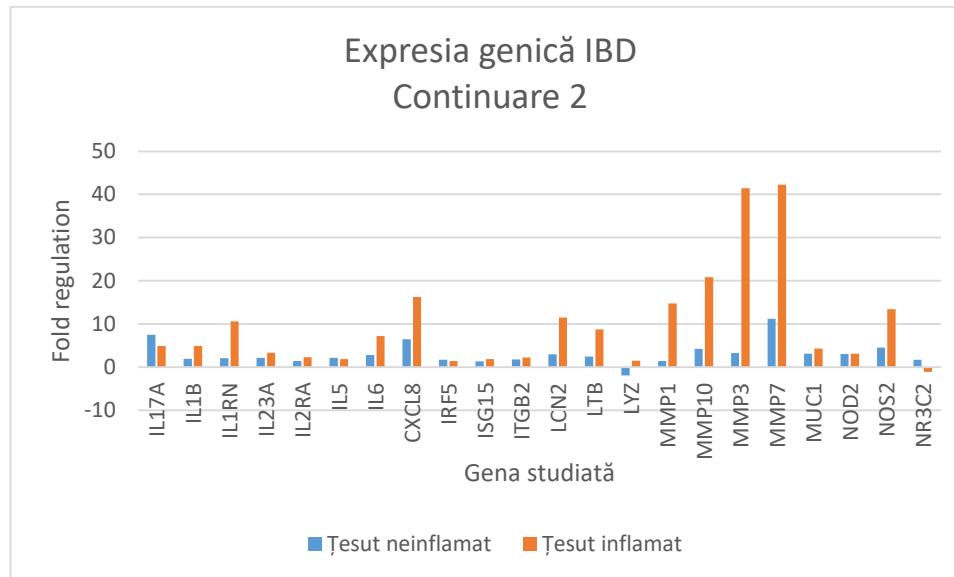


Figura 9.14. Expresia comparativă a genelor 43-63

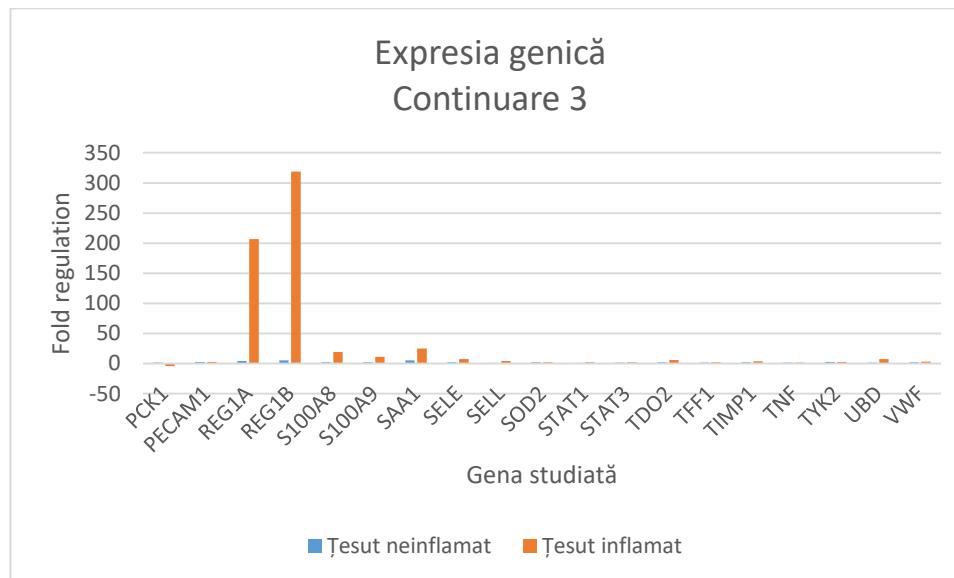


Figura 9.15. Expresia comparativă a genelor 64-84.

Grupând pacienții pe baza diagnosticului, am analizat diferențele între boala Crohn și control, observând 4 gene subexprimate și 32 de gene supraexprimate în țesutul neinflamat, dintre care 35 de gene au fost modificate semnificativ statistic, pe când în țesutul inflamat am identificat doar 1 genă subexprimată, cu 60 de gene supraexprimate, 58 de gene atingând semnificația statistică (tabelul 9.9, figurile 9.16, 9.17, 9.18, 9.19 și 9.20)

Tabel 9.9. Genele exprimate diferențial între mucoasa neinflamată și cea inflamată la pacienții cu CD vs. Control cu semnificație statistică p<0.05

Gena studiată	CD Ţesut neinflamat vs. Control (fold regulation)			CD Tesut inflamat vs. Control (fold regulation)		
		p value	Gena studiată		p value	
MUC1	4.7298	0.000756	IL17A	4.9618	0.000006	
TYK2	3.1163	0.00093	LTB	11.6307	0.000009	
IL6	4.066	0.002218	TYK2	2.867	0.000026	
VWF	2.118	0.002356	IL13	4.4998	0.000058	
SOD2	1.9193	0.00414	CXCL11	5.9563	0.000071	
CX3CL1	6.2059	0.004169	UBD	8.0084	0.000103	
TIMP1	2.1351	0.004251	C4BPB	6.0175	0.000107	
IL23A	2.1754	0.006517	REG1A	349.7077	0.000184	
IL13	9.9539	0.006655	STAT3	1.9772	0.000370	
CCL5	2.2169	0.006853	NOD2	3.5532	0.000591	
PECAM1	3.0021	0.008643	TDO2	5.9189	0.000632	
MMP10	5.2768	0.009107	ITGB2	2.5929	0.000657	
CXCR1	7.3957	0.013979	CXCL9	4.2582	0.000773	
IL17A	10.0001	0.014141	CCL11	3.5892	0.001112	
CHI3L1	7.3957	0.014342	CXCL10	2.4606	0.001187	
HSPA5	2.7491	0.0147	CXCL1	7.8994	0.001421	
LTB	2.8727	0.015563	C3	4.8565	0.001438	
NOD2	3.644	0.016487	NOS2	12.098	0.001481	
CSTA	4.6681	0.017914	IFNG	3.3276	0.001977	
SELE	2.4278	0.018354	PECAM1	3.7049	0.002165	
ITGB2	1.6996	0.023357	CCL5	2.8557	0.002168	
NOS2	5.3786	0.023484	CX3CL1	5.18	0.002200	
CX3CR1	2.5836	0.024172	VWF	3.748	0.002339	

NR3C2	1.69	0.028135	SELL	5.3365	0.002584
S100A9	2.3081	0.029243	SOD2	2.3165	0.003357
S100A8	1.936	0.030912	CXCL2	4.627	0.003361
IRF5	1.6464	0.031468	TIMP1	3.5421	0.003668
CCL11	1.8384	0.032419	TNF	2.3257	0.003932
CXCL8	6.1838	0.032589	REG1B	530.3499	0.005198
MMP7	11.0585	0.033125	MMP10	14.8646	0.005641
FPR1	1.5333	0.036453	MMP7	29.0057	0.007447
IL1RN	2.1775	0.038376	IL1RN	12.2078	0.007603
TDO2	1.9192	0.03928	CSTA	3.4237	0.008388
EGR3	5.5621	0.041928	IRF5	1.7975	0.009406
			CCR1	2.3254	0.010086
			IL6	7.9994	0.010615
			S100A9	11.2284	0.011231
			FPR1	9.3362	0.012202
			IL2RA	2.5076	0.013076
			MUC1	2.7727	0.013814
			LYZ	1.7868	0.015349
			IL23A	3.3633	0.015865
			CXCL8	14.6944	0.019958
			CCL25	20.3216	0.023435
			MMP3	41.7204	0.024161
			DEFA5	118.8536	0.024799
			CD55	2.4806	0.025582
			CCL2	2.1903	0.026116
			ISG15	2.0163	0.033973
			CXCR1	44.2663	0.035921

	CXCR3	1.8193	0.037570
	EGR3	6.0175	0.039783
	CCL20	2.4243	0.040237
	DEFA6	40.1567	0.041343
	S100A8	21.9773	0.041762
	SELE	9.8727	0.044350
	CHI3L1	44.2489	0.048768

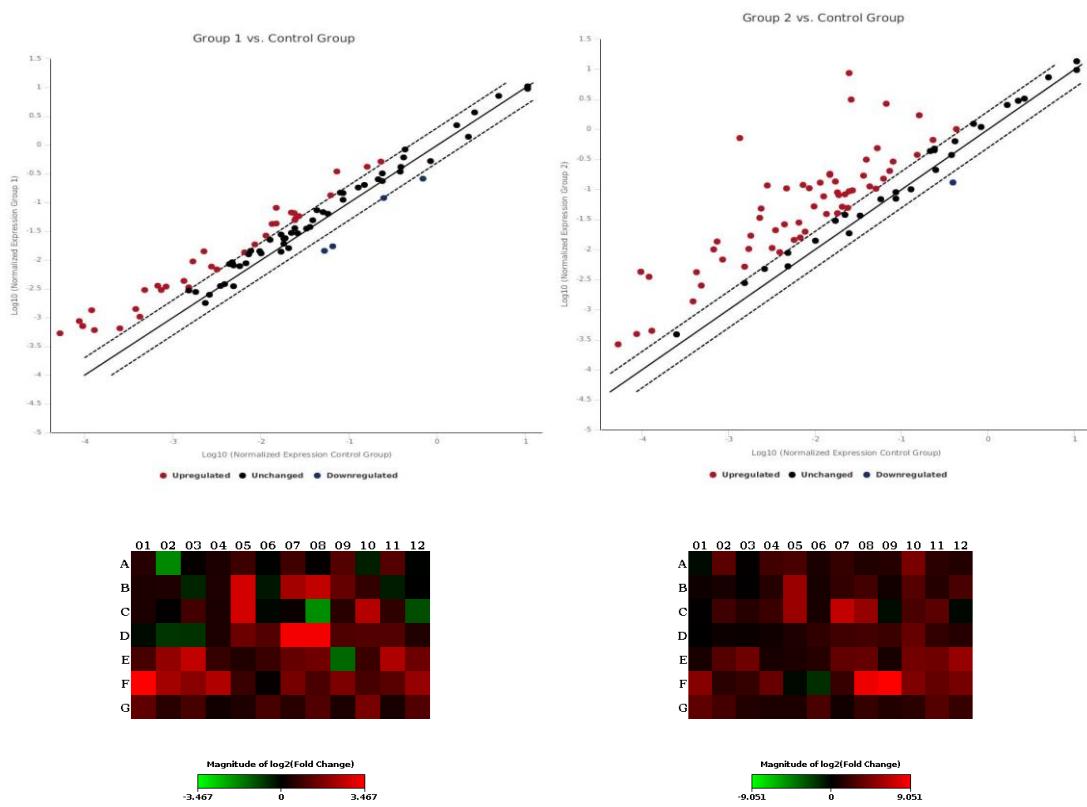


Figura 9.16. Scatter plot și hartă calorică ţesut neinflamat și inflamat vs. control

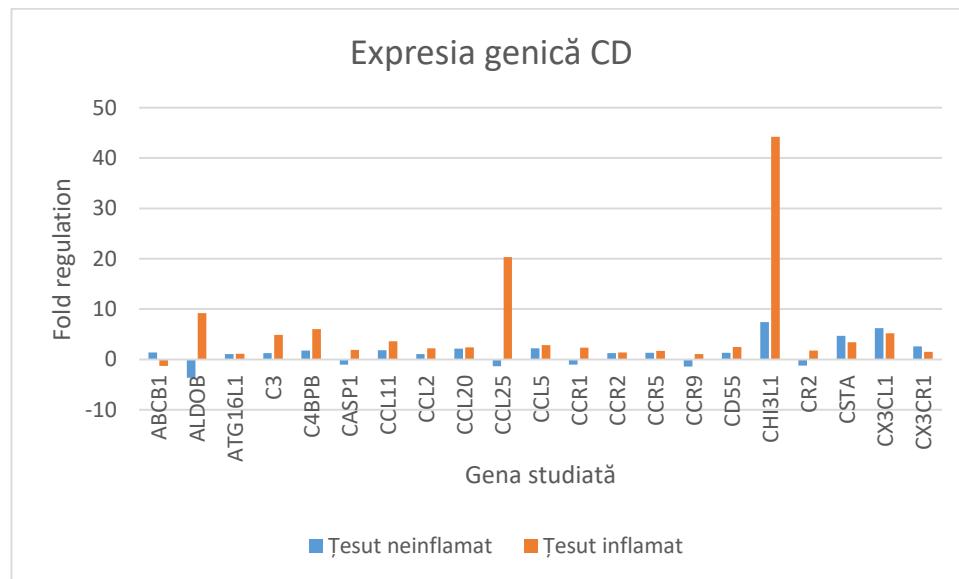


Figura 9.17. Expresia comparativă a primelor 21 gene.

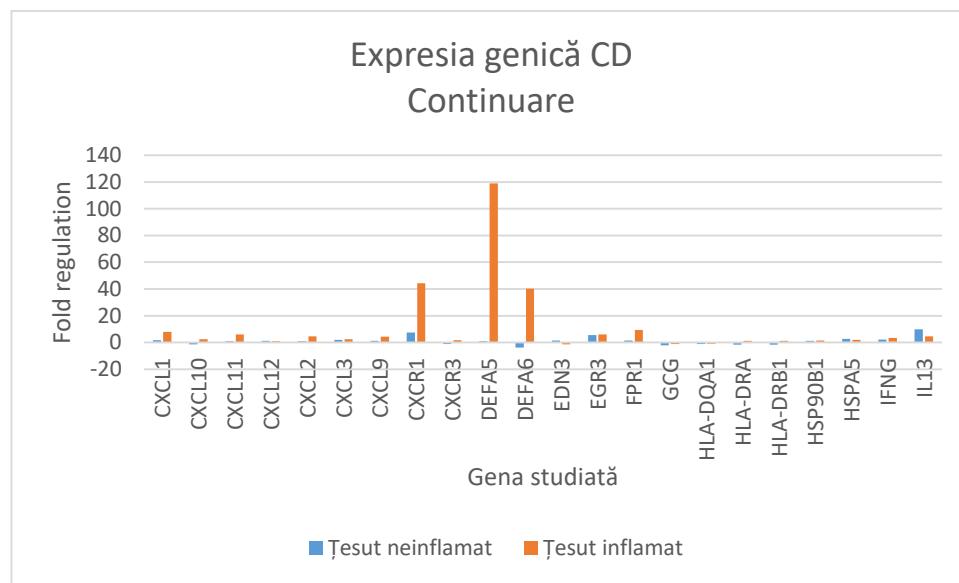


Figura 9.18. Expresia comparativă a genelor 22-42.

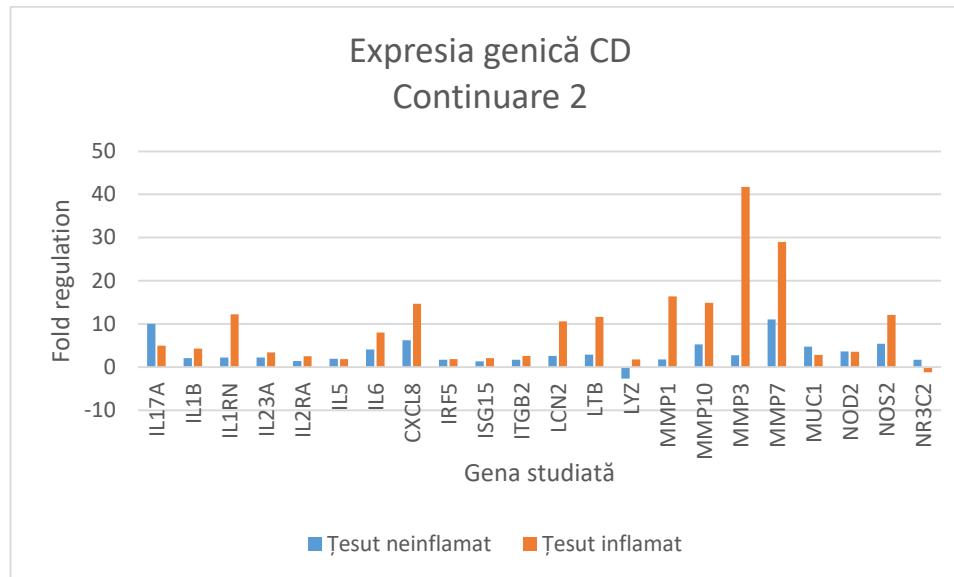


Figura 9.19. Expresia comparativă a genelor 43-64

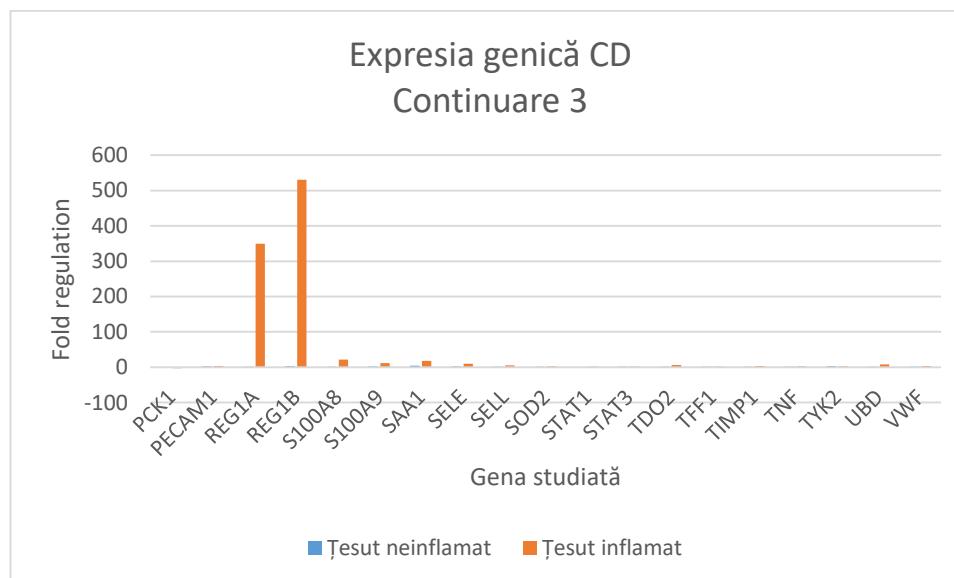


Figura 9.20. Expresia comparativă a genelor 64-84

Am continuat cu analiza diferențelor între pacienții cu boală Crohn operați – recidivă postoperatorie, și cei neoperați, de asemenea, comparând nivelul expresiei genice cu pacienții sănătoși. Am observat subexpresia a 3 gene și supraexpresia a 40 de gene la pacienții cu recidivă

postoperatorie, și doar 1 genă subexprimată și 65 de gene supraexprimate la pacienții cu boală pe intestin indemn comparativ cu controlul. Dintre acestea, 42 de gene la pacienții operați și 57 de gene la cei neoperați au atins pragul semnificației statistice (tabel 9.10, figurile 9.21, 9.22, 9.23, 9.24 și 9.25)

Tabel 9.10. Genele exprimate diferențial între mucoasa pacienților cu CD operați și cei neoperați vs. Control cu semnificație statistică p<0.05

Genastudiată	CD Pacienți operați – recidivă anastomotică vs. Control (fold regulation)	p value	CD Pacienți neoperați vs. Control (fold regulation)	Pacienți neoperați vs. Control (fold regulation)	p value
REG1B	1063.1694	0.000000	LTB	15.5431	0.000001
S100A9	11.9261	0.000000	IL13	6.2194	0.000001
C4BPB	6.8472	0.000001	TYK2	3.3082	0.000005
S100A8	22.8057	0.000001	IL17A	4.6785	0.000031
TDO2	4.1924	0.000003	NOD2	4.7368	0.000039
NOS2	10.4908	0.000006	CXCL9	5.1869	0.000075
MMP10	14.9915	0.000008	C3	6.9523	0.000140
FPR1	8.1486	0.000009	UBD	7.7395	0.000143
REG1A	1048.0981	0.000017	TDO2	7.1856	0.000160
CXCL1	13.2662	0.000018	ITGB2	2.9473	0.000192
IL1RN	9.1347	0.000018	C4BPB	5.9434	0.000224
CXCL8	13.063	0.000025	STAT3	2.1187	0.000258
IL6	5.6631	0.000070	CXCL11	4.5266	0.000319
MMP3	26.9958	0.000082	SOD2	3.0337	0.000332
MMP1	14.8525	0.000104	TIMP1	5.102	0.000411
CXCL11	10.7084	0.000108	SELL	7.0972	0.000424
MMP7	47.6058	0.000144	CX3CL1	6.3229	0.000508

LTB	6.2942	0.000213	REG1A	214.3636	0.000672
VWF	2.6702	0.000228	CCL11	4.083	0.000675
CXCR1	30.9322	0.000278	IRF5	2.301	0.000777
IL17A	4.8096	0.000294	VWF	4.3179	0.000833
CHI3L1	17.1764	0.000390	NOS2	13.0701	0.000854
SELE	4.4449	0.000461	TNF	2.7819	0.001039
PECAM1	3.0979	0.000520	IFNG	3.8538	0.001073
LCN2	9.5149	0.000562	CXCL2	5.3609	0.001462
CXCL10	3.3556	0.002924	CSTA	4.1853	0.002003
UBD	7.6066	0.003283	PECAM1	3.6981	0.002272
DEFA6	214.2654	0.003481	MMP10	16.6724	0.002359
CCL11	2.7341	0.003680	CXCL10	2.154	0.002578
CXCL2	4.3902	0.006612	CCL5	3.0969	0.002769
LYZ	2.8345	0.007300	IL6	9.3571	0.003157
IL13	3.6479	0.010257	IL2RA	3.0087	0.003240
CX3CL1	6.2214	0.011824	CXCR3	2.5615	0.003333
DEFA5	327.65	0.015314	CXCL1	7.4267	0.003749
TYK2	1.9436	0.016807	REG1B	411.3984	0.004508
CXCL3	4.9786	0.024021	IL23A	4.3437	0.004536
CCL25	83.1043	0.025796	MUC1	3.4761	0.005234
C3	2.7148	0.030009	MMP7	30.0769	0.006552
CCL2	2.2239	0.030237	IL1RN	12.4902	0.006886
TIMP1	1.7765	0.039319	S100A9	12.0349	0.008134
SELL	3.49	0.040151	FPR1	9.5521	0.008269
CD55	3.2012	0.047307	CXCL8	16.5354	0.008783
			CCR1	2.4378	0.009136
			MMP3	54.2584	0.010121
			CCL20	3.1614	0.011975

	STAT1	2.3393	0.019787
	CHI3L1	75.789	0.019980
	SELE	14.4306	0.022004
	ISG15	2.102	0.022803
	CXCR1	45.0644	0.022925
	CCL2	2.254	0.024104
	S100A8	22.6254	0.028897
	MMP1	17.5187	0.031946
	IL1B	5.2732	0.033721
	LCN2	12.5937	0.034756
	CR2	2.6257	0.048948
	EGR3	5.5638	0.049610

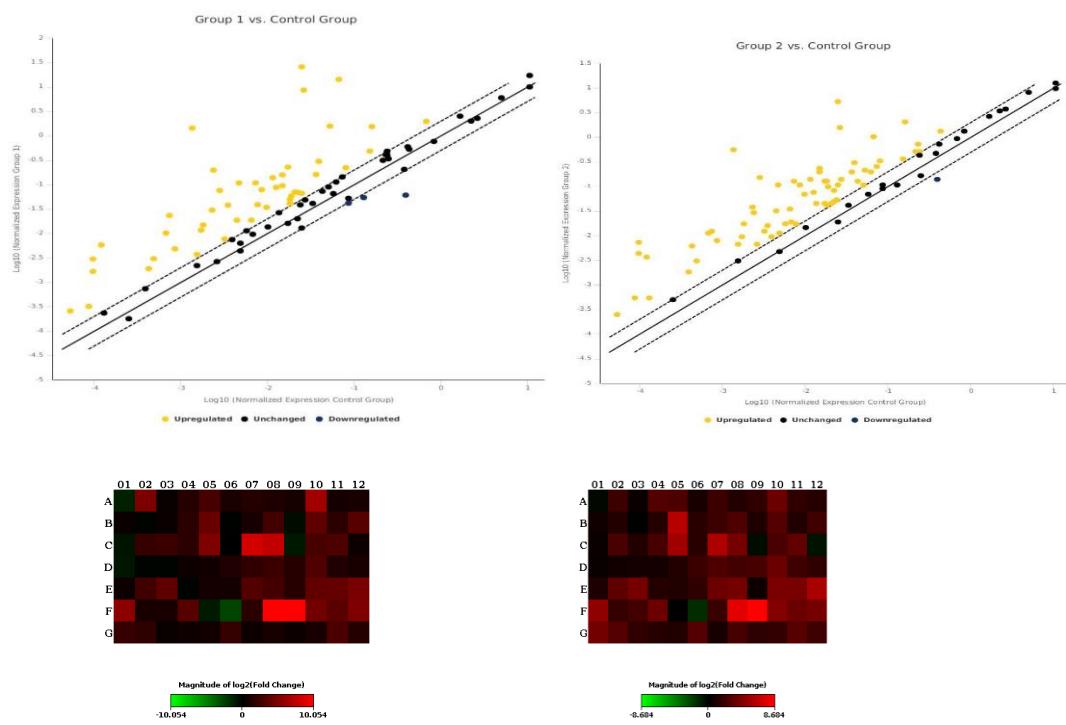


Figura 9.21. Scatter pot și hartă calorică țesut de la pacienți cu CD și recidivă postoperatorie și respectiv, pacienți neoperați vs. control

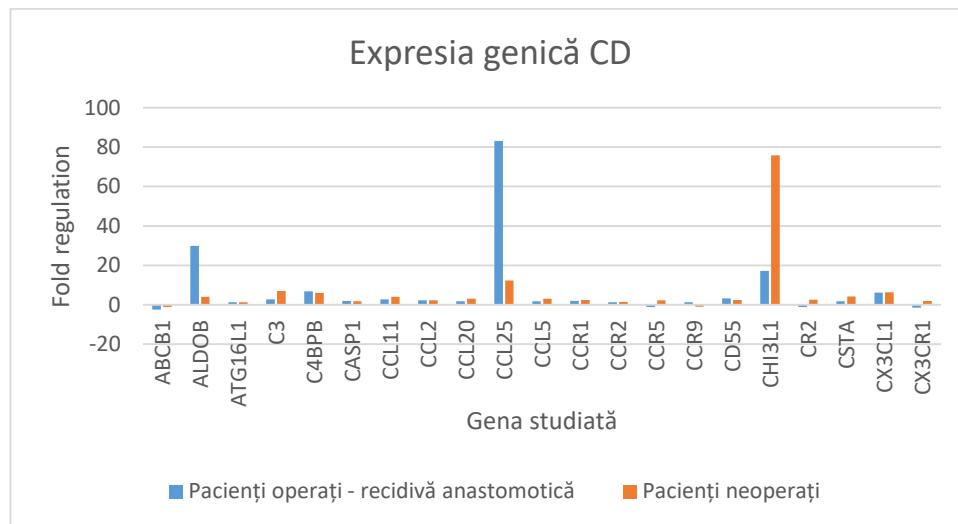


Figura 9.22. Expresia comparativă a primelor 21 gene.

