

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

”CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

GASTROENTEROLOGIE

*Noi markeri biologici, histologici și moleculari de activitate in bolile
inflamatorii intestinale*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. DICULESCU MIHAI MIRCEA

Student-doctorand:

ȚIERANU CRISTIAN GEORGE

2018

I. Introducere generală

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 în cazul leziunilor endoscopice severe care necesită întreruperea procedurii endoscopice din cauza riscului crescut de perforație iatrogenă. Dată 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 repetate 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 contextual unui MCV redus sugerează prezența unei talasemii. [3] Există date în literatură care au demonstrat utilitatea RDW ca factor de prognostic pentru morbiditatea și mortalitatea de cauza cardiovasculară în insuficiența cardiac, 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 boală 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 diferitele 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 diferitelor 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- α 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 variabilitate în răspunsul pacienților la aceste tratamente. [10]

Aceste 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 în organism) 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 pacienți cu IBD și 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 boală 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.

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 bioptice prelevate în timpul colonoscopiei de la 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 bioptice, 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]

II. 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 homeostazia fierului în organism, contribuind la apariția unei false feriprivii ce determină dezvoltarea anizocitozei. Obiectivul acestei cercetări a fost de a analiza corelațiile RDW cu diferitele 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 alelelor 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 întreruperea, 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 lucrare 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”.

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

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 prezentau anomalii biologice – fara 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 parametri 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, stenoizantă și fistulizantă, și de extensia lezională în boală cu afectare ileală, colonică și ileo-colonică. 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-colonică, iar B1=pattern inflamator, B2=pattern stenoizant și B3=pattern fistulizant[25]

Rezultate și 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 stenoizantă 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 suficient 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. [5–8,26]

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 ca lotul pacienților cu CD a fost de doar 22 subiecți. [26]

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 eritropoietină 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 eritropoietic. [21][27-31]

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. Categorie este nevoie de studii mai ample, multicentrice pentru a analiza și confirma datele obținute în studiul nostru.

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

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 Spitalul 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. 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). [23,25]

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

Pentru fiecare pacient s-a precizat vârsta, sexul, tipul de boală, vârsta 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.[23,25]

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.

Probele biologice disponibile au fost prelucrate cu kit-uri predefinite disponibile comercial, urmărind recomandările producătorilor.

Rezultate și discuții

TNF- α reprezintă o citokină cheie în procesul inflamator implicat în bolile inflamatorii intestinale, fiind implicată, așa cum am discutat mai sus, atât în manifestările locale, de organ, cât și în cele sistemice, 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. [34,35] 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 sistemice crescute la acești pacienți, fapt concordant

în final cu observațiile de mai sus legate de manifestări fenotipice mai severe la purtătorii alelei minore. [36-38]

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 serie de boli autoimune cum ar fi astm, psoriazis și artrită reumatoidă.[39-41] 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 cauziene din Australia, Cehia și Canada, unde nu s-au găsit asocieri semnificative pentru alela minoră a acestui SNP cu susceptibilitatea de a dezvolta boala. [42,43] 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. [43,44] Datele prezentului studiu confirmă absența asocierii dintre alela minoră a acestui SNP și susceptibilitatea de boală observată la pacienții cauzieni.

O altă observație interesantă din literatură subliniază asocierea genotipurilor ce conțin alela minoră a SNP -308G/A cu gradul crescut al inflamației sistemice 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. [40,41,43] Mai mult, Kim și colaboratorii au observat o frecvență alelică mai mare a alelei minore în cazul pacienților cu anticorpi anticitoplasmă neutrofilică, sugerând asocierea acestui SNP cu comportamentul evolutiv al bolii Crohn. [41] 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 anti*TNF- 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. [40,45] 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 metanalize 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 boală, în mod independent de fondul genetic. [46]

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. [47-49] Rezultatele noastre confirmă aceste rezultate, atingând totodată și semnificația statistică pentru această asocieră, 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.

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

Selecția 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.

Selecția pacienților s-a realizat pe baza diagnosticului de boală inflamatorie intestinală stabilit conform ghidului European ECCO de diagnostic și tratament al bolilor inflamatorii intestinale. [32-33] 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;
- Vârsta;
- 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.

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. [32-33]

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 vârsta 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 stenoizant, B3=pattern fistulizant), pentru boala Crohn.[32]

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 evaluează prezența/absența ulcerărilor/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, extensia leziunilor endoscopice 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 neoterminal. O valoare I0 sau I1 se consideră fără recurență postoperatorie.[32,33]

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/ulcerațiilor 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. [50-53]

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 hematoxină-eozină.

După obținerea secțiunilor și etalarea pe lame, s-a efectuat colorația histopatologică. Un medic anatomopatolog specialist a evaluat lamele și a confirmat diagnosticul de boală inflamatorie intestinală conform criteriilor din literatura de specialitate.[51] Pentru fragmentele congelate de țesut neinflamat și normal s-a efectuat câte o secțiune la criotom pentru examenul histopatologic. Secțiunile au fost colorate hematoxină-eozină și au fost verificate de către medicul anatomopatolog.

Fragmentele prevăzute pentru extracție de ARN au fost conservate într-un tampon special de inactivare a ARN-urilor reprezentat de *RNAlater* 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.

Extracția ARN, controlul calității acestuia și cantității obținute au fost efectuate cu kit-uri predefinite disponibile comercial, urmărind recomandările producătorului.

Rezultate și discuții

Acest studiu este primul din România 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 încercarea 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 trenduri generale de expresie genică. Rezultatele noastre sunt concordante cu datele din literatură care au descris patternuri de supraexpresie sugestive pentru inflamație cronică[53,54]

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 inflammat 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. [55-57]

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 constant prezentă indiferent de comparațiile efectuate, prezența supraexpresiei inclusiv în remisiune sugerând faptul că anumite mecanisme moleculare ale bolii rămân active. [55]

Matrix metallo-proteinazele (MMP) și inhibitorii acestora tisulari (TIMP) sunt implicați în patogeniza 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. [58-60]

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 boală Crohn stenoizantă și nivelul acestui receptor de citokine-chemokine s-a corelat cu scorul endoscopic de severitate. [59]. Datele noastre au arătat o expresie diferită între biopsiile prelevate din țesut inflammat și țesut neinflammat la pacienții cu boală Crohn, dar nu și la cei cu colită ulcerativă, și expresie similară între pacienții cu boală Crohn în remisiune endoscopică și cei cu activitate endoscopică, sugerând persistența unui proces de recrutare limfocitară chiar și în stadiul de remisiune endoscopică.[60]

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 inflammat și cel neinflammat, 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 artrită reumatoidă. Interesantă este observația ca 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 ca *CXCR1* ar putea fi un marker de activitate endoscopică[61]

Defensinele reprezintă niște peptide antimicrobiene ce fac parte din sistemul imun înăscut, 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 Lawrance et. Al., observând creșteri în special la pacienții cu boală Crohn, rezultat obținut și în prezentul studiu. [62,63]

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. [51]

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 detecția 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.

VI. 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 boală 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 funcționale 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 susceptibilitatea de a dezvolta boală inflamatorie intestinală în populația din România.
2. Alela minoră a SNP -238G/A se asociază cu riscul crescut de a dezvolta boală 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 II, 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><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27417569>
%5C<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><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/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. Satsangi J. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* [Internet]. 2006;55:749–53. Available from: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2005.082909>
26. 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.
27. 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.
28. 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>

29. FörhécZ Z, Gombos T, Borgulya G, Pozsonyi Z, Prohászka Z, Jánoskúti 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.

30. 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.

31. Hansen RA, Gartlehner G, Powell GE, Sandler RS. Serious Adverse Events With Infliximab: Analysis of Spontaneously Reported Adverse Events. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5.

32. 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>

33. 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.

34. 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;

35. 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;

36. 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.

37. 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.
38. 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.
39. 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&rendertype=abstract>
40. 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.
41. 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>
42. 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;
43. 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;
44. 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;
45. 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>

46. 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*.

47. Zipperlen K, Peddle L, Melay B, Hefferton D, Rahman P. Association of TNF- α polymorphisms in Crohn disease. *Hum Immunol*. 2005;

48. Sanchez R, Levy E, Costea F, Sinnott D. IL-10 and TNF- α promoter haplotypes are associated with childhood Crohn's disease location. *World J Gastroenterol*. 2009;

49. NADERI N, FARNOOD A, DADAEI T, HABIBI M, BALAI 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.

50. 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.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2016-312722>

51. 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.

52. 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.

53. Lawrance 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.

54. 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>

55. 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.
56. 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>
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. Muthas D, Reznichenko A, Balendran CA, Böttcher G, Clausen, Ib Groth Kärman 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.
62. 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.

63. 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.