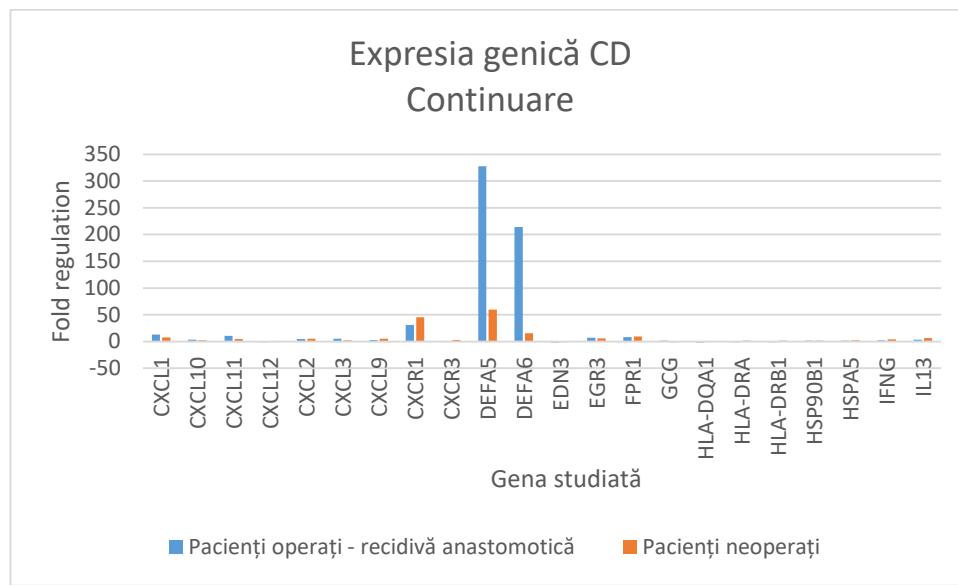


Figura 9.23. Expresia comparativă a genelor 22-42.

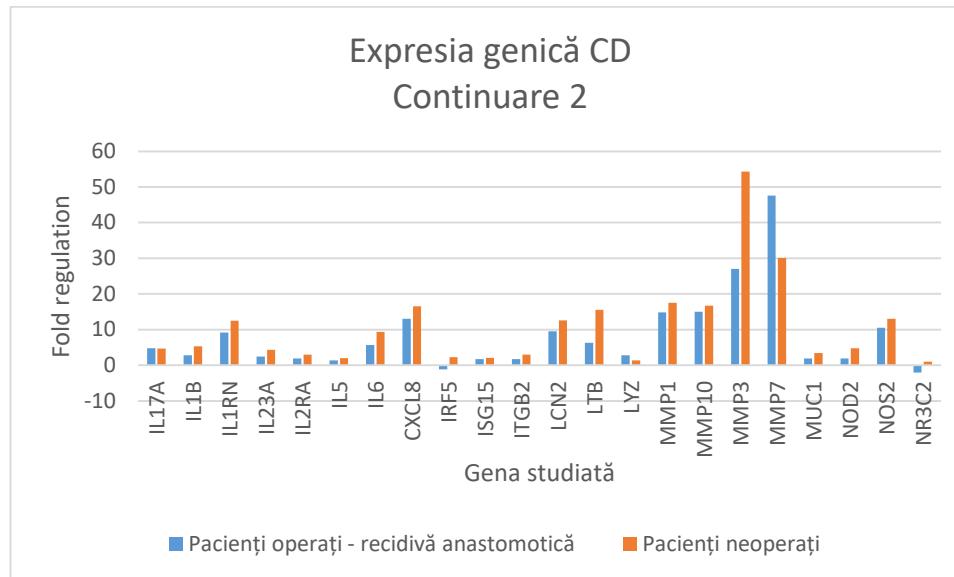


Figura 9.24. Expresia comparativă a genelor 43-64

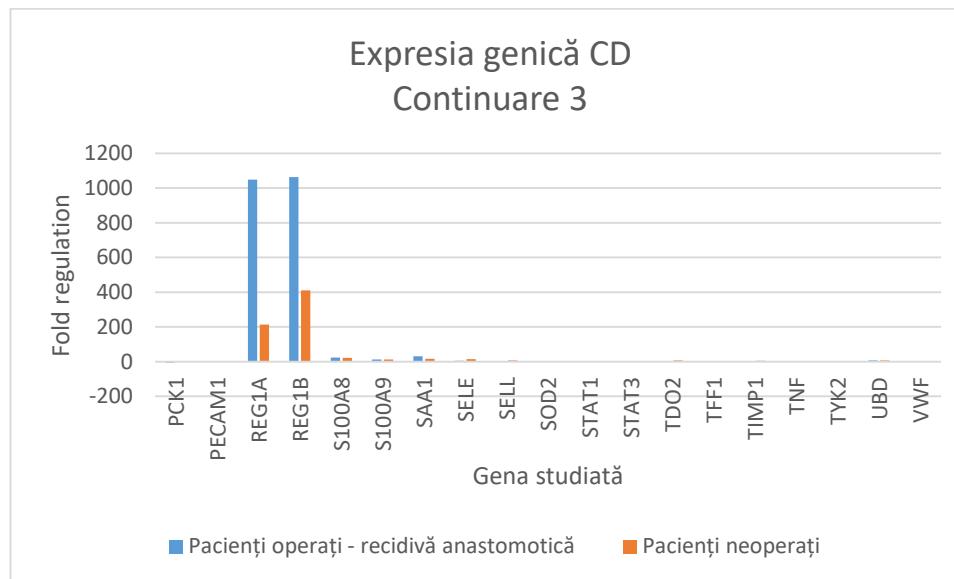


Figura 9.25. Expresia comparativă a genelor 64-84

Din punct de vedere endoscopic am grupat pacienții în remisiune și cei cu activitate endoscopică prezentă și am analizat similar, prin comparație cu pacienții sănătoși, expresia genică la nivel mucozal. Am obținut 2 și, respectiv, 1 genă subexprimate, și, respectiv, 40 și 67 de gene fiind supraexprimate. În cazul pacienților cu boală în remisiune endoscopică, 34 de

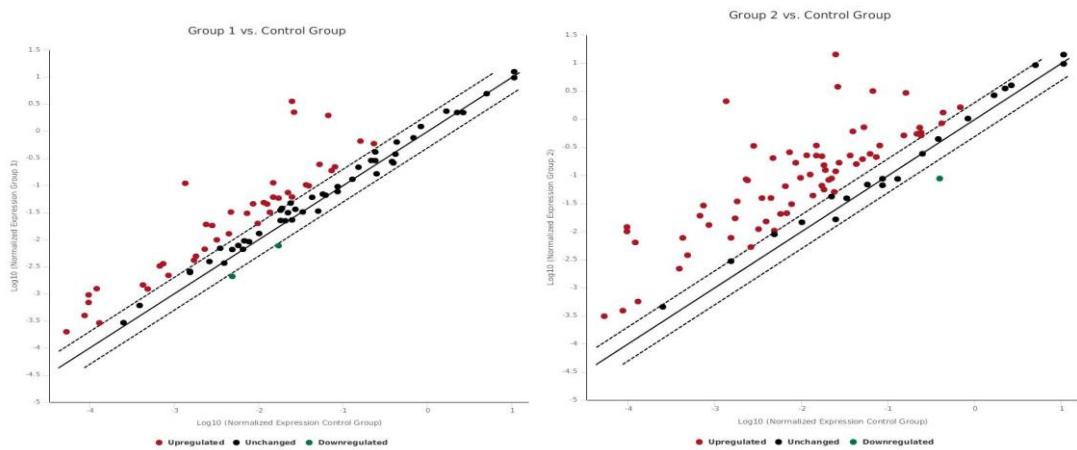
gene au prezentat semnificație statistică față de 59 de gene la pacienții cu activitate endoscopică (tabelul 9.11, figurile 9.26, 9.27, 9.28, 9.29 și 9.30)

Tabel 9.11. Genele exprimate diferențial între mucoasa pacienților cu CD în remisiune endoscopică și cu activitate endoscopică vs. Control cu semnificație statistică p<0.05

Genă studiată	CD Remisiune endoscopică vs. Control (fold regulation)			CD Activitate endoscopică vs. Control (fold regulation)		
		p value	Genă studiată		p value	
CXCR1	9.8876	0.000096	UBD	15.5242	0.000000	
SELE	3.4157	0.000136	LTB	15.0078	0.000001	
PECAM1	3.3008	0.000147	IL17A	5.84	0.000002	
IL13	4.5476	0.000256	NOD2	5.6553	0.000004	
S100A9	4.1724	0.000319	CXCL11	11.2255	0.000006	
LTB	7.4449	0.000334	TYK2	3.2184	0.000022	
S100A8	6.7883	0.000539	ITGB2	3.6928	0.000024	
TDO2	2.8867	0.000718	TDO2	8.9214	0.000042	
C4BPB	3.5519	0.000778	C4BPB	8.133	0.000049	
IL1RN	5.3276	0.001049	REG1A	579.573	0.000073	
TYK2	2.3417	0.001189	IL13	4.4727	0.000093	
REG1A	144.4608	0.001356	CXCL9	6.5836	0.000101	
FPR1	2.7074	0.001549	C3	8.2994	0.000112	
IL17A	3.7305	0.001609	SELL	9.2712	0.000131	
REG1B	81.0622	0.001810	NOS2	22.652	0.000164	
VWF	2.4701	0.002215	TIMP1	6.1933	0.000166	
MMP10	4.8155	0.002823	CX3CL1	7.8212	0.000201	
CCL11	2.7186	0.006171	CCR1	3.8917	0.000221	
CXCL8	2.9018	0.007330	TNF	3.1155	0.000232	
CHI3L1	7.1552	0.007808	STAT3	2.1389	0.000260	

IL6	2.5611	0.010499	CXCL1	12.7845	0.000377
LCN2	4.0691	0.011680	SOD2	3.0298	0.000464
MMP3	6.5257	0.012007	CCL11	4.2068	0.000481
MMP7	10.2109	0.012216	REG1B	1551.3224	0.000499
MMP1	4.2027	0.013325	CXCL10	3.9714	0.000587
IFNG	3.0969	0.013422	MMP10	28.3059	0.000635
NOS2	4.0367	0.014681	VWF	4.7564	0.001191
CXCL10	1.0646	0.021273	PECAM1	3.9576	0.001362
MUC1	2.562	0.021721	CXCL2	6.1697	0.001400
CXCL11	1.9649	0.022674	IL2RA	3.5751	0.002104
CXCL9	1.9863	0.031639	IL1RN	19.6069	0.002254
CXCL1	3.4016	0.035235	FPR1	18.9402	0.002838
CXCL2	2.7964	0.039960	S100A9	19.7693	0.002915
STAT3	1.7231	0.046274	CCL5	3.053	0.003049
			MMP7	52.6718	0.003087
			ISG15	3.8267	0.003281
			IFNG	3.467	0.003667
			IRF5	2.1251	0.003833
			IL23A	5.0114	0.004315
			CXCL8	37.1295	0.004719
			CSTA	4.3701	0.004993
			IL6	15.3356	0.005714
			MMP3	120.4369	0.005919
			LYZ	2.3614	0.006334
			CCL25	34.4647	0.007475
			CCL2	3.0504	0.008337
			CXCR1	104.2469	0.009195
			CD55	3.4013	0.009804

	CCL20	3.8924	0.011086
	CHI3L1	125.3322	0.012789
	MUC1	2.9009	0.014124
	SELE	18.1066	0.014408
	S100A8	43.0055	0.016610
	CR2	3.8251	0.018739
	STAT1	2.5274	0.019475
	MMP1	35.5146	0.019700
	IL1B	9.7342	0.021115
	EGR3	10.0821	0.022297
	DEFA5	143.786	0.022936
	LCN2	18.2469	0.026726
	CASP1	2.4085	0.037600



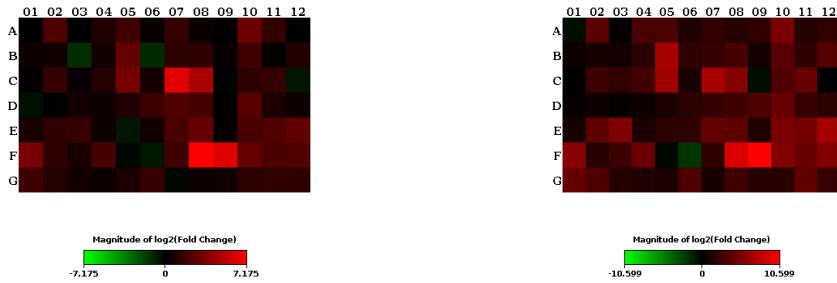


Figura 9.26. Scatter plot și hartă calorică țesut de la pacienți cu CD cu remisiune endoscopică și activitate endoscopică vs. Control

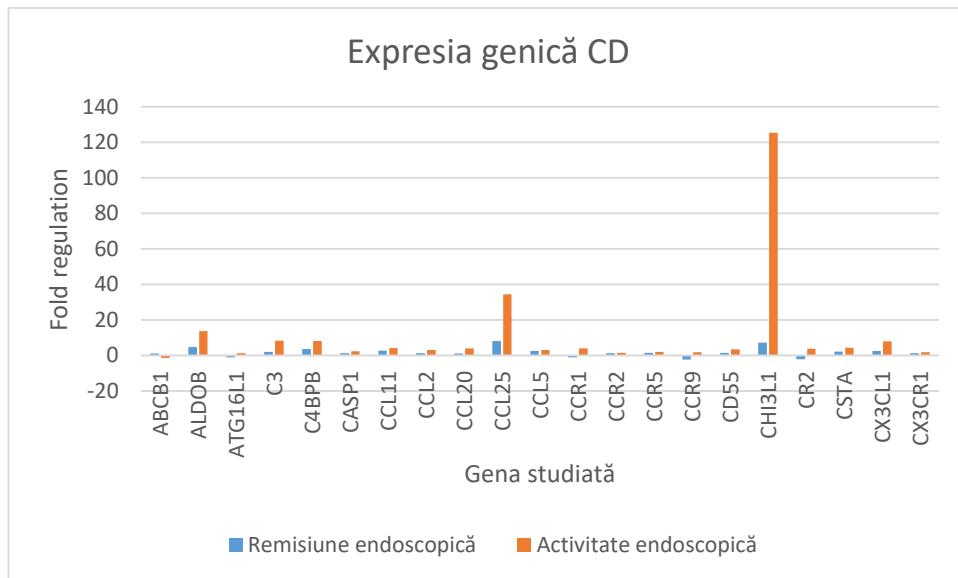


Figura 9.27. Expresia comparativă a primelor 21 gene.

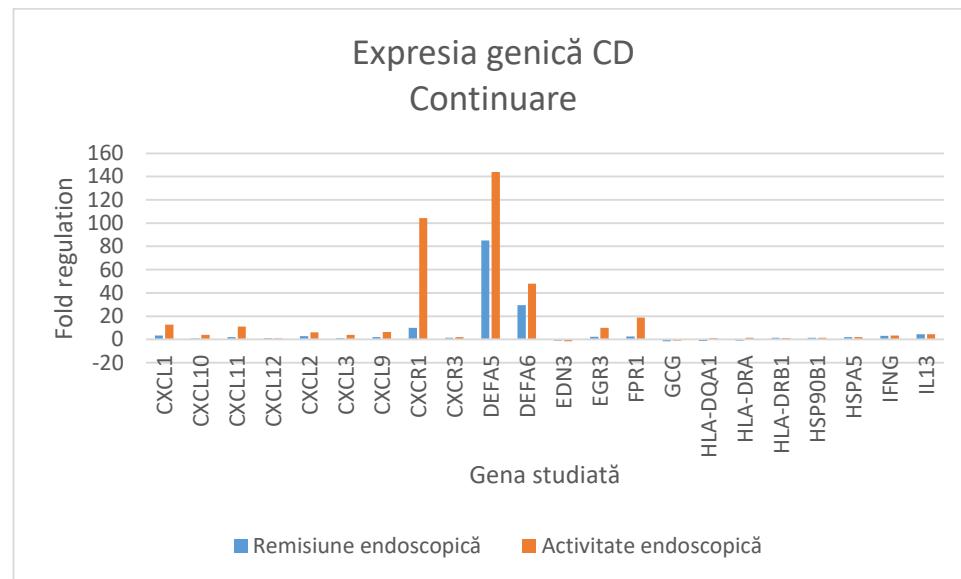


Figura 9.28. Expresia comparativă a genelor 22-42.

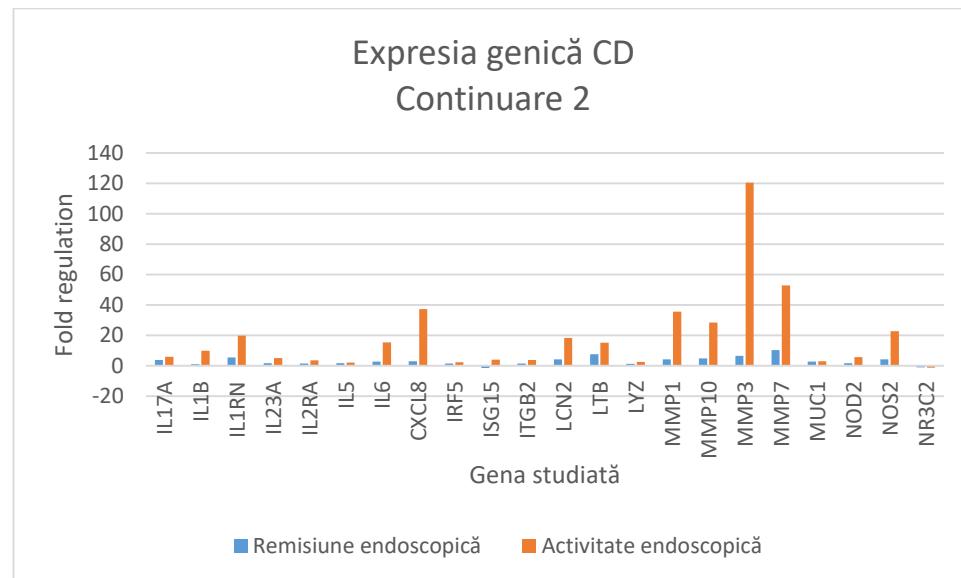


Figura 9.29. Expresia comparativă a genelor 43-64

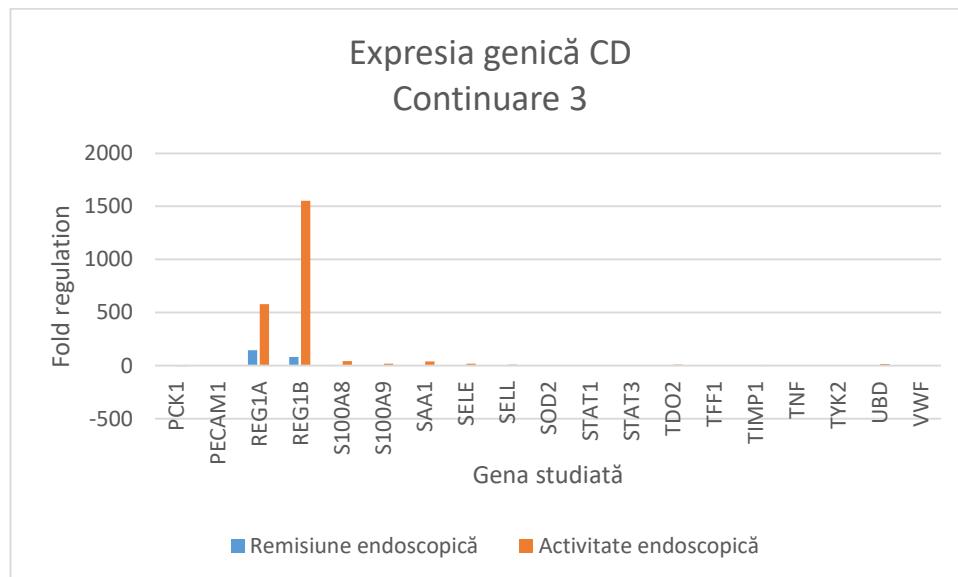


Figura 9.30. Expresia comparativă a genelor 64-84

Am căutat să identificăm care sunt influențele tratamentului asupra profilului de expresie genetică și am grupat pacienții în funcție de moleculele de tratament utilizate la momentul prelevării biopsiilor. În lotul pacienților cu boală Crohn nu au existat decât pacienți tratați cu derivați 5-ASA și agenți biologici. Am observat 2 gene subexprimate și 67 supraexprimate în lotul tratat cu 5-ASA, și 1 genă subexprimată cu 50 supraexprimate în lotul pacienților tratați cu antiTNF. Semnificația statistică s-a obținut la 55 de gene din primul lot și 50 de gene pentru al doilea lot. De notat, deși numărul genelor este similar, nivelul de expresie este diferit (tabel 9.12, figuri 9.31, 9.32, 9.33, 9.34 și 9.35)

Tabel 9.12. Genele exprimate diferențial între mucoasa pacienților cu CD în tratament 5-ASA și cei în tratament cu antiTNF vs. Control cu semnificație statistică p<0.05

Genă studiată	CD Tratament			CD Tratamentant iTNF vs. Control (fold regulation)		
	5-ASA vs. Control (fold regulation)	p value	Genă studiată	5-ASA vs. Control (fold regulation)	p value	
C3	10.9359	0.000000	IL17A	5.3311	0.000008	
CXCL9	12.5828	0.000000	REG1A	414.2439	0.000047	

FPR1	13.7784	0.000000	C4BPB	4.6782	0.000204
IL1RN	13.8925	0.000000	TYK2	2.4859	0.000207
LTB	22.42	0.000000	NOS2	8.5039	0.000292
S100A9	14.5977	0.000000	REG1B	450.4783	0.000377
SELE	12.3768	0.000000	IL13	4.083	0.000488
TDO2	7.9923	0.000000	LTB	7.9934	0.000529
CHI3L1	109.321	0.000001	CXCL11	4.4123	0.000741
CXCL8	30.9314	0.000001	UBD	5.7096	0.002044
MMP1	19.4855	0.000001	LCN2	5.4876	0.002990
MMP3	101.4963	0.000001	PECAM1	4.4703	0.003147
VWF	4.8027	0.000001	TDO2	4.9855	0.003659
CXCR1	45.9638	0.000004	DEFA5	157.8162	0.004231
ITGB2	4.6361	0.000004	LYZ	2.0725	0.004327
IL13	5.3342	0.000006	CXCL1	5.7212	0.004799
UBD	14.4777	0.000010	MMP7	15.5079	0.005892
CXCL10	5.6983	0.000012	NOD2	2.9809	0.006012
CXCL11	10.0697	0.000013	SELL	4.4832	0.006121
TYK2	3.6797	0.000014	CCL11	2.9861	0.006190
NOD2	4.8314	0.000015	DEFA6	53.6993	0.007035
S100A8	29.9271	0.000031	IL1RN	11.3384	0.007243
C4BPB	9.349	0.000066	STAT3	1.7885	0.007610
SOD2	3.0942	0.000089	CX3CL1	4.1394	0.008979
PECAM1	2.6671	0.000126	CCL25	32.5782	0.010083
SELL	7.2388	0.000155	S100A9	9.6648	0.010151
MMP7	86.7681	0.000177	VWF	3.2528	0.010815
CXCL2	7.7328	0.000195	IL6	5.6459	0.010941
CCL11	4.9524	0.000229	FPR1	7.4746	0.011843
TNF	3.6797	0.000278	IFNG	2.7402	0.015565

TIMP1	7.3593	0.000286	CXCR1	43.3247	0.015909
MUC1	6.5025	0.000317	TIMP1	2.3323	0.016355
MMP10	26.2256	0.000324	SOD2	1.9633	0.017206
IL6	14.7186	0.000396	ITGB2	1.8603	0.017652
IL17A	4.3759	0.000459	CCL5	2.5655	0.018964
STAT3	2.3566	0.000507	CXCL10	1.5228	0.019902
CXCL1	13.8925	0.000579	SELE	8.6763	0.020248
NOS2	22.42	0.000601	CXCL8	9.6037	0.020644
IFNG	4.6745	0.000877	MMP10	10.7462	0.021201
IL23A	6.8326	0.001209	MMP3	25.1026	0.021888
CCL20	6.4491	0.001317	CXCL2	3.4502	0.021949
CX3CL1	7.6693	0.001553	CCL2	2.1305	0.024600
CSTA	6.0371	0.001609	CCR1	2.13	0.024625
CXCR3	3.3882	0.001927	EGR3	5.922	0.026648
IRF5	2.5593	0.002017	S100A8	18.4226	0.026732
IL2RA	4.3399	0.002957	CHI3L1	26.3903	0.028996
LCN2	33.3159	0.005037	C3	3.054	0.030195
IL1B	7.6063	0.005182	MMP1	14.7819	0.032280
REG1A	260.0106	0.006487	CXCL9	2.2927	0.034501
CCL5	3.4446	0.007365	IL23A	2.2432	0.049245
REG1B	705.6958	0.008758			
CR2	6.9463	0.014375			
STAT1	2.6019	0.024207			
CCR1	2.7115	0.026031			
CCL2	2.299	0.031588			

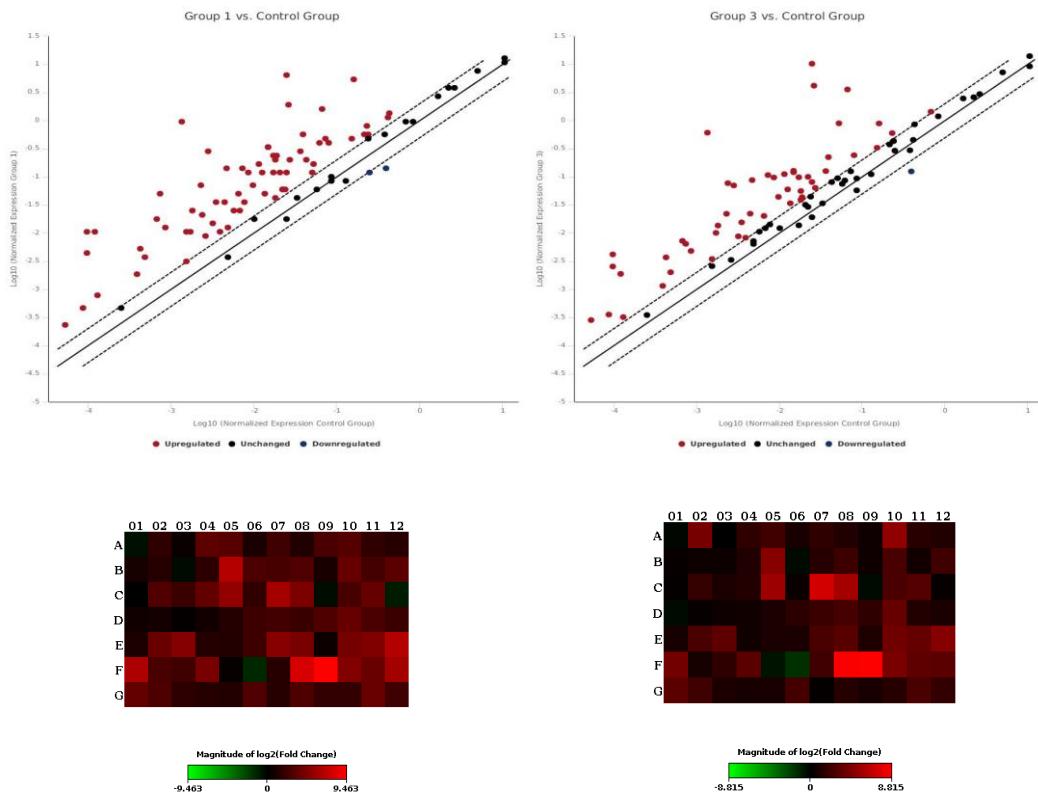


Figura 9.31. Scatter plot și hartă calorică țesut de la pacienți cu CD tratați cu 5-ASA și agenți biologici vs. control

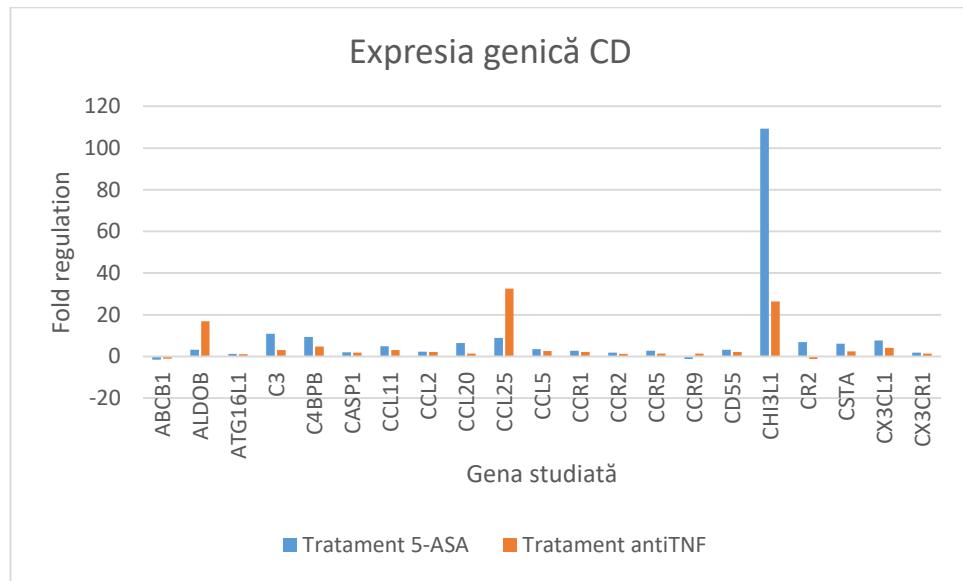


Figura 9.32. Expresia comparativă a primelor 21 gene.

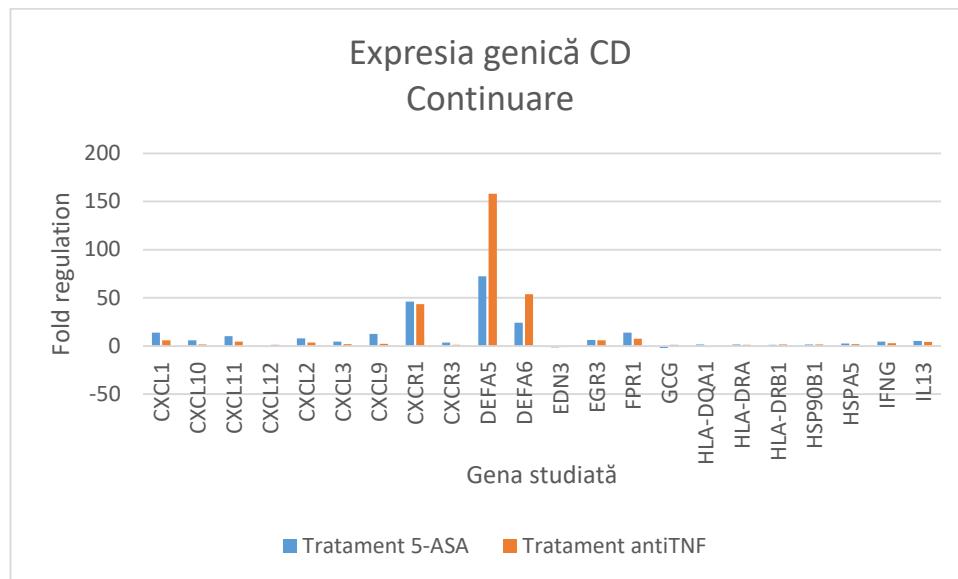


Figura 9.33. Expresia comparativă a genelor 22-42.

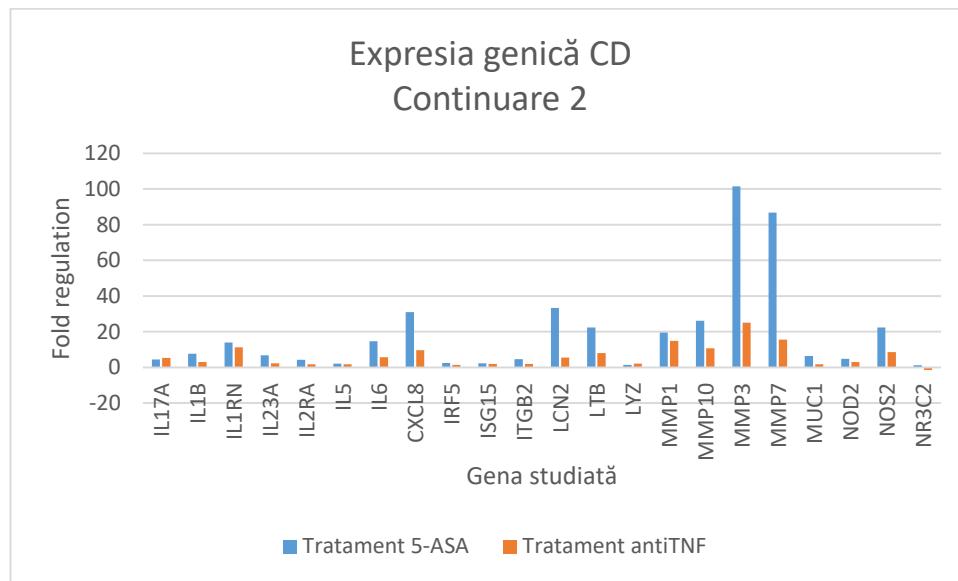


Figura 9.34. Expresia comparativă a genelor 43-64

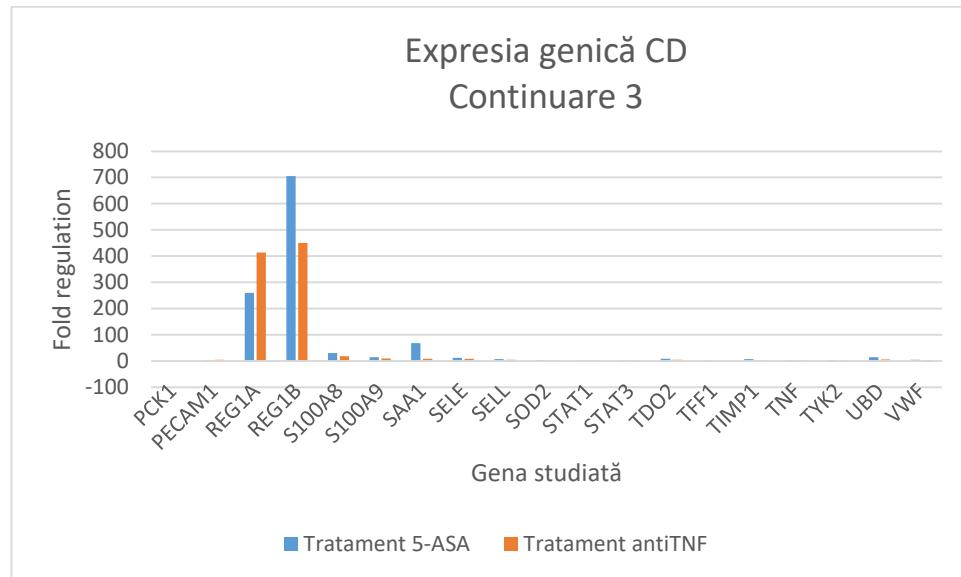


Figura 9.35. Expresia comparativă a genelor 64-84

Analizând grupul pacienților cu colită ulcerativă am urmărit gruparea acestora după aceeași parametrii ca și în cazul pacienților cu boală Crohn. Astfel, prima analiză am efectuat-o comparând țesutul neinflamat cu cel inflamat. Am obținut 30 de gene supraexprimate în țesutul neinflamat, cu 1 genă subexprimată și 55 supraexprimate în țesutul inflamat. Dintre ele, 9 gene au fost semnificativ modificate pentru țesutul neinflamat și 51 de gene pentru cel inflamat(tabel 9.13, figuri 9.36, 9.37, 9.38, 9.39 și 9.40)

Tabel 9.13. Genele exprimate diferențial între mucoasa neinflamată și mucoasa inflamată la pacienți cu UC vs. Control cu semnificație statistică $p < 0.05$

Genă studiată	UC Țesut neinflamat vs. Control (fold regulation)		Genă studiată	UC Țesut inflamat vs. Control (fold regulation)	
	Valoare p	Valoare p		Valoare p	Valoare p
C4BPB	3.6426	0.001289	CHI3L1	53.8901	0.000000
LCN2	6.5955	0.003647	TDO2	5.0369	0.000000
MMP7	9.2391	0.003896	MMP1	12.5135	0.000000
S100A8	3.2009	0.004588	MMP3	41.0014	0.000006

S100A9	2.3595	0.005018	MMP7	76.2981	0.000016
IL5	2.3713	0.034112	FPR1	4.7178	0.000017
DEFA5	44.1188	0.0351	IL6	6.0383	0.000021
PCK1	2.0142	0.042936	MUC1	8.3206	0.000030
CXCL8	6.9207	0.044803	SELE	4.3500	0.000055
		REG1B	143.1427	0.000065	
		CXCL1	12.9904	0.000067	
		MMP10	35.3709	0.000085	
		VWF	2.4973	0.000188	
		TIMP1	4.0199	0.000264	
		LCN2	13.1318	0.000342	
		IL13	8.8087	0.000555	
		S100A9	11.3335	0.000662	
		C3	4.0657	0.000718	
		CCL11	3.5152	0.000746	
		CXCL11	8.2793	0.000864	
		CCL20	4.0994	0.001063	
		CXCL2	7.2535	0.001064	
		IL1RN	8.3897	0.001475	
		UBD	6.5484	0.002094	
		CXCL3	7.9124	0.002138	
		CX3CL1	8.5958	0.002213	
		CXCL9	4.3380	0.002291	
		LTB	5.5835	0.002625	
		CXCL8	18.9274	0.002690	
		IL23A	3.2689	0.003353	
		CXCR1	11.5302	0.003704	

	SOD2	1.8173	0.003761
	STAT3	1.8966	0.004136
	CXCL10	3.6080	0.005432
	NOD2	2.5288	0.005477
	S100A8	15.1831	0.005492
	IL1B	5.9540	0.006939
	C4BPB	11.9074	0.010367
	SELL	2.8026	0.012178
	NOS2	15.7703	0.013738
	PCK1	-7.5467	0.014038
	TYK2	2.0644	0.015489
	IL17A	4.6520	0.015966
	CD55	4.9425	0.017054
	PECAM1	1.7637	0.038189
	TFF1	2.6756	0.038478
	CASP1	2.3230	0.044410

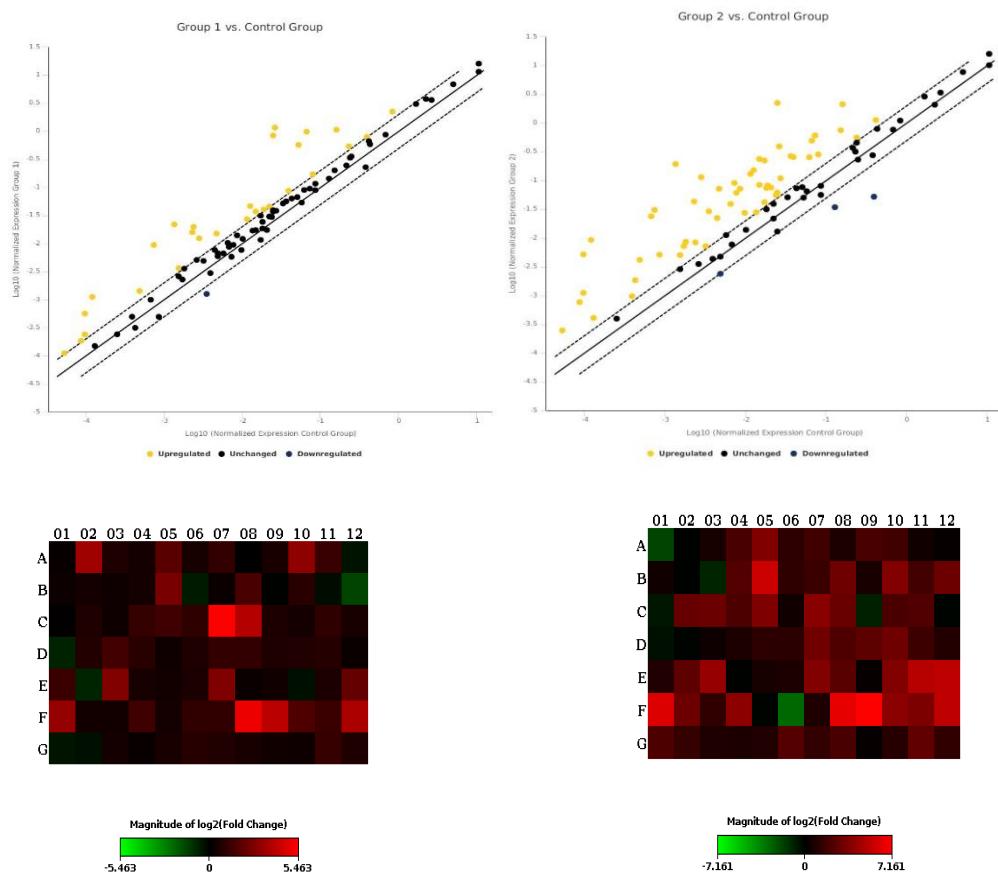


Figura 9.36. Scatter plot și hartă calorică țesut de la pacienți cu UC neinflamat și inflamat vs. control

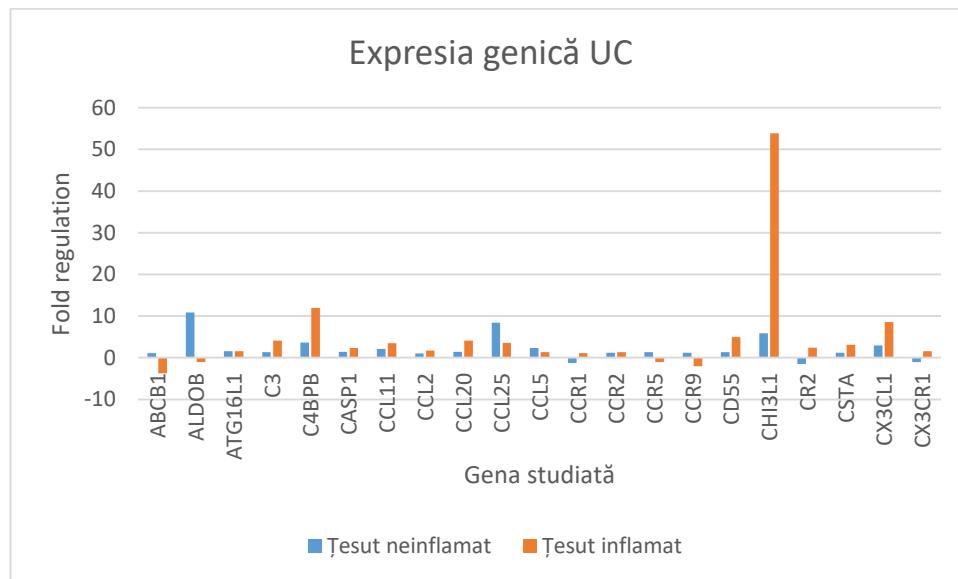


Figura 9.37. Expresia comparativă a primelor 21 gene.

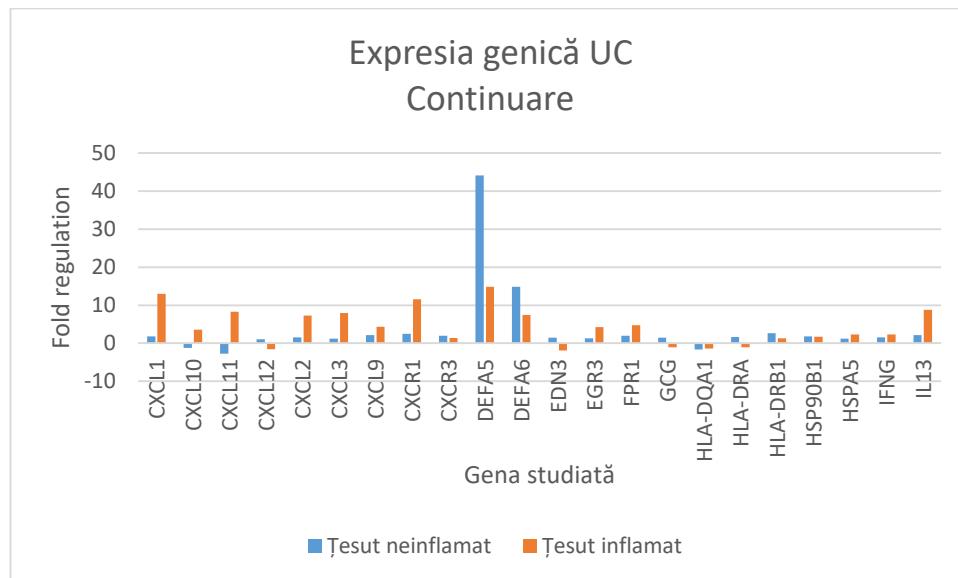


Figura 9.38. Expresia comparativă a genelor 22-42.

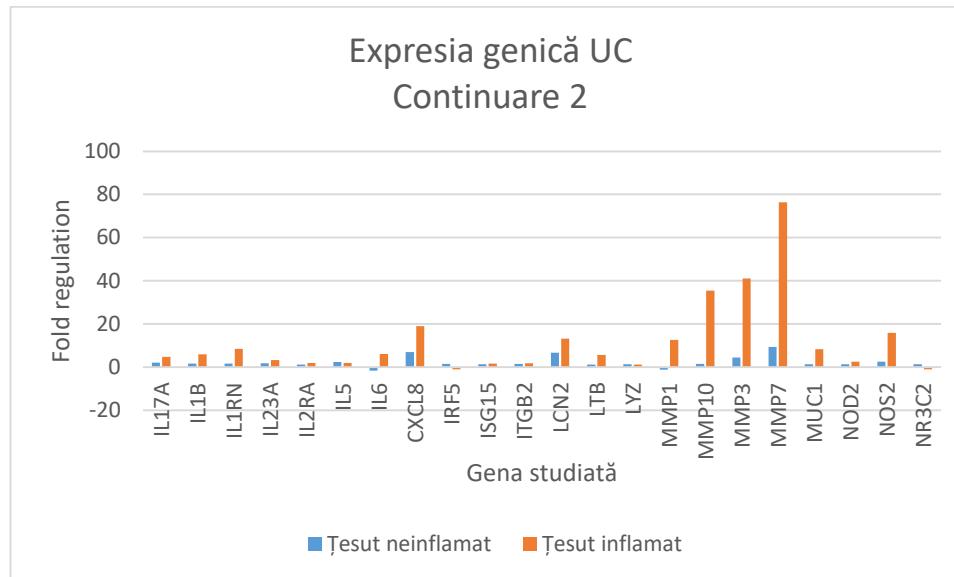


Figura 9.39. Expresia comparativă a genelor 43-64

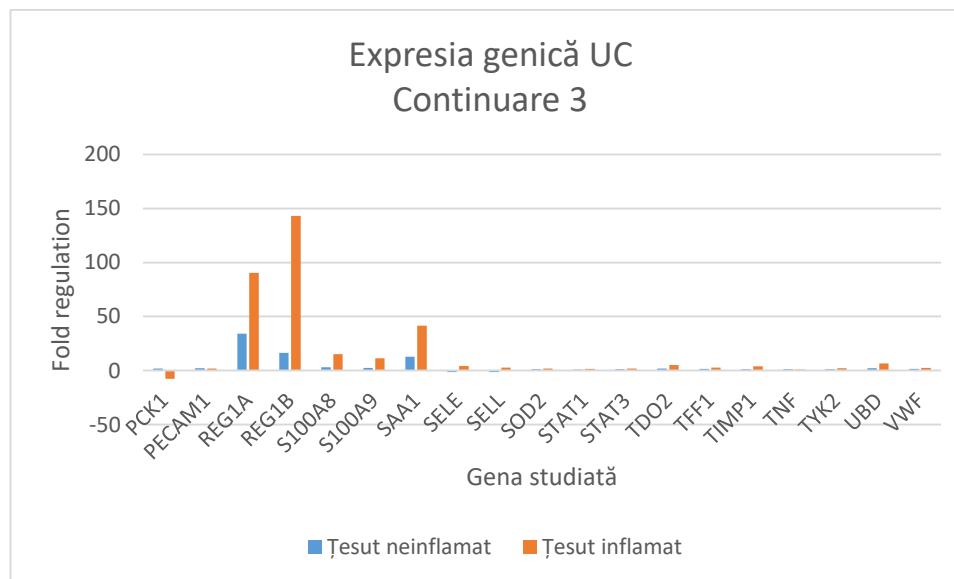


Figura 9.40. Expresia comparativă a genelor 64-84

Continuând, am comparat grupul pacienților cu UC și remisiune endoscopică cu grupul pacienților cu activitate endoscopică. Numărul genelor subexprimate și supraexprimate a fost de 5 și 37 în remisiune, și, respectiv, 3 și 61 la cei cu activitate endoscopică. Semnificația statistică a fost observată pentru 25 de gene la grupul în remisiune și pentru 53 de gene la grupul cu activitate endoscopică prezentă (tabel 9.14, figuri 9.41, 9.42, 9.43, 9.44 și 9.45)

Tabel 9.14. Genele exprimate diferențial între pacienți cu UC în remisiune endoscopică și cei cu activitate endoscopică vs. Control cu semnificație statistică p<0.05

Genastudiată	UC Remisiune endoscopică vs control (fold regulation)		p value	Genastudiată	UC Activitate endoscopică vs. Control (fold regulation)		p value
MMP3	20.2107	0.000001	MMP3	69.6968	0.000000		
CHI3L1	31.168	0.000005	CHI3L1	81.2567	0.000000		
S100A9	4.4221	0.000011	MMP1	15.2563	0.000000		
MMP10	25.4708	0.000012	MMP7	226.6065	0.000000		
MMP1	9.6076	0.000019	TDO2	7.2126	0.000000		
CXCL11	10.0011	0.000177	FPR1	8.207	0.000000		
MUC1	7.8111	0.000187	IL6	10.4609	0.000000		
C4BPB	6.0735	0.000307	IL13	33.6066	0.000000		
MMP7	17.8718	0.000338	SELE	10.9488	0.000000		
REG1B	42.8595	0.000769	VWF	3.8091	0.000000		
TDO2	3.1208	0.000956	CXCL1	22.5997	0.000001		
CXCL9	4.0296	0.001132	TIMP1	6.4819	0.000003		
S100A8	5.2305	0.001225	LCN2	31.0671	0.000003		
CXCL10	4.5214	0.001270	S100A9	22.957	0.000005		
NOS2	4.9073	0.001860	IL23A	7.8936	0.000005		
CXCR1	3.1205	0.001879	CXCL2	16.1456	0.000013		
IL1RN	4.5404	0.002111	CCL11	5.4435	0.000017		
CX3CL1	7.6989	0.004621	CCL20	6.5266	0.000027		
CXCL8	5.9115	0.006217	MMP10	45.248	0.000048		
TIMP1	2.1261	0.010809	NOD2	4.5025	0.000072		
UBD	5.6668	0.011162	SOD2	2.5223	0.000080		
CXCL1	6.2084	0.019360	CXCL8	45.3042	0.000083		

LCN2	4.1657	0.022772	REG1B	353.6393	0.000092
REG1A	66.9666	0.034286	MUC1	8.7243	0.000116
FPR1	2.255	0.040387	CXCR1	30.729	0.000118
			LTB	8.9479	0.000146
			C3	5.1965	0.000151
			IL1RN	13.2964	0.000170
			STAT3	2.431	0.000326
			S100A8	33.7654	0.000357
			SELL	4.2992	0.000382
			CX3CL1	9.3363	0.000576
			CXCL3	11.0098	0.000744
			IL17A	11.6811	0.000772
			IL1B	9.6161	0.000939
			NOS2	37.852	0.001470
			IL5	3.2633	0.001931
			C4BPB	19.7288	0.002660
			CXCL9	4.5847	0.002905
			CXCL11	7.1854	0.002938
			CD55	7.4631	0.004422
			UBD	7.2986	0.004482
			TYK2	2.2423	0.009890
			CSTA	4.1774	0.013216
			HSPA5	3.2646	0.013590
			CXCL10	3.0462	0.014470
			ISG15	3.8077	0.016095
			ITGB2	2.0408	0.021012
			TFF1	3.729	0.023792

	CASP1	2.8567	0.028086
	CR2	4.3995	0.038172
	CCL2	1.9986	0.045108
	PECAM1	1.8101	0.047641

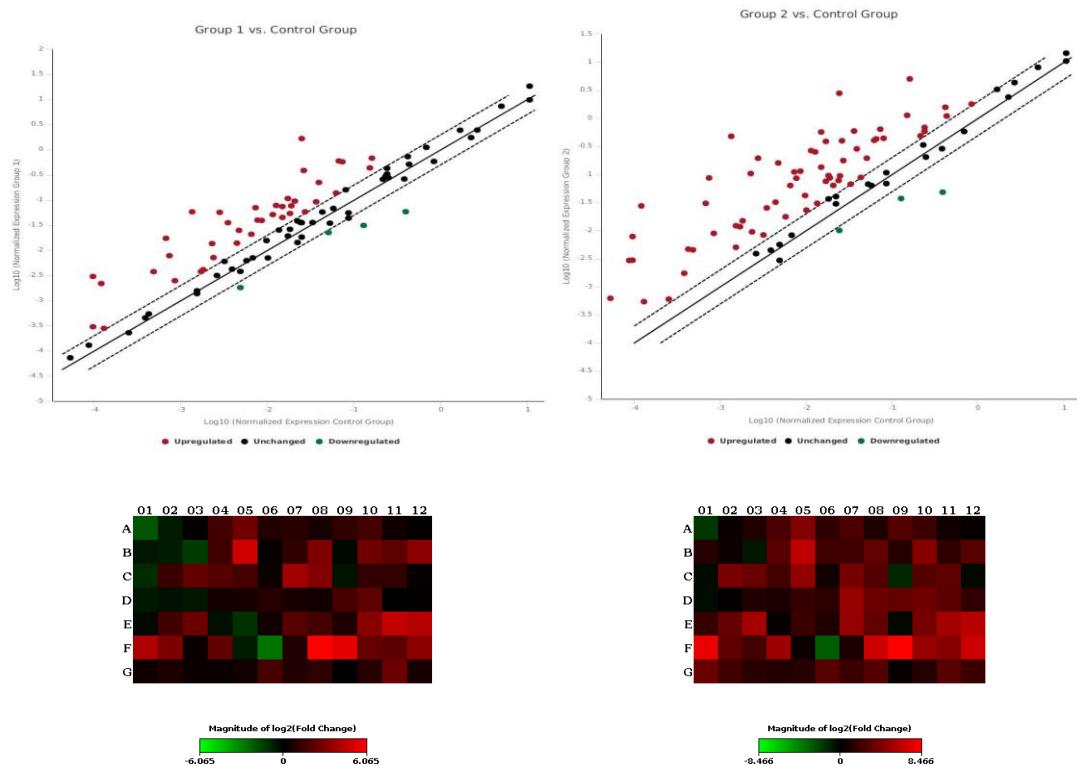


Figura 9.41. Scatter plot și hartă calorică țesut de la pacienți cu UC în remisiune și cu activitate endoscopică vs. control

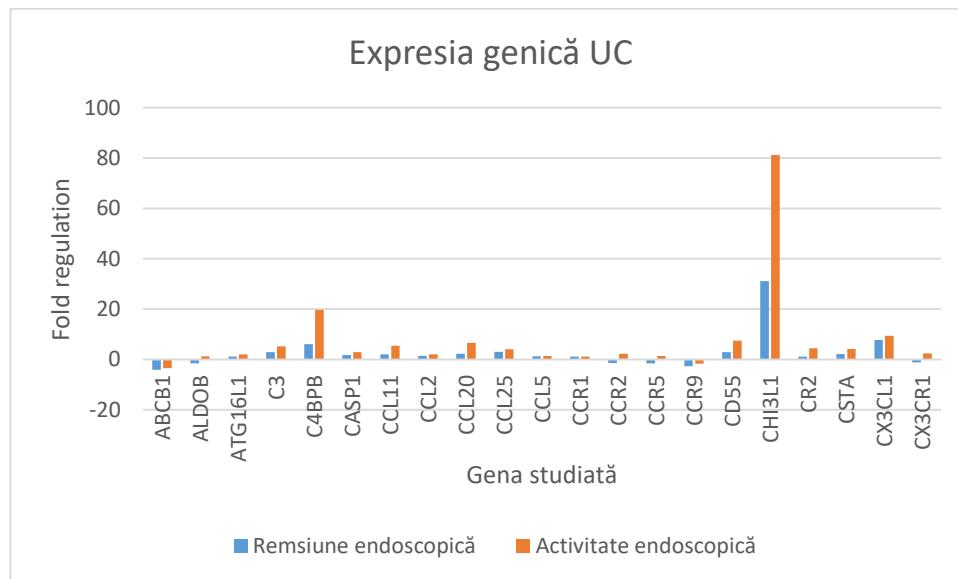


Figura 9.42. Expresia comparativă a primelor 21 gene.

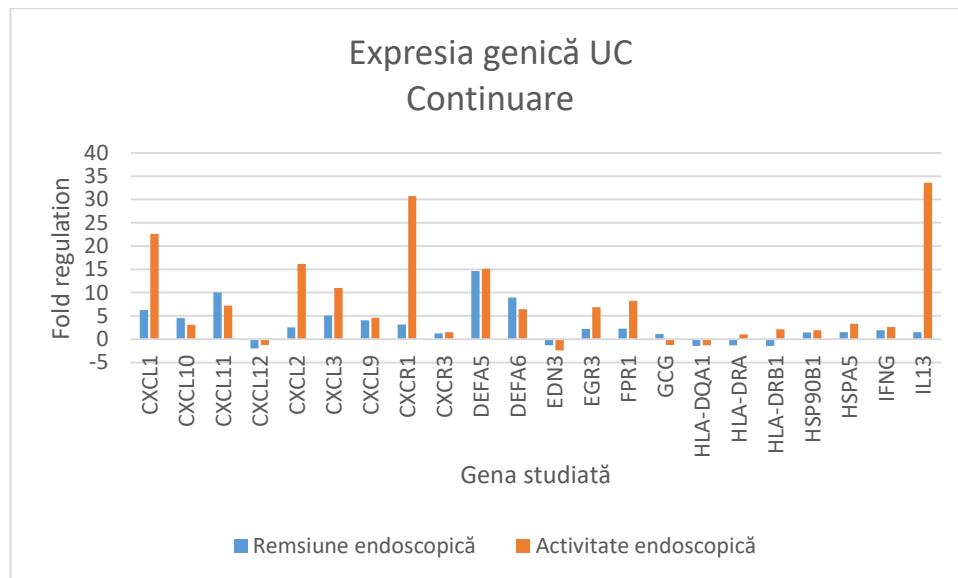


Figura 9.43. Expresia comparativă a genelor 22-42.

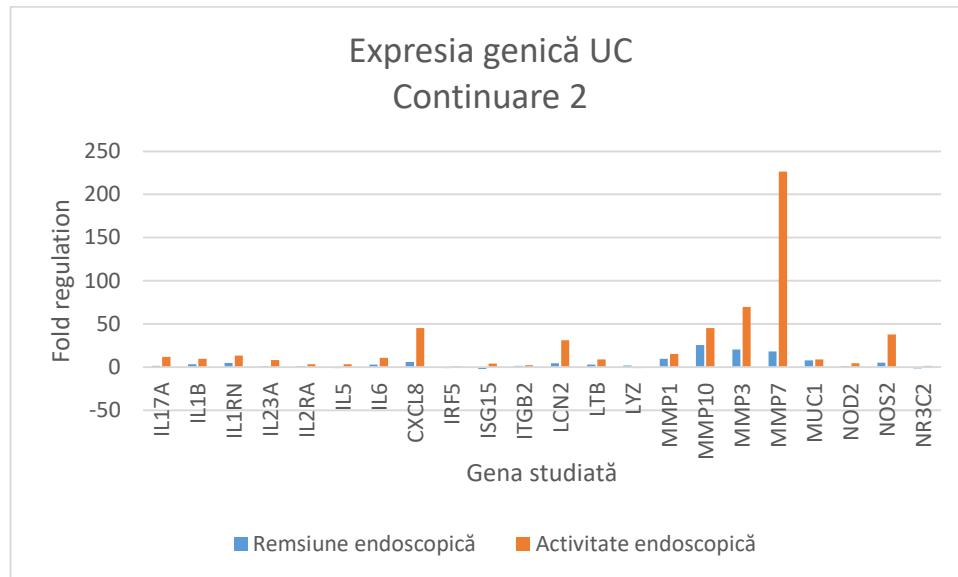


Figura 9.44. Expresia comparativă a genelor 43-64

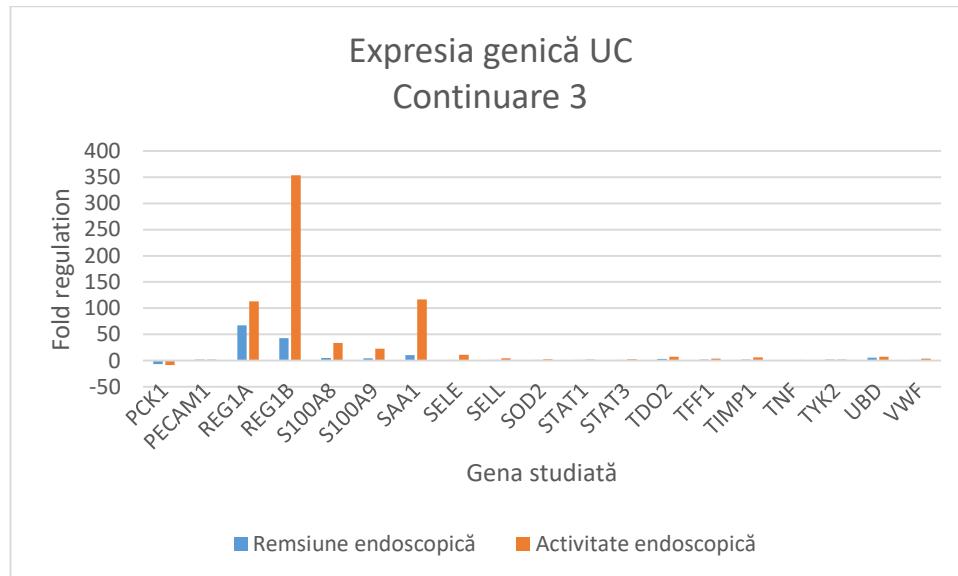


Figura 9.45. Expresia comparativă a genelor 64-84

Am încercat gruparea pacienților în funcție de tratamentul efectuat însă teste de evaluare a semnificației statistice nu s-au putut efectua decât pentru grupul pacienților tratați cu 5-ASA, restul grupurilor conținând doar câte un subiect. Astfel, am identificat 3 gene subexprimate și 57 gene supraexprimate în lotul pacienților cu UC tratați cu 5-ASA față de lotul control, cu 49 de gene atingând semnificația statistică(tabel 9.15, figuri 9.46, 9.47, 9.48, 9.49 și 9.50)

Tabel 9.15. Genele exprimate diferențial între pacienți cu UC în tratament cu 5-ASA vs. Control cu semnificație statistică p<0.05

Genastudiată	UC Tratament 5-ASA vs. Control (fold regulation)	p value
CHI3L1	106.0077	0.000000
MUC1	12.6704	0.000000
REG1B	510.3512	0.000000
TDO2	4.7854	0.000000
MMP3	61.2488	0.000001
MMP7	87.3225	0.000001
FPR1	5.539	0.000002
MMP1	12.0123	0.000006
CXCL11	15.3622	0.000009
IL6	7.4214	0.000015
TIMP1	5.4597	0.000025
MMP10	40.3175	0.000072
SELE	5.3462	0.000116
IL1RN	13.9608	0.000146
SOD2	2.4148	0.000190
VWF	2.8012	0.000270
IL13	11.6063	0.000275
CXCL9	7.2435	0.000325
CXCL1	13.4906	0.000544
UBD	9.4805	0.000638
LCN2	16.7232	0.000904
CXCL10	5.0192	0.000967
CX3CL1	14.8681	0.001228
C4BPB	20.2765	0.001944

TYK2	2.8122	0.002054
IL17A	7.3517	0.002334
CCL11	3.3964	0.002537
NOD2	3.1509	0.002537
NOS2	30.4804	0.002773
CXCL2	8.0383	0.002935
C3	3.9646	0.003280
S100A9	10.4863	0.003461
CXCL8	26.4717	0.003470
LTB	5.7811	0.003973
CXCR1	16.6792	0.004144
CD55	6.8063	0.004237
S100A8	16.7833	0.005306
IL1B	7.6674	0.005386
CCL20	3.978	0.005667
CXCL3	8.3983	0.008785
STAT3	1.978	0.009722
CSTA	4.6268	0.010589
HSPA5	3.0555	0.018553
ITGB2	2.0513	0.020186
CASP1	2.9858	0.021060
IL23A	2.7936	0.025164
ISG15	2.1573	0.032740
TFF1	2.8838	0.032790
REG1A	222.18	0.036443

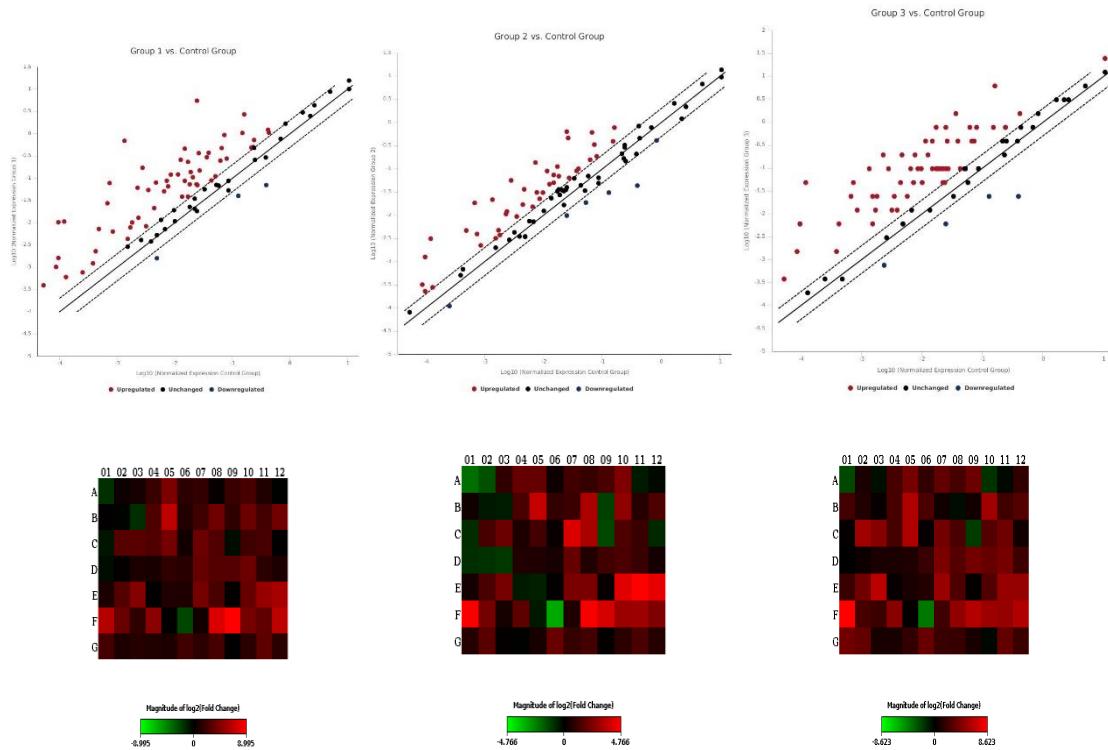


Figura 9.46 Scatter plot și hartă calorică țesut de la pacienți cu UC tratați cu diferite molecule vs. Control.

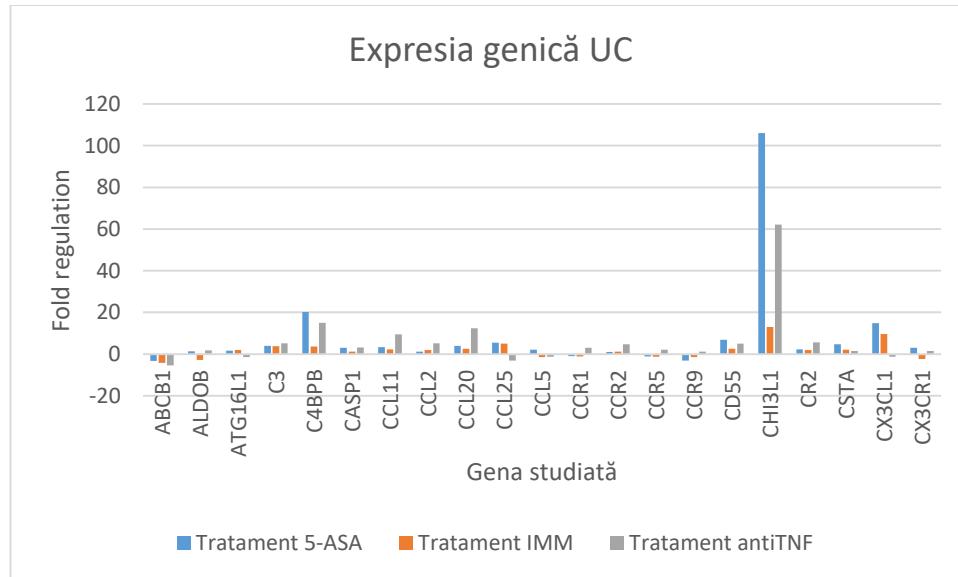


Figura 9.47. Expresia comparativă a primelor 21 gene.

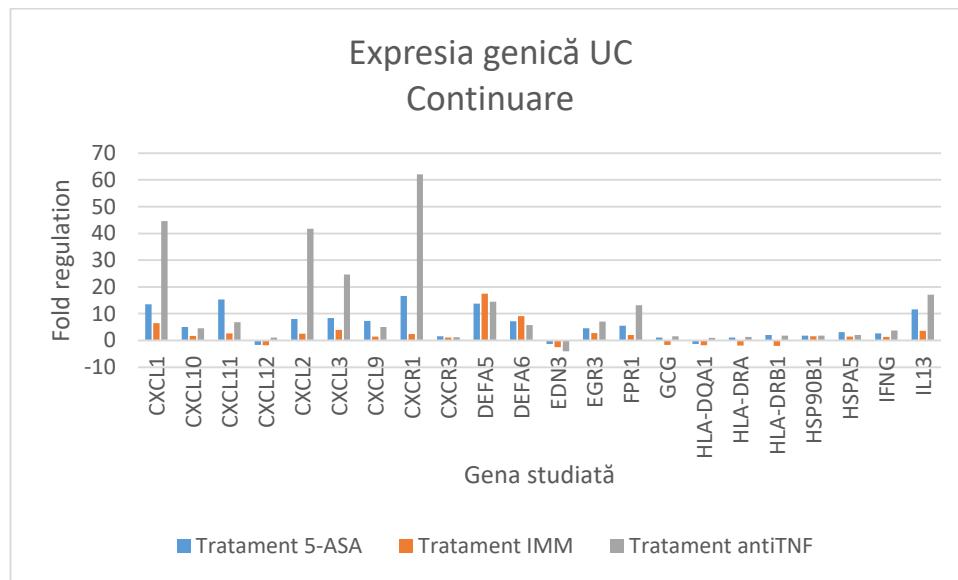


Figura 9.48. Expresia comparativă a genelor 22-42.

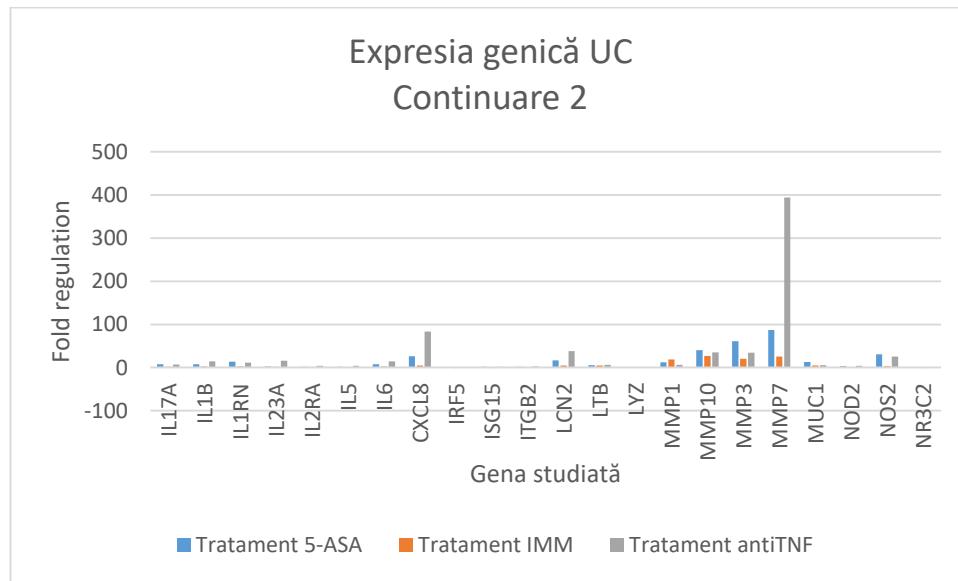


Figura 9.49. Expresia comparativă a genelor 43-64

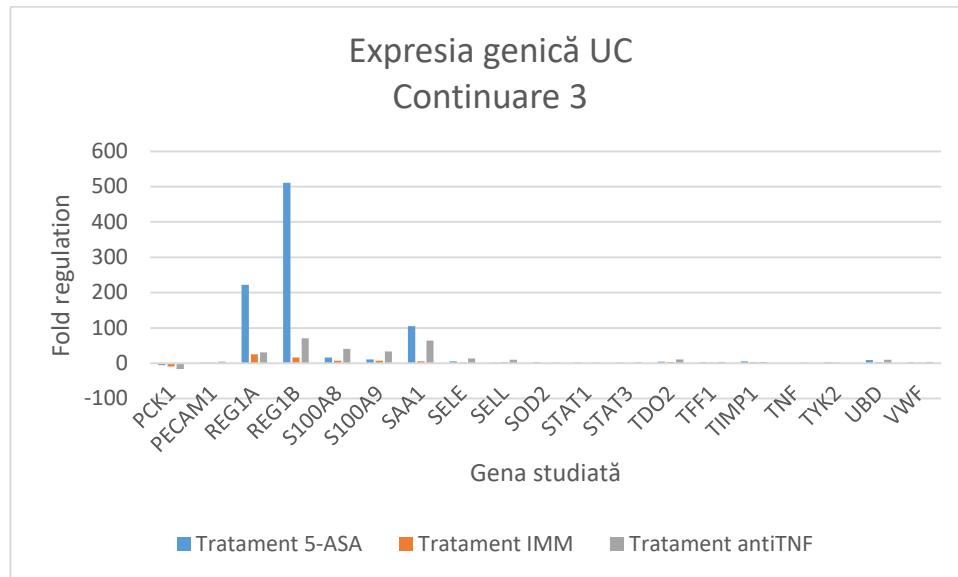


Figura 9.50. Expresia comparativă a genelor 64-84

Am avut la dispoziție material biptic de la același pacient pe care l-am supus analizei comparative, acesta fiind în tratament cu două molecule diferite la momentul recoltării probelor. Am plecat de la premiza că în acest fel se elimină bias-urile legate de severitate, extensie și profil individual de expresie al citokinelor la nivel mucozal. Am observat 3 gene subexprimate și 50 supraexprimate sub tratament cu imunomodulator și, 4 gene subexprimate și 57 supraexprimate sub tratament cu antiTNF. Nu s-a putut efectua analiză statistică. Datele comparative se regăsesc în tabelul 9.16 și figurile 9.51, 9.52, 9.53, 9.54 și 9.55. Notăm și aici profilul similar al genelor exprimate dar niveluri evident diferite de expresie, mai mari sub tratament cu imunomodulator.

Tabelul 9.16. Expresia genică la același pacient sub tratament cu imunomodulator și agent biologic.

Genă studiată	Pacient C.R. Sub tratament		Pacient C.R. Sub tratament	
	IMM	antiTNF	IMM	antiTNF
ABCB1	-8.9485			-5.3679
ALDOB		1.4337		1.8168
ATG16L1		4.5678		-1.387
C3		8.3647		5.2241

C4BPB	9.1363	15.0218
CASP1	1.6869	3.1841
CCL11	3.389	9.4631
CCL2	2.9284	5.2241
CCL20	6.343	12.3229
CCL25	104.8362	-3.1655
CCL5	-1.2772	-1.2155
CCR1	1.5574	3.0807
CCR2	1.6885	4.7316
CCR5	1.0729	2.1427
CCR9	-1.0629	1.2226
CD55	4.9113	5.0544
CHI3L1	74.4143	62.1034
CR2	3.5254	5.5806
CSTA	1.2978	1.442
CX3CL1	53.1227	-1.2984
CX3CR1	-1.9789	1.4903
CXCL1	38.355	44.6445
CXCL10	2.9354	4.5779
CXCL11	6.9239	6.8028
CXCL12	-2.0782	1.1073
CXCL2	12.1798	41.7925
CXCL3	12.8412	24.6458
CXCL9	5.5955	5.0544
CXCR1	12.176	62.1034
CXCR3	2.6466	1.1445
DEFA5	27.6654	14.534
DEFA6	14.8515	5.7678

EDN3	-5.036	-4.1222
EGR3	5.2899	7.0311
FPR1	6.505	13.1638
GCG	-1.2477	1.5404
HLA-DQA1	-1.9353	1.0029
HLA-DRA	-1.2397	1.3498
HLA-DRB1	1.3795	1.8168
HSP90B1	1.9312	1.8168
HSPA5	1.4386	2.0059
IFNG	2.8953	3.7554
IL13	25.8837	17.1419
IL17A	2.7375	7.0311
IL1B	4.5548	14.534
IL1RN	4.5956	11.1611
IL23A	6.7862	15.5259
IL2RA	3.9514	4.1463
IL5	1.5857	3.8815
IL6	7.0427	14.0621
CXCL8	23.5951	83.585
IRF5	-1.2683	1.2226
ISG15	1.621	1.8783
ITGB2	1.3058	2.2146
LCN2	28.0895	37.8525
LTB	10.1484	6.3682
LYZ	1.2109	1.1073
MMP1	19.42	6.5819
MMP10	38.5202	35.4344
MMP3	59.853	34.2839

MMP7	281.3122	394.3323
MUC1	4.1535	5.2241
NOD2	2.8735	3.8815
NOS2	12.6949	25.4728
NR3C2	-1.3901	1.1073
PCK1	-39.0182	-16.4886
PECAM1	1.7846	4.2855
REG1A	562.4182	31.0517
REG1B	1122.8548	70.8687
S100A8	32.1531	40.4356
S100A9	24.8915	33.1707
SAA1	70.9919	64.6126
SELE	8.4515	14.0621
SELL	9.5545	9.7807
SOD2	1.5235	1.7578
STAT1	1.8839	1.7578
STAT3	1.7694	3.1841
TDO2	7.0291	10.7987
TFF1	3.2961	3.6335
TIMP1	4.1527	3.5155
TNF	1.3065	1.7578
TYK2	1.9032	-1.1378
UBD	4.9598	9.7807
VWF	2.9965	3.8585

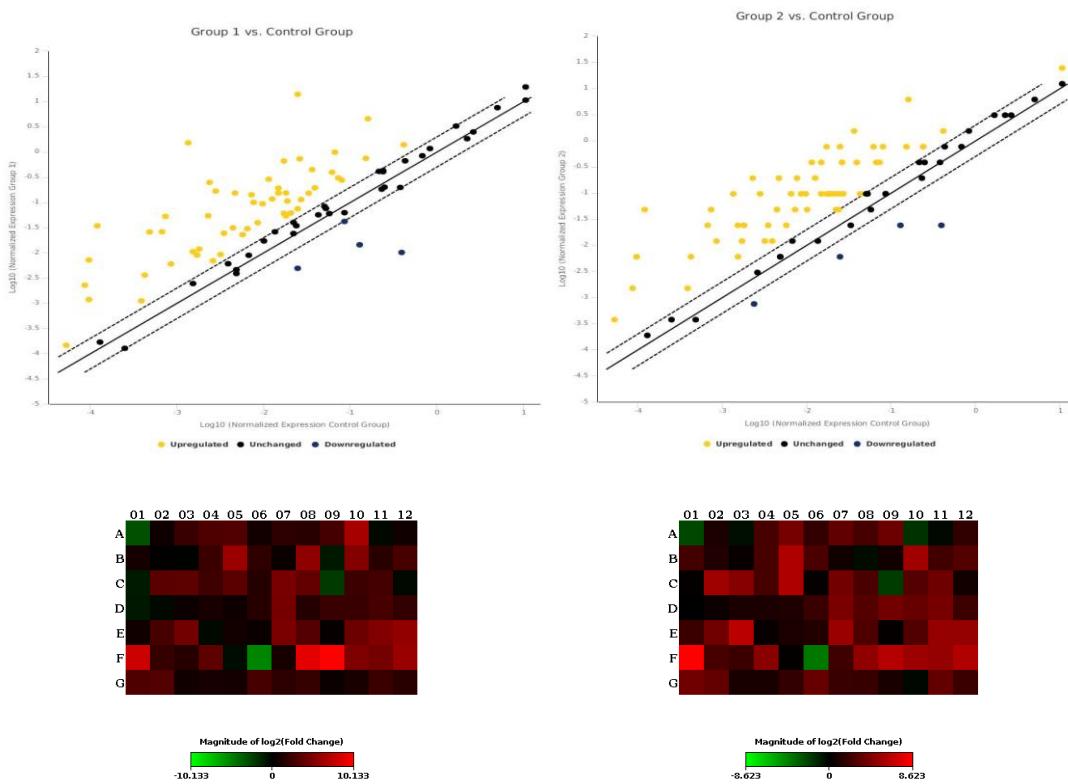


Figura 9.51. Scatter plot și hartă calorică țesut de la același pacient cu UC tratat cu imunomodulator și agent biologic vs. Control.

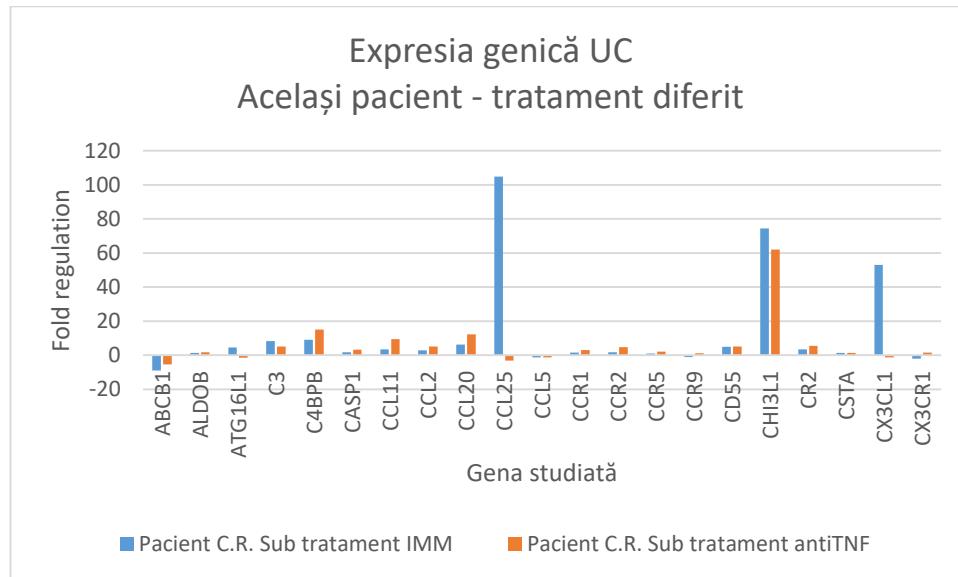


Figura 9.52. Expresia comparativă a primelor 21 gene.

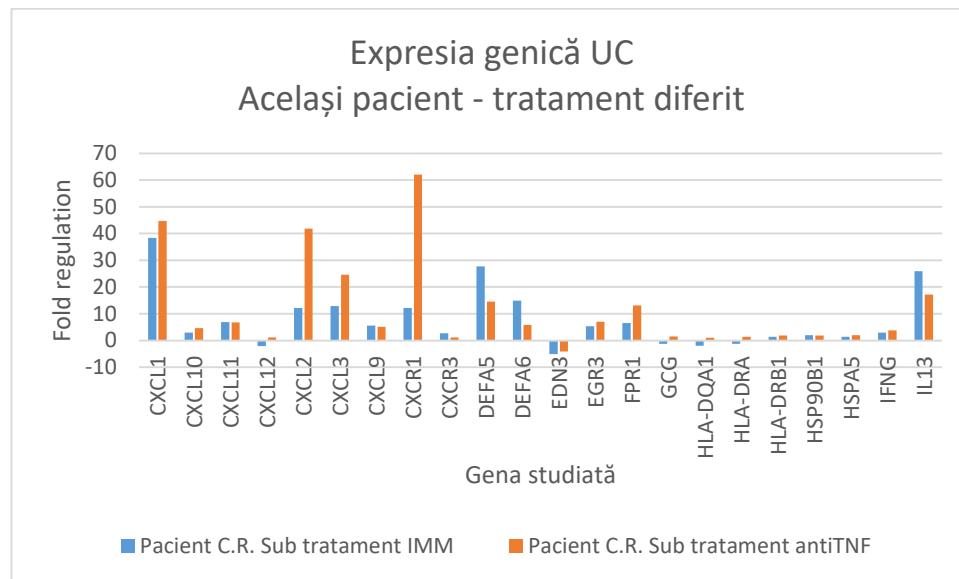


Figura 9.53. Expresia comparativă a genelor 22-42.

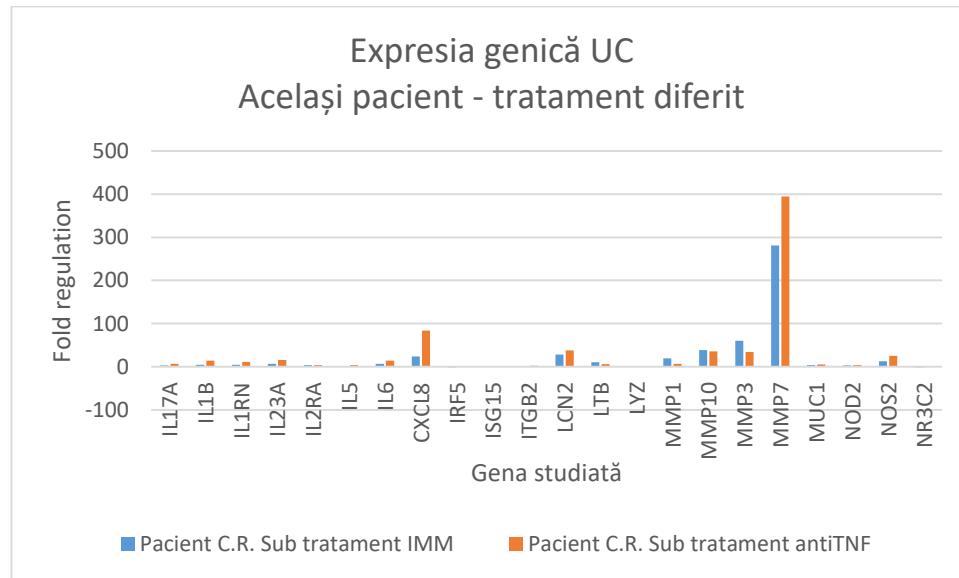


Figura 9.54. Expresia comparativă a genelor 43-64

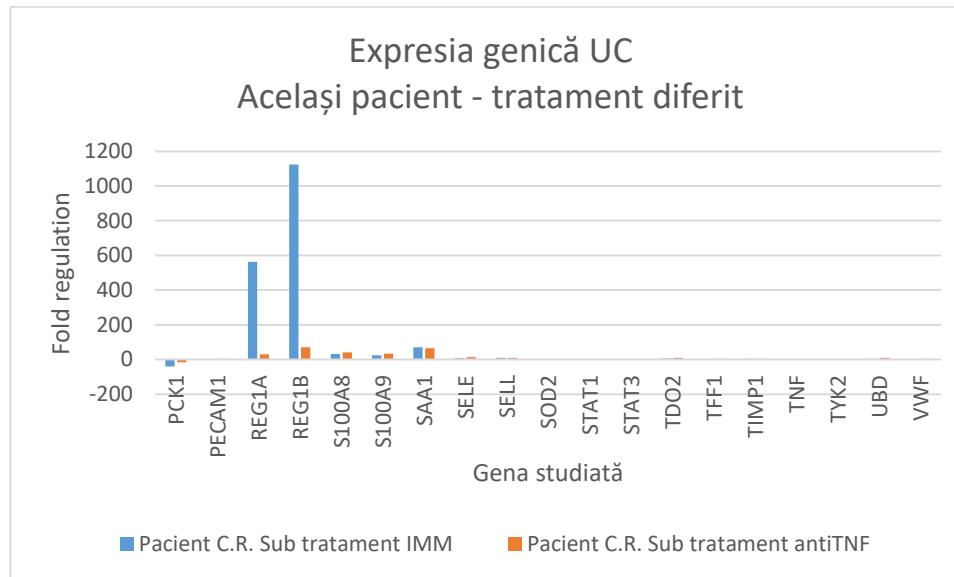


Figura 9.55. Expresia comparativă a genelor 64-84

9.4. Discuții

Acest studiu este primul din Romania care analizează un număr atât de mare de gene implicate în procesele de inflamație, apoptoză, răspuns imun, adeziune celulară, remodelare tisulară și secreție de mucus în incercarea de a identifica o semnătură moleculară a bolilor inflamatorii intestinale pentru diferite situații clinico-evolutive.

Rezultatele noastre demonstrează pe de o parte, o corelație bună între severitatea leziunilor observată în timpul colonoscopiei și cea observată din punct de vedere microscopic, pe de altă parte, diferențe semnificative atât ca valoare statistică cât și ca număr de gene exprimate între toate ipotezele comparative analizate, acest fapt sugerând implicarea concomitentă a tuturor căilor de propagare a inflamație analizate.

În ceea ce privește rolul scorurilor histologice în acest studiu datele obținute sugerează utilitatea acestora, dar numărul mic de pacienți și, secundar acestui fapt, inutilitatea aplicării unui test de semnificație statistică, conferă rezultatelor o valoare cel mult limitată, fiind nevoie de analize pe loturi mai ample pentru a confirma aceste date.

Referitor la profilul de expresie genică, având în vedere numărul mare de gene supraexprimate, voi discuta comparativ cu literatură doar genele supraexprimate cu valorile fold-regulation cele mai mari. Astfel, în toate analizele comparative am observat supraexpresie semnificativă atât statistic cât și ca valoare cantitativă a genelor **REG1A și REG1B**, toate genele **MMP, CHI3L1, CCL25, CXCR1, DEFA5 și DEFA6**.

Chiar dacă prezentul studiu are un lot restrâns de pacienți, am putut observa câteva tendințe generale de expresie genică. Rezultatele noastre sunt concordante cu datele din literatură care au descris patternuri de supraexpresie sugestive pentru inflamație cronică[23,340,341]

Membrii familiei genelor de regenerare (REG) au fost supraexprimate atât la pacienții cu boală inflamatorie în remisiune cât și la cei cu activitate endoscopică prezentă. Aceste rezultate confirmă datele din literatură care au demonstrat supraexpresia acestor gene la nivelul celulelor Paneth metaplazice la nivelul mucoasei colonice, atât în țesutul inflamat cât și în mucoasa endoscopic normală a acestor pacienți. Mai mult, aceste rezultate au fost reproduse și în populația pediatrică cu boli inflamatorii intestinale și pe model murin. [23,342–344]

O altă genă de interes observată în rezultatele acestui studiu este *chitinase 3-like 1 (CHI3L1)* care prin interacțiunea cu TLR4 permite aderarea și invazia bacteriilor la nivelul epitelului colonic. Datele din literatură sugerează o posibilă utilitate a acestei gene în detecția precoce a displaziei colonice asociate bolilor inflamatorii intestinale. Rezultatele noastre au arătat o supraexpresie constantă prezentă indiferent de comparațiile efectuate, prezența supraexpresiei inclusiv în remisiune sugerând faptul că anumite mecanisme moleculare ale bolii rămân active. [23,342]

Matrix metalo-proteinaze (MMP) și inhibitorii acestora tisulari (TIMP) sunt implicați în patogeneza bolilor inflamatorii intestinale prin răspunsul prompt în context inflamator cu promovarea regenerării celulare și remodelării tisulare. Ele sunt responsabile de turn-over și degradarea matrixului extracelular. Dezechilibrul dintre MMP și TIMP conduce la remodelare tisulară aberantă și inflamație acută și cronică, fenomen întâlnit în bolile inflamatorii intestinale. Rezultatele noastre sunt și aici concordante cu literatura, aducând un plus legat de faptul că supraexpresia acestor gene este prezentă și în mucoasa pacienților aflați în remisiune

endoscopică. De altfel, în literatură se postulează faptul că aceste proteine ar fi implicate în apariția neoplasmelor colorectale asociate bolilor inflamatorii intestinale, caz în care datele noastre atrag atenția că inclusiv pacienții aflați în remisiune pot prezenta risc crescut de a dezvolta un astfel de cancer. Suplimentar, în literatură există date pe modele murine care au demonstrat eficiența unui tratament cu barbiturice pe animale cu colită indusă prin administrarea de dextran sulfat. [333,345–347]

CCL25 joacă un rol crucial în recrutarea limfocitelor circulante la nivelul mucoasei intestinale prin activarea CCR9. Triveddi et al. Au identificat CCR9 elevat la pacienții cu colita ulcerativă activă și la pacienții cu boala Crohn stenozantă și nivelul acestui receptor de citokine-chemokine s-a corelat cu scorul endoscopic de severitate. [348]. Datele noastre au arătat o expresie diferită între biopsiile prelevate din țesut inflamat și țesut neinflamat la pacienții cu boala Crohn, dar nu și la cei cu colită ulcerativă, și expresie similară între pacienții cu boala Crohn în remisiune endoscopică și cei cu activitate endoscopică, sugerând persistența unui proces de recrutare limfocitară chiar și în stadiul de remisiune endoscopică.[349]

C-X-C motif chemokine receptor (CXCR1) reprezintă o altă genă de interes în analiza noastră deoarece am observat diferențe notabile în expresia acesteia între țesutul inflamat și cel neinflamat, între boala Crohn în remisiune endoscopică și cea cu activitate endoscopică, aceeași observație fiind valabilă și pentru colita ulcerativă. Proteina CXCR1 este un receptor cu mare afinitate pentru interleukina 8. Legarea ligandului de CXCR1 produce degranularea leucocitară contribuind semnificativ la întreținerea procesului inflamator tisular. Datele din literatură au demonstrat niveluri crescute ale acestui receptor atât în bolile inflamatorii intestinale, cât și în alte patologii care asociază inflamație tisulară cronică cum ar fi bronhopneumopatia obstructivă cronică, astmul bronșic, psoriazis și artrita reumatoidă. Interesantă este observația că nivelurile CXCR1 rămân crescute la nivel ileal la pacienții care nu răspund la tratamentul biologic. În studiul nostru, am observat diferențe notabile doar în nivelul comparativ al expresiei CXCR1 dintre boala Crohn în remisiune endoscopică și cea cu criterii de activitate endoscopică, sugerând că CXCR1 ar putea fi un marker de activitate endoscopică[350]

Defensinile reprezintă niște peptide antimicrobiene ce fac parte din sistemul imun înnăscut, contribuind la funcția de barieră a mucoasei intestinale prin efectul asupra patogenilor

de formare de micropori la nivel membranar cu eflux de ioni și distrucție celulară. Până în prezent au fost identificate 10 defensine la regnul uman, grupate în 2 familii – alfa defensinele de la 1 la 4 ce contribuie la răspunsul inflamator sistemic, și beta-defensinele de la 5-10 ce contribuie la răspunsul imun de la nivel intestinal. Dintre defensinele studiate de noi, DEFA5 a fost asociat cu valori crescute în colita Crohn, fiind propus ca și marker de diferențiere între aceasta și colita ulcerativă. Datele noastre sunt similare cu cele obținute de Lawrence et. Al., observând creșteri în special la pacienții cu boala Crohn, rezultat obținut și în prezentul studiu. [340,351,352]

Dintre gene subexprimate, phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (PCK1) a demonstrat o subexpresie superioară tuturor celorlalte gene subexprimate. PCK1 codifică o enzimă implicată în gluconeogeneză și a fost demonstrată a fi subexprimată în bolile inflamatorii intestinale conform cu rezultatele acestui studiu. Totuși, mecanismele exacte prin care această proteină funcționează și rolul ei în practica cotidiană nu sunt încă clar elucidate. [338]

În final, trebuie subliniat faptul că aceste progrese tehnologice în aria biologiei moleculare și geneticii au permis cuantificarea patternurilor de expresie a citokinelor inflamatorii la nivel tisular. Identificarea genelor cu expresie alterată ar putea conduce la selectarea unor noi ținte terapeutice, dezvoltarea de noi markeri pentru detectia precoce a acestor boli și totodată, ar putea facilita diferențierea dintre cele două entități clinice atunci când criteriile de diagnostic sunt superpozabile. Mai mult, identificarea unor gene supraexprimate la nivelul mucoasei normale din punct de vedere endoscopic ar putea prezice recăderile sau defini remisiunea profundă, în special la pacienții cu colită ulcerativă. [23]

9.5. Concluzii

Cu ocazia acestui studiu, am analizat un număr de 84 de gene implicate în procesele de răspuns imun la pacienții cu boli inflamatorii din Romania, fiind cel mai mare panel de gene studiat până în momentul de față. Totodată, am testat niște scoruri histologice rar folosite pentru a verifica nivelul de corelație cu severitatea endoscopică evaluată cu niște scoruri deja bine statuate.

Am obținut corelații cu efect crescut între scorurile endoscopice și cele histologice studiate, sugerând că acestea din urmă ar putea fi implementate în practica curentă cu rolul de a uniformiza practica medicală. Mai mult, pornind de la posibilul rol al remisiunii histologice în evoluția pe termen lung a acestor boli, aceste scoruri ar putea servi pentru ținte terapeutice propuse în viitoarele trialuri clinice pentru molecule noi. Nu în ultimul rând, remisiunea histologică evaluată cu aceste scoruri ar putea reprezenta un parametru util în decizia de intrerupere a tratamentului pentru a beneficia de o perioadă fără recăderi cât mai îndelungată.

Am demonstrat existența unor patternuri diferite de expresie genică între diferențele scenarii luate în discuție, identificând, totodată, câteva gene care s-au exprimat în mod constant în anumite situații sugerând ca acestea ar putea reprezenta markeri pentru diferențierea situațiilor analizate comparativ în studiu. Spre exemplu, supraexpresia defensinelor predominant în boala Crohn ar putea sugera că DEFA5 și DEFA6 pot reprezenta markeri de diagnostic diferențial între boala Crohn și colita ulcerativă în situațiile particulare în care diagnosticul diferențial nu poate fi făcut pe datele clinico-biologice, endoscopice și histologice uzuale.

De asemenea, am identificat gena CCL25 supraexprimată la nivel mucozal inclusiv la pacienții aflați în remisiune endoscopică, fapt ce ar putea reprezenta un punct de plecare pentru identificarea profilului molecular al pacientului cu risc de recădere clinică.

Totuși, prezenta lucrare are limitarea de a fi evaluat un număr mic de pacienți, aceste rezultate având nevoie de o confirmare formală bazată pe analiza unui număr mai mare de subiecți.

III. CONCLUZII GENERALE ȘI CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Din analiza statistică coroborată cu datele clinico-biologice și epidemiologice ale pacienților cu boli inflamatorii intestinale cronice incluși în acest proiect, putem concluziona următoarele:

a. DESPRE ROLUL RDW CA MARKER DE ACTIVITATE ÎN BOALA CROHN

1. RDW prezintă o corelație semnificativ statistică cu prezența anemiei indiferent de severitatea acesteia comparativ cu pacienții ce nu prezintă anemie.
2. RDW a prezentat corelație semnificativ statistică comparativ cu ceilalți markeri de activitate inflamatorie analizați.
3. RDW permite diferențierea bolii Crohn în remisiune de boala activă și, totodată, poate fi util pentru diferențierea între pacienții aflați în remisiune și cu activitate ușoară, de cei cu activitate severă.
4. RDW este util pentru diferențierea între pacienții cu boala Crohn și cei cu sindrom de intestin iritabil considerați lot control în prezentul studiu, în plus fiind capabil de a diferenția inclusiv boala aflată în remisiune clinică de prezența unor manifestări funktionale ce ar putea sugera o posibilă boală inflamatorie.
5. Prezentul studiu a analizat pentru prima dată în România rolul RDW ca marker de activitate

b. DESPRE ROLUL POLIMORFISMELOR MONONUCLEOTIDICE ALE GENEI TNF- α ÎN BOLILE INFLAMATORII INTESTINALE

1. Nu s-a obținut o asociere între alela minoră a SNP -308G/A și suceptibilitatea de a dezvolta boala inflamatorie intestinală în populația din România.
2. Alela minoră a SNP -238G/A se asociază cu riscul crescut de a dezvolta boala Crohn.

3. Alela minoră a ambelor SNP-uri studiate se asociază cu prezența manifestărilor extraintestinale la pacienții cu boli inflamatorii intestinale, pentru boala Crohn observându-se asociere doar în cazul alelei minore a SNP -308G/A.
4. S-a observat o frecvență alelică crescută pentru alela minoră a SNP -238G/A la pacienții cu boală Crohn non-responderi la tratamentul cu agenți biologici antiTNF- α , dar fără a atinge semnificația statistică.
5. Prezentul studiu este primul proiect la nivel național ce a analizat implicațiile polimorfismelor mononucleotidice ale genei TNF- α în susceptibilitatea de a dezvolta boli inflamatorii intestinale.

c. DESPRE ROLUL SCORURILOR HISTOLOGICE ȘI AL EXPRESIEI GENICE LA NIVEL MUCOZAL ÎN BOLILE INFLAMATORII INTESTINALE

1. Scorurile histologice prezintă corelație cu efect crescut (Pearson r) cu scorurile endoscopice în toate cele 3 subgrupuri de pacienți cu boli inflamatorii studiate, putând fi utile în cazul remisiunii histologice pentru decizia de întrerupere a tratamentului.
2. Există diferențe notabile la nivelul expresiei genice, atât în ceea ce privește numărul genelor supraexprimate, cât și valoarea fold-change a genelor ce au prezentat supraexpresie în ambele subgrupuri analizate indiferent de criteriile de selecție ale subgrupurilor.
3. Notăm diferențe semnificative la nivelul profilului expresiei genice în țesutul neinflamat (control intern) provenit de la pacienții cu boli inflamatorii intestinale comparativ cu lotul control sugerând existența unor fenomene inflamatorii la nivel molecular cu mult timp înaintea obiectivării leziunilor endoscopice.
4. Există diferențe notabile între profilul expresiei genice la pacienții operați și cei neoperați sugerând căi diferite de manifestare a inflamației în recidivele anastomotice.

5. Expresia genică a citokinelor studiate la nivel mucozal este diferită la pacienții cu activitate endoscopică vizibilă la colonoscopie comparativ cu cei aflați în remisiune endoscopică.
6. Profilul expresiei genice este influențat la nivelul genelor supraexprimate de diferitele molecule utilizate pentru tratamentul bolilor inflamatorii intestinale.
7. Acest studiu reprezintă primul proiect din România ce a analizat profilul expresiei genice la nivel tisular prin această metodă, la pacienții cu boli inflamatorii intestinale din România, și singurul care a analizat un panel atât de extins al genelor implicate în procesul inflamator.

Bibliografie

1. Lippi G, Turcato G, Cervellin G, Sanchis-Gomar F. Red blood cell distribution width in heart failure: A narrative review. *World J Cardiol.* 2018;10:6–14.
2. Pascual-Figal DA, Bonaque JC, Redondo B, Caro C, Manzano-Fernandez S, Sánchez-Mas J, et al. Red blood cell distribution width predicts long-term outcome regardless of anaemia status in acute heart failure patients. *Eur J Heart Fail.* 2009;11:840–6.
3. Horwich TB, Fonarow GC, Hamilton MA, MacLellan WR, Borenstein J. Anemia is associated with worse symptoms, greater impairment in functional capacity and a significant increase in mortality in patients with advanced heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:1780–6.
4. Groenveld HF, Januzzi JL, Damman K, van Wijngaarden J, Hillege HL, van Veldhuisen DJ, et al. Anemia and Mortality in Heart Failure Patients. A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:818–27.
5. Molnar T, Farkas K, Szepes Z, Nagy F, Nyari T, Wittmann T. RDW can be a useful additional marker in diagnosing Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dig Dis Sci.* 2008. p. 2828–9.
6. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Kouroumalis EA. Diagnosing anemia in inflammatory bowel disease: Beyond the established markers. *J Crohn's Colitis.* 2011. p. 381–91.
7. Hu D, Ren J, Wang G, Gu G, Li G, Liu S, et al. Value of red cell distribution width for assessing disease activity in Crohn's disease. *Am J Med Sci.* 2014;349.
8. Song CS, Park D Il, Yoon MY, Seok HS, Park JH, Kim HJ, et al. Association between red cell distribution width and disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 2012;57:1033–8.
9. Pedersen J, Coskun M, Soendergaard C, Salem M, Nielsen OH. Inflammatory pathways of importance for management of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20:64–77.

10. Bek S, Nielsen J V., Bojesen AB, Franke A, Bank S, Vogel U, et al. Systematic review: genetic biomarkers associated with anti-TNF treatment response in inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2016;44:554–67. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/apt.13736> %Cn<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27417569> %Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5113857>
11. Nielsen OH, Ainsworth MA. Tumor necrosis factor inhibitors for inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2013;369:754–62. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMct1209614> %Cn<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pu> bmed/23964937
12. Danese S, Colombel J-F, Peyrin-Biroulet L, Rutgeerts P, Reinisch W. Review article: The role of anti-TNF in the management of ulcerative colitis - Past, present and future [Internet]. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013. p. 855–66. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed15&NEWS=N&AN=52494710>
13. Gerich ME, McGovern DPB. Towards personalized care in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014. p. 287–99.
14. Siegel CA, Melmed GY. Predicting response to anti-TNF agents for the treatment of Crohn's disease. *Therap Adv Gastroenterol*. 2009. p. 245–51.
15. Siegel CA, Horton H, Siegel LS, Thompson KD, MacKenzie T, Stewart SK, et al. A validated web-based tool to display individualised Crohn's disease predicted outcomes based on clinical, serologic and genetic variables. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43:262–71.
16. 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*. 2016. p. 30–51.
17. Barber GE, Yajnik V, Khalili H, Giallourakis C, Garber J, Xavier R, et al. Genetic Markers Predict Primary Non-Response and Durable Response to Anti-TNF Biologic Therapies in Crohn's Disease. *Am J Gastroenterol*. 2016;111:1816–22.

18. Netz U, Carter JV, Eichenberger MR, Dryden GW, Pan J, Rai SN, et al. Genetic polymorphisms predict response to anti-tumor necrosis factor treatment in Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2017. p. 4958–67.
19. Mao YQ, Dong SQ, Gao M. Association between TNF- α rs1799724 and rs1800629 polymorphisms and the risk of Crohn's disease. *Genet Mol Res.* 2015;14:15811–21.
20. Lacruz-Guzmán D, Torres-Moreno D, Pedrero F, Romero-Cara P, García-Tercero I, Trujillo-Santos J, et al. Influence of polymorphisms and TNF and IL1 β serum concentration on the infliximab response in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur J Clin Pharmacol.* 2013;69:431–8.
21. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J Crohns Colitis [Internet].* 2010;4:28–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21122489>
22. 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. *J Crohn's Colitis.* 2017;11:3–25.
23. Tieranu C, Manuc T, Dobre M, Milanesi E, Plesea I-E, Tieranu E, et al. Gene expression profile of endoscopically active and inactive Ulcerative Colitis: preliminary data. *Rom J Morphol Embriol.* 2017;4:1301–7.
24. Tieranu C, Gigea C. RDW as a novel marker of disease activity in Crohn's disease: testing a hypothesis in an IBD tertiary care center in Romania. *Res Sci Today.* 2014;Supplement:100–7.
25. Mulder DJ, Noble AJ, Justinich CJ, Duffin JM. A tale of two diseases: The history of inflammatory bowel disease. *J Crohn's Colitis.* 2014. p. 341–8.
26. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: A pathologic and clinical entity. *J Am Med Assoc.* 1932;99:1323–9.
27. Smith MSH, Wakefield AJ. Crohn's disease: Ancient and modern. *Postgrad Med J.* 1994.

p. 149–53.

28. Aufses AH. The history of Crohn's disease. *Surg Clin North Am*. 2001; p. 1–11.
29. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411:599–603.
30. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411:603–6.
31. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2015;12:205–17. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84926416641&partnerID=40&md5=84b01f9055cfc17d9f4a4c4109e4e133>
32. Vind I, Riis L, Jess T, Knudsen E, Pedersen N, Elkjær M, et al. Increasing incidences of inflammatory bowel disease and decreasing surgery rates in Copenhagen City and County, 2003-2005: A population-based study from the Danish Crohn colitis database. *Am J Gastroenterol*. 2006;101:1274–82.
33. Bernstein CN, Wajda A, Svenson LW, MacKenzie A, Koehoorn M, Jackson M, et al. The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: A population-based study. *Am J Gastroenterol*. 2006;101:1559–68.
34. Rubin GP, Hungin a P, Kelly PJ, Ling J. Inflammatory bowel disease: epidemiology and management in an English general practice population. *Aliment Pharmacol Ther*. 2000;14:1553–9.
35. Loftus CG, Loftus E V., Harmsen WS, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Melton LJ, et al. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:254–61.
36. Yapp TR, Stenson R, Thomas G a, Lawrie BW, Williams GT, Hawthorne a B. Crohn's disease incidence in Cardiff from 1930: an update for 1991-1995. *Eur J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2000;12:907–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10958218>

37. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Wajda a. Epidemiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in a central Canadian province: a population-based study. *Am J Epidemiol.* 1999;149:916–24.
38. Pinchbeck BR, Kirdeikis J, Thomson AB. Inflammatory bowel disease in northern Alberta. An epidemiologic study. *J Clin Gastroenterol* [Internet]. 1988;10:505–15. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Economic+impact+of+inflammatory+bowel+disease+in+Alberta#0%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3263409>
39. Gunesh S, Thomas GAO, Williams GT, Roberts A, Hawthorne AB. The incidence of Crohn's disease in Cardiff over the last 75 years: An update for 1996-2005. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;27:211–9.
40. Molinié F, Gower-Rousseau C, Yzet T, Merle V, Grandbastien B, Marti R, et al. Opposite evolution in incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Northern France (1988-1999). *Gut.* 2004;53:843–8.
41. Latour P, Louis E, Belaiche J. Incidence of inflammatory bowel disease in the area of Liège: a 3 years prospective study (1993-1996). *Acta Gastroenterol Belg* [Internet]. 1998;61:410–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9923091>
42. Ott, Claudiaa; Obermeier, Floriana; Thieler, Sabinea; Kemptner, Danielaa; Bauer, Alexandraa; Schölmerich, Jürgena; Rogler, Gerhardc; Timmer A. The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany : a prospective population-based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2008;20:917–23.
43. Gearry RB, Richardson A, Frampton CMA, Collett JA, Burt MJ, Chapman BA, et al. High incidence of Crohn's disease in Canterbury, New Zealand: Results of an epidemiologic study. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12:936–43.
44. Yang SK, Hong WS, Min YI, Kim HY, Yoo JY, Rhee PL, et al. Incidence and prevalence of ulcerative colitis in the Songpa-Kangdong district, Seoul, Korea, 1986-1997. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000;15:1037–42.

45. Thia KT, Loftus E V, Sandborn WJ, Yang S-K. An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2008;103:3167–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19086963>
46. Edouard A, Paillaud M, Merle S, Orhan C, Chenayer-Panelatti Dagger M. Incidence of inflammatory bowel disease in the French West Indies (1997-1999). *Gastroenterol Clin Biol* [Internet]. 2005;29:779–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16294145>
47. Sood A, Midha V, Sood N, Bhatia AS, Avasthi G. Incidence and prevalence of ulcerative colitis in Punjab, North India. *Gut*. 2003;52:1587–90.
48. Cosnes J, Gowerrousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011;140:1785–94.
49. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012;142.
50. Loftus E V., Silverstein MD, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR. Ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: Incidence, prevalence, and survival. *Gut*. 2000;46:336–43.
51. Loftus J, Silverstein MD, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR. Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: Incidence, prevalence, and survival. *Gastroenterology*. 1998;114:1161–8.
52. Khalili H, Huang ES, Ananthakrishnan AN, Higuchi L, Richter JM, Fuchs CS, et al. Geographical variation and incidence of inflammatory bowel disease among US women. *Gut*. 2012;61:1686–92.
53. Nerich V, Monnet E, Etienne A, Louafi S, Ramée C, Rican S, et al. Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: A study based on national health insurance data. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12:218–26.
54. Loftus E V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004. p. 1504–17.

55. Abraham C, Cho JH. Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2009;361:2066–78. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra0804647>
56. Liu JZ, Anderson CA. Genetic studies of Crohn's disease: Past, present and future. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014;28:373–86.
57. Russell RK, Satsangi J. IBD: A family affair. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004. p. 525–39.
58. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Färkkilä M, Kontula K. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2006. p. 3668–72.
59. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011. p. 307–17.
60. M. Orholm, V. Binder, T. I. A. Søre. Concordance of Inflammatory Bowel Disease among Danish Twins: Results of a Nationwide Study. *Scand J Gastroenterol* [Internet]. 2000;35:1075–81. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/003655200451207>
61. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield a J. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ*. 1996;312:95–6.
62. Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Järnerot G. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: A long- term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology*. 2003;124:1767–73.
63. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature*. 1996;379:821–3.
64. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2012;491:119–24.
65. Glocker E-O, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schäffer AA, Noyan F, et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* [Internet].

- 2009;361:2033–45. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2787406/>
66. Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, Vázquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B, et al. The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe*. 2014;15:382–92.
67. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: Current status and the future ahead. *Gastroenterology*. 2014;146:1489–99.
68. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward D V, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol [Internet]*. 2012;13:R79. Available from:
<http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2012-13-9-r79>
69. Nagalingam NA, Lynch S V. Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2012. p. 968–80.
70. Manichanh C, Borruel N, Casellas F, Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012. p. 599–608.
71. Castiglione F, Diaferia M, Morace F, Labianca O, Meucci C, Cuomo A, et al. Risk factors for inflammatory bowel diseases according to the “hygiene hypothesis”: A case-control, multi-centre, prospective study in Southern Italy. *J Crohn's Colitis*. 2012;6:324–9.
72. Ng SC, Tang W, Leong RW, Chen M, Ko Y, Studd C, et al. Environmental risk factors in inflammatory bowel disease: A population-based case-control study in Asia-Pacific. *Gut*. 2015;64:1063–71.
73. Timm S, Svanes C, Janson C, Sigsgaard T, Johannessen A, Gislason T, et al. Place of upbringing in early childhood as related to inflammatory bowel diseases in adulthood: A population-based cohort study in Northern Europe. *Eur J Epidemiol*. 2014;29:429–37.
74. Balzola F, Bernstein C, Ho GT. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes:

Commentary. Inflamm Bowel Dis Monit. 2011. p. 166.

75. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, et al. High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004;127:412–21.
76. Martín R, Chain F, Miquel S, Lu J, Gratadoux JJ, Sokol H, et al. The commensal bacterium *faecalibacterium prausnitzii* is protective in DNBS-induced chronic moderate and severe colitis models. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20:417–30.
77. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux J-J, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2008;105:16731–6. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0804812105>
78. Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, et al. Low counts of *faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:1183–9.
79. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science (80-)*. 2011;334:105–8.
80. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014;505:559–63.
81. Norman JM, Handley SA, Baldridge MT, Droit L, Liu CY, Keller BC, et al. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell*. 2015;160:447–60.
82. Iliev ID, Funari VA, Taylor KD, Nguyen Q, Reyes CN, Strom SP, et al. Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor dectin-1 influence colitis. *Science (80-)*. 2012;336:1314–7.
83. Mahida YR, Kurlac L, Gallagher A, Hawkey CJ. High circulating concentrations of interleukin-6 in active Crohn's disease but not ulcerative colitis. *Gut*. 1991;32:1531–4.
84. Harries AD, Baird A, Rhodes J. Non-Smoking: A Feature of Ulcerative Colitis. *Br Med J*

(Clin Res Ed). 1982;284:706.

85. Higuchi LM, Khalili H, Chan AT, Richter JM, Bousvaros A, Fuchs CS. A Prospective Study of Cigarette Smoking and the Risk of Inflammatory Bowel Disease in Women. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2012;107:1399–406. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ajg.2012.196>
86. Mahid SS, Minor KS, Stromberg AJ, Galandiuk S. Active and passive smoking in childhood is related to the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:431–8.
87. Odes HS, Fich A, Reif S, Halak A, Lavy A, Keter D, et al. Effects of current cigarette smoking on clinical course of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dig Dis Sci*. 2001;46:1717–21.
88. Cosnes J, Nion-Larmurier I, Afchain P, Beaugerie L, Gendre JP. Gender differences in the response of colitis to smoking. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004. p. 41–8.
89. Cosnes J, Carbonnel F, Carrat F, Beaugerie L, Cattan S, Gendre J. Effects of current and former cigarette smoking on the clinical course of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 1999;13:1403–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10571595%5Cnhttp://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1046/j.1365-2036.1999.00630.x/asset/j.1365-2036.1999.00630.x.pdf?v=1&t=icccladv&s=3d31e1e492151d0d0f6672719144c79c801d289f>
90. Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, Le Quintrec Y, Gendre J. Effects of cigarette smoking on the long-term course of Crohn's disease. *Gastroenterology* [Internet]. 1996;110:424–31. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001650859600073X%5Cnhttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001650859600073X>
91. Lakatos PL, Szamosi T, Lakatos L. Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? *World J Gastroenterol*. 2007;13:6134–9.
92. Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and

- clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2004;18:481–96.
93. Persson PG, Hellers G, Ahlbom A. Use of oral moist snuff and inflammatory bowel disease. *Int J Epidemiol.* 1993;22:1101–3.
94. Birrenbach T, Böcker U. Inflammatory bowel disease and smoking. A review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm Bowel Dis.* 2004. p. 848–59.
95. Bergeron V, Grondin V, Rajca S, Maubert M-A, Pigneur B, Thomas G, et al. Current smoking differentially affects blood mononuclear cells from patients with crohn's disease and ulcerative colitis: Relevance to its adverse role in the disease. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2012;18:1101–11. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00054725-201206000-00014>
96. Ananthakrishnan AN, Nguyen DD, Sauk J, Yajnik V, Xavier RJ. Genetic polymorphisms in metabolizing enzymes modifying the association between smoking and inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2014;20:783–9.
97. Parkes GC, Whelan K, Lindsay JO. Smoking in inflammatory bowel disease: impact on disease course and insights into the aetiology of its effect. *J Crohns Colitis* [Internet]. 2014;8:717–25. Available from: <http://ecco-jcc.oxfordjournals.org/content/8/8/717.abstract>
98. Biedermann L, Brüllsauer K, Zeitz J, Frei P, Scharl M, Vavricka SR, et al. Smoking cessation alters intestinal microbiota: Insights from quantitative investigations on human fecal samples using FISH. *Inflamm Bowel Dis.* 2014;20:1496–501.
99. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbom A. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2003;124:40–6.
100. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbom A. Appendectomy and Protection against Ulcerative Colitis. *N Engl J Med* [Internet]. 2001;344:808–14. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM200103153441104>
101. Kaplan GG, Jackson T, Sands BE, Frisch M, Andersson RE, Korzenik J. The risk of

developing Crohn's disease after an appendectomy: A meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:2925–31.

102. Radon K, Windstetter D, Poluda AL, Mueller B, von Mutius E, Koletzko S. Contact with farm animals in early life and juvenile inflammatory bowel disease: a case-control study. *Pediatrics* [Internet]. 2007;120:354–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671062>
103. Van Kruiningen HJ, Joossens M, Vermeire S, Joossens S, Debeugny S, Gower-Rousseau C, et al. Environmental factors in familial Crohn's disease in Belgium. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11:360–5.
104. Barclay AR, Russell RK, Wilson ML, Gilmour WH, Satsangi J, Wilson DC. Systematic Review: The Role of Breastfeeding in the Development of Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr* [Internet]. 2009;155:421–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347609002376>
105. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Collins MT. Population-Based Case Control Study of Seroprevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in Patients with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *J Clin Microbiol*. 2004;42:1129–35.
106. Chacon O, Bermudez LE, Barletta RG. Johne's Disease, Inflammatory Bowel Disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 2004;58:329–63. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.58.030603.123726>
107. Feller M, Huwiler K, Stephan R, Altpeter E, Shang A, Furrer H, et al. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:607–13.
108. Selby W, Pavli P, Crotty B, Florin T, Radford-Smith G, Gibson P, et al. Two-Year Combination Antibiotic Therapy With Clarithromycin, Rifabutin, and Clofazimine for Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 2007;132:2313–9.
109. Rodríguez LAG, Ruigómez A, Panés J. Acute Gastroenteritis Is Followed by an Increased Risk of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2006;130:1588–94.

110. Porter CK, Tribble DR, Aliaga PA, Halvorson HA, Riddle MS. Infectious Gastroenteritis and Risk of Developing Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2008;135:781–6.
111. Gradel KO, Nielsen HL, Schønheyder HC, Ejlertsen T, Kristensen B, Nielsen H. Increased Short- and Long-Term Risk of Inflammatory Bowel Disease After Salmonella or Campylobacter Gastroenteritis. *Gastroenterology*. 2009;137:495–501.
112. Cadwell K, Patel KK, Maloney NS, Liu TC, Ng ACY, Storer CE, et al. Virus-Plus-Susceptibility Gene Interaction Determines Crohn's Disease Gene Atg16L1 Phenotypes in Intestine. *Cell*. 2010;141:1135–45.
113. Ananthakrishnan AN, Issa M, Binion DG. Clostridium Difficile and Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2009. p. 711–28.
114. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2010;105:2687–92. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-78649868190&partnerID=40&md5=c13b02841150d1197e27ac1be2fa1bf6>
115. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics and new diagnoses of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:2133–42.
116. Virta L, Auvinen A, Helenius H, Huovinen P, Kolho KL. Association of repeated exposure to antibiotics with the development of pediatric crohn's disease - A nationwide, register-based Finnish case-control study. *Am J Epidemiol*. 2012;175:775–84.
117. Singh S, Graff LA, Bernstein CN. Do NSAIDs, antibiotics, infections, or stress trigger flares in IBD. *Am J Gastroenterol*. 2009. p. 1298–313.
118. Chan SSM, Luben R, Bergmann MM, Boeing H, Olsen A, Tjonneland A, et al. Aspirin in the aetiology of Crohn's disease and ulcerative colitis: a European prospective cohort study. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2011;34:649–55. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2036.2011.04784.x>
119. Ananthakrishnan AN, Higuchi LM, Huang ES, Khalili H, Richter JM, Fuchs CS, et al.

- Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Ann Intern Med* [Internet]. 2012;156:350–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22393130> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3369539/> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3369539/>
120. Cornish J a, Tan E, Simillis C, Clark SK, Teare J, Tekkis PP. The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:2394–400.
121. Khalili H, Higuchi LM, Ananthakrishnan AN, Manson JE, Feskanich D, Richter JM, et al. Hormone therapy increases risk of ulcerative colitis but not Crohn's disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2012;143:1199–206. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L52219042> <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2012.07.096> <http://findit.library.jhu.edu/resolve?sid=EMBASE&issn=00165085&id=doi:10.1053/j.gastro.2012.07.096&atitle=Hormone+therapy+i>
122. Amre DK, D'Souza S, Morgan K, Seidman G, Lambrette P, Grimard G, et al. Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for crohn's disease in children. *Am J Gastroenterol*. 2007;102:2016–25.
123. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, Higuchi LM, De Silva P, Korzenik JR, et al. A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2013;145:970–7.
124. Roberts CL, Keita Å V., Duncan SH, O'Kennedy N, Söderholm JD, Rhodes JM, et al. Translocation of Crohn's disease Escherichia coli across M-cells: Contrasting effects of soluble plant fibres and emulsifiers. *Gut*. 2010;59:1331–9.
125. Galvez J, Rodríguez-Cabezas ME, Zarzuelo A. Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2005;49:601–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.200500013>
126. Cantorna MT, Munsick C, Bemiss C, Mahon BD. 1,25-Dihydroxycholecalciferol

Prevents and Ameliorates Symptoms of Experimental Murine Inflammatory Bowel Disease. *J Nutr* [Internet]. 2000;130:2648–52. Available from: <http://jn.nutrition.org/content/130/11/2648.full>

127. Froicu M, Cantorna MT. Vitamin D and the vitamin D receptor are critical for control of the innate immune response to colonic injury. *BMC Immunol* [Internet]. 2007;8:5. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17397543

128. Froicu M, Weaver V, Wynn TA, McDowell MA, Welsh JE, Cantorna MT. A crucial role for the vitamin D receptor in experimental inflammatory bowel diseases. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2003;17:2386–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14500760>

129. Froicu M, Zhu Y, Cantorna MT. Vitamin D receptor is required to control gastrointestinal immunity in IL-10 knockout mice. *Immunology*. 2006;117:310–8.

130. Mouli VP, Ananthakrishnan AN. Review article: vitamin D and inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2014;39:1–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24236989%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/artclerender.fcgi?artid=PMC3872479>

131. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Higuchi LM, Bao Y, Korzenik JR, Giovannucci EL, et al. Higher predicted vitamin D status is associated with reduced risk of crohn's disease. *Gastroenterology*. 2012;142:482–9.

132. Ananthakrishnan AN, Cagan A, Gainer VS, Cai T, Cheng SC, Savova G, et al. Normalization of plasma 25-hydroxy vitamin D is associated with reduced risk of surgery in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19:1921–7.

133. Cerasi M, Ammendola S, Battistoni A. Competition for zinc binding in the host-pathogen interaction. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2013;3. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2013.00108/abstract>

134. Haase H. Zinc Signals and Immune Function. *Mol Genet Nutr Asp Major Trace Miner*.

2016. p. 261–71.

135. Lahiri A, Abraham C. Activation of pattern recognition receptors up-regulates metallothioneins, thereby increasing intracellular accumulation of zinc, autophagy, and bacterial clearance by macrophages. *Gastroenterology*. 2014;147:835–46.
136. Bonaz BL, Bernstein CN. Brain-gut interactions in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2013;144:36–49.
137. Ghia J, Blennerhassett P, Deng Y, Verdu EF, Khan WI, Collins SM. Reactivation of Inflammatory Bowel Disease in a Mouse Model of Depression. *Gastroenterology* [Internet]. 2009;136:2280–2288.e4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508509003552>
138. Bailey MT, Dowd SE, Galley JD, Hufnagle AR, Allen RG, Lyte M. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: Implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain Behav Immun*. 2011;25:397–407.
139. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, Higuchi LM, de Silva P, Fuchs CS, et al. Sleep Duration Affects Risk for Ulcerative Colitis: A Prospective Cohort Study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12:1879–86.
140. Khalili H, Ananthakrishnan AN, Konijeti GG, Liao X, Higuchi LM, Fuchs CS, et al. Physical activity and risk of inflammatory bowel disease: prospective study from the Nurses' Health Study cohorts. *BMJ* [Internet]. 2013;347:f6633. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3935281/>
141. Bernstein CN, Eliakim A, Fedail S, Fried M, Gearry R, Goh KL, et al. World gastroenterology organisation global guidelines inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol*. 2016. p. 813–8.
142. Zaharie R, Tantau A, Zaharie F, Tantau M, Gheorghe L, Gheorghe C, et al. Diagnostic Delay in Romanian Patients with Inflammatory Bowel Disease : Risk Factors and Impact on the Disease Course and Need for Surgery. *J Crohn's Colitis* [Internet]. 2015;1–9. Available from: file:///C:/Users/Usuario/Documents/incontinencia fecal/RUMANIA RD IGUAL.pdf

143. Israeli E, Ryan JD, Shafer LA, Bernstein CN. Younger age at diagnosis is associated with panenteric, but not more aggressive, crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12.
144. Wu LM, Xu JR, Gu HY, Hua J, Hu J. Is Magnetic Resonance Imaging a Reliable Diagnostic Tool in the Evaluation of Active Crohn's Disease in the Small Bowel? *J Clin Gastroenterol*. 2013;47:328–38.
145. Giles E, Barclay AR, Chippington S, Wilson DC. Systematic review: MRI enterography for assessment of small bowel involvement in paediatric Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013. p. 1121–31.
146. Ford AC, Khan KJ, Achkar JP, Moayyedi P. Efficacy of oral vs. Topical, or combined oral and topical 5-aminosalicylates, in ulcerative colitis: Systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2012. p. 167–76.
147. Mayberry JF, Lobo a, Ford a C, Thomas a. NICE clinical guideline (CG152): the management of Crohn's disease in adults, children and young people. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2013;37:195–203. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23151246>
148. Irving PM, Gearry RB, Sparrow MP, Gibson PR. Review article: Appropriate use of corticosteroids in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007. p. 313–29.
149. Gisbert JP, Chaparro M. Systematic review with meta-analysis: inflammatory bowel disease in the elderly. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2014;39:459–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24405149>
150. Fries W, Cottone M, Cascio A. Systematic review: Macrophage activation syndrome in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013. p. 1033–45.
151. Feagan BG, McDonald JWD, Panaccione R, Enns RA, Bernstein CN, Ponich TP, et al. Methotrexate in combination with infliximab is no more effective than infliximab alone in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2014;146.
152. Carbonnel F, Colombel JF, Filippi J, Katsanos K, Peyrin-Biroulet L, Allez M, et al.

- Methotrexate for corticosteroid-dependent ulcerative colitis: Results of a placebo randomized controlled trial. *J Crohn's Colitis* [Internet]. 2015;9:S14–5. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emed13&AN=71884843%5Cnhttp://nt2yt7px7u.search.serialssolutions.com/?sid=OVID:Embase&ge=nre=article&id=pmid:&id=doi:&issn=0016-5085&volume=148&issue=4+SUPPL.+1&spage=S140&pages=S140&date=>
153. Valentino PL, Church PC, Shah PS, Beyene J, Griffiths AM, Feldman BM, et al. Hepatotoxicity caused by methotrexate therapy in children with inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis.* 2014. p. 47–59.
154. Danese S, Fiorino G, Peyrin-Biroulet L, Lucenteforte E, Virgili G, Moja L, et al. Biological agents for moderately to severely active ulcerative colitis: a systematic review and network meta-analysis. *Ann Intern Med* [Internet]. 2014;160:704–11. Available from: <http://annals.org/article.aspx?articleid=1872849>
155. O'Meara S, Nanda KS, Moss AC. Antibodies to infliximab and risk of infusion reactions in patients with inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis.* 2014. p. 1–6.
156. Costa J, Magro F, Caldeira D, Alarcão J, Sousa R, Vaz-Carneiro A. Infliximab reduces hospitalizations and surgery interventions in patients with inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis.* 2013. p. 2098–110.
157. Ford AC, Peyrin-Biroulet L. Opportunistic Infections With Anti-Tumor Necrosis Factor- α Therapy in Inflammatory Bowel Disease: Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2013;108:1268–76. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ajg.2013.138>
158. Zhang D, Xiong B, Li X, Xu T, Yu M. Meta-analysis: Serious adverse events in Crohn's disease patients treated with TNF-alpha inhibitors. *Hepatogastroenterology.* 2013;60:1333–42.
159. West RL, Van Der Woude CJ, Hansen BE, Felt-Bersma RJF, Van Tilburg AJP, Drapers JAG, et al. Clinical and endosonographic effect of ciprofloxacin on the treatment of perianal fistulae in Crohn's disease with infliximab: A double-blind placebo-controlled study. *Aliment*

Pharmacol Ther. 2004;20:1329–36.

160. Sood A, Midha V, Makharia GK, Ahuja V, Singal D, Goswami P, et al. The Probiotic Preparation, VSL#3 Induces Remission in Patients With Mild-to-Moderately Active Ulcerative Colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7.
161. He X, Chen Z, Huang J, Lian L, Rouniyar S, Wu X, et al. Stapled side-to-side anastomosis might be better than handsewn end-to-end anastomosis in ileocolic resection for Crohn's disease: A meta-analysis. *Dig Dis Sci*. 2014. p. 1544–51.
162. Antoniou SA, Antoniou GA, Koch OO, Pointner R, Granderath FA. Is laparoscopic ileocecal resection a safe option for Crohn's disease? Best evidence topic. *Int J Surg*. 2014;12:22–5.
163. Desai D, Faubion W a, Sandborn WJ. Review article: biological activity markers in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2007;25:247–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17217454>
164. Gabay C, Kushner I. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *N Engl J Med* [Internet]. 1999;340:448–54. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199902113400607>
165. Vermeire S. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2004;10:661–5. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1097/00054725-200409000-00026/full>
166. Jensen KB, Jarnum S, Koudahl G, Kristensen M. Serum orosomucoid in ulcerative colitis: its relation to clinical activity, protein loss, and turnover of albumin and IgG. *Scand J Gastroenterol* [Internet]. 1976;11:177–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1265438>
167. Andre C, Descos L, Landais P, Fermanian J. Assessment of appropriate laboratory measurements to supplement the Crohn's disease activity index. *Gut*. 1981;22:571–4.
168. Solem CA, Loftus E V., Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic

- activity in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2005;11:707–12.
169. Florin THJ, Paterson EWJ, Fowler E V., Radford-Smith GL. Clinically active Crohn's disease in the presence of a low C-reactive protein. *Scand J Gastroenterol.* 2006;41:306–11.
170. Travis SP, Farrant JM, Ricketts C, Nolan DJ, Mortensen NM, Kettlewell MG, et al. Predicting outcome in severe ulcerative colitis. *Gut* [Internet]. 1996;38:905–10. Available from: <http://gut.bmjjournals.org/cgi/doi/10.1136/gut.38.6.905>
171. Savarymuttu SH, Hodgson HJ, Chadwick VS, Pepys MB. Differing acute phase responses in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* [Internet]. 1986;27:809–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1583333/>
172. Hammer HB, Kvien TK, Glennås a, Melby K. A longitudinal study of calprotectin as an inflammatory marker in patients with reactive arthritis. *Clin Exp Rheumatol* [Internet]. 1995;13:59–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7774104>
173. Treton X, Bouhnik Y, Mary JY, Colombel JF, Duclos B, Soule JC, et al. Azathioprine Withdrawal in Patients With Crohn's Disease Maintained on Prolonged Remission: A High Risk of Relapse. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009;7:80–5.
174. Louis E, Mary J, Vernier-Massouille G, Grimaud J, Bouhnik Y, Laharie D, et al. Maintenance of Remission Among Patients With Crohn's Disease on Antimetabolite Therapy After Infliximab Therapy Is Stopped. *Gastroenterology.* 2012;142:63–70.
175. Lémann M, Mary JY, Colombel JF, Duclos B, Soule JC, Lerebours E, et al. A randomized, double-blind, controlled withdrawal trial in Crohn's disease patients in long-term remission on azathioprine. *Gastroenterology.* 2005;128:1812–8.
176. Rump JA, Schölmerich J, Gross V, Roth M, Helfesrieder R, Rautmann A, et al. A new type of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody (p-ANCA) in active ulcerative colitis but not in Crohn's disease. *Immunobiology* [Internet]. 1990;181:406–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2099908>

177. Ghosh S, Goldin E, Gordon FH, Malchow H a, Rask-Madsen J, Rutgeerts P, et al. Natalizumab for active Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2003;348:24–32.
178. Dotan I, Fishman S, Dgani Y, Schwartz M, Karban A, Lerner A, et al. Antibodies Against Laminaribioside and Chitobioside Are Novel Serologic Markers in Crohn's Disease. *Gastroenterology.* 2006;131:366–78.
179. Duerr RH, Targan SR, Landers CJ, Sutherland LR, Shanahan F. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis. Comparison with other colitides/diarrheal illnesses. *Gastroenterology [Internet].* 1991;100:1590–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2019365
180. McKenzie H, Main J, Pennington CR, Parratt D. Antibody to selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* (baker's and brewer's yeast) and *Candida albicans* in Crohn's disease. *Gut [Internet].* 1990;31:536–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1378569/>
181. Hyams JS, Treem WR, Eddy E, Wyzga N, Moore RE. Tumor necrosis factor-alpha is not elevated in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr [Internet].* 1991;12:233–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2051274>
182. Murch SH, Lamkin VA, Savage MO, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut [Internet].* 1991;32:913–7. Available from: <http://gut.bmjjournals.org/cgi/doi/10.1136/gut.32.8.913>
183. Braegger C, Nicholls S, Murch S. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet [Internet].* 1992;339:89–91. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014067369290999J>
184. Gardiner KR, Halliday MI, Barclay GR, Milne L, Brown D, Stephens S, et al. Significance of systemic endotoxaemia in inflammatory bowel disease. *Gut [Internet].* 1995;36:897–901. Available from: <http://gut.bmjjournals.org/cgi/doi/10.1136/gut.36.6.897>

185. Saiki T, Mitsuyama K, Toyonaga A, Ishida H, Tanikawa K. Detection of pro- and anti-inflammatory cytokines in stools of patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 1998;33:616–22.
186. van Dullemen HM, van Deventer SJ, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tytgat GN, et al. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology [Internet]*. 1995;109:129–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7797011>
187. Propst A, Propst T, Herold M, Vogel W, Judmaier G. Interleukin-1 receptor antagonist in differential diagnosis of inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol [Internet]*. 1995;7:1031–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8680901>
188. Casini-Raggi V, Kam L, Chong YJ, Fiocchi C, Pizarro TT, Cominelli F. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *J Immunol (Baltimore, Md 1950)*. 1995;154:2434–40.
189. Williams AJK, Symons JA, Watchet K, Duff GW. Soluble interleukin-2 receptor and disease activity in Crohn's disease. *J Autoimmun*. 1992;5:251–9.
190. Nielsen OH, Brynskov J. Soluble interleukin-2 receptors in ulcerative colitis. *Mediators Inflamm*. 1993;2:115–8.
191. Sabat R. IL-10 family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21:315–24.
192. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annu Rev Immunol [Internet]*. 2011;29:71–109. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-031210-101312>
193. Kühn R, Löbler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993;75:263–74.
194. Azuma YT, Matsuo Y, Kuwamura M, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, et al. Interleukin-19 protects mice from innate-mediated colonic inflammation. *Inflamm Bowel Dis*.

Dis. 2010;16:1017–28.

195. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK, et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* [Internet]. 2008;118:534–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18172556%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2157567>
196. Andoh A, Zhang Z, Inatomi O, Fujino S, Deguchi Y, Araki Y, et al. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology*. 2005;129:969–84.
197. Ministro P, Martins D. Fecal biomarkers in inflammatory bowel disease: how, when and why? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;11:317–28.
198. Lopez RN, Leach ST, Lemberg DA, Duvoisin G, Gearry RB, Day AS. Fecal biomarkers in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017. p. 577–82.
199. Nakarai A, Kato J, Hiraoka S, Kuriyama M, Akita M, Hirakawa T, et al. Evaluation of mucosal healing of ulcerative colitis by a quantitative fecal immunochemical test. *Am J Gastroenterol*. 2013;108:83–9.
200. Kato J, Hiraoka S, Nakarai A, Takashima S, Inokuchi T, Ichinose M. Fecal immunochemical test as a biomarker for inflammatory bowel diseases: can it rival fecal calprotectin? *Intest Res* [Internet]. 2016;14:5. Available from: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5217/ir.2016.14.1.5>
201. Travis SPL, Higgins PDR, Orchard T, Van Der Woude CJ, Panaccione R, Bitton a, et al. Review article: defining remission in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2011;34:113–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21615435>
202. Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Reinisch W, Geboes K, Barakauskiene A, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: definitions and diagnosis for the European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). *J Crohn's Colitis*. 2006;2:1–13.

203. Stange EF, Travis SPL, Vermeire S, Reinisch W, Geboes K, Barakauskiene A, et al. European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *J Crohn's Colitis*. 2008. p. 1–23.
204. Reinisch W, Van Assche G, Befrits R, Connell W, D'Haens G, Ghosh S, et al. Recommendations for the treatment of ulcerative colitis with infliximab: A gastroenterology expert group consensus. *J Crohn's Colitis*. 2012. p. 248–58.
205. Peyrin-Biroulet L, Ferrante M, Magro F, Campbell S, Franchimont D, Fidder H, et al. Results from the 2nd Scientific Workshop of the ECCO (I): Impact of mucosal healing on the course of inflammatory bowel disease. *J Crohn's Colitis*. 2011. p. 477–83.
206. Armuzzi A, Van Assche G, Reinisch W, de Chambrun GP, Griffiths A, Sladek M, et al. Results of the 2nd scientific workshop of the ECCO (IV): Therapeutic strategies to enhance intestinal healing in inflammatory bowel disease. *J Crohn's Colitis*. 2012. p. 492–502.
207. Colombel JF, Rutgeerts P, Reinisch W, Esser D, Wang Y, Lang Y, et al. Early mucosal healing with infliximab is associated with improved long-term clinical outcomes in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2011;141:1194–201.
208. D'Haens G, Baert F, van Assche G, Caenepeel P, Vergauwe P, Tuynman H, et al. Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. *Lancet*. 2008;371:660–7.
209. Baert F, Moortgat L, Van Assche G, Caenepeel P, Vergauwe P, De Vos M, et al. Mucosal Healing Predicts Sustained Clinical Remission in Patients With Early-Stage Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 2010;138:463–8.
210. Rutgeerts P, Diamond RH, Bala M, Olson A, Lichtenstein GR, Bao W, et al. Scheduled maintenance treatment with infliximab is superior to episodic treatment for the healing of mucosal ulceration associated with Crohn's disease. *Gastrointest Endosc*. 2006;63:433–42.
211. Schnitzler F, Fidder H, Ferrante M, Noman M, Arijs I, Van Assche G, et al. Mucosal healing predicts long-term outcome of maintenance therapy with infliximab in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:1295–301.

212. De Cruz P, Kamm MA, Prideaux L, Allen PB, Moore G. Mucosal healing in Crohn's disease: A systematic review. *Inflamm Bowel Dis.* 2013. p. 429–44.
213. Neurath MF, Travis SPL. Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review. *Gut* [Internet]. 2012;61:1619–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22842618>
214. Bryant R V., Winer S, SPL T, Riddell RH. Systematic review: Histological remission in inflammatory bowel disease. Is “complete” remission the new treatment paradigm? An IOIBD initiative. *J Crohn's Colitis.* 2014. p. 1582–97.
215. Korelitz BI. Mucosal healing as an index of colitis activity: Back to histological healing for future indices. *Inflamm Bowel Dis.* 2010. p. 1628–30.
216. Riley SA, Mani V, Goodman MJ, Dutt S, Herd ME. Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut* [Internet]. 1991;32:174–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1864537%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1378803>
217. Rosenberg L, Nanda KS, Zenlea T, Gifford A, Lawlor GO, Falchuk KR, et al. Histologic markers of inflammation in patients with ulcerative colitis in clinical remission. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2013;11:991–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3753658&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
218. Azad S, Sood N, Sood A. Biological and histological parameters as predictors of relapse in ulcerative colitis: a prospective study. *Saudi J Gastroenterol.* 2011;17:194–8.
219. Bitton A, Peppercorn MA, Antonioli DA, Niles JL, Shah S, Bousvaros A, et al. Clinical, biological, and histologic parameters as predictors of relapse in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2001;120:13–20.
220. Gupta RB, Harpaz N, Itzkowitz S, Hossain S, Matula S, Kornbluth A, et al. {A figure is presented}Histologic Inflammation Is a Risk Factor for Progression to Colorectal Neoplasia in Ulcerative Colitis: A Cohort Study. *Gastroenterology.* 2007;133:1099–105.

221. Wright R, Truelove SR. Serial rectal biopsy in ulcerative colitis during the course of a controlled therapeutic trial of various diets. *Am J Dig Dis.* 1966;11:847–57.
222. Bessisow T, Lemmens B, Ferrante M, Bisschops R, Van Steen K, Geboes K, et al. Prognostic value of serologic and histologic markers on clinical relapse in ulcerative colitis patients with mucosal healing. *Am J Gastroenterol.* 2012;107:1684–92.
223. Hefti MM, Chessin DB, Harpaz N, Steinhagen RM, Ullman TA. Severity of inflammation as a predictor of colectomy in patients with chronic ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum.* 2009;52:193–7.
224. Rutter M, Saunders B, Wilkinson K, Rumbles S, Schofield G, Kamm M, et al. Severity of Inflammation Is a Risk Factor for Colorectal Neoplasia in Ulcerative Colitis. *Gastroenterology.* 2004;126:451–9.
225. D’Haens GR, Fedorak R, Lémann M, Feagan BG, Kamm MA, Cosnes J, et al. Endpoints for clinical trials evaluating disease modification and structural damage in adults with Crohn’s disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009. p. 1599–604.
226. Truelove SC. Cortisone in Ulcerative Colitis Final Report on a Therapeutic Trial. *Br Med J.* 1955;2:1041–8.
227. Panaccione R, Colombel JF, Louis E, Peyrin-Biroulet L, Sandborn WJ. Evolving definitions of remission in Crohn’s disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19:1645–53.
228. Peyrin-Biroulet L, Bressenot A, Kampman W. Histologic Remission: The Ultimate Therapeutic Goal in Ulcerative Colitis? *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014;12.
229. Villanacci V, Antonelli E, Geboes K, Casella G, Bassotti G. Histological healing in inflammatory bowel disease: A still unfulfilled promise. *World J Gastroenterol.* 2013;19:968–78.
230. Freeman HJ. Limitations in assessment of mucosal healing in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2010;16:15–20.
231. Mazzuoli S, Guglielmi FW, Antonelli E, Salemme M, Bassotti G, Villanacci V. Definition and evaluation of mucosal healing in clinical practice. *Dig Liver Dis.* 2013. p. 969–

77.

232. Mosli MH, Feagan BG, Sandborn WJ, D'Haens G, Behling C, Kaplan K, et al. Histologic evaluation of ulcerative colitis: A systematic review of disease activity indices. *Inflamm Bowel Dis.* 2014. p. 564–75.
233. D'Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG, Geboes K, Hanauer SB, Irvine EJ, et al. A Review of Activity Indices and Efficacy End Points for Clinical Trials of Medical Therapy in Adults With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology.* 2007;132:763–86.
234. Florén CH, Benoni C, Willén R. Histologic and colonoscopic assessment of disease extension in ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol.* 1987;22:459–62.
235. Geboes K, Riddell R, Öst A, Jensfelt B, Persson T, Löfberg R. A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut.* 2000;47:404–9.
236. Gomes P, du Boulay C, Smith CL, Holdstock G. Relationship between disease activity indices and colonoscopic findings in patients with colonic inflammatory bowel disease. *Gut* [Internet]. 1986;27:92–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1620033/>
237. Hanauer S, Schwartz J, Robinson M, Roufail W, Arora S, Cello J, et al. Mesalamine capsules for treatment of active ulcerative colitis: results of a controlled trial. Pentasa Study Group. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 1993;88:1188–97. Available from: <http://europepmc.org/abstract/med/8338086>
238. Hanauer SB, Robinson M, Pruitt R, Lazenby AJ, Persson T, Nilsson G, et al. Budesonide enema for the treatment of active, distal ulcerative colitis and proctitis: A dose-ranging study. *Gastroenterology.* 1998;115:525–32.
239. KORELITZ BI, SOMMERS SC. Responses to Drug Therapy in Ulcerative Colitis: Evaluation by Rectal Biopsy and Histopathological Changes. *Am J Gastroenterol.* 1975;64:365–70.
240. Powell-Tuck J, Day DW, Buckell NA, Wadsworth J, Lennard-Jones JE. Correlations

- between defined sigmoidoscopic appearances and other measures of disease activity in ulcerative colitis. *Dig Dis Sci.* 1982;27:533–7.
241. Truelove SC, Richards WID. Biopsy Studies in Ulcerative Colitis. *Br Med J.* 1956;1:1315–9.
242. Haens GRD, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeerts P. Early Lesions of Recurrent Crohn's Disease Caused by Infusion. *Gastroenterology.* 1998;114:262–7.
243. Baars JE, Nuij VJAA, Oldenburg B, Kuipers EJ, Van Der Woude CJ. Majority of patients with inflammatory bowel disease in clinical remission have mucosal inflammation. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18:1634–40.
244. Peyrin-Biroulet L, Cieza A, Sandborn WJ, Coenen M, Chowers Y, Hibi T, et al. Development of the first disability index for inflammatory bowel disease based on the international classification of functioning, disability and health. *Gut.* 2012;61:241–7.
245. Pariente B, Cosnes J, Danese S, Sandborn WJ, Lewin M, Fletcher JG, et al. Development of the Crohn's disease digestive damage score, the Lémann score. *Inflamm Bowel Dis.* 2011. p. 1415–22.
246. Hayashi K, Piras V, Tabata S, Tomita M, Selvarajoo K. A systems biology approach to suppress TNF-induced proinflammatory gene expressions. *Cell Commun Signal [Internet].* 2013;11:84. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3832246/>&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
247. Spriggs DR, Deutsch S, Kufe DW. Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha. *Immunol Ser.* 1992;56:3–34.
248. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet].* 1997;94:3195–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9096369>
249. Warlé MC, Farhan A, Metselaar HJ, Hop WCJ, Perrey C, Zondervan PE, et al. Are

- cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles? *Liver Transplant.* 2003;9:170–81.
250. Smith AJP, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20:43–59.
251. Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, et al. Association of TNF2, a TNF- α promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: A multicenter study. *J Am Med Assoc.* 1999;282:561–8.
252. Scardapane A, Breda L, Lucantoni M, Chiarelli F. TNF- α polymorphisms in juvenile idiopathic arthritis: Which potential clinical implications? *Int J Rheumatol.* 2012.
253. Bayley JP, Ottenhoff THM, Verweij CL. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes Immun.* 2004. p. 315–29.
254. Bouma G, Crusius JBA, Oudkerk Pool M, Kolkman JJ, Von Blomberg BME, Kostense PJ, et al. Secretion of tumour necrosis factor α and lymphotoxin α in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol.* 1996;43:456–63.
255. Huizinga TWJ, Westendorp RGJ, Bollen ELEM, Keijzers V, Brinkman BMN, Langermans JAM, et al. TNF- α promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol.* 1997. p. 149–53.
256. Kubota T, McNamara DM, Wang JJ, Trost M, McTiernan CF, Mann DL, et al. Effects of tumor necrosis factor gene polymorphisms on patients with congestive heart failure. *Circulation.* 1998;97.
257. Knight JC, Udalova I, Hill a V, Greenwood BM, Peshu N, Marsh K, et al. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet [Internet].* 1999;22:145–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10369255>
258. Knight JC, Keating BJ, Rockett KA, Kwiatkowski DP. In vivo characterization of regulatory polymorphisms by allele-specific quantification of RNA polymerase loading. *Nat*

Genet. 2003;33:469–75.

259. Date Y, Seki N, Kamizono S, Higuchi T, Hirata T, Miyata K, et al. Identification of a genetic risk factor for systemic juvenile rheumatoid arthritis in the 5'-flanking region of the TNFalpha gene and HLA genes. *Arthritis Rheum.* 1999;42:2577–82.
260. Elahi MM, Asotra K, Matata MB, Mastana SS. Tumour Necrosis Factor Alpha-308 Gene Locus Promoter Polymorphism: An Analysis of Association with Health and Disease. *BBA - Mol Basis Dis.* 2009;1792:pp.163.
261. Lawrence IC, Fiocchi C, Chakravarti S. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum Mol Genet.* 2001;10:445–56.
262. Kocher O, Cheresh P, Lee SW. Identification and partial characterization of a novel membrane-associated protein (MAP17) up-regulated in human carcinomas and modulating cell replication and tumor growth. *Am J Pathol.* 1996;149:493–500.
263. Zervos AS, Gyuris J, Brent R. Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell.* 1993;72:223–32.
264. Antalis TM, Reeder JA, Gotley DC, Byeon MK, Walsh MD, Henderson KW, et al. Down-regulation of the down-regulated in adenoma (DRA) gene correlates with colon tumor progression. *Clin Cancer Res.* 1998;4:1857–63.
265. Lawrence IC, Fiocchi C, Chakravarti S. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2001;10:445–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11181568>
266. Roediger WEW. THE COLONIC EPITHELIUM IN ULCERATIVE COLITIS: AN ENERGY-DEFICIENCY DISEASE? *Lancet.* 1980;316:712–5.
267. Jones DE, Bevins CL. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem.* 1992;267:23216–25.
268. Gologan S, Iacob R, Iancu D, Iacob S, Cotrutz B, Vadan R, et al. Inflammatory gene expression profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis: A comparative analysis using a

- reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification protocol. *J Crohn's Colitis.* 2013;7:622–30.
269. Velikova T, Kyurkchiev D, Spassova Z, Karakolev I, Ivanova-Todorova E, Altankova I, et al. Alterations in cytokine gene expression profile in colon mucosa of Inflammatory Bowel Disease patients on different therapeutic regimens. *Cytokine.* 2017;92:12–9.
270. Van Assche G, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis [Internet].* 2010;4:7–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21122488>
271. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut [Internet].* 1996;39:690–7. Available from: <http://gut.bmjjournals.org/cgi/doi/10.1136/gut.39.5.690>
272. Mendoza JL, Abreu MT. Biological markers in inflammatory bowel disease: Practical consideration for clinicians. *Gastroentérologie Clin Biol [Internet].* 2009;33:S158–73. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0399832009731513>
273. Tsoliakidou G, Koutroubakis IE, Tzardi M, Kouroumalis EA. Increased expression of VEGF and CD146 in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis.* 2008;40:673–9.
274. Billioud V, Gibot S, Massin F, Oussalah A, Chevaux JB, Williet N, et al. Plasma soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in Crohn's disease. *Dig Liver Dis.* 2012;44:466–70.
275. Archanioti P, Gazouli M, Theodoropoulos G, Vaiopoulou A, Nikiteas N. Micro-RNAs as regulators and possible diagnostic bio-markers in inflammatory bowel disease. *J Crohn's Colitis.* 2011. p. 520–4.
276. Cougard PA, Desjeux A, Vitton V, Baumstarck-Barrau K, Lesavre N, Grimaud JC. The usefulness of factor XIII levels in Crohn's disease. *J Crohn's Colitis.* 2012;6:660–4.

277. Iskandar HN, Ciorba MA. Biomarkers in inflammatory bowel disease: current practices and recent advances. *Transl Res [Internet]*. 2012;159:313–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424434> %Cn<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3308116/>
278. Cakal B, Akoz AG, Ustundag Y, Yalinkilic M, Ulker A, Ankarali H. Red cell distribution width for assessment of activity of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2009;54:842–7.
279. Satsangi J. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut [Internet]*. 2006;55:749–53. Available from: <http://gut.bmjjournals.org/cgi/doi/10.1136/gut.2005.082909>
280. Lippi G, Targher G, Montagnana M, Salvagno GL, Zoppini G, Guidi GC. Relation between red blood cell distribution width and inflammatory biomarkers in a large cohort of unselected outpatients. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133:628–32.
281. Papadaki HA, Kritikos HD, Valatas V, Boumpas DT, Eliopoulos GD. Anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis is associated with increased apoptosis of bone marrow erythroid cells: improvement following anti-tumor necrosis factor-alpha antibody therapy. *Blood [Internet]*. 2002;100:474–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12091338>
282. Förhész Z, Gombos T, Borgulya G, Pozsonyi Z, Prohászka Z, Jánoskuti L. Red cell distribution width in heart failure: Prediction of clinical events and relationship with markers of ineffective erythropoiesis, inflammation, renal function, and nutritional state. *Am Heart J*. 2009;158:659–66.
283. Colombel J, Ferrari N, Debuysere H, Marteau P, Gendre J, Bonaz B, et al. Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology*. 2000;118:1025–30.
284. Hansen RA, Gartlehner G, Powell GE, Sandler RS. Serious Adverse Events With Infliximab: Analysis of Spontaneously Reported Adverse Events. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5.

285. Zhang B-B, Liu X-Z, Sun J, Yin Y-V, Sun Q-Q. Association between TNF α gene polymorphisms and the risk of duodenal ulcer: a meta-analysis. PLoS One. 2013;8:e57167.
286. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. Cell. 2001. p. 487–501.
287. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. J Pathol. 2008. p. 149–60.
288. Matsukura H, Ikeda S, Yoshimura N, Takazoe M, Muramatsu M. Genetic polymorphisms of tumour necrosis factor receptor superfamily 1A and 1B affect responses to infliximab in Japanese patients with Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther. 2008;27:765–70.
289. Mascheretti S, Hampe J, Kühbacher T, Herfarth H, Krawczak M, Fölsch U, et al. Pharmacogenetic investigation of the TNF/TNF-receptor system in patients with chronic active Crohn's disease treated with infliximab. Pharmacogenomics J. 2002;2:127–36.
290. Louis E, Vermeire S, Rutgeerts P, De Vos M, Van Gossum A, Pescatore P, et al. A positive response to infliximab in Crohn disease: association with a higher systemic inflammation before treatment but not with -308 TNF gene polymorphism. Scand J Gastroenterol. 2002;37:818–24.
291. Fowler E V., Eri R, Hume G, Johnstone S, Pandeya N, Lincoln D, et al. TNF α and IL10 SNPs act together to predict disease behaviour in Crohn's disease. J Med Genet. 2005;42:523–8.
292. Ferguson LR, Huebner C, Petermann I, Gearry RB, Barclay ML, Demmers P, et al. Single nucleotide polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene affects inflammatory bowel diseases risk. World J Gastroenterol [Internet]. 2008;14:4652–61. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2738789&tool=pmcentrez&render_type=abstract
293. Ahirwar DK, Kesarwani P, Singh R, Ghoshal UC, Mittal RD. Role of tumor necrosis factor-alpha (C-863A) polymorphism in pathogenesis of inflammatory bowel disease in Northern India. J Gastrointest Cancer. 2012;43:196–204.

294. Ng SC, Tsoi KK, Kamm MA, Xia B, Wu J, Chan FK, et al. Genetics of inflammatory bowel disease in Asia: systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2012;18:1164–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21887729>
295. Cao Q, Zhu Q, Wu ML, Hu WL, Gao M, Si JM. Genetic susceptibility to ulcerative colitis in the Chinese Han ethnic population: Association with TNF polymorphisms. *Chin Med J (Engl)*. 2006;119:1198–203.
296. 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. *J Crohn's Colitis*. 2017;11:649–70.
297. Popa O-M, Bojinca M, Bojinca V, Ciofu C, Bara C, Popa LO. INTRODUCTION TO SNP GENOTYPING BY REAL-TIME PCR. *Trav du Muséum Natl d'Histoire Nat «Grigore Antipa»*. 2009;LII:515–22.
298. Attia J, Ioannidis J, Thakkinstian A, McEvoy M, Scott R, Minelli C, et al. How to use an article about genetic association: A: Background concepts. *JAMA*. 2009;301:74–81.
299. Ng SC, Tsoi KKF, Kamm MA, Xia B, Wu J, Chan FKL, et al. Genetics of inflammatory bowel disease in Asia: Systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;
300. Fan W, Maoqing W, Wangyang C, Fulan H, Dandan L, Jiaojiao R, et al. Relationship between the polymorphism of tumor necrosis factor- α -308 G>A and susceptibility to inflammatory bowel diseases and colorectal cancer: A meta-analysis. *Eur J Hum Genet*. 2011;
301. Louis E, Peeters M, Franchimont D, Al. E. Tumor necrosis factor (TNF) gene polymorphism in Crohn's disease (CD): influence on disease behavior? *Clin Exp Immunol*. 2000;119:64–8.
302. Louis E, Vermeire S, Rutgeerts P, Al. E. A positive response to infliximab in Crohn disease: association with a higher systemic inflammation before treatment but not with -308 TNF gene polymorphism. *Scand J Gastroenterol*. 2002;37:818–24.
303. Kim T, Kim B, Shin H, Al. E. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene

polymorphisms in Korean patients with inflammatory bowel disease. *Korean J Gastroenterol.* 2003;42:377–86.

304. Wilson a G, Symons J a, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:3195–9.

305. Rioux JD, Goyette P, Vyse TJ, Hammarstrom L, Fernando MMA, Green T, et al. Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* 2009;106:18680–5. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0909307106>

306. Cantor MJ, Nickerson P, Bernstein CN. The role of cytokine gene polymorphisms in determining disease susceptibility and phenotype in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2005;

307. Hradsky O, Lenicek M, Dusatkova P, Bronsky J, Nevoral J, Valtrova V, et al. Variants of CARD15, TNFA and PTPN22 and susceptibility to Crohn's disease in the Czech population: High frequency of the CARD15 1007fs. *Tissue Antigens.* 2008;

308. Sashio H, Tamura K, Ito R, Yamamoto Y, Bamba H, Kosaka T, et al. Polymorphisms of the TNF gene and the TNF receptor superfamily member 1B gene are associated with susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease, respectively. *Immunogenetics.* 2002;

309. Gonzalez S, Rodrigo L, Martinez-Borra J, Al. E. TNF-alpha -308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF-alpha production and inflammatory activity in Crohn's patients with fistulizing disease. *Am J Gastroenterol.* 2003;98:1101–6.

310. López-Hernández R, Valdés M, Campillo J a, Martínez-Garcia P, Salama H, Salgado G, et al. Genetic polymorphisms of tumour necrosis factor alpha (TNF- α) promoter gene and response to TNF- α inhibitors in Spanish patients with inflammatory bowel disease. *Int J Immunogenet [Internet].* 2013;63–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23590430>

311. Gwan GS, Seo YH, Choi SJ, Lee HY. Association between TNF- α (-308 A/G, -238 A/G,

- 857 C/T) polymorphisms and responsiveness to TNF- α blockers in spondyloarthropathy, psoriasis and Crohn's disease: a meta-analysis. *Pharmacogenomics J.*
312. Zipperlen K, Peddle L, Melay B, Hefferton D, Rahman P. Association of TNF- α polymorphisms in Crohn disease. *Hum Immunol.* 2005;
313. Sanchez R, Levy E, Costea F, Sinnett D. IL-10 and TNF- α promoter haplotypes are associated with childhood Crohn's disease location. *World J Gastroenterol.* 2009;
314. NADERI N, FARNOOD A, DADAEI T, HABIBI M, BALAII H, FIROUZI F, et al. Association of Tumor Necrosis Factor Alpha Gene Polymorphisms with Inflammatory Bowel Disease in Iran. *Iran J Public Health.* 2014;43:630–6.
315. Dignass A, Eliakim R, Magro F, Maaser C, Chowers Y, Geboes K, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis Part 1: Definitions and diagnosis. *J Crohn's Colitis.* 2012. p. 965–90.
316. De Lange KM, Moutsianas L, Lee JC, Lamb CA, Luo Y, Kennedy NA, et al. Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease. *Nat Genet.* 2017;49:256–61.
317. Liu T-C, Stappenbeck TS. Genetics and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis [Internet].* 2016;11:127–48. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-012615-044152>
318. Molodecky NA, Kaplan GG. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y) [Internet].* 2010;6:339–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20567592%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2886488>
319. Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, Lau KF, Bridger S, Macpherson AJ, et al. A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. *Am J Hum Genet [Internet].* 1999;64:808–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1377799/?tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

320. Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Hedderich J, May S, Lu T, et al. Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis. *Nat Genet*. 2008;40:713–5.
321. Franke A, McGovern DPB, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet*. 2010;42:1118–25.
322. Stoll M, Corneliusen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, et al. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet*. 2004;36:476–80.
323. Cader MZ, Kaser A. Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. *Gut* [Internet]. 2013;62:1653–64. Available from: <http://gut.bmjjournals.org/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2012-303955>
324. Wu F, Dassopoulos T, Cope L, Maitra A, Brant SR, Harris ML, et al. Genome-wide gene expression differences in Crohn's disease and ulcerative colitis from endoscopic pinch biopsies: Insights into distinctive pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:807–21.
325. Cardinale CJ, Wei Z, Li J, Zhu J, Gu M, Baldassano RN, et al. Transcriptome Profiling of Human Ulcerative Colitis Mucosa Reveals Altered Expression of Pathways Enriched in Genetic Susceptibility Loci. Taylor CT, editor. PLoS One. Public Library of Science; 2014;9:e96153.
326. Gologan S, Iacob R, Iancu D, Iacob S, Cotruta B, Vadan R, et al. Inflammatory gene expression profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis: A comparative analysis using a reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification protocol. *J Crohn's Colitis*. 2013;7:622–30.
327. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory Bowel Disease. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2010;28:573–621. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101225> <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-immunol-030409-101225>

328. Kaser A, Blumberg RS. Endoplasmic reticulum stress and intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 2010; p. 11–6.
329. Heazlewood CK, Cook MC, Eri R, Price GR, Tauro SB, Taupin D, et al. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med.* 2008;5:0440–60.
330. Jass JR, Walsh MD. Altered mucin expression in the gastrointestinal tract: a review. *J Cell Mol Med [Internet].* 2001;5:327–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12067494>
331. Van der Sluis M, De Koning BAE, De Bruijn ACJM, Velcich A, Meijerink JPP, Van Goudoever JB, et al. Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection. *Gastroenterology.* 2006;131:117–29.
332. Cheon JH. Genetics of inflammatory bowel diseases: A comparison between Western and Eastern perspectives. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013;28:220–6.
333. Hindryckx P, Baert F, Hart A, Armuzzi A, Panès J, Peyrin-Biroulet L. Clinical trials in luminal Crohn's disease: A historical perspective. *J Crohn's Colitis.* 2014. p. 1339–50.
334. Hindryckx P, Jairath V, D'Haens G. Acute severe ulcerative colitis: from pathophysiology to clinical management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* Nature Publishing Group; 2016;13:654–64.
335. Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Beyls J, Kerremans R, Hiele M. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology [Internet].* 1990;99:956–63. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0016508590906136>
336. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, et al. Infliximab for Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N Engl J Med [Internet].* 2005;353:2462–76. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa050516>
337. Marchal-Bressenot A, Scherl A, Salleron J, Peyrin-Biroulet L. A practical guide to assess the Nancy histological index for UC. *Gut [Internet].* 2016;65:1919.2–1920. Available from: <http://gut.bmjjournals.org/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2016-312722>

338. Langner C, Magro F, Driessen A, Ensari A, Mantzaris GJ, Villanacci V, et al. The histopathological approach to inflammatory bowel disease: A practice guide. *Virchows Arch.* 2014; p. 511–27.
339. Zimmerman NP, Vongsa RA, Wendt MK, Dwinell MB. Chemokines and chemokine receptors in mucosal homeostasis at the intestinal epithelial barrier in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2008; p. 1000–11.
340. Lawrence IC, Fiocchi C, Chakravarti S. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum Mol Genet.* 2001;10:445–56.
341. Dieckgraefe BK, Stenson WF, Korzenik JR, Swanson PE, Harrington CA. Analysis of mucosal gene expression in inflammatory bowel disease by parallel oligonucleotide arrays. *Physiol Genomics* [Internet]. 2000;4:1–11. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11074008&retmod=e=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/1155AAEC-4999-4B07-94DA-53CD16939619>
342. Van Beelen Granlund A, Østvik AE, Brenna Ø, Torp SH, Gustafsson BI, Sandvik AK. REG gene expression in inflamed and healthy colon mucosa explored by in situ hybridisation. *Cell Tissue Res.* 2013;352:639–46.
343. Sim WH, Wagner J, Cameron DJ, Catto-Smith AG, Bishop RF, Kirkwood CD. Expression profile of genes involved in pathogenesis of pediatric Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2012;27:1083–93. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1746.2011.06973.x>
344. Holgersen K, Kutlu B, Fox B, Serikawa K, Lord J, Hansen AK, et al. High-resolution gene expression profiling using RNA sequencing in patients with inflammatory bowel disease and in mouse models of colitis. *J Crohn's Colitis.* 2015;9:492–506.
345. Rath T, Roderfeld M, Graf J, Wagner S, Vehr AK, Dietrich C, et al. Enhanced expression of MMP-7 and MMP-13 in inflammatory bowel disease: A precancerous potential? *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12:1025–35.

346. de Bruyn M, Vandooren J, Ugarte-Berzal E, Arijs I, Vermeire S, Opdenakker G. The molecular biology of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in inflammatory bowel diseases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2016; p. 295–358.
347. O'Sullivan S, Wang J, Pigott MT, Docherty N, Boyle N, Lis SK, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 by a barbiturate-nitrate hybrid ameliorates dextran sulphate sodium-induced colitis: effect on inflammation-related genes. *Br J Pharmacol*. 2017;174:512–24.
348. Trivedi PJ, Bruns T, Ward S, Mai M, Schmidt C, Hirschfield GM, et al. Intestinal CCL25 expression is increased in colitis and correlates with inflammatory activity. *J Autoimmun*. 2016;68:98–104.
349. Yao JY, Lu Y, Zhi M, Li CJ, Hu PJ, Gao X. Inhibition of the interleukin-23/interleukin-17 pathway by anti-interleukin-23p19 monoclonal antibody attenuates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced Crohn's disease in rats. *Mol Med Rep*. 2014;
350. Muthas D, Reznichenko A, Balandran CA, Böttcher G, Clausen, Ib Groth Kärrman Mårdh, Carina Ottosson T, Uddin M, et al. Neutrophils in Ulcerative Colitis: A review of selected biomarkers and their potential therapeutic implications. *Scand J Gastroenterol*. 2017;52:125–35.
351. Coretti L, Natale A, Cuomo M, Florio E, Keller S, Lembo F, et al. The Interplay between Defensins and Microbiota in Crohn's Disease. *Mediators Inflamm*. 2017.
352. Williams A, Korolkova O, Sakwe A, Geiger T, James S, Muldoon R, et al. Human alpha defensin 5 is a candidate biomarker to delineate inflammatory bowel disease. *PLoS One*. 2017;12:e0179710.

Anexe